

Tesis de Posgrado

Contaminantes metálicos en el Río de la Plata : monitoreo del sistema acuático y estudio de algunos efectos tóxicos en moluscos bivalvos por medio de bioensayos

Verrengia Guerrero, Noemí Rosario

1995

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

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

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Verrengia Guerrero, Noemí Rosario. (1995). Contaminantes metálicos en el Río de la Plata : monitoreo del sistema acuático y estudio de algunos efectos tóxicos en moluscos bivalvos por medio de bioensayos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2721_VerrengiaGuerrero.pdf

Cita tipo Chicago:

Verrengia Guerrero, Noemí Rosario. "Contaminantes metálicos en el Río de la Plata : monitoreo del sistema acuático y estudio de algunos efectos tóxicos en moluscos bivalvos por medio de bioensayos". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1995. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2721_VerrengiaGuerrero.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

Contaminantes Metálicos en el Río de la Plata:
Monitoreo del Sistema Acuático y Estudio de
Algunos Efectos Tóxicos en Moluscos Bivalvos
por Medio de Bioensayos

Noemí R. Verrengia Guerrero

1995

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Contaminantes Metálicos en el Río de La Plata:
Monitoreo del Sistema Acuático y Estudio de Algunos
Efectos Tóxicos en Moluscos Bivalvos por Medio de Bioensayos**

Noemí R. Verrengia Guerrero

Director de Tesis: Dra. Eva M. Kesten
Consejero: Dr. Edgardo J. Wood

Toxicología y Química Legal
Departamento Química Biológica - FCEN - UBA

Tesis presentada para optar al Título de
Doctora de la Universidad de Buenos Aires

1995

Tomo I
Tesis
No.
42

A mis Padres

A la memoria de mis abuelos

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, deseo expresar mi profundo reconocimiento y gratitud a mis maestros, profesores y autoridades del Colegio San Fernando y del Instituto Sagrado Corazón de Jesús, sitios ambos en Hurlingham, Prov. Bs. As. De ellos aprendí mucho más que la lección del día. Me enseñaron que el camino del éxito se recorre invariablemente con honradez, empeño y pasión, confiando en que Dios nos ilumine para superar los obstáculos y las dificultades. Por ello, considero que en la memoria del Padre Humberto Cherasco, fundador de ambas instituciones, puedo sintetizar la dedicación y el esfuerzo de todos aquellos que ocuparon el frente de las aulas.

Mi agradecimiento a la Dra. Ana M. Pinet, quien fue la primera persona en abrirme las puertas del Área de Toxicología y Química Legal.

Mi reconocimiento a la Dra. Eva M. Kesten, por haber aceptado dirigir el presente trabajo, por escuchar y acceder con paciencia a mis propuestas, brindándome todo su apoyo y experiencia.

Al Dr. Edgardo J. Wood, por sus frecuentes consejos y sugerencias, y por el estímulo que recibí de él, especialmente en los momentos difíciles.

A los Dres. Daniel E. Nahabedian y Humberto J.A. Moretto. Ellos participaron en la caracterización de los moluscos y me facilitaron los organismos gastrópodos empleados en los bioensayos. El Dr. Nahabedian accedió siempre con gran disposición e idoneidad a mis permanentes consultas, asesorándome en los aspectos estrictamente biológicos.

Al Dr. Víctor J. Moreno y a la Dra. Julia Aizpun, por haberme permitido participar en importantes cursos de postgrado, orientados específicamente a la contaminación ambiental, los cuales fueron decisivos para mi formación teórica.

A la Dra. Clara R. Krisman, quien me facilitó la técnica para las determinaciones de glucógeno.

A la Dra. Ana Haedo y a mi tío, Ing. Pascual J. Verrengia, por la colaboración que me brindaron en los cálculos y métodos estadísticos.

A quienes fueron mis Profesores y Docentes en el Departamento de Química Biológica, FCEN, UBA, tanto en las materias básicas

como en las de la orientación, por haber sabido despertar y cultivar en mí el interés por la ciencia. Quisiera también hacer extensivo mi reconocimiento a todos aquellos Profesores, que sin llegar a conocerme como alumna, me brindaron una maravillosa cordialidad, alentando mis inquietudes mediante consejos oportunos o palabras de estímulo.

A Carmen Aldonatti, Eduardo Cánepa, Adriana Cochón, Eduardo Cortón, Antonio DeBonis, Marta Masceti y Guillermo Noriega, por su amistad, apoyo y ayuda.

A mis conmpañeras de trabajo en el Área de Toxicología y Química Legal: María L. Oneto, Marita Montalto, Estela Molinari y Silvana Basack, por el ambiente de camaradería que me ofrecieron. Mi especial reconocimiento a la Sra. Celeste Almendra, por el cuidado y la dedicación en la preparación del material de laboratorio.

Finalmente, agradezco profundamente a mis padres el apoyo que me brindaron en todo momento, tanto sea para salir a recolectar muestras, escribir a máquina, clarificar mi redacción y tantas cosas más. Por la paciencia, el aliento y los consejos recibidos, sin los cuales no hubiese sido posible concretar este trabajo.

"...Los ríos son nuestros hermanos, ellos calman nuestra sed. Los ríos llevan nuestras canoas y alimentan a nuestros hijos.

Sabemos que el hombre blanco no comprende nuestra manera de ser. Le da lo mismo un pedazo de tierra que el otro, porque él es un extraño que llega en la noche a sacar de la tierra lo que necesita. La tierra no es su hermano sino su enemigo.

Trata a su madre la tierra, y a su hermano el cielo, como si fuesen cosas que se pueden comprar, saquear y vender, como si fuesen corderos y cuentas de vidrio. Su insaciable apetito devorará la tierra y dejará tras sí sólo un desierto.

El ruido de la ciudad parece insultar los oídos. ¿Y qué clase de vida es cuando el hombre no es capaz de escuchar el solitario grito de la garza o la discusión nocturna de las ranas alrededor de la laguna?

El aire es algo precioso para el hombre de piel roja porque todas las cosas comparten el mismo aliento: el animal, el árbol y el hombre.

Esto lo sabemos: la tierra no pertenece al hombre, sino que el hombre pertenece a la tierra. El hombre no ha tejido la red de la vida; es sólo una hebra de ella. Todo lo que haga a la red, se lo hará a sí mismo. Lo que ocurre a la tierra, ocurrirá a los hijos de la tierra. Lo sabemos. Todas las cosas están relacionadas como la sangre que une a una familia..."

Fragmentos de la carta enviada por el jefe de la tribu Suwamish al Presidente de los Estados Unidos de América, Franklin Pierce, en 1855.

Í N D I C E G E N E R A L

INTRODUCCIÓN

TOMO I

Página

	Prólogo	1
I.	Elementos Metálicos: Su Importancia Ambiental y Biológica	5
II.	Sistemas Acuáticos	12
	* El Sistema Acuático del Río de La Plata	15
III.	Ecotoxicología	21
III.1.	Etapas de la Ecotoxicología	23
III.2.	Fuentes de Contaminación	27
III.3.	Procesos de Distribución	28
III.3.1.	Distribución de Contaminantes en Sistemas Acuáticos	29
	* Especiación y Biodisponibilidad de Elementos Metálicos	29
	* Principales Ligandos Sustancias húmicas	32
	* Subcompartimientos del Sistema Acuático:	
	- Fase acuosa soluble	36
	- Material coloidal	39
	- Sedimentos del lecho y material en suspensión	40
	- Superficies biológicas	44
III.4.	Procesos de Transformación	46
	* Persistencia de Algunos Contaminantes	49
III.5.	Procesos de Transporte	51
III.6.	Efectos sobre los Organismos	54
	* Bioacumulación, Bioconcentración y Biomagnificación	55

	- Parámetros de bioacumulación y de bioconcentración	57
	* Respuestas de los Organismos	58
	* Resistencia y Tolerancia	61
	* Origen de las Respuestas y Propagación de los Efectos sobre los Ecosistemas	63
III.7.	Herramientas de la Ecotoxicología	67
III.7.1.	Monitoreo Ambiental	67
III.7.2.	Monitoreo Biológico	69
	* Evaluación Biológica	70
	* Bioensayos	75
	- Bioensayos Predictivos	76
	Microcosmos, Mesocosmos y Limnocorrales	79
	- Bioensayos de Evaluación o Monitoreo	80
IV.	Algunas Características de los Organismos Acuáticos Seleccionados para este Trabajo	82
	* Moluscos Gastrópodos	83
	* Moluscos Bivalvos o Pelecípodos	85
	- Las Branquias	88
	- Reservas Energéticas: Los hidratos de carbono y su metabolismo	89
	* Organismos Específicos Seleccionados	93
V.	Efectos de los Elementos Metálicos sobre Organismos Acuáticos	95
	* Ingreso de los Elementos	95
	* Mecanismos de Ingreso	97
	* Vías de Distribución	101
	* Distribución en Tejidos	103
	* Distribución a Nivel Intracelular	106
	- Grupos tioles no proteicos: Glutatió	106
	- Grupos tioles proteicos: Metalotio- neínas	109
	- Compartimentalización en el sistema lisosomal	114
	- Acumulación en gránulos	115
	- Relevancia de los distintos procesos	118
	* Interacciones Nocivas a Nivel Subcelular	120

PARTE EXPERIMENTAL

TOMO II

Página

**CAPÍTULO I.: DETERMINACIÓN DE ELEMENTOS METÁLICOS EN
MUESTRAS DE AGUAS.**

I.1.	Introducción	127
	Fuentes de Variación	127
	Recolección de las Muestras	128
	Pretratamiento de las Muestras	131
	Tratamiento y Análisis	133
	Condiciones de Trabajo	133
	Estudios Realizados	135
I.2.	Materiales y Métodos	136
I.2.1.	Optimización de la Metodología:	
I.2.1.1.	Recolección de las Muestras	136
I.2.1.2.	Materiales, Reactivos y Condiciones de Trabajo	136
I.2.1.3.	Estudio de la Influencia de Distintos Pretratamientos	137
I.2.1.4.	Tratamiento y Análisis de las Muestras	137
I.2.1.5.	Método de Pretratamiento Adoptado para el Análisis de la Fracción Recuperable	139
I.2.1.6.	Estudio del Posible Rol Interferente del Hierro	140
I.2.1.7.	Estudio de Conservación de las Muestras	140
I.2.2.	Análisis de Elementos Metálicos en Muestras de Aguas del Río de la Plata:	
I.2.2.1.	Recolección de las Muestras	141
I.2.2.2.	Metodología de Análisis	141
I.3.	Resultados y Discusión	143
I.3.1.	Análisis de Algunos Factores que Influyen en la Etapa de Pretratamiento de las Muestras	143
I.3.2.	Método Seleccionado para el Análisis de la Fracción Recuperable	145

I.3.3.	Estudios Complementarios	
I.3.3.1.	Estudio del Posible Rol Interferente del Hierro en la Determinación de Plomo	148
I.3.3.2.	Estudio de Conservación de las Muestras	152
I.3.4.	Análisis de Elementos Metálicos en Muestras de Aguas del Río de la Plata	153

CAPÍTULO II.: DETERMINACIÓN DE ELEMENTOS METÁLICOS EN MUESTRAS DE SEDIMENTOS

II.1.	Introducción	157
	Estudios Realizados	161
II.2.	Materiales y Métodos	162
II.2.1.	Recolección de las Muestras	162
II.2.2.	Materiales, Reactivos y Condiciones de Trabajo	163
II.2.3.	Tratamiento de las Muestras	163
II.2.4.	Procesos de Digestión y Análisis	163
II.2.5.	Métodos Estadísticos	164
II.3.	Resultados y Discusión	165
II.3.1.	Estudio de la Eficiencia de Distintos Procesos de Digestión	165
II.3.2.	Niveles de Elementos Metálicos en Muestras de Sedimentos	169
II.3.2.1.	Factores de Concentración	182
II.3.2.2.	Comparación con Reportes Bibliográficos	184
II.3.3.	Estudios Complementarios	189

CAPÍTULO III.: DETERMINACIÓN DE ELEMENTOS METÁLICOS EN MUESTRAS DE TEJIDOS BIOLÓGICOS

III.1.	Introducción	200
	Estudios Realizados	204
III.2.	Materiales y Métodos	205
III.2.1.	Recolección de las Muestras	205
III.2.2.	Tratamiento y Análisis de las Muestras de Tejidos Biológicos	205

- III.2.3. Análisis de las Muestras de Sedimentos
- III.2.4. Tratamiento y Análisis de las Valvas de Moluscos Bivalvos
- III.2.5. Materiales, Reactivos y Condiciones de Trabajo
- III.2.6. Cálculos y Métodos Estadísticos

- III.3. Resultados y Discusión
- III.3.1. Niveles de Elementos Metálicos en Hígado de Peces
- III.3.2. Niveles de Elementos Metálicos en Hepato páncreas de Gastrópodos
- III.3.3. Niveles de Elementos Metálicos en Moluscos Bivalvos
 - III.3.3.1. Influencia del Ambiente Físico y Factores de Bioacumulación
 - III.3.3.2. Estudios Complementarios
 - III.3.3.3. Comparación con Reportes Bibliográficos

CAPÍTULO IV.: BIOENSAYOS

- IV.1. **Introducción**
 - Tipos de Bioensayos
 - Selección de los Organismos
 - Recolección y Transporte de Moluscos Bivalvos
 - Aclimatación de los Organismos
 - Tipos de Agua a Emplear en los Bioensayos
 - Estudios Realizados

- IV.2. **Materiales y Métodos**
 - IV.2.1. Organismos Seleccionados
 - IV.2.2. Medio Acuoso
 - IV.2.3. Bioensayos
 - IV.2.4. Estudios de Letalidad
 - IV.2.5. Estudios de Bioacumulación
 - IV.2.6. Determinaciones de Glucógeno
 - IV.2.7. Determinaciones de Grupos Tioles

IV.2.8.	Cálculos y Métodos Estadísticos	254
IV.3.	Resultados y Discusión	256
IV.3.1.	Bioensayos Agudos con Algunos Invertebra- dos Acuáticos:	
IV.3.1.1.	Estudios de Letalidad	256
IV.3.1.2.	Estudios de Bioacumulación	261
IV.3.2.	Bioensayos Agudos con Moluscos Bivalvos:	
IV.3.2.1.	Influencia de los Ácidos Húmicos en la Toxicidad de Cadmio o Plomo	266
IV.3.2.2.	Efectos del Cadmio o del Plomo sobre los Niveles de Glucógeno	273
IV.3.2.3.	Efectos del Cadmio o del Plomo sobre los Niveles de Grupos Tioles	278
IV.3.2.4.	Discusión de los Resultados	283
	RESUMEN Y CONCLUSIONES	291
	BIBLIOGRAFÍA	301

ABREVIATURAS UTILIZADAS

AAS	Espectrofotometría de absorción atómica
Ac H	Ácidos húmicos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	5'-difosfato de adenosina
AMP	5'-monofosfato de adenosina
APDC	Aminopirrolidinditiocarbamato
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	5'-trifosfato de adenosina
ATP asa	Adenosina trifosfatasa
BPC	Bifenilos policlorados
CE ₅₀	Concentración efectiva 50
CL ₅₀	Concentración letal 50
Cys	Cisteína
DDC	Dietilditiocarbamato
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
DPTA	Ácido diaminopropanoltetraacético
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico)
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FBA	Factor de bioacumulación
FBC	Factor de bioconcentración
FC	Factor de concentración
FCEN	Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
GSH	Glutación, forma reducida
GSSG	Glutación disulfuro u oxidado
HAP	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
Inv	Invierno
MIBC	Metilisobutilcetona
MT	Metalotioneína
NTA	Ácido nitriloacético
ppb	partes por billón
ppm	partes por millón
Pque Ecol	Parque Ecológico
Prim	Primavera
Pto	Puerto
SDS	Dodecil-sulfato de sodio
SH-	Grupo(s) tiol(es)
signif	significativo

TCA	Ácido tricloroacético
tej	Tejido
TGI	Tracto gastrointestinal
transf	Transformación
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
Ver	Verano

INTRODUCCION

PROLOGO

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

En la memoria se han grabado los tristes episodios de Minamata, a fines de la década del '50, con 1.200 casos de personas intoxicadas, algunos fatales, por consumir pescado contaminado con metilmercurio (Turner et al., 1980; Menzer, 1991). La explosión de la fábrica donde se producía el herbicida 2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5-T), en Seveso (Julio, 1976), que liberó tetraclorodibenzodioxinas (TCDD), una de las sustancias de mayor toxicidad (Kesten, 1990; Menzer, 1991). O el desastre de Bhopal, India (Diciembre 1984), en el cual se liberaron accidentalmente 40 toneladas de isocianato de metilo; con un saldo de cerca de 3000 muertos y otras 200000 personas afectadas (Rosencranz, 1988).

En otro orden, la lluvia ácida, como consecuencia de los altos niveles atmosféricos de óxidos de azufre y nitrógeno que, mediante una serie de reacciones químicas, se convierten en ácidos sulfúrico y nítrico, ha provocado alteraciones diversas en los distintos ecosistemas, afectando también edificios, monumentos y obras de arte, especialmente en los países más desarrollados del hemisferio norte (Mohnen, 1988; Graedel y Crutzen, 1989). El debilitamiento de la capa de ozono estratosférica, que protege a la tierra de la excesiva radiación ultravioleta, debido a la dispersión de halocarburos, especialmente CF_2Cl_2 y CFCl_3 (Graedel y Crutzen 1989). El calentamiento del planeta, por niveles excesivos de dióxido de carbono, el talado indiscriminado o la deforestación de los bosques (Goreau y de Mello, 1988; Sarokin y Schulkin, 1992a), constituyen otros ejemplos de perturbaciones al medio ambiente.

No pretendemos, por cierto, abarcar todos los casos que han conmovido, o aún conmueven, a la opinión pública. Entre 1964 y

1986, se han registrado casi 73 sucesos de importancia por año, a nivel mundial (Shaw y Stroup, 1990a). Los casos ya citados permiten comprender la magnitud de la problemática, justificando el debate. De hecho, a través de múltiples y variadas actividades, la capacidad del hombre para modificar al medio ambiente ha aumentado y aumenta con mayor celeridad que sus posibilidades para prever y prevenir los efectos adversos que traen aparejado. Tenemos que asumir que como contrapartida al incesante desarrollo industrial y tecnológico, ha surgido lo que podríamos llamar "un nuevo dominio de la ignorancia", representado por la contaminación y la degradación del medio ambiente, cuyas consecuencias aún no estamos en condiciones de evaluar completamente (Regier, 1989).

En numerosas ocasiones hemos adoptado actitudes contradictorias y avanzado en base a criterios de prueba y error. Nos alarma la gran cantidad de residuos químicos, pero, a la vez, nos resistimos a desprendernos de todo aquello que nos resulte útil y hayamos incorporado a nuestro estilo de vida. Hemos vivido arrojando una gran variedad de sustancias contaminantes al medio ambiente, sin ningún tipo de tratamiento, y, posteriormente en muchos casos, hemos aprendido también a controlar y regular dichas descargas. Solemos ser también egoístas, pensando que muchos de los daños no los sufriremos nosotros; en todo caso recaerán en otros seres vivos o en las generaciones que nos sucedan, sin percatarnos de que allí estarán nuestros hijos. En otros casos, hemos adoptado actitudes de extrema alarma con respecto al medio ambiente, mientras que la naturaleza fue capaz de desarrollar procesos de resistencia o tolerancia, a veces difíciles de interpretar.

Por otra parte, es indudable que mucho se ha avanzado en procura de proteger a los distintos ecosistemas y en prevenir los efectos adversos derivados de la contaminación. La **Ecotoxicología** ha surgido como la respuesta científica, orientada a satisfacer esas metas. Sin embargo, según Levin et al., (1989) "La ciencia puede recorrer un largo camino en procura de disminuir la ignorancia, pero aún así una cuota de incerteza permanecerá, más o menos escondida, detrás de cualquier determinación o estudio". Lo cierto es que la Ecotoxicología es aún una ciencia novel, que requiere enormemente de un aporte interdisciplinario, y está sujeta

a las presiones de diversos sectores sociales, políticos y económicos (Levin et al., 1989). Además, a nivel científico, se presentan innumerables dificultades para interpretar y comprender una problemática tan compleja. Por todo esto, la tendencia que parece prevalecer actualmente se basa en la sensata explotación de los recursos naturales, dentro de un marco que contemple equilibradamente las necesidades materiales del hombre; el bienestar de los ecosistemas, manteniendo la diversidad de especies, y eliminando o aminorando todas aquellas actividades que puedan tener efectos persistentes. Este objetivo, ampliamente difundido se lo reconoce con el nombre de **desarrollo sustentable** (Bengtsson, 1988; Rockwell y Moss, 1990; Schaeffer, 1991).

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

Paulatinamente, la situación parece estar cambiando en los países en desarrollo, ya que algunos de ellos están encarando el reconocimiento de sus problemas ambientales; impulsando el desarrollo de programas de monitoreo de diversas sustancias tóxicas, entre otros estudios científicos, e implementando normativas legales más estrictas para controlar y regular las emisiones contaminantes (Whelan, 1988; Bojórquez-Tapia, 1989).

Nuestro propio país no ha sido ajeno, ni puede serlo, al impacto de la contaminación ambiental. Basta con observar las emisiones y descargas de numerosas industrias, o recordar los frecuentes casos de mortandad de peces en varios sistemas acuáticos. No hace mucho tiempo aún (1993), el trágico episodio en el cual murieron varias personas por emanaciones tóxicas, supuestamente de gas cianhídrico, que surgieron imprevistamente de las tuberías cloacales. O la catástrofe ecológica en la que miles de aves han encontrado su muerte por la presencia de piletas de petróleo a cielo abierto, en el sur patagónico. También es cierto que, afortunadamente, desde distintos sectores públicos y privados, se ha manifestado reiteradamente la voluntad por revertir este tipo de situaciones.

Motivados por ese interés, se ha intentado efectuar un aporte, si bien modesto y en muchos aspectos preliminar, a la compleja problemática ambiental. Por ello, hemos encarado el presente estudio de algunos elementos metálicos en ciertas zonas costeras del sistema acuático del Río de la Plata. A continuación reseñaremos los principales factores que justificaron la elección de dichos metales, como sustancias químicas contaminantes, y su impacto ambiental sobre los sistemas acuáticos. Seguidamente, nos introduciremos en el campo de la Ecotoxicología, la cual nos brindó los elementos para satisfacer los objetivos más relevantes de este trabajo de tesis.

I. ELEMENTOS METÁLICOS: SU IMPORTANCIA AMBIENTAL Y BIOLÓGICA

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

Es indudable que el descubrimiento del fuego, aunado con la capacidad para extraer y fundir los metales, constituyeron dos poderosos pilares para el crecimiento y desarrollo de la humanidad. Primero, para el hombre primitivo, y así sucesivamente, hasta nuestros días. Con metales se construyeron y se construyen todavía, en muchos casos, monedas, herramientas, obras de arte, artículos de joyería, imprentas, múltiples y variados utensilios domésticos, productos medicinales, biocidas diversos, edificios, puentes, vehículos de transportes, desde rudimentarios carruajes hasta naves espaciales. La lista puede continuar hasta donde nos lleve la imaginación, o aquella magia de los antiguos alquimistas ...

Por metales se disputaron territorios y se pelearon guerras. Se trabajaron para puntas de lanzas, cañones, proyectiles y armas de fuego. Los metales representan riqueza, poder u ostentación; vida o muerte. Difícilmente otra sustancia química reúna a la vez todos estos atributos.

Ahora bien, una de las características más relevantes que presentan los elementos metálicos es que resultan "inmutables", ya que no pueden ser creados ni destruidos. Por ello, una vez que son extraídos, a partir de sus fuentes naturales, la cantidad total de elementos permanece siempre constante, aun cuando pueden sufrir cambios en cuanto a su especiación química, mediante procesos biogénicos o antropogénicos (Waldichuk, 1974; Goyer, 1991). De este modo, con el constante aumento de su extracción, para su empleo en múltiples propósitos, se incrementa la cantidad de metales disponibles en el ambiente, en forma continua. Por consiguiente, estos elementos frecuentemente están asociados con efectos tóxicos y problemas de contaminación, resultando una de las sustancias químicas de mayor interés en Ecotoxicología.

La contaminación ambiental por metales trazas no es por cierto un fenómeno reciente y reconoce tanto fuentes naturales como

antropogénicas, aunque éstas últimas superan ampliamente a las primeras (Nriagu, 1990).

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

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

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

En base a numerosos trabajos se han podido establecer algunas estimaciones, que si bien no son rigurosas, resultan altamente ilustrativas de las emisiones atmosféricas de diversos elementos. En la Tabla 1 se detallan las principales fuentes naturales y cantidades de algunos elementos a la atmósfera, según la recopilación de Nriagu y Pacyna (1988). Se transcriben los valores para aquellos elementos que estarán involucrados en el presente trabajo, excepto para el hierro, sobre el cual no figuraban datos en la citada recopilación.

La actividad volcánica representa la mayor fuente natural de cadmio, incluyendo la que se verifica en las profundidades de los océanos. Así, en suelos volcánicos se han registrado niveles de hasta 4,5 ppm del elemento, considerablemente mayores que el promedio, de 0,4 ppm, determinado para suelos no volcánicos (Menzer, 1991; WHO, 1992). Las partículas de suelos y polvos, susceptibles de dispersarse por la acción de los vientos, dan cuenta de la principal emisión natural de cobalto. En cambio, ambas fuentes

Tabla 1.: Emisiones atmosféricas de elementos metálicos a partir de fuentes naturales, a nivel mundial.

	partículas suelo arrastradas x vientos	espray marino	volcanes	incendio de bosques	fuentes biogénicas	total (a)
	(miles de toneladas por año)					
Cadmio	0,21	0,06	0,82	0,11	0,24	1,4
Cobalto	4,1	0,07	0,96	0,31	0,66	6,1
Cobre	8,0	3,6	9,4	3,8	3,3	28
Cromo	27	0,07	15	0,09	1,1	43
Níquel	11	1,3	14	2,3	0,73	29
Plomo	3,9	1,4	3,3	1,9	1,7	12
Zinc	19	0,44	9,6	7,6	8,1	45

(a) totales redondeados.

Fuente: Nriagu y Pacyna, 1988.

contribuyen en forma más pareja, a la emisión de los restantes elementos: cromo, cobre, níquel, plomo y zinc.

En la tabla 2 se transcriben las estimaciones de las emisiones atmosféricas de los elementos a partir de fuentes antropogénicas (Nriagu y Pacyna, 1988). La actividad industrial, con sus diversos procesos, contribuye en forma significativa a la emisión de los metales cadmio, cromo, cobre y zinc. Para níquel, la fuente más relevante proviene de la combustión de combustibles fósiles para generar energía. Pero el dato más sorprendente es la gran cantidad de plomo que se libera como consecuencia del empleo de naftas adicionadas con derivados alquilados del metal, utilizados como antidetonantes.

Algunos elementos, entre los que citaremos al cadmio, mercurio, níquel, oro, platino y plomo, tienen una importancia industrial o económica destacada, pero carecen de función biológica conocida y, en general, presentan alta toxicidad (Beliles, 1975).

En cambio, el rol esencial que desempeñan otros metales, como el cobalto, cobre, hierro, manganeso, molibdeno, selenio y zinc, ya sea como macronutrientes o elementos trazas, ha sido ampliamente reconocido (Beeby, 1991; Goyer, 1991). Prácticamente un tercio de las enzimas conocidas requieren de la presencia de iones metálicos para poder desempeñar correctamente sus roles fisiológicos. En algunos casos, los iones metálicos se encuentran firmemente unidos a sitios específicos de las proteínas, formando parte integral de las mismas. En otros, la unión es más lábil, y el metal se desempeña fundamentalmente como activador (Simkiss, 1979). Las metaloenzimas participan de una amplia gama de funciones vitales para la célula, como lo son el transporte de gases (casos de la hemoglobina y hemocianina); la respiración celular, a través de los citocromos, y el metabolismo energético, efectuando la transferencia de electrones (Simkiss, 1979).

Por consiguiente, los organismos debieron desarrollar, a lo largo de la evolución, mecanismos capacitados para controlar el ingreso y la regulación de esos elementos. La regulación queda garantizada, dentro de ciertos límites, mediante un balance entre los niveles de reserva y los destinados a la excreción. Algunos organismos han desarrollado sistemas efectivos que les permiten remover el exceso de metales, especialmente de los sitios más sensibles. Estos mecanismos les aseguran un mayor bienestar,

Tabla 2.: Emisiones atmosféricas de elementos metálicos a partir de fuentes antropogénicas, a nivel mundial.

	producción de energía	minería	metalurgia	procesos de manufactura comerciales (miles de toneladas por año)	usos comerciales de residuos	incineración de residuos	transporte	totales (b)
Cd	0,79		5,43	0,60		0,75		7,6
Cu	8,04	0,42	23,2	2,01		1,58		35
Cr	12,7			17,0		0,84		31
Ni	42,0	0,80	3,99	4,47		0,35		52
Pb	12,7	2,55	46,5	15,7	4,50	2,37	248	332
Zn	16,8	0,46	72,0	33,4	3,25	5,90		132

(a) incluye usos agrícolas, (b) totales redondeados.

Fuente: Nriagu y Pacyna, 1988.

cuando los organismos quedan expuestos a niveles de concentración anormalmente elevados, que, de otro modo, desencadenarían efectos adversos. Idealmente, estos sistemas deberían ser capaces de diferenciar entre los elementos necesarios, de aquellos que aún en niveles mínimos, resultan invariablemente tóxicos. Lamentablemente, en la práctica no resultan ser lo suficientemente selectivos, como para impedir que, bajo ciertas condiciones, los metales no esenciales se incorporen a través de las rutas disponibles para el ingreso de los elementos esenciales (Simkiss, 1979; Beeby, 1991). Estas interacciones son consecuencia de ciertas analogías químicas existentes entre ambos tipos de elementos, especialmente en relación a su capacidad para formar complejos de coordinación, que promueven el ingreso, intervienen en la distribución, almacenamiento y/o excreción de los metales en los distintos tejidos del organismo (Beeby, 1991). Las analogías químicas, a su vez, dependen de la posición de los elementos en la tabla periódica. Así, mientras la mayoría de los elementos esenciales se ubican en el 4º período, los metales tóxicos más frecuentes, se encuentran en el período 5º, si son solubles, o en el 6º, los menos solubles y potencialmente más nocivos para los organismos (Beeby, 1991).

En la literatura se han propuesto diversas clasificaciones adicionales, para tratar de relacionar las tendencias de formación de complejos con la estructura atómica de los metales. Una de ellas, conocida como la aproximación de Ahrland-Chatt-Davies (ACD), divide a los iones metálicos en tres categorías, según sean las configuraciones electrónicas de los orbitales externos. En la Tabla 3 se dan los ejemplos más representativos, para cada una de ellas.

Los cationes metálicos tipo A carecen de electrones en los orbitales externos, de modo que tienen la configuración de un gas inerte, resultando muy poco polarizables. Estos cationes, en general, forman complejos lábiles, mediante enlaces electrostáticos.

Por el contrario, los cationes tipo B tienen una fuerte tendencia a formar complejos estables, mediante uniones covalentes. Su configuración electrónica externa consta de 10 a 12 electrones y son altamente polarizables.

En la tercer categoría, se encuentran los cationes de la mayoría de los elementos de transición, los cuales presentan de 1 a 9

electrones en los orbitales d y, por ende, carecen de simetría esférica. Como grupo, no es posible establecer una tendencia general de complejación. Así, algunos de ellos, se asemejan, en cuanto a su comportamiento, a los cationes del grupo A, caso del Pb^{2+} ; mientras que otros a los del grupo B, caso del Cd^{2+} . Por ello, se los suele considerar como "elementos ubicados en la línea de borde" entre uno y otro grupo (borderline elements, en inglés) (Beeby, 1991; Brezonik et al., 1991).

Tabla 3.: Clasificación de los iones metálicos según el esquema de Ahrlund-Chatte-Davies.

Clase A	elementos en el "borde"	Clase B
Li^+ , Na^+ , K^+ , Be^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} , Mn^{2+} , Al^{3+} , La^{3+} , Cr^{3+} .	Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} .	Cu^+ , Ag^+ , Au^+ , Tl^+ , Hg_2^{2+} , Hg^{2+} , Pd^{2+} , Pt^{2+} , Tl^{3+} .

II. SISTEMAS ACUÁTICOS

Los sistemas acuáticos, que en conjunto ocupan aproximadamente el 75 % de la superficie terrestre (Menzer, 1991), también han contribuído enormemente al desarrollo y bienestar de la humanidad. Tan solo recordemos que la mayor parte de las ciudades, a lo largo y ancho del mundo, se han asentado sobre las costas de ríos mares o lagos. Los sistemas acuáticos constituyen todavía una fuente de recursos alimenticios y de agua potable, un medio de transporte, un lugar de recreación y esparcimiento.

Como contrapartida, estos sistemas han sido quizás los más seriamente afectados por diversos problemas de contaminación. Los efectos adversos que se registran obedecen a varias causas. Algunas de ellas operan en forma directa (French, 1991; GESAMP, 1991; Malins y Ostrander, 1991):

explotación excesiva de sus recursos naturales.

actividades portuarias.

liberación de descargas o efluentes de industrias diversas y actividades mineras, con alto contenido de sustancias químicas, de naturaleza orgánica o inorgánica.

liberación de descargas urbanas y cloacales, con alto contenido de materia orgánica biodegradable y nutrientes, que pueden provocar un proceso de eutroficación y depleción de oxígeno, alterando los ciclos biogeoquímicos naturales de diversas sustancias.

derrames "in situ" de petróleo u otras sustancias tóxicas.

descargas con alto contenido de material particulado, que modifican las características físicas del sistema, a la vez que constituyen un medio de transporte de numerosos contaminantes adsorbidos sobre las superficies de las partículas.

Otras causas operan en forma indirecta (Eidt et al., 1989). De este modo, los sistemas acuáticos pueden verse afectados:

por procesos de volatilización o arrastre derivados de la aplicación o emisión de plaguicidas o herbicidas, entre otras sustancias, que se efectúan en las zonas adyacentes.

mediante el escurrimiento de los suelos, por acción de las

lluvias o aguas residuales que desaguan en ellos.

a través de un percolado vertical, primero, de sustancias que inicialmente escurren hacia las napas subterráneas y, luego se transfieren lateralmente hacia las cuencas.

Finalmente, los sistemas acuáticos pueden ser alcanzados por las deposiciones, húmedas o secas, de contaminantes emitidos inicialmente a la atmósfera. De ellas, la lluvia ácida, ha provocado la acidificación de numerosos lagos y ríos, especialmente de aquellos que disponen de una capacidad reguladora pobre o limitada (Cattoggio, 1990).

Las consecuencias de tales actividades se han manifestado mediante diferentes procesos, algunos de ellos severos, a través de la erosión de las costas; degradación de los arrecifes de corales; la mortalidad masiva o la aparición de tumores diversos, en peces y otros organismos; crecimientos desmesurados de algas y/o fitoplancton; disminuciones en la población y diversidad de varias especies, entre otros (GESAMP, 1991; Sarokin y Shulkin, 1992b; Bucke, 1993).

Según la literatura, se considera que las comunidades biológicas de los sistemas acuáticos son especialmente sensibles a la presencia de sustancias químicas contaminantes. En gran parte, esto se debe a que las especies predominantes tienen, en su mayoría, ciclos de vida relativamente cortos y ciclos reproductivos muy frecuentes, que fácilmente pueden ser afectados por perturbaciones al medio. Además, las condiciones siempre fluctuantes en cuanto a las características hidrológicas y las propiedades físico-químicas de los sistemas acuáticos promueven una constante movilización de muchos contaminantes (Ford, 1989; Pratt, 1990).

En la actualidad, se considera al agua como un recurso natural básico, al que se debe proteger, no sólo desde un punto de vista ambiental, sino también por sus implicancias en la salud humana (Viessman, 1990; Okun, 1991; Briscoe, 1993). Recordemos para ello, que numerosas poblaciones, urbanas o rurales, obtienen el agua de bebida a partir de diversos sistemas acuáticos de ríos o lagos. Por consiguiente, diversas enfermedades pueden ser transmitidas por la presencia de bacterias u otros organismos patógenos, así como por la presencia de sustancias químicas contaminantes. Diariamente miles de niños mueren de enfermedades pre-

venibles, al beber aguas insalubres. Se calcula que aproximadamente dos tercios de la población de diversas naciones en desarrollo carece de aguas potables seguras. Por otra parte, se considera que la mayoría de esas enfermedades son transmitidas por contaminación fecal. Esta situación se agrava ya que se estima que menos de un 2% de todos los residuos cloacales que son eliminados a esos mismos sistemas, son tratados adecuadamente en América Latina (El-Hinnawi et al., 1982; Viessman, 1990; Briscoe, 1993).

Sin ir mucho más lejos, desde hace años, los balnearios distribuidos a lo largo de la costa argentina del Río de la Plata han quedado virtualmente inutilizados por las advertencias de "Prohibido bañarse: Aguas Contaminadas", debido a los altos recuentos de bacterias y otros microorganismos.

Las enfermedades ocasionadas por la presencia de sustancias químicas contaminantes se deben, fundamentalmente, a la ingesta de alimentos contaminados, obtenidos de los sistemas acuáticos. En general, en estos casos se observan efectos crónicos, aunque también se han registrado efectos agudos, tal como en el de Minamata. A través del conocido fenómeno de bioacumulación, el cual trataremos más adelante en detalle, los distintos organismos del sistema acuático pueden adquirir niveles de ciertas sustancias químicas más altos que los presentes en el cuerpo de agua. De este modo, suelen acumular sustancias como ciertos compuestos organoclorados (DDT, bifenilos policlorados (BPC), hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), y algunos elementos metálicos; representando un riesgo para la salud de los consumidores (El-Hinnawi et al., 1982; Gluth et al., 1985; Bro et al., 1987; Hovinga et al., 1993).

Justamente, la liberación y el destino de diversos elementos metálicos, especialmente aquellos que comúnmente se conocen como "metales pesados", tienen considerable interés en sistemas acuáticos, ya que se los considera contaminantes relevantes. Una serie de características justifican esta aseveración. Se trata de sustancias persistentes, capaces de inducir una amplia gama de efectos tóxicos y con un alto potencial de acumulación, en las distintas poblaciones de la comunidad, aún en niveles de concentración moderados (Clements, 1991; GESAMP, 1991; Luoma y Carter, 1991). En adición, se estima que las descargas directas, para la

mayoría de los contaminantes metálicos, a los sistemas acuáticos, exceden a las emisiones atmosféricas, que antes señaláramos (Tabla 4). Por otra parte, las deposiciones de estas emisiones en el ambiente acuático, constituyen una de las más importantes vías de contaminación, especialmente para metales como el plomo, o con respecto a aquellos sistemas ubicados en zonas rurales o escasamente pobladas (Nriagu y Pacyna, 1988; Nriagu, 1990).

Ahora bien, de acuerdo con su naturaleza, los sistemas acuáticos pueden clasificarse en marinos, de aguas dulces o estuarios. Éstos últimos, constituyen una suerte de interfase entre los dos primeros (Menzer, 1991). Un estuario se puede definir como un sistema en el cual las aguas de un río se conectan libremente con las del mar (Ketchum, 1983). Como consecuencia de este proceso de mezclado, se produce un gradiente de salinidad, tanto vertical como horizontal, a la vez que temporal. Los estuarios están sujetos simultáneamente a la dinámica del río, que se contrapone con la del mar. Estos sistemas, normalmente, se caracterizan por su alta productividad y, frecuentemente, constituyen el sitio donde se desarrollan las larvas de un gran número de peces, moluscos y crustáceos, algunos de los cuales, como adultos, vivirán en ambientes marinos. Lamentablemente, en la actualidad, se considera que la mayor parte de los estuarios del mundo, se encuentran contaminados. A su vez, ellos constituyen una de las principales vías de contaminación de los ambientes marinos (Ketchum, 1983; GESAMP, 1987; UNESCO, 1988). También se estima que las zonas costeras, suelen sufrir con mayor intensidad los impactos negativos derivados de la liberación de sustancias químicas en los ambientes acuáticos (Elbaz-Poulichet, 1984; GESAMP, 1991).

Habiendo señalado la importancia ambiental de estos sistemas, resulta obvio, en virtud de su cercanía, la elección de ciertas zonas costeras del Río de la Plata, al encarar el presente trabajo. Por consiguiente, pasaremos a señalar algunas de sus características más relevantes.

EL SISTEMA ACUATICO DEL RIO DE LA PLATA

La cuenca del Río de la Plata se destaca por su extensión entre las más importantes del mundo, cubriendo parcialmente los te-

Tabla 4.: Emisiones de elementos metálicos en sistemas acuáticos, a nivel mundial.

	Cadmio	Cobre	Cromo	Níquel	Plomo	Zinc
Descargas domésticas	1,7	28	46	62	6,8	48
Plantas generadoras de energía	0,12	13	5,7	11	0,72	18
Minería y fundiciones	2,0	14	12	13	7,0	29
Procesos de manufactura	2,4	34	51	7,4	14	85
Descargas atmosféricas	2,2	11	9,1	10	100	40
Descargas cloacales	0,69	12	19	11	9,4	17
Total (a)	9,1	112	143	114	138	237

(a) totales redondeados.

Fuente: Nriagu y Pacyna, 1988.

rritorios de Bolivia, Paraguay, Brasil, Uruguay y Argentina (Figura 1). El Río de la Plata, último eslabón de dicha cuenca, está formado por la confluencia de los ríos Paraná y Uruguay, los cuales aportan, en promedio, un flujo de 17000 y 5000 $\text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$, respectivamente. Desde su nacimiento hasta su desembocadura, su largo es de aproximadamente 300 Km, y su ancho va creciendo a partir del delta del Paraná, donde alcanza unos 40 Km, hasta superar los 200 Km. En su curso se pueden distinguir tres zonas (Figura 2): el Río de la Plata Superior, Medio y Exterior (Dagnino Pastore, 1973; Bazán y Arraga, 1993).

No se trata de un río profundo. Su profundidad media es de alrededor de 6 m, presentando con frecuencia muchos bancos, como consecuencia de la sedimentación por la gran cantidad de material en suspensión, en el que predominan limos y arcillas, aportada principalmente por el río Paraná, que le confiere su color amarillado tan característico. Por consiguiente, es necesario dragarlo con frecuencia, para posibilitar la navegación hacia los distintos puertos (Dagnino Pastore, 1973; Bazán y Arraga, 1993).

La concentración de material en suspensión, a la altura de la línea Buenos Aires-Colonia, varía entre 70 y 80 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Aproximadamente en la línea Punta Piedras-Punta Brava, como resultado de las corrientes marinas, se verifica una zona de turbulencias, que produce la resuspensión del material particulado, obteniéndose allí los máximos valores de concentración para aguas superficiales. Pasada esa zona de turbulencias, los valores vuelven a decaer, ya que predominan los procesos de sedimentación. Se considera que debido a dichos procesos, muchos contaminantes, especialmente aquellos asociados al material particulado, quedan atrapados en el lecho del río, sin llegar al mar (Bazán y Arraga, 1993).

En las zonas del Río de la Plata Superior y Medio (Figura 2), la salinidad promedio oscila entre 0,2 y 0,4 ‰, rango típico para sistemas fluviales (Bazán y Arraga, 1993).

No obstante la dimensión de la cuenca, la densidad de habitantes que pueblan las costas, la liberación de innumerables descargas industriales, urbanas y cloacales, las actividades portuarias que tienen lugar a lo largo del Río de la Plata, todo esto aunado con la liberación de afluentes que a su vez, están altamente contaminados, como el río Reconquista o el Riachuelo, muy pocos

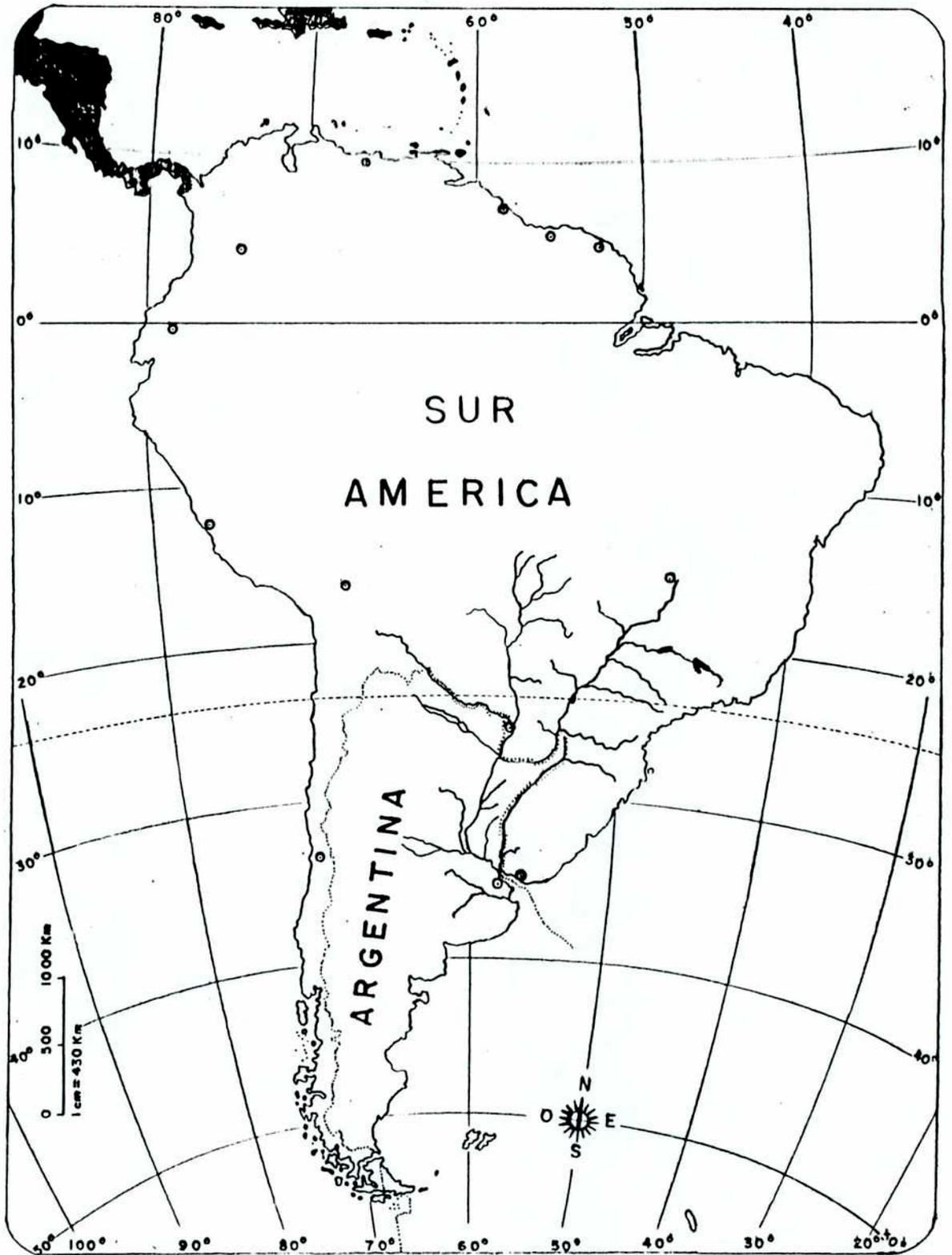


Fig. 1.: Mapa de América del Sur donde se muestran los principales ríos que integran la cuenca del Plata.

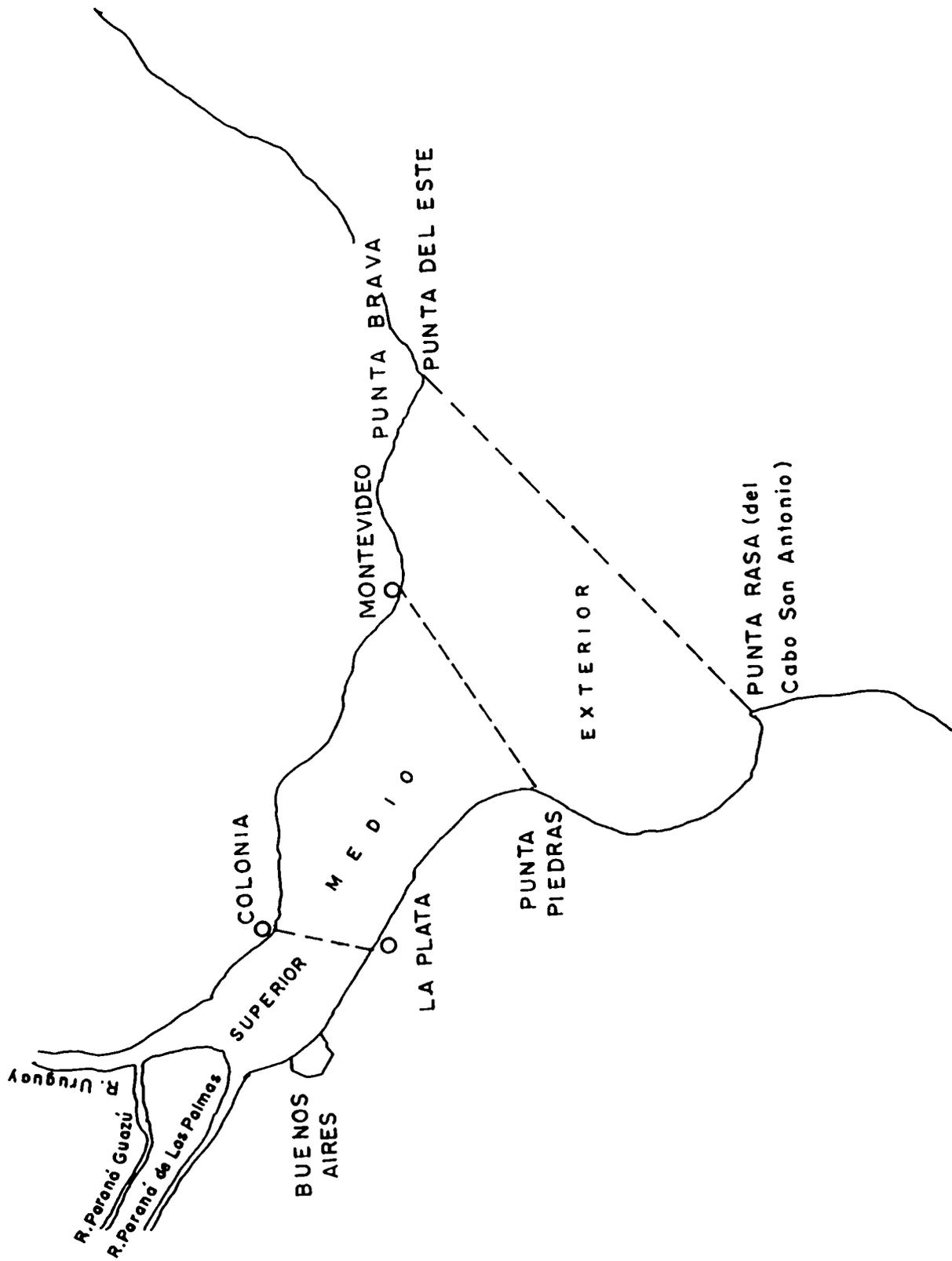


Fig. 2.: Zonas que pueden distinguirse en el curso del Río de la Plata.

estudios se han encarado para evaluar la calidad de sus aguas.

Quizás, el trabajo más relevante sea el realizado en forma conjunta por la Comisión Administradora del Río de la Plata, el Servicio de Hidrografía Naval, Argentina, y el Servicio de Oceanografía, Hidrología y Meteorología de la Armada, Uruguay (CARP-SIHN-SOHMA, 1990). Dicho estudio comprendió la zona que se denomina como el "curso principal", la cual abarca el área delimitada a partir de unos 4-5 Km de la línea de costas hacia el centro del río. Los valores de concentración de iones amonio, fosfatos y nitratos, que estiman el grado de contaminación por materia orgánica y nutrientes, se encontraron dentro de los rangos normales, no sobrepasando, en general, los niveles aceptables recomendados para sistemas fluviales. Es interesante destacar, sin embargo, que para todos los parámetros en estudio, sus valores tienden invariablemente a aumentar al acercarse a las zonas costeras. Dicho estudio incluyó también análisis de algunos elementos metálicos (Cd, Cu, Fe, Hg, Pb y Zn) y metaloides (As); hidrocarburos, y compuestos organoclorados, cuyos niveles de concentración siguieron un comportamiento similar al de los otros parámetros ya señalados. El trabajo concluye finalmente, que los procesos naturales de autodepuración, que se verifican en el curso principal del río debidos a la dinámica propia del sistema, resultan, por el momento, considerablemente efectivos para amortiguar los efectos de las descargas de contaminantes. Pero, a la vez, también destaca que la situación puede estar más comprometida en las zonas costeras (CARP-SIHN-SOHMA, 1990).

III. ECOTOXICOLOGÍA

En primera instancia, la **Ecotoxicología** surge como aquella rama de la Toxicología que se dedica al estudio de las interacciones nocivas de las sustancias químicas, naturales o sintéticas, sobre los ecosistemas (Truhaut, 1977; Connell, 1987).

Esta definición impone otra: la del término "ecosistema". Recientemente, Chapman (1992) escribió: "Muchos autores emplean la palabra ecosistema, pero pocos proveen una definición". Clásicamente, un ecosistema puede definirse como:

"una combinación de los fenómenos naturales que se verifican entre la comunidad total de organismos, junto con el ambiente físico y químico en el cual viven y se desarrollan (Margalef, 1977)."

El inconveniente de esa definición surge por la dificultad para poder establecer los límites o las barreras físicas, que delimiten claramente a los distintos ecosistemas, a excepción de que éstos sean arbitrarios (Lugo y Morris, 1982; Chapman, 1992; Rapport, 1992). Estas dificultades se ponen particularmente de manifiesto en relación a sistemas acuáticos. La realidad nos enfrenta con un sentido de continuidad, que se aprecia al pasar de un lago a un río, o viceversa; de un río a un estuario, pasando luego al mar y, finalmente, hasta el océano (Kolasa y Pickett, 1992; Rapport, 1992).

Sin embargo, en cada uno de esos sistemas se puede reconocer la presencia de un conjunto de especies animales y vegetales distintivas, que habitan en ellos, interactuando entre sí, y que configuran lo que se conoce como **comunidad biótica** (Villem, 1977; Chapman, 1992). A su vez, dentro de una comunidad, se distinguen las **poblaciones**, cada una conformada por un grupo de organismos de especies idénticas o similares (Villem, 1977).

Si bien no siempre las comunidades adyacentes se encuentran netamente definidas y separadas, éstas pueden ser caracterizadas por ecólogos calificados y competentes; o, cuando menos, se pueden identificar las poblaciones más relevantes en cada sistema (Lugo y Morris, 1982; Chapman, 1992).

De este modo, se considera que la Ecotoxicología estudia los efectos adversos de las sustancias químicas sobre la estructura y

funcionalidad de las comunidades bióticas y sus interacciones con los componentes abióticos (Schaeffer, 1991).

En los últimos años, algunos autores han comenzado reiteradamente a referirse a la Ecotoxicología, como la ciencia del estudio de la "salud de los ecosistemas" (Schaeffer, 1991; Calow, 1992; Chapman, 1992; Rapport, 1992). Esto en parte, surge como consecuencia de considerar a los ecosistemas como un "supraorganismo" y puede atribuirse a un intento por resaltar los impactos negativos que pueden sufrir los distintos organismos no sólo como consecuencia de la liberación de sustancias químicas. De hecho, cualquier cambio ambiental, no necesariamente debido a agentes químicos, puede provocar alteraciones nocivas en las comunidades bióticas. Algunos factores físicos, como cambios en la temperatura o turbidez de las aguas, procesos de erosión o rellenado de zonas costeras, el talado indiscriminado de árboles, por citar sólo algunas de las perturbaciones más relevantes, producen también efectos adversos que suelen ser incluidos dentro del campo de estudio de la Ecotoxicología.

Por consiguiente, en algunos casos, y siguiendo las recomendaciones bibliográficas, los términos de "perturbación" o "estrés" se emplearán como sinónimos, para que, de este modo, queden incluidas todas las posibles fuentes capaces de afectar negativamente a las comunidades bióticas (Kelly et al., 1987; Kelly y Harwell, 1989).

Aún cuando hayamos definido y en alguna medida delimitado el campo de estudio de la Ecotoxicología, sentiremos que no es suficiente. Una serie de interrogantes surgen en relación a las características de las sustancias químicas de mayor interés y al modo en que se verifican sus interacciones con el medio ambiente y con las comunidades bióticas.

Por consiguiente, resulta imprescindible establecer un camino, el cual, a través de distintas etapas y en forma ordenada, nos conduzca hacia la interpretación y aclaración de esos interrogantes. Necesariamente en sus comienzos, este camino requerirá de una serie de simplificaciones y aproximaciones con las situaciones reales, a partir de las cuales podamos ir avanzando. Trataremos de dar un esquema general de base, para luego ir detallando los aspectos más relevantes en relación a los sistemas acuáticos y los elementos metálicos, los cuales han sido el objetivo del presente trabajo.

III.1. ETAPAS DE LA ECOTOXICOLOGÍA

En primer lugar, debemos explicar la presencia de las sustancias químicas en el medio ambiente. Para ello hay que considerar la existencia de una fuente emisora (Connell, 1987; Glasby, 1988). Como primera aproximación, podríamos asumir que inicialmente la fuente emite una dada sustancia química contaminante X, a un determinado compartimiento ambiental: acuático, atmosférico o terrestre. A continuación, el tóxico puede sufrir una serie de procesos de distribución y/o transporte, a través de los diversos compartimientos (Morgan y Bretthauer, 1977; Connell, 1987; Landner, 1988), tal como se ilustra en la Figura 3. Adicionalmente, la sustancia puede ser objeto de una serie de procesos de transformación, abióticos o bióticos, que conduzcan a la formación de otros productos, los cuales pueden resultar con mayor, menor o similar actividad biológica, con respecto al original (Connell, 1987).

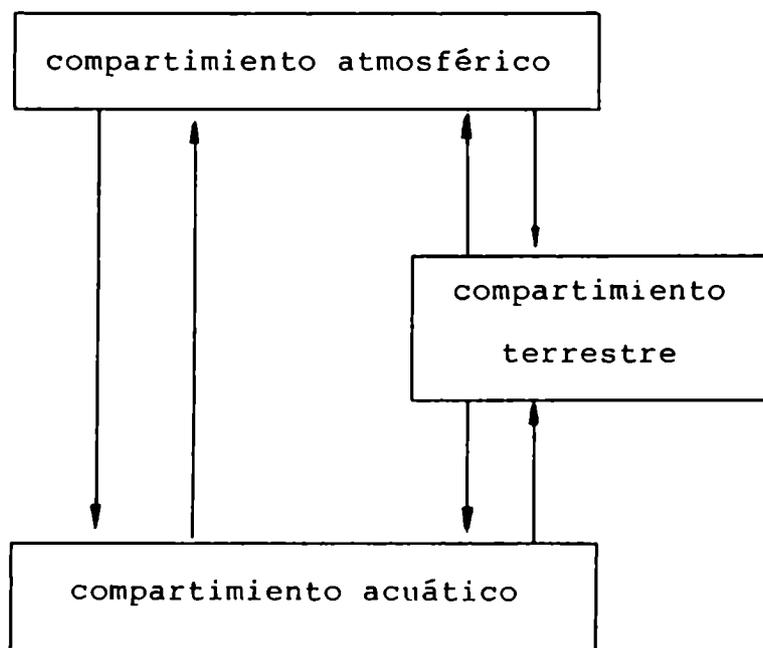


Fig. 3: Distribución de las sustancias químicas en los distintos compartimientos ambientales.

Ahora bien, los compartimientos ambientales constituyen sistemas heterogéneos, en los cuales se pueden distinguir varias fases

o subcompartimientos (sedimentos del lecho y material en suspensión, para el compartimiento acuático; polvos y partículas, en el atmosférico, etc). De manera tal que es necesario incluir todos los posibles procesos de distribución, transporte y transformación de carácter inter-compartimiento.

Todos estos procesos, que condicionan el "destino" de las sustancias químicas en el medio ambiente, dependen fundamentalmente de las propiedades físicas y químicas del compuesto X en cuestión, de otras sustancias presentes en la emisión, y de las características de cada compartimiento (Morgan y Bretthauer, 1977; Truhaut, 1977; Connell, 1987).

Sin embargo, aún no están completamente dilucidados ni se conocen todos los factores que rigen a los fenómenos de distribución, transporte y transformación (Kelly et al., 1987).

A continuación, debemos explicar cómo surgen las interacciones nocivas entre las sustancias químicas y los distintos organismos del ecosistema.

El primer requisito a tener en cuenta puede parecer pueril, pero es imprescindible que exista una exposición y que ésta conduzca efectivamente a la incorporación de dichas sustancias en los organismos presentes (Connell, 1987; Sedman, 1989).

Para encarar este tipo de estudios, consideramos conveniente volver a introducir una simplificación que facilite su comprensión. De este modo, analizaremos en primer término, un caso hipotético, en el cual concentraremos nuestra atención sobre un dado organismo de una especie, entre todas las presentes en el ecosistema, y que designaremos **organismo receptor**, el cual puede estar expuesto a una dada sustancia química genérica X en el ambiente acuático:

sust. química X —————> organismo receptor

Esta simplificación no está completamente reñida con la realidad, ya que, como veremos posteriormente, algunas especies resultan ser particularmente más sensibles que otras.

Existen varios caminos que posibilitan la incorporación de sustancias químicas en los organismos y que se detallan en la Figura 4. El receptor puede estar expuesto, en forma directa, a las sustancias que se emiten al sistema acuático (camino 1). O bien,

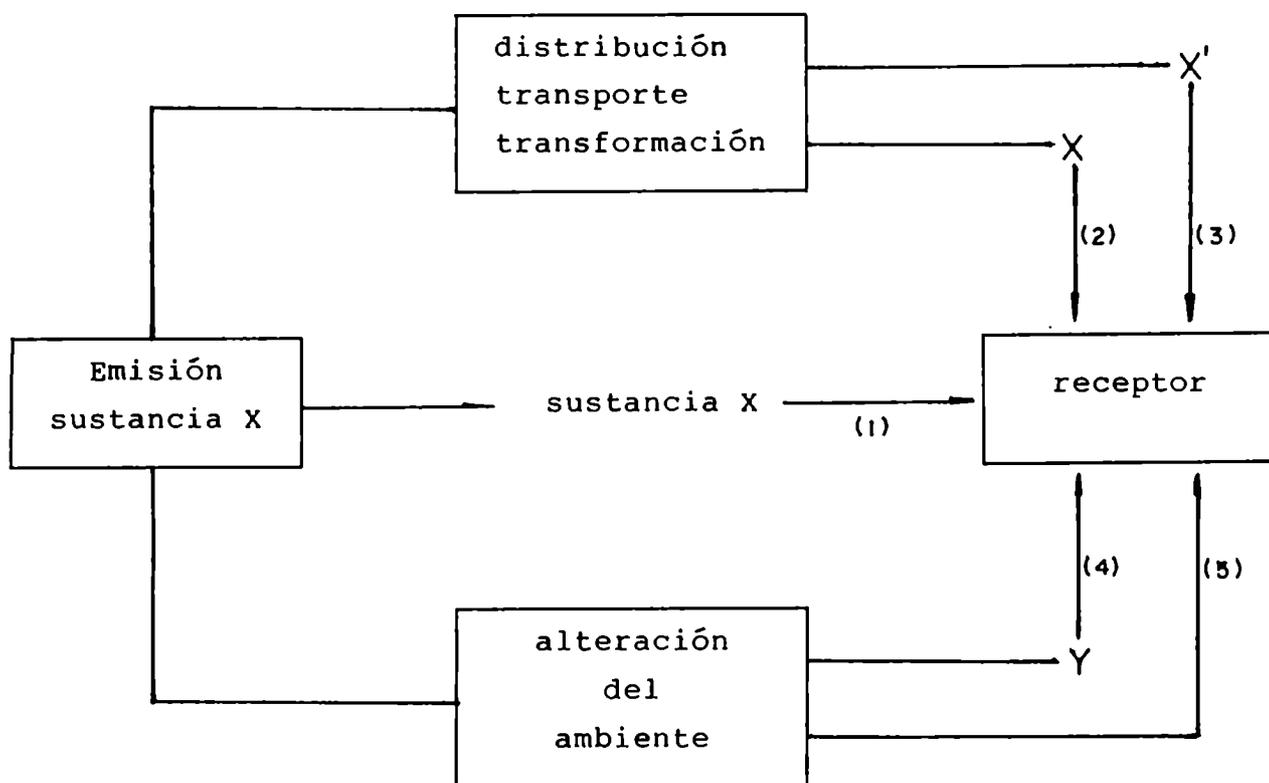


Fig. 4: Posibles vías de exposición a sustancias químicas.

en forma indirecta, tras verificarse uno o varios de los posibles procesos de distribución, transporte y/o transformación. De esta manera, el impacto puede resultar como consecuencia de la misma sustancia originalmente emitida (camino 2); o bien de algún otro producto (X'), resultante de su transformación en el ambiente (camino 3) (Kelly et al., 1987; Kelly, 1989).

Por otra parte, no debe omitirse que las descargas emitidas por la fuente, pueden desencadenar alteraciones ambientales, de modo tal que se altere la geoquímica natural del sistema, promoviendo la transformación y/o solubilización de sustancias que ya se encontraban en el ambiente, aunque no formando parte de la descarga, y que hasta entonces no estaban biodisponibles (camino 4). En adición, las descargas también pueden modificar las condiciones físicas del medio, provocando cambios de temperatura o luz, entre otros, los cuales como ya hemos mencionado pueden ejercer efectos adversos sobre el receptor (camino 5) (Poff y Mathews, 1986; Kelly et al., 1987; Kelly, 1989).

Ahora bien, merece destacarse que para poder evaluar y predecir las respuestas de una población o de una comunidad frente a las perturbaciones ambientales, es necesario disponer de un profundo conocimiento de las funciones de los diversos componentes del ecosistema en ausencia de factores estresantes, de manera de comprender cómo éstos pueden afectar las funciones normales. Es indudable que muchos progresos se han logrado en los últimos años, pero el objetivo aún no ha sido completamente alcanzado (Dorigan et al.,1987).

III.2. FUENTES DE CONTAMINACION

Las fuentes de emisión de sustancias químicas pueden ser clasificadas en base a diferentes criterios. Así, según sea el origen, la fuente puede ser natural, caso de las emanaciones de volcanes o incendios de bosques; o consecuencia de la actividad antropogénica, como las emisiones industriales, agrícolas, domésticas o urbanas, entre otras (Truhaut, 1977; Nriagu, 1990; Menzer, 1991). Ya hemos citado algunos ejemplos más específicos al tratar los elementos metálicos.

Algunas de esas fuentes son estacionarias. Pero también hay fuentes móviles, entre las que se destacan las producidas por los escapes de los motores de combustión de diversos vehículos (Morgan y Bretthauer, 1977).

La fuente puede ser considerada como puntual, cuando el alcance de la emisión está relativamente localizado, o no puntual, si es más difuso y generalizado (Smith et al., 1987; Menzer, 1991).

Finalmente, según la duración de la emisión, la fuente puede ser considerada como accidental (derrames de petróleo no intencionales), continua o intermitente (Kelly et al., 1989; Mc Cahon y Pascoe, 1990; Menzer, 1991).

En relación a la fuente, es importante poder establecer la cantidad de sustancias químicas que son emitidas, así como también el compartimiento ambiental sobre el que inicialmente se liberan (Connell, 1987; Landner, 1988). Con respecto al primer punto, merece señalarse que algunas sustancias no presentan un alto grado de toxicidad intrínseco, pero al liberarse en grandes cantidades son capaces de producir modificaciones no deseadas en el ambiente.

III.3. PROCESOS DE DISTRIBUCIÓN

El proceso de distribución de una sustancia química en los distintos compartimientos y subcompartimientos ambientales está regido por la siguiente propiedad: su **fugacidad**. La fugacidad puede definirse como la tendencia de escape que exhibe un compuesto para pasar de una fase a otra (Connell, 1987; Burridge y Haya, 1989; Metcalfe, 1993). Diversas propiedades se emplean en la práctica, como parámetros estimadores de la fugacidad, según sean las características físico-químicas de las sustancias en cuestión. Así, para sustancias volátiles se emplea la constante de Henry; para compuestos orgánicos altamente lipofílicos, la constante de partición octanol-agua (k_{ow}); para sustancias con alta afinidad por el material particulado, el coeficiente de adsorción (k_d) (Metcalfe, 1993).

Las leyes de la termodinámica establecen que, una vez alcanzado el estado de equilibrio, las fugacidades de una sustancia, en todas las diversas fases en las cuales se distribuye, son iguales. De esta manera, disponiendo de los valores de fugacidad, es factible calcular la concentración en cada una de las fases involucradas en su distribución (Connell, 1987; Metcalfe, 1993). En base a esta teoría, diversos modelos matemáticos se han ideado para determinar la concentración esperada de un contaminante liberado al ambiente. Los más simples, sólo contemplan los procesos más elementales que inciden en la distribución. Los más complejos, van progresivamente incorporando mayor información acerca de las fluctuantes condiciones ambientales, y la posibilidad de ocurrencia simultánea de procesos de transporte y/o transformación (Mackay et al., 1983; Yoshida et al., 1988; Burridge y Haya, 1989). Dichos modelos constituyen un medio a través del cual los científicos y los entes reguladores pueden predecir la distribución, o incluso el destino, de los contaminantes en los distintos subcompartimientos del sistema acuático, los cuales trataremos a continuación. Aproximaciones de este tipo tienen un considerable valor predictivo, aunque no siempre reflejan fielmente una situación real (Connell, 1987; Burridge y Haya, 1989).

III.3.1. DISTRIBUCIÓN DE CONTAMINANTES EN SISTEMAS ACUÁTICOS

Como sabemos, los sistemas acuáticos naturales no presentan una fase acuosa homogénea. Por el contrario, en ellos pueden distinguirse distintas fases, o subcompartimientos, en los cuales se van a distribuir las sustancias químicas que se liberen en ellos, a partir de las diversas fuentes. Se reconocen así, los siguientes subcompartimientos:

- fase acuosa soluble
- coloides y micelas
- material en suspensión
- sedimentos del lecho
- diversos organismos biológicos

El fenómeno de distribución es considerablemente complejo y depende, por un lado, de la naturaleza y las propiedades físico-químicas de los contaminantes, y, por otro, de una gama muy amplia de factores físicos, químicos, biológicos, geológicos, hidrológicos y climáticos, característicos del sistema acuático en consideración (Stallard y Edmond, 1983; Connell, 1987; GESAMP, 1987; Marcus, 1989; Simkiss, 1990).

Uno de los máximos desafíos de la ecotoxicología consiste en saber entender e interpretar dicho fenómeno, a fin de poder evaluar el destino y el impacto ambiental de las distintas sustancias químicas. Por cierto, no es una tarea sencilla.

ESPECIACIÓN Y BIODISPONIBILIDAD DE ELEMENTOS METÁLICOS

En el caso particular de elementos metálicos, éstos pueden presentarse bajo una gama muy amplia de formas químicas, según se detalla a continuación (Brezonik et al., 1991):

especies iónicas libres, generalmente hidratadas, en uno o varios estados de oxidación.

formando complejos con ligandos de naturaleza inorgánica.

formando complejos con ligandos de naturaleza orgánica.

adsorbidos sobre superficies coloidales, el material en sus-

pensión y/o los sedimentos del lecho.
adsorbidos o absorbidos por la biota.

El estudio y la determinación de las distintas formas físico-químicas en que puede presentarse un metal en los sistemas acuáticos, constituye lo que se denomina **especiación** del elemento (Dorigan et al.,1987; Brezonik et al.,1991; Florence et al.,1992). Las concentraciones relativas de las diferentes especies químicas dependen, básicamente, de las condiciones ambientales del medio. Las distintas especies, según se distribuyan en la fase acuosa o se asocien a los sedimentos del lecho, estarán sujetas a un mayor o menor proceso de transporte. Los distintos ligandos presentes en el sistema, pueden favorecer la solubilización o, por el contrario, la precipitación de los diferentes elementos. De este modo, los estudios de especiación revisten un considerable interés en relación a la determinación de los ciclos geoquímicos de los contaminantes metálicos, por cuanto permiten esclarecer los fenómenos de distribución, movilidad y transporte. O sea, el destino de dichas sustancias en el sistema acuático (Brezonik et al.,1991; Florence et al.,1992).

Por otra parte, las distintas especies químicas exhibirán una toxicidad muy diferente en los diversos organismos presentes. Basta un ejemplo sencillo para comprobar la tremenda importancia de este hecho. Mientras que los iones de Cr^{3+} resultan esenciales para numerosos organismos, los de Cr^{6+} son altamente tóxicos (Goyer, 1991). Por consiguiente, desde un punto de vista ecotoxicológico, es fundamental poder determinar aquellas especies químicas susceptibles de ser incorporadas por la biota y producir efectos nocivos, o sea las especies **biodisponibles**. De esta manera, los estudios de especiación revisten también interés en relación a los ciclos biológicos, al intentar o permitir la interpretación de los fenómenos de biodisponibilidad, bioacumulación y toxicidad (Dorigan et al.,1987; Brezonik et al.,1991; Florence et al.,1992).

Teniendo en cuenta estas consideraciones, podemos comprender que para establecer el potencial impacto ecotoxicológico de un contaminante metálico en un sistema acuático, no basta con determinar únicamente los niveles de concentración totales en un dado subcompartimiento. La meta ideal consiste en identificar y cuan-

tificar todas las diversas especies individuales en que puede encontrarse un elemento (Dorigan et al.,1987; Brezonik et al.,1991; Florence et al.,1992).

Por ello, se considera que los estudios de especiación deberían resolver los siguientes aspectos (Bourque y Guy, 1989):

- * detección y determinación de las diferentes especies metálicas específicas.
- * determinación del estado de oxidación de los elementos.
- * diferenciación de las especies iónicas libres de las asociadas a los distintos complejantes, coloides o material particulado.

En la práctica, las técnicas de especiación son considerablemente laboriosas, insumen mucho tiempo y resultan costosas. Además, no es factible identificar o caracterizar a todos los potenciales ligandos que pudieran estar disponibles en el cuerpo de agua, para interaccionar con los diversos elementos. Muchas de las interacciones resultantes pueden ser lábiles, y los equilibrios se pueden afectar aun durante el procedimiento de recolección de las muestras para su análisis (Batley y Gardner, 1977).

Por consiguiente, y hasta el momento, ese objetivo ideal todavía no ha sido alcanzado. La tendencia general parece enfocarse en la determinación de aquellas especies que sean más fácilmente biodisponibles o rápidamente incorporadas por los diversos organismos, y que exhiban mayor potencial tóxico (Florence et al., 1992).

Se considera que únicamente una proporción muy pequeña de los elementos metálicos se encuentra en la llamada fase acuosa soluble, generalmente como iones libres hidratados. La mayor proporción está asociada a los sedimentos del lecho o al material en suspensión, tal como veremos en las secciones posteriores. Una proporción intermedia se encuentra complejada con sustancias orgánicas o inorgánicas, de origen natural o antropogénico. Esta proporción es muy variable, dependiendo del tipo y la concentración de los potenciales agentes complejantes (Marcus y Scott, 1990; Brezonik et al.,1991; Florence et al.,1992).

A continuación trataremos de caracterizar algunos de los potenciales ligandos con que pueden interactuar los elementos metálicos. De este modo, se podrán reconocer las especies más repre-

sentativas que pueden estar presentes en cada uno de los distintos subcompartimientos. Seguidamente, trataremos las características más relevantes de éstos y señalaremos los principales factores ambientales que pueden influir en el proceso de especiación.

PRINCIPALES LIGANDOS

Obviamente, no es posible hacer una lista completa de todos los potenciales compuestos capaces de reaccionar con los elementos metálicos. No obstante, algunos de ellos están bien caracterizados, ya sea debido a que por su presencia o por su concentración definen la naturaleza del cuerpo de agua; o bien porque forman parte de ciertas descargas específicas.

Entre los ligandos de naturaleza inorgánica se destacan principalmente los siguientes: Cl^- , HCO_3^- y CO_3^{2-} , F^- , NO_3^- , NH_3 y NH_4^+ , OH^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , SH^- , SH^{2-} , CN^- , entre otros (Neubecker y Allen, 1983; Brezonik et al., 1991; Florence et al., 1992).

La concentración de iones Cl^- es responsable del grado de salinidad que presenta un sistema acuático. Mientras que los niveles son relativamente constantes en aguas dulces típicas o en el mar abierto, la situación en los estuarios es muy diferente, ya que éstos están invariablemente sujetos a un gradiente de salinidad, en sentido horizontal y/o vertical. Las variaciones de salinidad en sentido horizontal dependen fundamentalmente del flujo de agua de río, por un lado, y de la acción de las mareas, por el otro. Pero ambas corrientes pueden, a su vez, verse afectadas por fenómenos climáticos, especialmente por la acción de los vientos, que favorecen una hidrodinámica sobre la otra. El gradiente vertical puede ser pequeño si se verifica un buen mezclado de las aguas. En cambio, en los sistemas estratificados, las aguas profundas son considerablemente más salinas que las superficiales (Ketchum, 1983; Officer, 1983).

La concentración de iones CO_3^{2-} y HCO_3^- da cuenta de la alcalinidad de las aguas. Además, algunos de los compuestos inorgánicos que contienen átomos de carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, azufre o fósforo, están involucrados en los procesos de productividad primaria, esenciales para el desarrollo de los seres

vivos (Lerman et al., 1989).

La presencia de otros ligandos, en cambio, es consecuencia de la actividad antropogénica. Tal es el caso de los iones CN^- , los cuales pueden derivar de diversos compuestos de cianuro orgánico, que se emplean frecuentemente en la manufactura de plásticos, en la industria textil, o forman parte de los formulados de algunos agroquímicos. En ciertos efluentes se han registrado niveles de CN^- de hasta 60 mg.L^{-1} , siendo el valor máximo permisible de 3 mg.L^{-1} (Mehra y Arseneau, 1989).

Entre los compuestos orgánicos naturales con potencial capacidad para reaccionar con los elementos metálicos se destacan las sustancias húmicas, las cuales se encuentran distribuídas en prácticamente todos los sistemas acuáticos (Brezonik et al., 1991). En menor medida, se pueden encontrar también algunos compuestos nitrogenados, derivados principalmente de oligo- o polipéptidos, aminoácidos y proteínas (Neubecker y Allen, 1983; Brezonik et al., 1991).

En diversas descargas industriales se ha detectado la presencia de compuestos sintéticos, tales como el ácido nitriloacético, (NTA) o el etilendiaminotetraacético (EDTA). La importancia relativa de estas sustancias como potenciales agentes complejantes, dependerá de la magnitud y la frecuencia de las descargas (Neubecker y Allen, 1983; Brezonik et al., 1991).

Indudablemente, esta lista resulta pequeña frente a la enorme diversidad de sustancias que pueden estar presentes en un sistema dado. Por el momento, la mayoría de los estudios se han focalizado sobre el material húmico. Comparativamente, muy pocos trabajos han abordado la identificación o el comportamiento de otros ligandos (Lövgren y Sjöberg, 1989).

Sustancias húmicas

Las sustancias húmicas se producen como consecuencia de la descomposición de tejidos biológicos, especialmente vegetales, en ambientes terrestres y acuáticos (Ogner y Schnitzer, 1970; Josephson, 1982; Mizuike, 1987). Dentro de este material pueden distinguirse tres fracciones, en base a su solubilidad en medio ácido o básico y a su peso molecular (Mizuike, 1987; Benson y

Long, 1991):

ácidos fúlvicos: solubles tanto en soluciones ácidas como básicas.

ácidos húmicos, propiamente dichos,: solubles en medio básico, pero insolubles en medio ácido.

ácidos húminos: insolubles en ambos medios. Por consiguiente, esta fracción puede encontrarse únicamente en suelos y sedimentos.

La estructura química del material húmico todavía no está completamente caracterizada, a pesar de que ha sido objeto de numerosas investigaciones (Josephson, 1982; Mizuike, 1987; Abbt-Braun et al.,1989; Schulten y Plage, 1991). El peso molecular de estos compuestos varía desde 300 hasta 300.000 Da., aproximadamente (Mizuike, 1987; Benson y Long, 1991). En líneas generales, pueden describirse como polímeros aromáticos, con características ácidas e hidrofílicas; altamente polares, debido a la presencia de grupos carboxílicos, e hidroxilos fenólicos y/o alcohólicos (Josephson, 1982; Mizuike, 1987; Abbt-Braun et al.,1989). Estudios más recientes demostraron que los compuestos mayoritarios serían bencenos y alquilbencenos, principalmente aquellos de cadenas alquílicas lineales, que usualmente varían entre 1 y 13 átomos de carbono (Schulten y Plage, 1991). Sin embargo, se han distinguido también otros componentes, considerados minoritarios, en proporción altamente variable según la procedencia del material (Josephson, 1982; Abbt-Braun et al.,1989; Schulten y Plage, 1991; Schulten y Schnitzer, 1992). Schulten y Plage (1991) han propuesto una estructura general, que se presenta en la Figura 5. en la cual los anillos aromáticos se unen por medio de cadenas alquílicas, más o menos largas, con un grado variable de entrecruzamiento.

Los materiales húmicos constituyen las sustancias orgánicas mayoritarias, responsables de la marcada coloración que se observa en algunos sistemas, aunque también están presentes en aguas cuasi transparentes, incluyendo las del mar abierto (WHO,1984; Brezonik et al.,1991). Su concentración puede variar entre 1 y 70 mg.L⁻¹, siendo el valor promedio de aproximadamente 1 a 6 mg.L⁻¹ (Neubecker y Allen, 1983; Benson y Long, 1991).

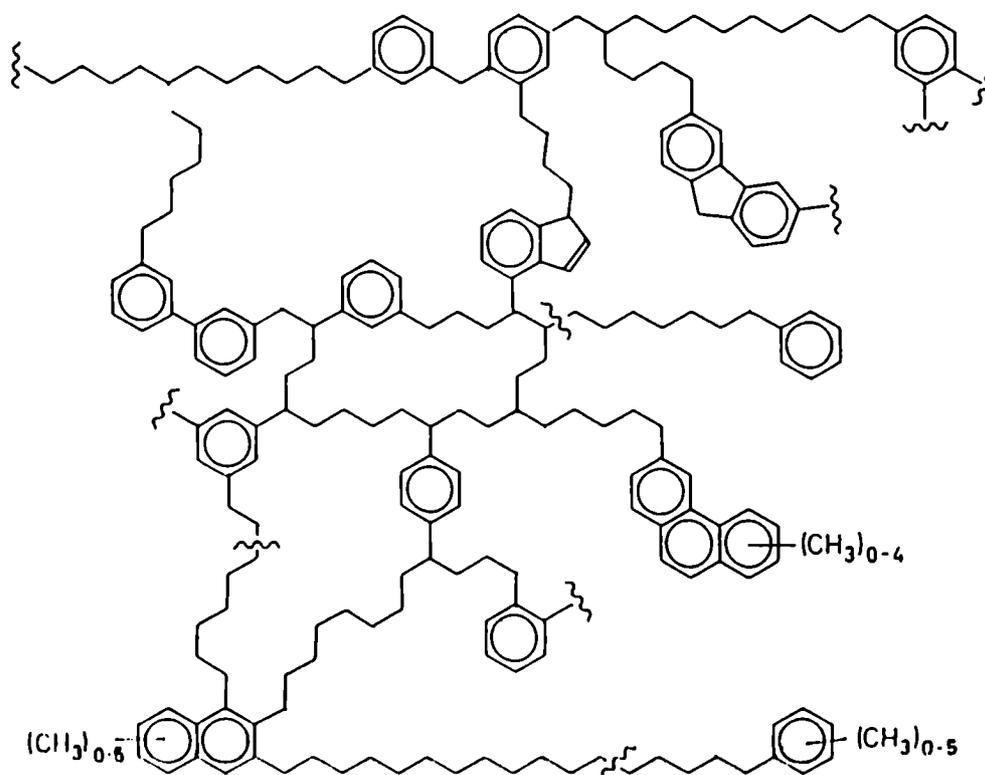


Fig. 5: Estructura química propuesta para las sustancias húmicas (según Schulten y Plage, 1991).

Los valores observados en aquellos sistemas de "aguas negras", como pantanos y ciénagas, oscilan entre 50 y 70 mg.L^{-1} . En estos casos, se considera que su presencia puede conferir una importante acidez al sistema (Oliver et al., 1983).

Merece también señalarse que la presencia de ácidos húmicos en sistemas de ríos o lagos, que se destinan al suministro de agua potable para consumo humano, puede constituir un serio riesgo para la salud. Durante el proceso de desinfección por cloración de las aguas, por reacción con el material húmico, se pueden formar compuestos clorados, entre los que se distinguen los conocidos trihalometanos (cloroformo, dibromoclorometano, etc.). Muchos de estos compuestos han demostrado ser carcinogénicos, teratogénicos y/o mutagénicos (Cheh et al., 1980; Lin et al., 1984; WHO, 1984; Meier et al., 1986).

Las sustancias húmicas pueden reaccionar con una gran variedad de compuestos orgánicos e inorgánicos. Entre los primeros, se han documentado reacciones con diversos compuestos hidrófobos, alca-

nos, ácidos grasos, dialquil-ftalatos o ésteres; con plaguicidas como el DDT, organofosforados y carbamatos; hidrocarburos aromáticos policíclicos; bifenilos policlorados, etc. (Khan y Schnitzer, 1972; Josephson, 1982; Benson y Long, 1991; Steinberg et al., 1992; Lee et al., 1993).

Entre los compuestos inorgánicos, se ha demostrado que el material húmico puede reaccionar con un amplio número de elementos metálicos, con grupos nitratos, fosfatos, silicatos y sulfatos, entre otros (Benes et al., 1976; Giesy et al., 1977; Josephson, 1982; Stackhouse y Benson, 1988).

Los complejos resultantes pueden exhibir propiedades físico-químicas diferentes a las de las sustancias libres. Por consiguiente, los efectos tóxicos también pueden resultar modificados. Para algunos contaminantes se ha demostrado que en presencia de ácidos húmicos, pueden verificarse tanto efectos sinergistas, como antagonistas, dependiendo del tóxico y de la concentración de material húmico (Stackhouse y Benson, 1988; Benson y Long, 1991; Steinberg et al., 1992; Lee et al., 1993).

Ahora bien, así como las estructuras químicas de las sustancias húmicas todavía "son un misterio", "el mecanismo por el cual reaccionan es también un misterio" (Josephson, 1982). Indudablemente estos aspectos están íntimamente relacionados, ya que recién cuando se pueda caracterizar unívocamente la estructura química para dichas sustancias, podrán interpretarse las interacciones y las uniones involucradas en la formación de los complejos (Schulten y Schnitzer, 1992).

SUBCOMPARTIMIENTOS DEL SISTEMA ACUÁTICO

FASE ACUOSA SOLUBLE

La definición de fase acuosa soluble es arbitraria y sólo queda estrictamente fijada en función del procedimiento de fraccionamiento empleado. En base a una convención, actualmente ya generalizada en casi todo el mundo, la fracción soluble es aquella obtenida por medio de un proceso de filtración a través de un poro de 0,45 μm (US EPA, 1971; Brown et al., 1974; APHA-AWWA-WPCF, 1980; Ashton y Chan, 1987).

Desde la perspectiva de los contaminantes, el grado de solubilidad intrínseco de estas sustancias es una de las características claves que determinarán la magnitud de su distribución en esta fase. Esta aseveración que puede resultarnos un tanto ingenua, en vista del enorme conocimiento sobre las propiedades físicas y químicas para casi todas las sustancias en un medio de agua pura, cobra vital importancia cuando se trata de un cuerpo de agua natural. En estos casos, se verifican condiciones no sólo muy diversas, sino también muy cambiantes, de salinidad, fuerza iónica, pH, temperatura y fundamentalmente de composición, que introducen modificaciones significativas en todos aquellos parámetros obtenidos a partir de sistemas simples (May et al., 1978; Farrington, 1989).

Ya hemos mencionado que únicamente una proporción muy pequeña de los elementos metálicos se encuentra en la fase acuosa soluble, como iones libres, generalmente hidratados. En general, esa proporción puede aumentar por un incremento en la acidez del sistema, o por la presencia de ligandos que rindan complejos solubles. Por ejemplo, el material húmico constituye entre el 50 y el 80 % del contenido total de carbono orgánico disuelto en la fase acuosa (Abbt-Braun et al., 1989).

Para el cadmio, las especies solubles en sistemas de aguas dulces se limitan al catión libre Cd^{2+} y a pequeñas cantidades de CdSO_4 y CdCl_2 , o complejos con sustancias húmicas. A medida que la salinidad aumenta, la proporción de complejos con iones Cl^- también aumenta, a expensas de la disminución de iones libres. Las especies de fórmula general $\text{CdCl}_x^{(2-x)}$ predominarán, en forma casi exclusiva, en los ambientes marinos típicos (GESAMP, 1984; Bewers, 1987).

Con respecto al plomo, en sistemas de aguas dulces relativamente no contaminados, predominan especies inorgánicas que presentan muy baja solubilidad. Los principales compuestos que se han identificado incluyen los siguientes: PbCO_3 , Pb(OH)_2 , PbSO_4 y PbCl_2 (GESAMP, 1984; WHO, 1989; Brezonik et al., 1991).

Según distintos autores, se considera que para muchos elementos, las formas iónicas libres, en primer término, o los complejos inorgánicos, en segundo lugar, exhibirían una mayor y más rápida biodisponibilidad. En cambio, los elementos complejados con sustancias orgánicas, ya sean éstas de origen natural o sintético,

no serían rápida y directamente disponibles para los organismos del sistema acuático (Brezonik et al.,1991).

Diversas experiencias de laboratorio demostraron que la incorporación y la toxicidad de metales como el cadmio o el cobre, en distintas especies acuáticas (fitoplancton, bacterias, algas, bivalvos y crustáceos), resultaban efectivamente mayor a partir de las especies iónicas libres (Sunda y Lewis, 1978; Sunda y Gillispie, 1979; Sanders et al.,1983; Jenkins y Sanders, 1986; Sunda et al.,1987).

Resultados similares se encontraron al comparar el grado de incorporación de plomo en presencia o ausencia de tres agentes complejantes, los ácidos etilendiaminotetraacético (EDTA), nitrilotriacético (NTA) y diaminopropanoltetraacético (DPTA), en peces (WHO, 1989).

Sin embargo, también se han descrito importantes excepciones. En el caso del mercurio, las especies orgánicas se caracterizan por una muy alta lipofiliidad y, por consiguiente, resultan más rápidamente biodisponibles y presentan mayor toxicidad en relación a las especies iónicas libres o a los compuestos inorgánicos (Magos, 1975; Goyer, 1991). Además, algunos reportes han sugerido que la toxicidad de los compuestos alquilados de plomo, en peces, podría ser de 10 a 100 veces mayor que la de los compuestos inorgánicos. Sin embargo, esos resultados suelen ser difíciles de interpretar, por cuanto dichos compuestos orgánicos, en general, no son estables, ya que se degradan relativamente rápido, en el término de días o pocas semanas, en el ambiente acuático (GESAMP, 1984; WHO, 1989).

Las formas disueltas de los elementos trazas también resultan de particular interés para la salud pública, por cuanto serán más fácil y rápidamente incorporadas en las fuentes de suministro de aguas potables (Smith et al.,1987).

Por último, merece señalarse que en la interfase agua/atmósfera, se distingue una microcapa, de aproximadamente 50 um de espesor. En ella, se registran concentraciones singularmente altas de sustancias químicas contaminantes, en su mayor parte provenientes de emisiones atmosféricas, con relación a las que se observan en las aguas subsuperficiales. Así, se ha establecido, por ejemplo, que los niveles de ciertos elementos metálicos en dicha microsuperficie pueden superar entre 10 y 1000 veces a los presentes en

el resto de la fase acuosa. Esta elevada concentración de contaminantes estaría promovida por los procesos de transporte atmosféricos, una alta actividad bacteriana y de especies del plancton, así como por las burbujas que se originan a nivel superficial. Además, allí también se concentrarían mayores niveles de carbono orgánico, en forma disuelta o particulada. Por lo tanto, esta microcapa, que actuaría como un medio de transición, desempeña un rol fundamental en el transporte de contaminantes entre la atmósfera y el medio acuático (Duce et al., 1972; Piotrowicz et al., 1972; Jing y Wei-Wen, 1988; Malins y Ostrander, 1991).

MATERIAL COLOIDAL

El término coloide se utiliza para distinguir a partículas discretas, de dimensiones variables que oscilan en el orden de los μm a nm . Estas partículas pueden exhibir una composición muy diversa. Algunas, están fundamentalmente conformadas por polímeros de proteínas y carbohidratos, asociados a su vez con cantidades variables de minerales arcillosos, en su mayor parte amorfos, y algunos elementos metálicos. Estas partículas, de origen natural, derivan básicamente de tejidos biológicos muertos, de diversos microorganismos: bacterias, protozoos, fitoplancton o zooplancton (Means y Wijayaratne, 1982; Witkowski et al., 1987). Otras, en cambio, derivan de surfactantes iónicos, como los detergentes (Quiroga et al., 1989). Por consiguiente, se distinguen del material en suspensión principalmente por su tamaño y por exhibir un comportamiento característico, de acuerdo con su composición (Means y Wijayaratne, 1982; Witkowski et al., 1987).

Las partículas coloidales se caracterizan por presentar una fase interior no polar, compuesta por hidrocarburos; una fase exterior iónica, y una región de polaridad intermedia (Valsaraj y Thibodeaux, 1989).

La importancia del material coloidal consiste en su capacidad para solubilizar sustancias contaminantes no polares, o hidrofóbicas, que de otro modo serían muy poco solubles en el sistema acuoso. Así, en su mayor parte, estos contaminantes se pueden disolver en la fase interior del coloide. También, aunque en menor grado, se puede producir un fenómeno de adsorción sobre la

fase iónica exterior, o pueden quedar ocluidos en la fase intermedia (Valsaraj y Thibodeaux, 1989). Dado que la constante de partición K_{ow} constituye una medida de la lipofilicidad, para compuestos hidrofóbicos, se ha demostrado mediante diversas experiencias que esos valores pueden estimar el grado de asociación de dichos compuestos a las micelas coloidales, dentro de ciertos límites (Means y Wijayarathne, 1982; Valsaraj y Thibodeaux, 1989).

Las especies iónicas de los metales, por su parte, pueden interaccionar con la fase exterior de las partículas (Pakalns y Farrar, 1977; Frenet, 1981).

Debido a su tamaño, el material coloidal permanecerá, en general, distribuido en la fase acuosa. Así, cuando se filtren las muestras de agua, para obtener la denominada fracción soluble (poro de filtro = 0,45 μ m) dicho material se encontrará en el filtrado. De este modo, se puede sobreestimar el nivel de concentración de un dado contaminante al analizar la fracción soluble (Booij, 1993).

Además, debido a las cargas superficiales que presentan las partículas coloidales, es posible que en sistemas de elevada salinidad (ambientes marinos o estuarios) precipiten por la alta fuerza iónica del medio, depositándose en los sedimentos del lecho (Means y Wijayarathne, 1982).

SEDIMENTOS DEL LECHO Y MATERIAL EN SUSPENSIÓN

Se considera que la mayor proporción de elementos metálicos presentes en sistemas acuáticos, se encuentra asociada con los sedimentos (Marcus y Scott, 1990). Por consiguiente, se impone una definición del término sedimento y una descripción de sus principales componentes, que nos permitan interpretar la importancia del estudio y análisis de este subcompartimiento.

Conceptualmente, un sedimento puede ser considerado como una mezcla heterogénea de partículas disímiles. Estas partículas pueden ser transportadas por el cuerpo de agua, o bien depositarse en los lechos, procesos que dependen de un gran número de factores, que progresivamente iremos tratando. Por ello, algunos autores incluyen bajo el nombre de sedimentos tanto al material en

suspensión como al que se deposita en los lechos, ya que las partículas en uno y otro caso tienen una composición básica similar (Bradford, 1988; Förstner, 1990). Sin embargo, en ocasiones, es necesario limitar el término de sedimentos para caracterizar al material depositado en los lechos, por cuanto éste se distingue del material en suspensión durante los procesos de transporte y transformación.

En cuanto a la composición de las partículas, se puede distinguir una matriz, de origen mineral o biológico, sobre la cual se asocian diversos compuestos de naturaleza inorgánica u orgánica, que las recubren y pueden actuar como sustratos frente a las diversas sustancias químicas presentes en el sistema acuático. Entre los compuestos inorgánicos más relevantes pueden citarse arcillas minerales, cuarzo, feldespato, silicatos de aluminio amorfos, carbonatos, óxidos e hidróxidos de hierro y manganeso. Los ácidos húmicos figuran entre los compuestos orgánicos más representativos (Bradford, 1988; Lai, 1988; Förstner, 1990).

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

- * precipitación, coprecipitación o disolución
- * oxidación y/o reducción
- * adsorción y desorción
- * intercambio iónico
- * complejación
- * crecimiento o inhibición del crecimiento de microorganismos.

Se considera que las propiedades físicas de las partículas son las que exhiben mayor influencia en los procesos de adsorción, desorción, intercambio iónico, transporte y deposición. Específicamente entre dichas propiedades deben considerarse el tamaño de partícula, su área superficial, la densidad, porosidad y carga superficial. De ellas, el tamaño de partícula constituye uno de los parámetros principales que controlan el transporte de los sedimentos, los procesos de adsorción, y la transferencia de las sustancias químicas entre la fase acuosa y el material particula-

do (Lai, 1988; Förstner, 1990).

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

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

Numerosos tóxicos orgánicos, especialmente los hidrofóbicos, al igual que algunos inorgánicos, particularmente los metálicos, exhiben una gran tendencia a asociarse con los diversos componentes presentes en las superficies de las partículas de sedimentos y/o el material en suspensión (Bradford, 1988; Farrington, 1989).

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

Esta asociación, que se verifica en casi todos los sistemas acuáticos, da como resultado una elevada concentración de contaminantes sobre las distintas partículas, considerablemente superior a la que se encuentra en la fase acuosa soluble (Horowitz, 1988). Por consiguiente, la distribución de contaminantes en sedimentos y en el material en suspensión constituye un proceso de fundamental importancia, ligado principalmente a las características físicas, químicas, geológicas e hidrológicas de las cuencas (Bordalo Costa y Peneda, 1989; Marcus, 1989; Pardo et al., 1990).

Ahora bien, frente a cambios en las condiciones ambientales,

como modificaciones en el pH, salinidad, potencial de óxido-reducción, o por la presencia de compuestos quelantes, una proporción variable de los contaminantes presentes en los sedimentos, puede redisolverse pasando a la fase acuosa soluble o ingresando en la biota. La fracción de elementos metálicos susceptible de intercambios con la fase acuosa resulta aún muy difícil de evaluar, ya que varía de acuerdo con la composición básica de las partículas (Horowitz, 1988; Bordalo Costa y Peneda, 1989; Pardo et al., 1990).

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

- * en primer lugar, como atrapantes de numerosos tipos de contaminantes, actuando como principal depósito de acumulación.
- * en segundo, como fuentes potenciales de liberación de sustancias tóxicas al medio.

Entre las partículas de los sedimentos puede distinguirse también una fase acuosa, que se designa como agua de poro o agua intersticial. Esta fase tiene singular interés porque en ella se encuentran niveles de concentración de contaminantes mucho mayores que los registrados en la columna de agua circundante. Estos niveles tan elevados surgen de la liberación de contaminantes a partir de las partículas de sedimentos (Giesy y Hoke, 1990; Landrum y Robbins, 1990).

Otro aspecto que merece destacarse consiste en que la exposición de los distintos organismos biológicos a los contaminantes asociados a los sedimentos y al material en suspensión, puede conducir a la incorporación de dichas sustancias. Esta incorporación puede verificarse por contacto directo y, también, por la ingestión intencional o accidental de partículas, durante el proceso de alimentación. Por consiguiente, el concepto de biodisponibilidad se aplica también para designar a la fracción de un contaminante asociado al sedimento, material en suspensión o presente en el agua de poro, que es susceptible de ser incorporado por los organismos (Luoma, 1988; Landrum y Robbins, 1990; Marcus y Scott, 1990; Luoma y Carter, 1991).

SUPERFICIES BIOLÓGICAS

En líneas generales, podemos decir que los distintos procesos de distribución para los elementos metálicos que acabamos de ver, han sido extensamente estudiados. En cambio, se ha prestado mucha menor atención a los procesos que pueden verificarse entre estos elementos y el material biológico. Recién en los últimos años, se ha tomado conocimiento que las especies metálicas solubles son capaces de interaccionar con diversas superficies biológicas, sin que obligatoriamente se produzca la incorporación en los organismos. Estas interacciones pueden verificarse a través de las paredes celulares de algas; de microorganismos diversos, entre ellos bacterias y hongos, y de las membranas branquiales, en el caso de organismos superiores (Mullen et al.,1989; Handy y Eddy, 1990; Simkiss,1990; Brezonik et al.,1991; Mahan y Holcombe, 1992).

En algunos lagos, se ha comprobado que este tipo de superficies biológicas constituyen el sustrato más relevante, sobre el cual se distribuyen los diversos elementos (Brezonik et al., 1991). Otros autores han demostrado que las paredes bacterianas resultan aún más eficientes que los minerales arcillosos, para adsorber a este tipo de contaminantes (Mullen et al.,1989).

Los mecanismos involucrados en este tipo de interacciones distan de ser simples. Su estudio se dificulta por la gran variedad y cantidad de grupos funcionales que pueden estar presentes en las diversas superficies biológicas (Brezonik et al.,1991). Además, estos fenómenos están fuertemente influenciados por las propiedades físico-químicas del ambiente acuático; especialmente por factores tales como la dureza y el pH de las aguas, y la presencia de diversos aniones o sustancias complejantes (Ferris et al., 1989; Brezonik et al.,1991).

Para la mayoría de los elementos metálicos, las evidencias disponibles hasta el momento, sugieren que estas interacciones transcurren a través de un mecanismo de intercambio iónico (Brezonik et al.,1991; Mahan y Holcombe, 1992). Así, en estudios relativamente recientes, se ha demostrado que, en algunos casos, intervendrían grupos carboxílicos o uniones a través de átomos de S o N, dependiendo del metal en cuestión. Sin embargo, tampoco se descarta que, en otros casos, puedan intervenir uniones de tipo covalente (Mahan y Holcombe, 1992).

Por lo tanto, se ha reconocido la importancia de las superficies biológicas en la distribución de una proporción, aún no bien establecida, de elementos metálicos en sistemas acuáticos. Diversas investigaciones se están realizando para identificar los grupos funcionales y los posibles mecanismos involucrados. Sin embargo, todavía no se ha podido aclarar correctamente el rol que desempeñan estas interacciones en la incorporación de los distintos metales.

Aparentemente en algas, el primer paso, previo a la incorporación, de iones metálicos, consistiría en una adsorción superficial sobre la pared celular. De esta manera, la cantidad de metal que verdaderamente se absorbe sería directamente proporcional a la cantidad presente en la superficie (Brezonik et al., 1991).

En peces, algunos autores consideran que las superficies corporales y el tejido branquial constituyen los primeros sitios de interacción frente a los iones metálicos. Sin embargo, en relación al tejido branquial, aún no se ha podido determinar si se trata de un proceso de adsorción o de absorción (Handy y Eddy, 1990). El esclarecimiento de estos fenómenos de superficie permitiría comprender no sólo los procesos de distribución de elementos metálicos en sistemas acuáticos, sino también los posibles mecanismos involucrados en la toxicidad y acumulación de metales en la biota (Simkiss, 1990).

III.4. PROCESOS DE TRANSFORMACIÓN

Anteriormente ya se ha señalado que las sustancias químicas contaminantes pueden sufrir, en el ambiente, una serie de transformaciones que conduzcan a la formación de productos, los cuales pueden exhibir una mayor, menor o similar actividad biológica con respecto al inicialmente liberado. Dichas transformaciones pueden verificarse exclusivamente mediante reacciones químicas puras, y se reconocen como procesos abióticos; o bien, por medio de la participación de algún organismo vivo, recibiendo el nombre de procesos bióticos o de biodegradación (Korte, 1978; Alexander, 1980).

Los agentes bióticos más estudiados consisten en diversas poblaciones microbianas, principalmente bacterias heterotróficas y hongos (Alexander, 1980; Leisinger, 1983); como así también en ciertos organismos vegetales, entre los que se incluyen diversas especies de algas y macrofitas acuáticas (Brix y Schierup, 1989).

Experiencias de laboratorio relativamente simples nos permiten poner en evidencia la ocurrencia de transformaciones químicas mediadas por microorganismos. Para ello, se incubaba el compuesto de estudio en el medio apropiado: (a) en condiciones estériles y (b) en condiciones no estériles. De esta manera, si se comprueba que se verifica mayor transformación, o si ésta es más rápida en el caso (b) con respecto al (a), podemos inferir entonces la intervención de microorganismos (Alexander, 1980).

Sin embargo, en la literatura todavía se discute la verdadera relevancia e incidencia de cada uno de esos procesos en la transformación de numerosos contaminantes (Korte, 1978; Alexander, 1980). De hecho, los procesos de transformación pueden incluir una o, más generalmente, varias etapas y debido a la complejidad del medio en que se verifican, tanto sea por sus características físico-químicas como por la multiplicidad de organismos presentes, los productos intermedios así como los mecanismos involucrados aún no han sido completamente reconocidos (Kelly et al., 1987).

Por ejemplo, aunque pueda resultar sorprendente, todavía se dispone de escasa información acerca de las posibilidades de biodegradación en ambientes marinos para muchas de las sustancias químicas que pueden estar presentes en las descargas industriales. Generalmente, se desconoce si aun aquellos contaminantes que

demonstraron ser biodegradables en sistemas de aguas dulces o en suelos, también podrán serlo en sistemas marinos. En éstos predominan condiciones ambientales muy diferentes en cuanto a salinidad y a un estado relativamente oligotrófico, que conlleva a la selección de comunidades microbianas específicas (Nyholm y Kristensen, 1992; Nyholm et al., 1992).

Pese a estas limitaciones, se considera que para la mayoría de los contaminantes ambientales, los valores iniciales de concentración son bajos y la velocidad con que se transforman puede responder a una cinética de pseudo primer orden. De esta manera, el tiempo necesario para reducir la concentración a la mitad de su valor original, o sea el tiempo de vida media: $t_{1/2}$, puede ser considerado como un buen parámetro para comparar la magnitud de las transformaciones entre las diversas sustancias químicas (Connell, 1987).

Entre las transformaciones abióticas que pueden verificarse en el ambiente se destacan las siguientes: reacciones fotoquímicas diversas, volatilización, hidrólisis, oxidación y procesos de sedimentación y/o adsorción a las superficies (Korte, 1978; Cripe y Pritchard, 1990). Éstos últimos son los que, en general, tienen mayor relevancia en relación a los contaminantes metálicos inorgánicos en sistemas acuáticos. Se verifican a través de la formación de complejos con compuestos orgánicos o inorgánicos presentes en las diversas partículas del material en suspensión o en los sedimentos del lecho. Estas reacciones dependen marcadamente del pH del medio y de la naturaleza de las sustancias complejantes, así como del elemento en cuestión (Korte, 1978). Además, como ya se ha mencionado, desempeñan un factor clave en la especiación y distribución de los metales.

Las transformaciones bióticas, o de biodegradación, incluyen un espectro mucho más amplio y variado de reacciones, entre las que se incluyen oxidaciones de átomos de O, N, S o de grupos metilos; reducciones de dobles o triples enlaces, o de grupos sulfóxidos; deshalogenación, desaminación, descarboxilación, formación de epóxidos, hidroxilación; formación de cetonas; hidrólisis de grupos ésteres, éteres, etc., por citar sólo algunos de los ejemplos más relevantes (Alexander, 1980; Leisinger, 1983).

Obviamente, sería imposible pretender detallar toda la información relativa a los procesos de transformación de sustancias

químicas en el medio ambiente. Sin embargo, no pueden dejar de señalarse algunas de sus principales consecuencias.

Muchas moléculas orgánicas de cierto grado de complejidad, tanto de origen natural como sintético, son susceptibles de ser metabolizadas por diversos microorganismos, los cuales, en muchos casos, las emplean como fuente de hidratos de carbono para la biosíntesis de sus constituyentes celulares (Alexander, 1980). Por consiguiente, estos procesos de biodegradación conducen, en forma más o menos directa, a la mineralización de dichos compuestos, con su consecuente pérdida o disminución de la toxicidad y acción biológica.

Esta capacidad de transformación de los microorganismos ha constituido el principio básico para su aplicación en las plantas de tratamiento de efluentes industriales o domésticos (Leisinger, 1983; Ghisalba, 1983). Los constantes trabajos de investigación han posibilitado la aislación, ya sea por selección natural o, más recientemente, por medio de técnicas de ingeniería genética, de microorganismos con capacidad para degradar una amplia variedad de contaminantes, algunos de ellos con alto potencial de toxicidad, como los hidrocarburos aromáticos policíclicos, pesticidas diversos o compuestos organoclorados, previo a su liberación en el ambiente (Cook et al., 1983; Finn, 1983; Ghisalba y Küenzi, 1983 a y b; Johnson y Talbot, 1983; Motosugi y Soda, 1983; Wiesel et al., 1993).

Ahora bien, cuando las descargas con alto contenido de sustancias químicas se liberan directamente al medio ambiente, por ejemplo sobre sistemas acuáticos, se puede generar un estado de abundancia de nutrientes o de eutroficación. En estos casos, la degradación de dichas sustancias constituye un proceso ligado a un marcado incremento en la población de ciertas especies, que se hace evidente, por ejemplo, a través de los conocidos florecimientos desmedidos de algas. Estos florecimientos han provocado mortandad de peces, invertebrados o incluso de otras especies de algas, principalmente como consecuencia de una depleción del oxígeno disuelto en el agua (Alexander, 1980; Sangfors, 1988).

No debe olvidarse, además, que los procesos de transformación también pueden ser responsables de la generación de compuestos con mayor toxicidad. Se ha demostrado, por ejemplo, que la formación de metil mercurio, derivado orgánico aún más tóxico que

las especies inorgánicas de ese metal, puede verificarse tanto por mecanismos abióticos como bióticos (Goyer, 1991; Menzer, 1991).

En forma análoga, se ha comprobado la formación de ciertos compuestos aromáticos policlorados, a partir de efluentes que contienen altos niveles de hidrocarburos e iones cloruro (Metcalf, 1993).

Algunos de los productos originados por reacciones de transformación exhiben incluso propiedades cancerígenas, como en el caso de las nitrosoaminas. Entre los precursores orgánicos de dichos compuestos se encuentran las aminas terciarias y secundarias o los compuestos de nitrógeno cuaternario, los cuales suelen estar ampliamente difundidos en descargas industriales. Un potencial precursor inorgánico, el nitrito, es continuamente generado en suelos y aguas, ya sea a partir de iones amonio, durante la nitrificación, o a partir de iones nitrato (Alexander, 1980).

PERSISTENCIA DE ALGUNOS CONTAMINANTES

Merece destacarse que no todas las sustancias químicas son susceptibles de ser fácil y rápidamente degradadas. Algunos autores consideran que, en líneas generales, las transformaciones abióticas raramente conducen a cambios apreciables en la estructura química. Por lo tanto, dichos procesos no son capaces de convertir totalmente las moléculas orgánicas, de cierto grado de complejidad, en productos inorgánicos. Por otro lado, la comunidad microbiológica también carece de lo que podríamos llamar una "omnipotencia catabólica" (Alexander, 1980; Leisinger, 1983). Entre ellas pueden citarse las siguientes: plásticos diversos, polímeros sintéticos, algunos hidrocarburos aromáticos policíclicos o policlorados, ciertos pesticidas, etc. (Wesén et al., 1990).

Es decir, no todos los compuestos químicos presentes en el ambiente sirven de substratos óptimos para el metabolismo biótico, algunos de ellos únicamente pueden ser incluso parcialmente comestabilizados (Alexander, 1980).

Podríamos asumir, entonces, que frente a ciertas moléculas, existe una resistencia natural para la transformación, por la

cual éstas tenderán a permanecer inalteradas en los diversos compartimientos o subcompartimientos, por un cierto período. Esto de ninguna manera quiere significar que la transformación sea imposible, sino que ésta transcurrirá en un tiempo considerablemente más largo. Como consecuencia de ello, se verificará el fenómeno de persistencia de esos compuestos, los cuales conforman uno de los grupos de sustancias de mayor interés para la ecotoxicología (Connell, 1987; Landner, 1988; Farrington, 1989).

Muchas pueden ser las causas que conducen a la persistencia de ciertos contaminantes.

Cualquier factor estructural que impida o retarde el ataque de las sustancias por parte de los microorganismos también puede favorecer su persistencia. Los compuestos insolubles, como ciertos polímeros sintéticos, o aquellos que han sido fuertemente adsorbidos por el material particulado o coloidal, escapan o dificultan el ataque degradativo (Alexander, 1980; Leisinger, 1983). En el caso de los metales, es una consecuencia directa por tratarse de sustancias químicas elementales. Otras causas, se deben a factores ambientales, como por ejemplo la ausencia o disminución de oxígeno, que impide o dificulta la actividad microbiana (Alexander, 1980). Finalmente otras, más enigmáticas, se relacionan con teorías de la evolución biológica. ¿Cómo puede ser capaz un ser vivo de actuar sobre estructuras químicas sintéticas de alto grado de complejidad y que además, en algunos casos, difieren marcadamente de los productos naturales? Indudablemente, no es fácil hallar una respuesta (Alexander, 1980; Leisinger, 1983).

Retomemos ahora el análisis del fenómeno de persistencia en su relación con el interés ecotoxicológico. Estrictamente, ¿por qué importan estas sustancias?. ¿Por ser tóxicos potentes? Si nos referimos a compuestos tales como las dioxinas, indudablemente la respuesta será afirmativa. Por el momento, las dioxinas figuran entre las sustancias más tóxicas producidas por el hombre (Kesten 1990). Sin embargo, otras sustancias persistentes son, en sí mismas, de muy escasa toxicidad y, aún así, constituyen un verdadero problema para el ambiente. Por ejemplo, la enorme cantidad de diversos residuos plásticos no degradables (Alexander, 1980). Por tanto, la clave que nos permite privilegiar a las sustancias persistentes, aún cuando difieran marcadamente entre sí por su toxicidad intrínseca, la constituye la acumulación de dichos productos en el ambiente.

III.5. PROCESOS DE TRANSPORTE

De un modo u otro, ya hemos mencionado, en forma más o menos explícita, algunos de los procesos de transporte involucrados en la dispersión de sustancias químicas contaminantes.

Al reseñar su importancia ambiental, destacamos que muchos elementos metálicos planteaban problemas de contaminación a nivel global. Esta situación no surge como resultado de una emisión global, sino que es una directa consecuencia de la acción de los procesos de transporte.

Por consiguiente, según sea la incidencia de los fenómenos de transporte sobre las distintas fuentes de emisión, el alcance de la contaminación resultante puede ser categorizado como local, regional o global (Korte, 1978). Obviamente, todas aquellas sustancias que se caractericen por su persistencia en el ambiente, tienen mayores posibilidades de ser ampliamente dispersadas, más allá del área de emisión (Korte, 1978).

En líneas generales, no resulta exagerado afirmar que los distintos fenómenos climáticos, vientos y precipitaciones pluviales, constituyen los medios más relevantes para el transporte de los diversos contaminantes. Los vientos posibilitan la dispersión de las sustancias presentes en la atmósfera, ya sea en forma de gases, vapores, o asociados con partículas. También favorecen la dispersión de las diversas partículas del suelo. A su vez, por medio de las deposiciones, secas o húmedas, dichas sustancias pueden alcanzar los sistemas acuáticos o terrestres (Truhaut, 1977; Korte, 1978; Connell, 1987). De esta manera, es posible explicar la presencia de compuestos persistentes en zonas sobre las que ni siquiera se han verificado emisiones o aplicaciones.

Por ejemplo, el DDT fue detectado en aguas de deshielos de la Antártida. Esta sustancia es relativamente volátil y exhibe una notable tendencia a adsorberse sobre las superficies. Por ello, se evapora fácilmente de las aplicaciones de polvo o rocío, asociándose a las partículas atmosféricas, quedando así sujeto a un proceso de dispersión, por acción de los vientos. En esta forma, puede recorrer grandes distancias; pero al acercarse a las zonas polares, la disminución de la temperatura promueve su condensación y, de este modo, termina por depositarse en dichas zonas (OPS-OMS, 1982; Metcalfe, 1993). A pesar que el DDT ha sido

prohibido en casi todos los países desarrollados, su uso continúa en muchas de las naciones en vías de desarrollo (OPS-OMS, 1982; Mangla, 1988).

El uso de naftas adicionadas con derivados alquilados de plomo, como antidetonantes, es también otra realidad en muchas regiones. Ya anteriormente hemos mencionado que constituye la mayor fuente de emisión de este metal. Se ha estimado que cerca de un 75 % de plomo se emite a la atmósfera, tras la combustión de dichas naftas; en su mayor parte, asociado a partículas. De dichas emisiones, aproximadamente un 50 % se deposita en un área relativamente cercana, mientras que el 25 % restante resulta dispersado por acción de los vientos, depositándose en áreas más alejadas. Estas deposiciones constituyen una importante vía para la dispersión del metal en sistemas acuáticos y/o terrestres (Morgan y Bretthauer, 1977).

Los procesos de transporte suelen ser "responsables" de que algunos países sufran problemas de contaminación por sustancias químicas emitidas por naciones vecinas. Kabala (1988) consideraba que en la entonces República de Yugoslavia, la emisión de SO₂ gaseoso era relativamente baja. Sin embargo, padecían los efectos de la lluvia ácida, como meros importadores del SO₂ liberado por las naciones más industrializadas de Europa.

Situaciones análogas se pueden verificar cuando dos o más naciones comparten una misma cuenca hídrica (Ayala, 1987). Muchas veces se ha discutido en nuestro país acerca de la construcción de represas en Paraguay o Brasil, por los efectos adversos que pueden producir sobre la cuenca del Plata. Del mismo modo, la liberación de efluentes contaminados no respeta fronteras. Por ello, suele preocuparnos el empleo de grandes cantidades de mercurio para la extracción de oro mediante la formación de amalgamas, técnica ampliamente difundida en la selva amazónica. La mayor parte de ese mercurio se libera posteriormente a los cursos de agua, algunos de los cuales alimentan los sistemas acuáticos del noreste argentino (Malm et al., 1990; Nriagu, en prensa).

En sistemas acuáticos, muchas veces, es difícil separar los procesos de distribución de los de transporte, puesto que las diversas fases, o subcompartimientos, disponibles para la distribución de los contaminantes, promueven simultáneamente su transporte. Así, la propia fase acuosa soluble está expuesta a la dinámi-

ca propia del sistema, de acuerdo con sus características hidrológicas. Los coloides y el material particulado serán arrastrados por las corrientes, favoreciendo la movilización de los contaminantes adsorbidos o asociados a sus superficies. Incluso, la parte superior de los sedimentos del lecho, está expuesta a un desplazamiento, si bien menor que en los casos anteriores, por efecto de las corrientes de fondo (Means y Wijayaratne, 1982; Baker et al., 1983; US Geological Survey, 1987; Booij, 1993).

III.6. EFECTOS SOBRE LOS ORGANISMOS

La incorporación de sustancias químicas en los organismos se puede producir a través de dos vías (Salanki et al., 1982; Connell, 1987; Farrington, 1989; Depledge, 1990; Hogstrand y Haux, 1991):

- * por exposición ambiental
- * mediante la ingesta de alimentos, entre los cuales pueden incluirse otras especies biológicas.

A continuación, tendrán lugar los procesos de absorción, distribución, metabolismo y eliminación, que constituyen las etapas de la toxicocinética. De ellas dependerá el tiempo de residencia de las sustancias tóxicas en los organismos y el acceso a los blancos críticos responsables de la toxicidad (Klaassen y Rozman, 1991; Sipes y Gandolfi, 1991).

Se requiere de un acabado conocimiento de la biología y, particularmente, de la fisiología de cada especie para poder establecer la importancia y magnitud de cada uno de esos procesos, los cuales pueden asumir características muy distintas, según se trate de organismos vegetales o animales. Aún entre éstos, pueden existir diferencias apreciables entre vertebrados e invertebrados. Por consiguiente, cada uno de esos aspectos debe ser encarado dentro del marco biológico específico de cada organismo. En adición, merece señalarse que cuando se trata de organismos acuáticos, muchas de las características biológicas y fisiológicas básicas, así como también los mecanismos disponibles para cada proceso, los cuales constituyen el sustento para los aspectos toxicológicos, aún no han sido completamente detallados o convenientemente esclarecidos (Depledge, 1990; Hogstrand y Haux, 1991; Malins y Ostrander, 1991).

La incorporación de sustancias químicas en los organismos puede inducir un rango muy amplio y variado de respuestas, algunas letales, otras subletales. Lamentablemente, en general, las correlaciones entre la exposición a los contaminantes y los efectos biológicos resultantes no siempre son obvias (Connell, 1987; Depledge, 1989). Entre las potenciales respuestas, el fenómeno de bioacumulación de contaminantes exhibe una particular relevancia y por sus características se tratará separadamente.

BIOACUMULACIÓN, BIOCONCENTRACIÓN Y BIOMAGNIFICACIÓN

Cuando el proceso de incorporación supera al de eliminación, puede ocurrir que los organismos presenten mayores niveles de ciertas sustancias químicas en sus tejidos, en relación con los que se encuentran en su entorno ambiental y/o en sus alimentos. Este fenómeno, conocido con el nombre de **bioacumulación**, ha sido ampliamente registrado en la literatura (Swedish EPA, 1990; Walker, 1990; Malins y Ostrander, 1991).

Conceptualmente, el término bioacumulación se define como el ingreso o la retención de sustancias químicas en los organismos por cualquier vía (Landrum y Robbins, 1990; Swedish EPA, 1990; Walker, 1990; Metcalfe, 1993). Si, en cambio, el ingreso de contaminantes se verifica exclusivamente a través de la fase acuosa, entonces recibe el nombre de **bioconcentración** (Swedish EPA, 1990; Metcalfe, 1993). Cuando la incorporación se produce a través de la ingesta de alimentos, se denomina **biomagnificación** (Finerty et al., 1990; Streit, 1992; Metcalfe, 1993).

Suele existir una cierta confusión en relación a los términos de bioacumulación y bioconcentración, los cuales, algunas veces, son usados como sinónimos, especialmente en relación a organismos acuáticos. En la naturaleza, resulta en general muy difícil poder establecer la proporción de un contaminante que ingresa por una u otra vía. De este modo, la distinción entre ambos términos suele ser más teórica que real y, por ello, algunos autores prefieren usarlos en forma indistinta (Streit, 1992).

Históricamente, estos procesos comenzaron a ser evidentes a fines de la década del '50 y principios de la del '60. Por ese entonces, se registraron altos niveles de ciertos insecticidas organoclorados, tales como DDT, dieldrin o heptacloro, en tejidos de diversas especies de pájaros, particularmente de predadores. Pudo comprobarse que este tipo de compuestos era acumulado en los tejidos grasos de los organismos y, luego, transferido a través de las cadenas alimentarias. Posteriormente, fenómenos de biomagnificación fueron comprobados en relación a otros compuestos clorados, como por ejemplo ciertos bifenilos policlorados y dioxinas, en ecosistemas acuáticos y terrestres (Walker, 1990).

Diversas razones impulsan a la comprensión detallada del fenómeno de bioacumulación. Este proceso puede aumentar la

persistencia de diversas sustancias químicas en el ecosistema, dado que cuando éstas se fijan en los diversos tejidos de los organismos, quedan impedidas de sufrir procesos directos de degradación, ya sean físicos o químicos. Por otra parte, aquellos contaminantes que inicialmente quedan secuestrados en determinados sistemas celulares a fin de eliminarlos de circulación y disminuir su potencial tóxico, pueden, bajo ciertas condiciones, como por privación de alimentos, liberarse de dichos depósitos y recircular ejerciendo efectos adversos para la salud del organismo. Por último, los predadores de esos organismos se enfrentan a los fenómenos de biomagnificación a través de las cadenas alimentarias (Streit, 1992).

Ahora bien, merece destacarse que no todas las sustancias, son igualmente susceptibles de ser bioacumuladas. En relación a compuestos orgánicos se pudo establecer que aquellas que sí lo hacen, tienen en común una serie de propiedades (Streit, 1992):

- * alta lipofilicidad
- * baja solubilidad en agua
- * carecen de carga neta o se ionizan con dificultad
- * peso molecular relativamente bajo
- * alta persistencia ambiental.

Estas propiedades posibilitan una gran incorporación a través de las membranas biológicas, mediante simples mecanismos de difusión pasiva. Una vez incorporados, sufren escasos o nulos procesos de metabolización y se eliminan muy lentamente, promoviendo su acumulación. Como exhiben un tiempo de vida media largo, se puede verificar su transferencia a través de las cadenas alimentarias (Streit, 1992).

Teniendo en cuenta que ciertos elementos metálicos son requeridos en algunos procesos biológicos, los organismos han desarrollado diversos mecanismos para concentrarlos. En forma análoga, los elementos tóxicos, cuando se presentan en altos niveles, pueden ser incorporados y acumulados. El grado de bioacumulación de metales resulta muy variable para los distintos elementos y entre las diversas especies del ecosistema. Además, depende de los niveles ambientales y de los hábitos nutricionales y posición del organismo en la escala zoológica (Waldichuk, 1974; Depledge, 1990).

Tratando de establecer un cierto marco de referencia, Streit (1992) considera que los cationes metálicos del grupo B son los que, por sus propiedades físico-químicas y capacidad para formar complejos con ligandos que tengan átomos de S o N, tienen mayores posibilidades de ser bioacumulados. Típicos elementos de este grupo son: Ag^+ , Au^+ , Hg^{2+} y Tl^{3+} . Por su parte, los representantes del grupo A, como los alcalinos, alcalino-térreos y los cationes: Al^{3+} , Cr^{3+} , Fe^{3+} , entre otros, tienen las menores posibilidades. Los cationes con propiedades intermedias, como Co^{2+} , Ni^{2+} y Pb^{2+} , se encuentran más cerca del comportamiento de los elementos del grupo A. En cambio, los iones Cd^{2+} , Cu^{2+} y Tl^+ , están más cerca de los del grupo B.

Los compuestos orgánicos de ciertos metales, como los aril- o alquil-mercuriales, metil o fenil estaño, que son altamente lipofílicos, pueden ser fácilmente bioacumulados y presentar también una transferencia a través de las cadenas alimentarias (Magos, 1975; Bryan y Gibbs, 1991; Streit, 1992).

Parámetros de bioacumulación y de bioconcentración

Como consecuencia de una incorporación previa de contaminantes por un dado organismo, durante un cierto período, se pueden alcanzar niveles de concentración en sus tejidos prácticamente constantes, de tal manera que el proceso llega a un estado estacionario (Swedish EPA, 1990; Streit, 1992). Bajo estas condiciones, el grado de bioacumulación o de bioconcentración puede ser cuantificado mediante diversos parámetros. Así, puede ser expresado en términos de concentraciones de masa, esto es la cantidad de compuesto químico X por unidad de biomasa; por el peso del organismo, seco o húmedo; o por cantidad de lípidos, especialmente empleado frente a compuestos altamente lipofílicos (Streit, 1992). Otra forma de expresión, ampliamente difundida, consiste en el empleo de los llamados factores de bioacumulación o de bioconcentración, FBA o FBC, respectivamente. Estos factores son adimensionales. Se obtienen mediante el cociente entre la concentración del compuesto X en el organismo, o algún tejido específico, y su concentración en algún compartimiento o subcompartimiento del sistema acuático (fase acuosa total, fase acuosa soluble, sedi-

mentos, etc.) o en los alimentos (Swedish EPA, 1990, Walker, 1990; Streit, 1992).

$$\text{factor de bioacumulación: FBA} = \frac{|x| \text{ en org. entero}}{|x| \text{ en agua y/o alimento}}$$

$$\text{factor de bioconcentración: FBC} = \frac{|x| \text{ en org. entero}}{|x| \text{ en fase ambiental}}$$

$|x|$ = concentración de sustancia X

RESPUESTAS DE LOS ORGANISMOS

Los organismos disponen de estrategias muy variadas, en muchos casos también considerablemente complejas, para responder a las múltiples perturbaciones que se suceden en su medio ambiente (Dorigan y Harrison, 1987).

Cualquiera sea el origen y la naturaleza del agente estresante, natural o antropogénico, químico o físico, cada organismo tiene una dada capacidad para hacerle frente, elaborando respuestas tendientes a disminuir su impacto. Este proceso implica un determinado costo energético para el organismo, ya que debe dirigir y concentrar sus reservas en la elaboración de dichas respuestas. Por consiguiente, la energía que inicialmente estaba disponible para el desarrollo de diversos procesos vitales, como crecimiento o reproducción, podrá resultar seriamente disminuída (Mulvey y Diamond, 1991).

En primer lugar, hay que tener en cuenta que los organismos, de por sí, disponen de respuestas adaptativas normales, para hacer frente a ciertos cambios naturales que se suceden, aun, en un medio acuático no perturbado. Por consiguiente, existe una "zona de homeostasis", dentro de la cual el organismo podrá desarrollarse en condiciones saludables (Depledge, 1989).

Uno de los objetivos básicos de la ecotoxicología consiste en establecer el punto a partir del cual, el organismo se ve obliga-

do a apartarse de dichas condiciones, por efecto de las perturbaciones ambientales (Luoma y Carter, 1991). En estas circunstancias, las respuestas que elabore el organismo dependerán de la intensidad, frecuencia y duración del agente agresor (Kelly y Harwell, 1989).

Cuando se trata de una exposición a altos niveles de contaminantes y de breve duración, se suele denominar como "perturbación aguda". Usualmente, estos altos niveles de concentración son consecuencia de derrames o descargas accidentales de sustancias tóxicas, o de su aplicación intencional, cuando se trata de herbicidas o plaguicidas. En contraste, las perturbaciones crónicas se deben a una serie constante o alternada de exposiciones que presentan concentraciones comparativamente más bajas de contaminantes (Weinstein y Birk, 1989; Schaeffer, 1991).

Los efectos resultantes de ambos tipos de perturbaciones se clasifican también como agudos o crónicos, teniendo en cuenta la magnitud y duración de las respuestas. Así, los efectos agudos son aquellos que se manifiestan como daños severos, generalmente visibles en un corto período, de aproximadamente 12 a 24 horas. Por su parte, los efectos crónicos, generalmente no resultan evidentes en el corto plazo y, cuando lo son, persisten durante un cierto tiempo, variable según las circunstancias. Intuitivamente, los efectos crónicos reflejan una patología que evoluciona muy lentamente y en forma poco apreciable (Weinstein y Birk, 1989; Schaeffer, 1991).

Erróneamente, a veces suele considerarse que a partir de una perturbación aguda únicamente se verificarán efectos o respuestas agudas. En forma análoga, cuando se trata de una perturbación crónica. Diversas situaciones reales desmienten esa creencia. Los efectos pueden ser agudos o crónicos independientemente de la magnitud de la exposición (Schaeffer, 1991).

En una primera etapa, la perturbación provocará un deterioro progresivo de la salud del organismo, desviándolo de su estado de homeostasis, el cual estará acompañado por la elaboración de respuestas compensatorias. Superado el límite de compensación, se manifestará un estado patológico, en el cual el organismo ya estaría perdiendo o saturando su capacidad de respuesta para hacer frente con éxito a la continuidad de la agresión (Depledge, 1989; Luoma y Carter, 1991). Sin embargo, en determinados casos,

por ejemplo si cesa la perturbación o si ésta no es demasiado intensa, se pueden todavía poner en juego mecanismos de reparación, que actúen con la rapidez suficiente como para restablecer las respuestas compensatorias, revirtiendo el proceso patológico. De lo contrario, cuando la perturbación conduce a severos daños morfológicos y alteraciones metabólicas significativas, que provoquen importantes pérdidas celulares y tisulares, o alteren en forma permanente algún proceso fisiológico vital, la respuesta final será la muerte del organismo (Depledge, 1989; Weinstein y Birk, 1989). Depledge (1989) esquematizó gráficamente estos conceptos, en una forma muy práctica y sintética, que transcribimos en la Figura 6.

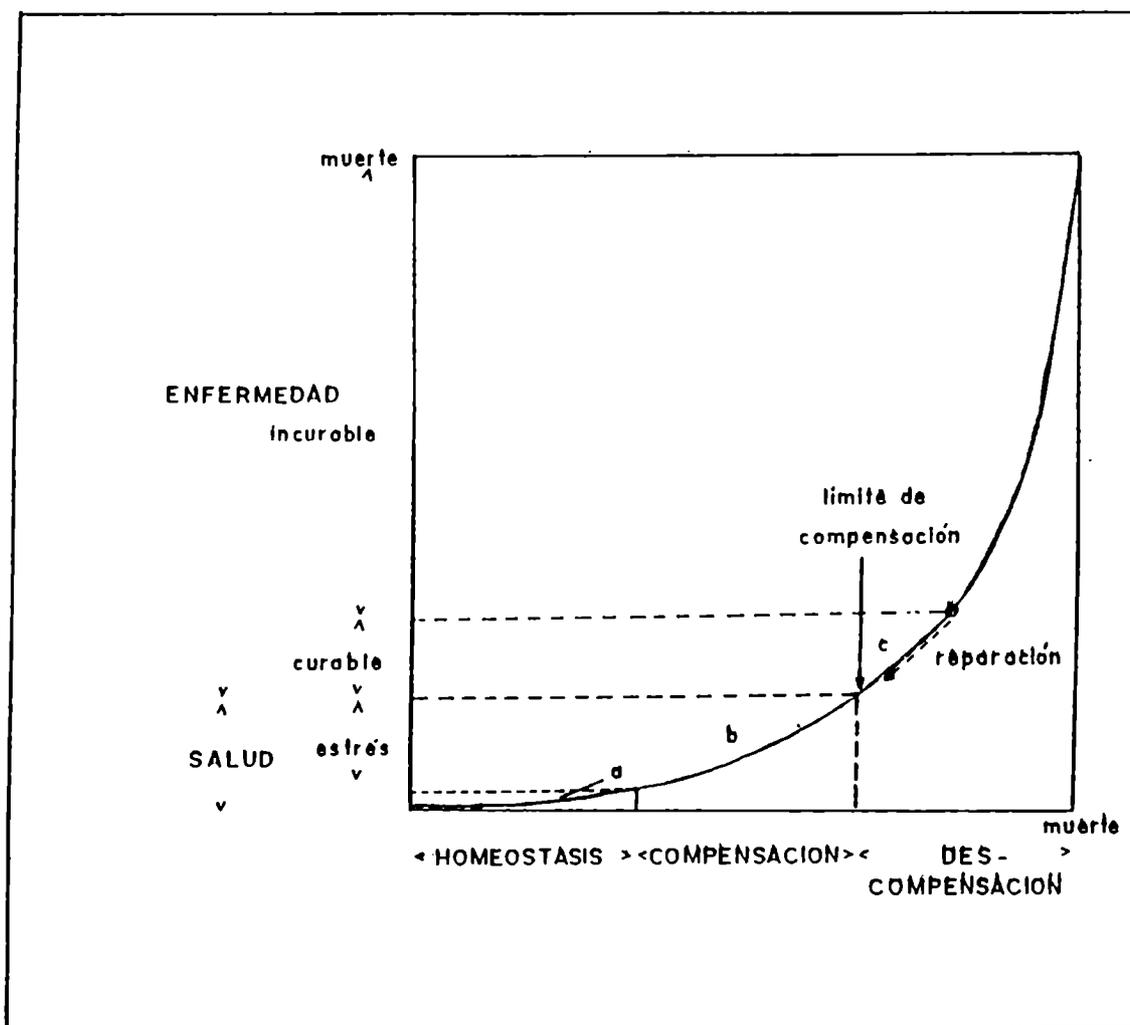


Fig. 6.: Esquema de la magnitud del deterioro de los organismos en función de la incapacidad resultante, según Depledge (1989).

Algunas de las respuestas que elabora un organismo son consideradas como específicas o selectivas, ya que únicamente se ponen de manifiesto frente a uno o unos pocos contaminantes, los cuales presentan estructuras químicas estrechamente relacionadas, de tal manera que pueden compartir o competir por los mismos mecanismos de acción. Otras, en cambio, son de tipo general o inespecíficas. Surgen como consecuencia del costo energético involucrado en la estrategia defensiva que opone el organismo frente al estrés y, por ende, se verifican frente a una gran variedad de sustancias tóxicas, aún cuando éstas no tengan relación entre sí (Dorigan y Harrison, 1987; Viarengo y Canesi, 1991).

Finalmente, debemos destacar que los organismos en la naturaleza están expuestos a la acción simultánea de numerosas sustancias químicas, naturales o sintéticas. Por consiguiente, cuando se trata de establecer la toxicidad de un dado contaminante debería tenerse presente que éste puede interactuar con todas las otras sustancias presentes en el ambiente.

Los efectos resultantes de la exposición conjunta del organismo al contaminante y a los distintos constituyentes del sistema se pueden clasificar en cuatro categorías. Como similares o disímiles, dependiendo de si los sitios de acción primaria son los mismos o son diferentes a los observados para el tóxico solamente. Como interactivos o no interactivos, dependiendo, en este caso, de si se producen o no interacciones entre ambos componentes (Broderius, 1991).

De este modo, las respuestas de los organismos en sistemas naturales resultan muy variadas y muy difíciles de predecir, aunque ya han sido propuestos algunos modelos para esclarecer estos aspectos (Broderius, 1991).

RESISTENCIA Y TOLERANCIA

Ahora bien, como ya hemos señalado, algunas poblaciones resultarán más sensibles que otras frente a una dada condición de estrés. También, dentro de una misma población hay que considerar que cada individuo presenta características fisiológicas y bioquímicas particulares, por tanto la magnitud de la respuesta que

sea capaz de elaborar será consecuencia de su propio microhábitat, así como de las diferencias en el sexo, la edad, el tamaño y estado nutricional del organismo. Incluso, salvo en circunstancias especiales, existen variaciones genéticas entre los individuos de una misma población (Mulvey y Diamond, 1991).

Por consiguiente, mientras algunas especies padecen una disminución drástica de su población, otras son capaces de hacer frente y superar exitosamente la situación adversa, llegando, incluso, a incrementar su número. Este fenómeno es consecuencia, en parte, de la disminución de competencia, por ejemplo en relación a la disponibilidad de nutrientes (Mulvey y Diamond, 1991).

El fenómeno de resistencia a los contaminantes está ampliamente documentado en la literatura y, en algunos casos, lo podemos comprobar en nuestra propia experiencia diaria. Numerosas especies plagas han adquirido resistencia a diversas clases de plaguicidas.

Básicamente, este fenómeno, se puede verificar a través de dos mecanismos (Klerks y Levinton, 1989):

- * **Adaptación genética:** Cuando la presencia de contaminantes conduce a una selección natural de las especies intrínsecamente más resistentes, o que han sido capaces de exhibir una variación genética adecuada.
- * **Adaptación o Aclimatación fisiológica:** En este caso, su desarrollo es consecuencia de una exposición previa del organismo a la sustancia química (Dorigan et al., 1987). Se verifica a través de una serie de procesos que comprenden desde la regulación del ingreso de los contaminantes, pasando por su distribución, metabolismo tisular y/o celular, hasta la eliminación de dichas sustancias.

Según algunos autores, el término de resistencia está reservado exclusivamente para designar al proceso de adaptación genética, mientras que el de adaptación fisiológica recibe el nombre de tolerancia (Goldstein et al., 1974; Alikhan, 1993). Otros, en cambio, suelen utilizar ambos términos en forma indistinta; aunque sí quedan bien delimitados los diferentes mecanismos involucrados en cada caso (Klerks y Levinton, 1989; Mulvey y Diamond, 1991; Posthuma et al., 1992).

Cuando se verifica una resistencia por adaptación genética, las nuevas generaciones de esa especie, exhibirán igualmente el mismo comportamiento de sus progenitoras. Si, en cambio, se produce una adaptación fisiológica, ésta no será transmitida a las futuras generaciones.

Para determinar si se ha producido una adaptación genética, basta con estudiar el comportamiento, en condiciones controladas de laboratorio, de las progenies nacidas y criadas en un ambiente libre de contaminantes. Se prefiere, incluso, el empleo de progenies de segunda generación, para disminuir la posible influencia de efectos maternos directos (Klerks y Levinton, 1989; Posthuma et al., 1992). No obstante, estos estudios están sujetos a las reales posibilidades de mantener y, especialmente, criar a los organismos en condiciones de laboratorio (Klerks y Levinton, 1989).

En la mayoría de las situaciones observadas en la naturaleza, suele resultar bastante difícil distinguir entre ambos mecanismos. Para establecer si se han producido cambios fisiológicos, a fin de desarrollar una aclimatación, se requiere de un conocimiento detallado de todos los procesos toxicocinéticos potencialmente involucrados (Klerks y Levinton, 1989).

Por el momento dejaremos la descripción de los mecanismos involucrados en el desarrollo de adaptación fisiológica frente a elementos metálicos, para retomarlo al estudiar los efectos de dichos contaminantes en los organismos acuáticos (punto V).

ORIGEN DE LAS RESPUESTAS Y PROPAGACIÓN DE LOS EFECTOS SOBRE LOS ECOSISTEMAS

Algunas sustancias químicas presentan escasa o nula toxicidad, o bien se transforman muy rápidamente en productos no tóxicos, de tal modo que aún dentro de un amplio rango de concentraciones, no se observan alteraciones apreciables o significativas en el ecosistema. En otros casos, dependiendo fundamentalmente de los niveles y la frecuencia de exposición, los efectos tóxicos que pudieran provocar en determinadas especies, son revertidos por los diversos mecanismos de reparación. No obstante, frente a ciertas sustancias, aún cuando se encuentren en concentraciones relativamente bajas, se desencadenarán efectos tóxicos que en principio

afectarán a aquellas poblaciones más sensibles, pero seguidamente comprometerán a toda la comunidad.

Los efectos tóxicos de las sustancias químicas en los organismos vivos se originan invariablemente a través de las interacciones nocivas que se verifican a nivel subcelular. Estos efectos suelen ser caracterizados como "primarios" y se pueden manifestar mediante la inducción o inhibición de diversas actividades enzimáticas; cambios estructurales en las membranas celulares o de ciertas organelas; alteraciones en el metabolismo de los hidratos de carbono, lípidos o proteínas; interacciones con ácidos nucleicos, entre los factores más relevantes. En esta etapa, los efectos tóxicos pueden llegar a ser revertidos por los mecanismos de reparación del organismo. Pero, si esto no ocurriera, comenzarán a propagarse, con mayor o menor intensidad, a nivel tisular, pudiendo alcanzar los distintos órganos del receptor. Cuando este tipo de lesiones progresan, queda comprometida la supervivencia de dicho individuo. A partir de la mortalidad de los individuos, se puede afectar, en forma significativa, su población. Los cambios en una población provocan alteraciones en la comunidad a la que pertenece y de este modo compromete al ecosistema (Haux y Förlin, 1988; Weistein y Birk, 1989).

Por consiguiente, los efectos de los contaminantes pueden ser estudiados en cada uno de los diferentes niveles de organización biológica, según se representa esquemáticamente en la Figura 7.

Conceptualmente, existen dos enfoques opuestos para evaluar el impacto ambiental. Uno de ellos, consiste en la llamada "aproximación holística" (de "arriba hacia abajo"). A través de este enfoque se intenta evaluar los cambios que se producen a nivel de las comunidades o de las poblaciones. En forma experimental, estas evaluaciones se realizan mediante distintos estudios de monitoreo biológico, según detallaremos en la sección III.7. Hay que tener en cuenta que a medida que los efectos se propagan hacia niveles de organización biológica de mayor complejidad se vuelven más evidentes. Pero, a la vez, las consecuencias adversas para el ecosistema irán resultando más difíciles de revertir. Por consiguiente, este enfoque revela la magnitud de un dado impacto ambiental, cuando ya se han producido los efectos adversos, pero no resulta tan eficaz como para predecirlos (Munkittrick y Dixon, 1989; Weinstein y Birk, 1989; Power et al., 1991).

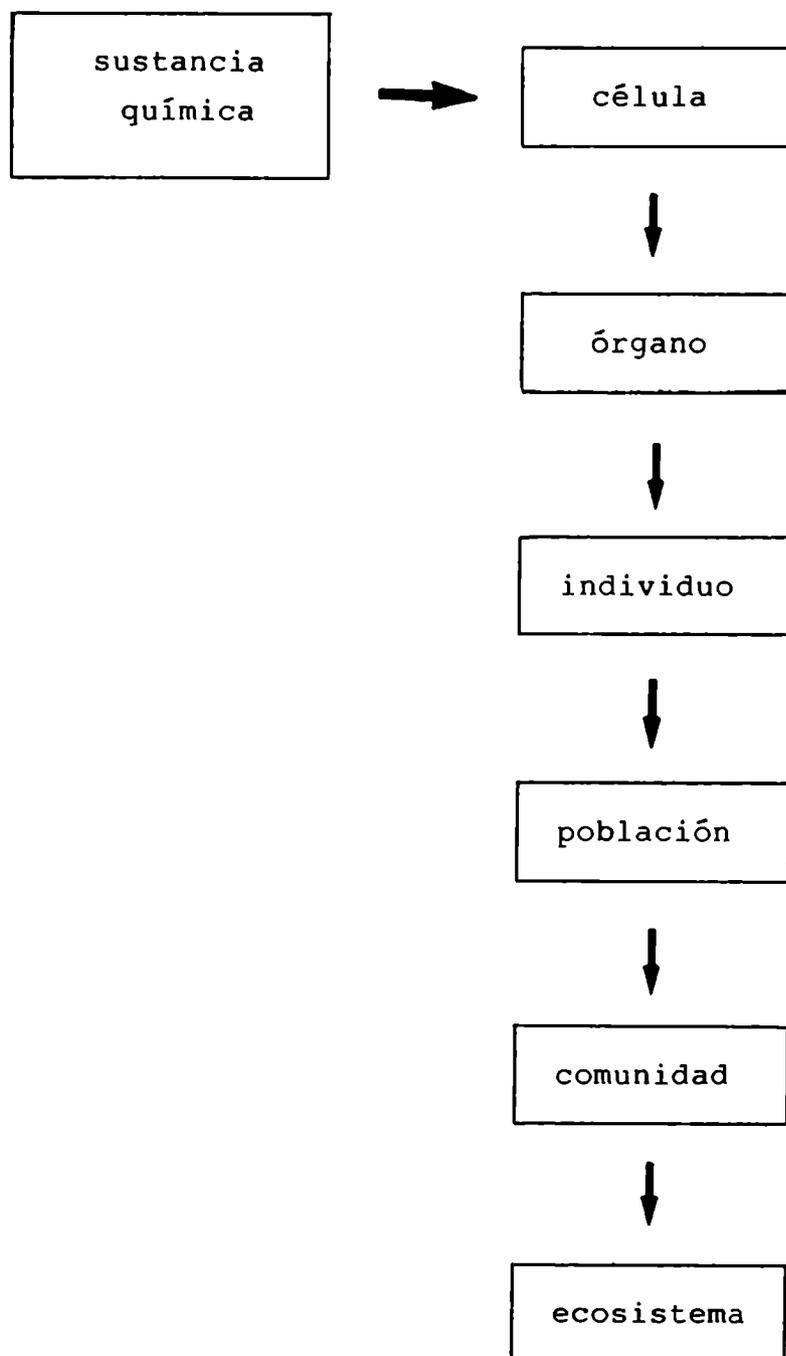


Figura 7.: Propagación de los efectos de las sustancias químicas en los diversos niveles de organización biológica.

El segundo enfoque, denominado "aproximación reduccionista", tiene un sentido de "abajo hacia arriba". Por consiguiente, el punto de partida radica en el estudio de las respuestas que se verifican a nivel subcelular. Las respuestas que elaboran los organismos frente a un estrés en dicho nivel pueden ser observadas en el término de horas o, a lo sumo, de unos pocos días. En cambio, los efectos sobre las comunidades o el ecosistema pueden tardar años en manifestarse. Estos estudios intentan identificar las respuestas primarias, especialmente aquellas que puedan considerarse como específicas, de modo que sirvan como parámetros precoces, indicadores de contaminación. Dichos parámetros constituirían una señal de alarma temprana, frente a la cual se podrían implementar medidas de prevención y protección adecuadas para impedir la propagación de los efectos adversos hacia los niveles superiores del ecosistema. En forma experimental, estos estudios se realizan mediante los llamados bioensayos predictivos, que serán tratados en la sección III.7.2.. Según este enfoque, se intenta reducir la complejidad del ecosistema, a un nivel más fácilmente reproducible en condiciones controladas de laboratorio. Sin embargo, este objetivo no siempre ha podido ser plenamente satisfecho (Maltby y Naylor, 1990; Power et al.,1991).

III.7. HERRAMIENTAS DE LA ECOTOXICOLOGÍA

La evaluación de la calidad de los sistemas acuáticos y del impacto asociado con la liberación de sustancias químicas requiere de ciertas consideraciones fundamentales, que pueden resumirse en tres categorías (Levin et al., 1989):

- * determinación del destino
- * determinación del transporte
- * estudio de los efectos tóxicos de los contaminantes sobre los seres vivos.

Todos estos aspectos deben resolverse en el marco de cada ecosistema particular, teniendo en cuenta las posibles interacciones entre las distintas sustancias químicas, la diversidad de organismos del sistema y sus características ambientales.

Sin embargo, existe una gran distancia entre el mero reconocimiento hasta el desarrollo y la implementación de los métodos y técnicas que resuelvan eficazmente estas necesidades.

Por ello, en base a estas consideraciones pasaremos a señalar los métodos con que cuenta la ecotoxicología en pos de su objetivo básico: la preservación de los ecosistemas. Básicamente, disponemos de dos grandes áreas de partida, que consisten en:

- el monitoreo ambiental
- el monitoreo biológico.

III.7.1. MONITOREO AMBIENTAL

La determinación analítica de todas las sustancias y especies químicas en los diversos subcompartimientos del sistema acuático sería, en principio, el procedimiento ideal que nos permitiría simultáneamente, identificar los distintos contaminantes y cuantificar los niveles presentes.

En sus comienzos, las políticas ambientales se basaron en el concepto de regular y controlar las descargas de contaminantes en los sistemas acuáticos. Se establecieron así, valores máximos permitidos o tolerables para las distintas sustancias, y se enca-

raron regularmente programas de monitoreo, especialmente en muestras de aguas, aire o sedimentos (Courtemanch et al.,1989). Sin embargo, estos monitoreos convencionales tienen una relativa y limitada relevancia ambiental, debido a diferentes causas (Andersson et al.,1989).

En primer lugar, hay que considerar el vasto número de sustancias, con una variedad muy amplia de estructuras que pueden estar presentes en un dado sistema. De este modo, resultaría casi imposible, en la práctica, realizar todas las determinaciones necesarias (Swedish EPA, 1990).

Muchas de las sustancias, especialmente aquellas de elevada toxicidad y, por ende, de mayor interés ecotoxicológico, se presentan en niveles trazas o aún menores. Por consiguiente, las determinaciones sólo son posibles a través de técnicas analíticas sofisticadas, generalmente laboriosas y costosas, ya que de otro modo no se alcanzaría el límite de detección. En adición, se pueden presentar problemas derivados de la contaminación accidental de las muestras, durante las distintas etapas de su análisis (Courtemanch et al.,1989; WHO, 1992).

Oportunamente, en la introducción del Capítulo I., discutiremos con mayor detalle las dificultades asociadas con el análisis de elementos metálicos en muestras de aguas naturales.

Ya hemos señalado, también, que los contaminantes están distribuidos heterogéneamente en los distintos subcompartimientos del sistema acuático, en un estado de equilibrio muy complejo y dinámico, que se modifica constantemente a lo largo del tiempo. Ese delicado equilibrio natural puede verse afectado durante el simple proceso de recolección de la muestra, de tal manera que los análisis resultantes no llegan a reflejar las condiciones originales del sistema.

Por otra parte, y quizás el inconveniente más serio que presentan, los análisis de contaminantes en muestras de aguas, suelos, sedimentos o aire, no revelan por sí mismos, las consecuencias adversas que pueden sufrir los distintos organismos de la comunidad biológica (Andersson et al.,1989; Courtemanch et al., 1989).

Recordemos que, especialmente para elementos metálicos, las determinaciones de los niveles totales, no reflejan la magnitud e importancia de las especies químicas con mayor impacto ecotoxicológico.

lógico. Además, tampoco es factible diferenciar, en forma rutinaria, la proporción de elementos presentes por causas naturales, de aquellos que han sido movilizados por la actividad antropogénica.

Para resolver parte de todas esas dificultades, los programas de monitoreo ambiental pueden encararse a través de dos enfoques distintos.

En primer término, se parte del conocimiento de las sustancias que pudieran descargarse con mayor frecuencia o formarse "in situ" en el sistema, y se encaran los programas de monitoreo específicos. Se realiza, pues, el seguimiento de aquellos contaminantes que, ya sea por cuestiones de interés o por estimaciones previas, se considera que tengan mayores probabilidades de ocurrencia (Swedish EPA, 1990).

La otra aproximación, consiste en encarar un estudio de determinaciones generales, tan amplio como sea posible, el cual únicamente estaría limitado por los recursos disponibles. Este monitoreo inicial e inespecífico permitiría detectar, entre una gran cantidad de contaminantes, aquellos de mayor toxicidad o que se presentan en mayores concentraciones (Swedish EPA, 1990).

En la práctica, una combinación sensata, evaluando las condiciones de cada sistema en particular, de ambas aproximaciones suele ser lo más recomendable.

Por otra parte, la incorporación de un monitoreo biológico permitiría correlacionar la información ambiental con los efectos nocivos registrados en la biota, posibilitando así una evaluación integral (Andersson et al., 1989; Courtemanch et al., 1989).

III.7.2. MONITOREO BIOLÓGICO

El monitoreo biológico puede ser definido, según Herricks et al. (1989), como el análisis del estado de los seres vivos, con el fin de proveer información esencial para determinar y/o predecir el nivel y la evolución de la contaminación en un dado ecosistema. Dentro del monitoreo biológico se distinguen:

- * la evaluación biológica
- * los bioensayos.

EVALUACIÓN BIOLÓGICA

La evaluación biológica, o bioevaluación, consiste en análisis obtenidos mediante estudios de campo, los cuales carecen, por consiguiente, de un estricto control experimental. Este tipo de evaluaciones cubren un amplio espectro, desde la simple descripción de uno o varios de los organismos presentes en una comunidad, hasta el estudio de ciertas propiedades y procesos del ecosistema (Herricks et al., 1989). Ordenadamente, se pueden clasificar en cuatro categorías (Malty y Calow, 1989):

- a - determinación de ciertos organismos denominados "especies indicadoras".
- b - determinaciones generales de la estructura de la comunidad.
- c - determinaciones de la funcionalidad de la comunidad.
- d - estudios de bioacumulación.

A continuación efectuaremos una descripción breve de cada uno de estos métodos y nos limitaremos a exponer algunos de sus principales alcances. Veremos, en cada caso, que la información obtenida se ha tratado de expresar numéricamente mediante parámetros o índices, a fin de facilitar las comparaciones. Estos parámetros no surgen tanto de un interés científico, sino que son requeridos por los encargados de controlar y regular las descargas de sustancias tóxicas en el medio ambiente (Waldichuk, 1989).

a - El concepto de "especie indicadora" se basa en la existencia de ciertos grupos de plantas o animales, cuyo normal desarrollo tiene lugar únicamente dentro de un estrecho margen de condiciones ambientales. Por consiguiente, en las primeras fases de una perturbación, las especies que sean más sensibles, experimentarán un significativo descenso de su población, eventualmente llegando hasta incluso desaparecer. Esta situación, suele traer simultáneamente aparejado un incremento en la población de otras especies más resistentes o capaces de desarrollar tolerancia al agente perturbador. De esta manera, la disminución o carencia de especies sensibles, así como el aumento de especies tolerantes o resistentes, puede constituir un criterio para establecer el nivel de contaminación. Entre los organismos empleados con este fin

se incluyen especies de algas, insectos, microorganismos, invertebrados, peces y aves (Block et al., 1987; Ford, 1989; Maltby y Calow, 1989; Moretto et al., 1993). Los resultados de estas determinaciones, suelen expresarse numéricamente mediante los llamados "Índices bióticos" (IB), de manera de facilitar las comparaciones entre distintos ecosistemas. Uno de estos índices se calcula a través de la siguiente fórmula (Ford, 1989):

$$\text{Índice Biótico} = \frac{n_i a_i}{N}$$

donde n_i = número de organismos de la especie indicadora "i".
 a_i = valor de tolerancia que se le asigna a dicha especie.
 N = número total de organismos de la muestra.

b - Como extensión de los estudios sobre una determinada especie indicadora, surgieron los trabajos que consideran simultáneamente el análisis combinado sobre distintas especies de la comunidad (Maltby y Calow, 1989).

El parámetro de evaluación más simple es el llamado "índice de riqueza de especies", que da cuenta del número de especies diferentes presentes en un determinado muestreo. Dicho índice está basado en el hecho de que, generalmente, el número de especies que son negativamente afectadas por una perturbación es considerablemente mayor al número de especies resistentes o tolerantes, las cuales exhibirán un incremento en su población (Ford, 1989). Por ello, se han establecido también relaciones entre el número de especies tolerantes o resistentes, con respecto al número de especies sensibles (Maltby y Calow, 1989).

Los "índices de diversidad" evalúan no sólo el número de especies presentes en el muestreo, sino también la abundancia de organismos en cada una de ellas (Ford, 1989; Maltby y Calow, 1989).

Los estudios - a - y - b -, como se puede apreciar, se basan casi exclusivamente en un enfoque ecológico. En general, estos estudios son objeto de frecuentes controversias. En primer lugar, la elección de una especie como "indicadora", se basa en experiencias previas, en las cuales se ha demostrado que resultan particularmente sensibles o resistentes. Por consiguiente, en

muchas ocasiones suele ser muy difícil determinar o identificar cuál es la mejor especie indicadora, entre otras razones porque algunos organismos suelen ser sensibles a un contaminante y, a la vez, resistentes o tolerantes a otro. Además, estos estudios no suelen brindar información sobre las causas primarias, responsables de un dado cambio en las poblaciones (Maltby y Calow, 1989).

Estas técnicas son fundamentalmente comparativas, ya que se basan en las diferencias resultantes del estudio de la composición biológica de las comunidades distribuidas en zonas contaminadas, con zonas que se consideran supuestamente libres de contaminación. Por consiguiente, los índices que hemos señalado, pueden pasar por alto una situación de contaminación leve o, incluso, moderada; aunque siempre reflejarán un caso severo (Ford, 1989; Maltby y Calow, 1989).

c - Las alteraciones que se verifican en la estructura de las comunidades, por efecto de las perturbaciones ambientales, tienen su origen en procesos previos que afectan su funcionalidad. Por consiguiente, es posible estimar el grado de contaminación de un sistema, mediante parámetros que reflejen adecuadamente las alteraciones funcionales en una o varias especies de la comunidad. Procesos tales como la productividad primaria (P), el grado de respiración (R), así como las alteraciones en los ciclos normales de nutrientes, constituyen una medida de la funcionalidad de la comunidad (Woodwell, 1970; Maltby y Calow, 1989).

Por ejemplo, un aumento de fósforo en el sistema acuático, conduce a la eutroficación del mismo, promoviendo un crecimiento desmesurado de algas. Este aumento en la productividad puede evaluarse midiendo los niveles de clorofila, o bien el grado de respiración total de la comunidad. Con estas determinaciones se han elaborado relaciones entre la productividad y la respiración: P/R; entre la productividad y la biomasa (B): P/B, o entre la respiración y la biomasa: R/B, las cuales se han utilizado como parámetros de contaminación (Odum, 1969; Pratt, 1990).

Sin embargo, se discute el empleo de dichos parámetros, por cuanto, en algunas situaciones específicas, han revelado una menor sensibilidad en comparación con los estudios de la estructura de las comunidades (Pratt, 1990).

La disponibilidad de nutrientes está finamente regulada

mediante distintos procesos cíclicos, en los cuales intervienen diversos microorganismos. Se considera que en condiciones de estrés la capacidad de los ecosistemas para retener y procesar los nutrientes en forma eficaz, tiende a disminuir. Dichos ciclos son muy difíciles de evaluar pero, en cambio, pueden determinarse muchas de las actividades enzimáticas microbianas, involucradas en el proceso (Pratt, 1990).

En los últimos años, se han implementado también una serie de ensayos, los cuales permiten estimar la productividad de una dada especie, tanto en condiciones de laboratorio como de campo. Estos ensayos reciben el nombre de "margen de crecimiento" (scope for growth, en inglés) y se basan en un balance energético. Se estima que la producción puede tener lugar únicamente cuando se verifica un incremento neto en la energía corporal. O sea, cuando el contenido energético de la ración absorbida (I) supera los gastos de respiración (R) y las pérdidas por excreción (E). De esta manera, se obtiene la siguiente ecuación:

$$I \times \text{eficiencia de la absorción} - (R + E) = \text{Producción}$$

Esta expresión parecería constituir un buen parámetro indicador de contaminación, aunque todavía resulta un poco prematuro establecer conclusiones definitivas, en vista de lo reciente de su aplicación (Maltby y Naylor, 1990; van Erkom Schuring y Griffiths, 1992).

d - Los estudios de bioacumulación intentan evaluar el nivel de sustancias químicas en aquellas especies que, por experiencias previas, han demostrado ser especialmente sensibles para concentrarlas. Usualmente, estas especies se reconocen como indicadoras o centinelas de bioacumulación. De esta manera, se trata de estudios de campo, que se complementan con el análisis químico de contaminantes en diversos organismos o tejidos biológicos.

Idealmente, una especie indicadora útil para los estudios de este tipo, debería reunir las siguientes características (Nriagu, 1993):

- * ser relativamente abundante en el área de estudio, preferentemente sésil o sedentaria, y fácilmente identificable. El pro-

ceso de recolección debe ser sencillo, rápido y económico.

- * su ciclo de vida debe ser mayor al período de estudio.
- * el ingreso de contaminantes debe depender directamente de los niveles ambientales.
- * el organismo debe ser tolerante o resistente, no sólo al contaminante en estudio, sino también a las otras sustancias químicas o agentes físicos estresantes, que puedan estar presentes en el ambiente.

En vista de este último requerimiento, podemos ver que el concepto de especie indicadora necesario para los estudios de bioacumulación, resulta justamente opuesto al que habíamos detallado en el punto -a-, de los estudios de evaluación biológica.

En un primer momento, estos estudios estuvieron destinados fundamentalmente a la protección de la salud pública, ya que muchos de los organismos acuáticos están destinados al consumo humano o a la preparación de alimentos diversos (Waldichuk, 1974; Guthrie et al., 1979).

De hecho, algunos monitoreos siguen cumpliendo ese propósito. Sin embargo, no tardó en reconocerse también su aplicación desde un punto de vista ecotoxicológico. Los análisis de bioacumulación permiten, de una manera integrada, evaluar no sólo el nivel de contaminantes en una dada especie, sino que también reflejan el nivel de contaminación del sistema ambiental (Nriagu, 1993).

Debido justamente al fenómeno de bioacumulación, los niveles de ocurrencia de contaminantes en tejidos biológicos son considerablemente más elevados que los que se verifican en su entorno ambiental, Por consiguiente, las determinaciones analíticas resultan, en general, más sencillas y económicas, desde el punto de vista metodológico, y no están tan sujetas a problemas de contaminación accidental (Nriagu, 1993). Incluso, día a día, se reportan métodos más rápidos, con elevada sensibilidad y especificidad, especialmente para su empleo en el trabajo rutinario de un gran número de muestras (Walker et al., 1993).

Diversos países, desde hace tiempo, vienen realizando en forma esporádica o rutinaria, programas de biomonitoreo de diversos contaminantes, entre ellos elementos metálicos (Dickson, 1987; Schmitt y Brumbaugh, 1990; Winger et al., 1990; Mäkelä et al., 1991; Laskowski y Maryanski, 1993).

Algas, numerosas especies de peces y, especialmente, de macroinvertebrados han sido los organismos más frecuentemente empleados.

Así, se pueden obtener niveles de referencia y de comparación entre diversos organismos y sistemas; al igual que estimar la evolución de los contaminantes a través del tiempo.

Justamente uno de esos estudios (Schmitt y Brumbaugh, 1990) pudo reconocer que la disminución del contenido de plomo en diversas especies de peces, se correlacionaba con la restricción primero, y la prohibición, después, del empleo de alqueros del metal en las naftas.

Muchos trabajos fueron incluyendo, también, determinaciones simultáneas en el ambiente físico (aguas, sedimentos, material particulado, etc.) a fin de correlacionar los niveles de contaminantes allí presentes, con los encontrados en los organismos indicadores. De esta manera, es posible calcular los factores de bioacumulación o de bioconcentración, como parámetros de referencia y de comparación.

BIOENSAYOS

Una de las definiciones que nos parecen más amplias para caracterizar al término de bioensayo fue dada por la FAO (1977) y expresa:

"Bioensayo es un ensayo que emplea un organismo, un grupo de organismos o un tejido vivo, para la determinación de la potencia de cualquier sustancia fisiológicamente activa y que, en principio, se desconoce".

Conviene destacar que el término ha tenido diferentes significados, por cuanto los bioensayos pueden adoptar características muy diversas así como servir a múltiples propósitos (Anderson, 1980; FAO, 1987). Por siglos, se han venido empleando activamente en la industria farmacéutica, para establecer los niveles óptimos de las dosis de drogas, y para el estudio de los potenciales efectos adversos (Anderson, 1980). De hecho, algunos autores prefieren el nombre de "ensayos de toxicidad", dado que en muchos

casos, constituyen la herramienta experimental para determinar los efectos tóxicos y estudiar los mecanismos involucrados, de las sustancias químicas sobre los seres vivos (FAO, 1987).

Dentro del campo de la ecotoxicología, los bioensayos pueden ser definidos como (Calow, 1989; Maltby y Calow, 1989):

"El empleo de sistemas biológicos, de variados niveles de complejidad, para establecer el impacto de las sustancias químicas, especialmente aquellas derivadas de la actividad antropogénica, sobre los ecosistemas."

Básicamente, se reconocen dos tipos de bioensayos, según sea el objetivo que se persiga. Los llamados **bioensayos predictivos**, cuyo fin consiste en visualizar o pronosticar el impacto de una o varias sustancias químicas antes de que se liberen al medio. Por su parte, los **bioensayos de evaluación o de monitoreo** permiten establecer el nivel actual de contaminación de un dado medio ambiental (Calow, 1989; Maltby y Calow, 1989).

BIOENSAYOS PREDICTIVOS

El rol predictivo de los bioensayos puede interpretarse de la siguiente forma: Una perturbación (agente químico) se aplica al sistema (uno o más seres vivos). Éste elabora una respuesta, la cual deberá ser interpretada dentro del entorno ambiental del experimento. El objetivo es pues, estudiar dicha respuesta.

En la práctica, el o los organismos son expuestos, en recipientes adecuados, a concentraciones diversas de una sustancia química (o varias), disuelta convenientemente, de preferencia en agua. Transcurrido un cierto período, se observa la respuesta de los organismos. Paralelamente, se efectúa un ensayo control, en el cual los organismos se exponen únicamente al medio de dilución.

Históricamente, podemos decir que más del 90 % de los bioensayos predictivos se han basado en experiencias que emplearon una única especie, según el relevamiento de trabajos publicados hasta el año 1987. Las especies más frecuentemente empleadas fueron de organismos invertebrados, siendo el 75 % de los estudios. La

mayor parte de los trabajos, más del 90 % hasta el año 1979, y cerca del 80 % para el período 1979-1987, se concentraron en el estudio de la letalidad, como respuesta, en experiencias realizadas durante cortos períodos, generalmente de 24 a 96 hs (ensayos agudos) (Maltby y Calow, 1989). Por consiguiente, estos bioensayos permiten evaluar el nivel de concentración de una sustancia química necesario para provocar la muerte del 50 % de los organismos expuestos: el conocido parámetro de concentración letal 50 (CL₅₀)(Dixon y Newman, 1991).

Según sea el enfoque, estos bioensayos satisfacen los siguientes propósitos:

- a) determinar la sensibilidad relativa de diferentes organismos, frente a un dado contaminante (Dorigan et al., 1987).
- b) comparar la toxicidad de los distintos contaminantes en un dado organismo (Waldichuk, 1989).

El parámetro CL₅₀ ha sido el protagonista estelar que impulsó el desarrollo de normas y criterios de control de contaminantes en sistemas acuáticos. Ha satisfecho ampliamente las necesidades de los encargados de los organismos de control, y hasta en ocasiones del público en general, por ser un número fácilmente manejable. Lamentablemente, suelen ignorarse muchas de las limitaciones que presenta (Waldichuk, 1989). En primer lugar, suele ser difícil en la práctica comparar los valores de CL₅₀ obtenidos por distintos autores, por cuanto las condiciones ambientales, como las propiedades físico-químicas del medio de dilución, ni las de los organismos del ensayo, como su edad, sexo, tamaño o aclimatación, están aún lo suficientemente estandarizadas (Waldichuk, 1989; Dixon y Newman, 1991). Además, en este tipo de bioensayos, se ignoran las interacciones químicas y biológicas que pueden verificarse en la naturaleza, por tanto, las interpretaciones resultantes no son estrictamente extrapolables (Connell, 1987; Waldichuk, 1989).

Las limitaciones de los bioensayos agudos de letalidad fueron, desde siempre, mejor reconocidas por los toxicólogos (Waldichuk, 1989).

Para alcanzar un manejo integral de los recursos de los sistemas acuáticos, se requiere del conocimiento y comprensión de la

ser consideradas como "marcadores tempranos", o de "alerta", ya que permitirían detectar las alteraciones nocivas en un organismo, antes de que se verifique su muerte.

Esta línea de investigación viene cobrando un gran impulso en los últimos años y se destaca como una de las más promisorias en el campo de la ecotoxicología (Calow y Sibly, 1990; Brouwer et al., 1990; Koeman 1991; Widdows y Donkin, 1991). Merece destacarse, que no recurre únicamente a bioensayos de laboratorio, sino que incluye determinaciones analíticas, toxicológicas y bioquímicas, tratando de convalidar los resultados con experiencias de campo, lo cual implica un enorme aporte interdisciplinario.

Para terminar, diremos que en el otro extremo, se ubican los bioensayos de laboratorio que tratan de establecer los niveles de contaminantes que, en principio y hasta nuestro conocimiento, no producen ningún efecto adverso sobre los organismos del ensayo.

De estas experiencias surgen los conocidos parámetros:

NOEL (por su sigla en inglés) que representa el nivel al cual no se observan efectos adversos.

NOEC (por su sigla en inglés) que representa la concentración a la cual no se observan efectos adversos.

Estos valores constituyen una herramienta más de guía, para obtener una estimación de los niveles de exposición aceptables para el ecosistema por un dado contaminante. Para ello, se aplican a estos parámetros, los llamados "factores de seguridad", que usualmente varían entre 10 y 1000, o bien métodos de extrapolación diversos (Okkerman et al., 1991).

Microcosmos, mesocosmos y limnocorrales

Dado que los bioensayos de laboratorio que se valen de una única especie no pueden representar estrictamente las condiciones naturales, en los últimos años, se han tratado de desarrollar otras metodologías. De este modo, a manera de puente de unión entre las experiencias de laboratorio y los ecosistemas, fueron surgiendo los términos de microcosmos y mesocosmos. Sin embargo, se presentan algunas dificultades al intentar definir dichos términos (Gearing, 1989; La Point y Perry, 1989).

Más allá de la imagen intuitiva, por la cual un microcosmo puede ser considerado como "una pequeña parte que representa al cosmos", se puede citar una definición más conceptual:

"... muestras de diversas especies de organismos tomados de la naturaleza e instalados en contenedores artificiales en un ambiente de laboratorio" (Gearing, 1989).

Sin embargo, algunos microcosmos se realizan en el ambiente externo (Crossland et al., 1991).

Por otra parte, no quedan bien delimitadas las diferencias entre microcosmos y mesocosmos, ya que para algunos autores éstos se distinguen por su tamaño, mientras que para otros es cuestión de si se trata de un ambiente de laboratorio o natural. Entre estos últimos, se prefiere el término de limnocorrales para designar a las experiencias que se desarrollan en espacios naturales, convenientemente cercados (Connell, 1987; Landner, 1988; La Point y Perry, 1989).

Idealmente estos sistemas deberían contener a todos los componentes funcionales de la comunidad natural en estudio, desde productores primarios, hasta consumidores primarios y secundarios, predadores y carroñeros, y simular de un modo tan eficiente como sea posible las condiciones ambientales. Sin embargo, las dificultades de costo y construcción que surgen al tratar de implementar estos sistemas, obligan en muchos casos a limitar el número de especies a incluir (Gearing, 1989; Crossland et al., 1991).

La meta que se persigue es poder estudiar el destino y los efectos de las sustancias químicas en un ambiente "natural", que revele las distintas interacciones ambientales y biológicas. Sin embargo, aún quedan dudas acerca de si estos sistemas pueden reflejar fielmente al ecosistema (Landner, 1988).

BIOENSAYOS DE EVALUACIÓN O MONITOREO

En la aplicación de evaluación o monitoreo, la respuesta que elabora el organismo sirve para estimar el nivel de perturbación a que ha sido sometido. En este tipo de bioensayos invariablemente se emplean organismos que se han criado y mantenido en condiciones de laboratorio preestablecidas y preferentemente normati-

zadas, los cuales se exponen al medio cuya toxicidad se pretende evaluar. Este medio puede consistir en muestras de distintos cuerpos de aguas, efluentes o descargas específicas, extractos acuosos o eluatos de suelos, sedimentos u otro tipo de material sólido, preparadas convenientemente de acuerdo a cada bioensayo en particular (Bitton y Dutka, 1986).

Una gran variedad de organismos ha sido empleada en este tipo de estudios. En un principio, se recurrió a ciertas especies de peces, de algas o de algunos invertebrados, mediante ensayos a corto o largo plazo. Desde hace algunos años, fueron surgiendo una serie de pruebas rápidas, a corto plazo, que se reconocen en general como "microbioensayos". Diversas cepas bacterianas; algunos microorganismos como nematodos, pequeños crustáceos, protozoos, hongos y semillas vegetales, suelen ser los sistemas biológicos más empleados. La mayoría de estas pruebas se basan en el estudio de respuestas tales como mortalidad, inmovilización o inhibición de la actividad de algunas enzimas. Las principales ventajas de estos bioensayos consisten en su simplicidad metodológica, requieren poco espacio y equipamiento, al igual que un pequeño volumen de muestra, resultando en general económicos y aptos para estudios rutinarios, aún cuando éstos involucren un gran número de muestras (Dutka, 1988 y 1991; US EPA, 1991; Bitton y Koopman, 1992).

Para simplificar aún más los aspectos metodológicos, existen también ensayos comerciales (Bitton y Koopman, 1992).

El grado de toxicidad de las distintas muestras se determina en forma cualitativa, o incluso semicuantitativa, en base a la intensidad de la respuesta que elabora el sistema biológico empleado (Bitton y Dutka, 1986; Dutka, 1991).

Debido a las ventajas que presentan, la mayoría de estos bioensayos han sido adoptados por diversos organismos reguladores y de control de los Estados Unidos, Canadá y Europa (Dutka, 1988; US EPA, 1991).

Su principal desventaja reside en que si bien pueden reconocer o detectar la toxicidad del medio, no permiten identificar las sustancias químicas que las provocan. Sin embargo, ya están disponibles algunos microbioensayos capaces de reaccionar únicamente frente a determinadas familias o grupos de compuestos, como ciertos elementos metálicos o plaguicidas (Bitton y Koopman, 1992).

IV. ALGUNAS CARACTERÍSTICAS DE LOS ORGANISMOS ACUÁTICOS SELECCIONADOS PARA ESTE TRABAJO

Más de un millón de especies han sido descritas dentro del reino animal. Básicamente, éstas han sido clasificadas en dos clases:

- a) vertebrados, aproximadamente un 5 % del total,
- b) invertebrados, el porcentaje restante,

según posean o no columna vertebral, como rasgo más significativo para su diferenciación. Esta clasificación puede resultar un tanto arbitraria o artificial, debido a los dispares porcentajes de especies que se encuadran en cada clase, pero, en la práctica, continúa en vigencia (Barnes, 1987).

Para un gran número de organismos invertebrados aún se dispone de un limitado conocimiento acerca de diversos aspectos biológicos, entre los que se incluyen morfología, fisiología, embriología y ecología, debido a la gran cantidad y diversidad de especies (Gardiner, 1978; Barnes, 1987).

A continuación, trataremos de introducir algunos conceptos básicos y generales sobre los invertebrados del filo "Mollusca", ya que a él pertenecen las especies seleccionadas para el presente trabajo de tesis.

Los moluscos figuran entre los invertebrados más notables y mejor conocidos, y representan el filo de especies más numeroso, después de los artrópodos (Roux, 1986a; Barnes, 1987).

Se les encuentra tanto en ambientes marinos, de agua dulce, salada o salobre, como en ambientes terrestres (Barnes, 1987). En líneas generales, se caracterizan por tener un cuerpo blando, en el que se distinguen tres regiones más o menos diferenciadas: la cabeza anterior; un pie ventral, que sirve para la locomoción, y una masa visceral muy desarrollada, recubierta por el manto. Éste consiste en un repliegue cutáneo encargado de la formación de la conchilla calcárea, que protege a casi todos los moluscos y que adopta diferentes formas, según las especies (Roux, 1986a; Weisz, 1987).

El filo de los moluscos se divide en siete clases, a saber:

- aplacóforos
- monoplacóforos
- poliplacóforos
- escafópodos
- cefalópodos
- gastrópodos
- bivalvos o pelecípodos

Dos de las especies seleccionadas para este trabajo pertenecen a la clase de gastrópodos, mientras que la tercera a la de bivalvos o pelecípodos. Por consiguiente, daremos algunos detalles específicos de cada una de dichas clases.

MOLUSCOS GASTRÓPODOS

Los gastrópodos constituyen la clase más rica de moluscos. Se caracterizan por presentar una concha en forma de espiral, asimétrica, que contiene en su interior a la masa visceral, a la vez que constituye un refugio para el cuerpo del animal. En muchos casos, la abertura de la concha queda recubierta mediante una placa córnea, situada en la parte dorsal y posterior del pie, denominada opérculo (Figura 8). La concha puede presentar una infinita variedad de formas, colores, tipos y relieves (Roux, 1986b; Barnes, 1987; Weisz, 1987).

En los gastrópodos se observan virtualmente todos los tipos de hábitos alimenticios, aunque muchos de ellos son herbívoros. Estos últimos se alimentan principalmente de algas, partes tiernas de plantas vasculares acuáticas, vegetación en descomposición u hongos. Para ello, disponen de una estructura especializada, denominada rádula, que consiste en una especie de cinta quitinosa, equipada con dientes. La rádula les permite raspar, cortar y fragmentar los distintos tejidos que componen su dieta (Roux, 1986b; Barnes, 1987; Wiesz, 1987).

En la mayoría de los gastrópodos, la digestión es fundamentalmente extracelular y transcurre en el estómago. Las enzimas pueden ser producidas por las glándulas salivales y el hepatopáncreas o glándula digestiva (Barnes, 1987).

La torsión de la concha de los gastrópodos impuso algunos

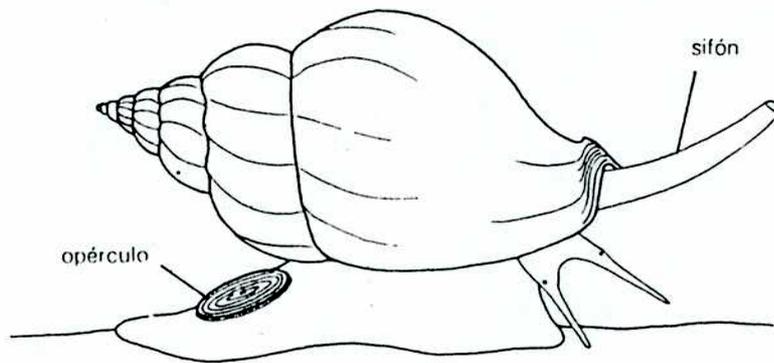
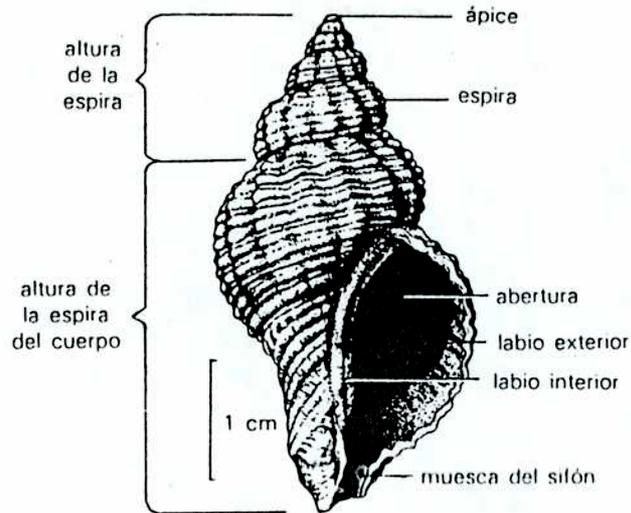


Fig. 8.: Algunas características de la concha de los gastrópodos.

cambios en las estructuras viscerales. Así, la excreción se verifica mediante un solo nefridio, puesto que en la mayoría de las especies, el correspondiente al lado derecho ha desaparecido, o no cumple funciones excretoras, aunque suele formar parte del gonoducto. El corazón, ubicado anteriormente, presenta, en general, una aurícula y un ventrículo. A partir de éste, se irriga la masa visceral, la cabeza y el pie. De los senos arteriales, la sangre se reúne finalmente en un gran seno venoso cefalopedal, del cual pasa a través de la red pulmonar capilar, en aquellos organismos que son pulmonados, para su oxigenación (Barnes, 1987).

Los gastrópodos acuáticos que presentan pulmones, deben salir a la superficie para llenar de aire su saco pulmonar (Roux, 1986a).

El transporte de oxígeno se realiza a través de moléculas de hemoglobina o de hemocianina. En este último pigmento, la molécula de oxígeno es transportada por dos átomos de cobre. La oxihemocianina presenta un color azul pálido, mientras que la desoxihemocianina es incolora (Gardiner, 1978; Barnes, 1987).

MOLUSCOS BIVALVOS O PELECÍPODOS

Estos nombres, reflejan algunas de las características más distintivas de los organismos de esta clase (Roux, 1986 a y b; Barnes, 1987). Se denominan bivalvos dado que la conchilla posee dos valvas, articuladas dorsalmente, que encierran por completo al cuerpo del animal, el cual se halla comprimido dorsalmente. Pelecípodos significa "pie en hacha" y ésta es la forma en que el pie, su órgano motor, se encuentra comprimido lateralmente.

Esta clase de moluscos consta de tres subclases (Barnes, 1987):

- protobranquios
- septibranchios
- lamelibranquios

La mayoría de las especies de bivalvos pertenecen a esa última subclase. Por lo tanto, nos limitaremos a detallar sus características más relevantes.

Estos organismos presentan una cabeza muy pequeña, que no se diferencia fácilmente del cuerpo. La cavidad del manto es la más espaciosa, con respecto a los otros moluscos. Debido a la compresión lateral del cuerpo, los bivalvos son generalmente excavadores de fondos blandos y forman parte de la denominada fauna del bentos (Roux, 1986b; Barnes, 1987).

En rigor, la mayoría de los moluscos acuáticos están asociados a los fondos rocosos, arenosos o fangosos en que viven. En general, se desplazan muy lentamente (almejas, ostras) o permanecen adheridos al sustrato, por medio de diferentes estrategias (mejillones). Por ello, han quedado virtualmente ligados a una exis-

tencia relativa o totalmente sedentaria (Roux, 1986a; Weisz, 1987).

La conchilla de los bivalvos consta de dos valvas similares, más o menos ovales, y usualmente convexas. En cada valva, se observa una protuberancia dorsal, denominada umbo, la cual constituye la parte más vieja de la conchilla. En torno a éste, se distinguen unas líneas concéntricas, que son las de crecimiento. Estas marcas se forman como consecuencia de un detenimiento en el crecimiento de los ejemplares y una deposición de carbonato de calcio, que hace que se forme una marca más gruesa. Pueden formarse durante cada temporada, o también frente a cambios imprevistos en las condiciones ambientales. Por ello, dichas marcas deben emplearse con precaución, al pretender determinar la edad de un organismo. Las valvas se mantienen unidas mediante el llamado ligamento de la charnela, y por una banda de proteínas elásticas (Roux, 1986b; Barnes, 1987) (Figura 9. A).

En la Figura 9. B se presenta un modelo de la anatomía interna típica de un molusco bivalvo. Estos organismos, en general, poseen una glándula digestiva bien desarrollada y presentan en su estómago una varilla o estilete cristalino, que es un cuerpo gelatinoso y alargado. Del estilete se desprende la única enzima para la digestión extracelular que producen los pelecípodos, ya que las proteínas y los lípidos sufren una digestión intracelular dentro de la glándula digestiva. La rotación del contenido del estómago, por influjo del estilete cristalino, lanza en forma continua material alimenticio parcialmente digerido hacia la llamada zona de clasificación. En esta región se separan las partículas más voluminosas, las cuales son enviadas al intestino para su eliminación (Bullough, 1981; Barnes, 1987; Weisz, 1987).

Los órganos renales, pares, están íntimamente asociados con el sistema circulatorio, que es abierto y complejo. Estos órganos se conectan a una vejiga urinaria, cuyos cilios promueven el movimiento de la orina (Bullough, 1981; Barnes, 1987; Weisz, 1987).

El corazón presenta un ventrículo, plegado en torno al intestino, del cual parten una serie de arterias que terminan en la masa visceral, en el pie y en los lóbulos del manto. Estos últimos son también órganos respiratorios importantes. Las venas procedentes de esos lóbulos devuelven directamente la sangre oxigenada al corazón. La sangre procedente de la masa visceral y del

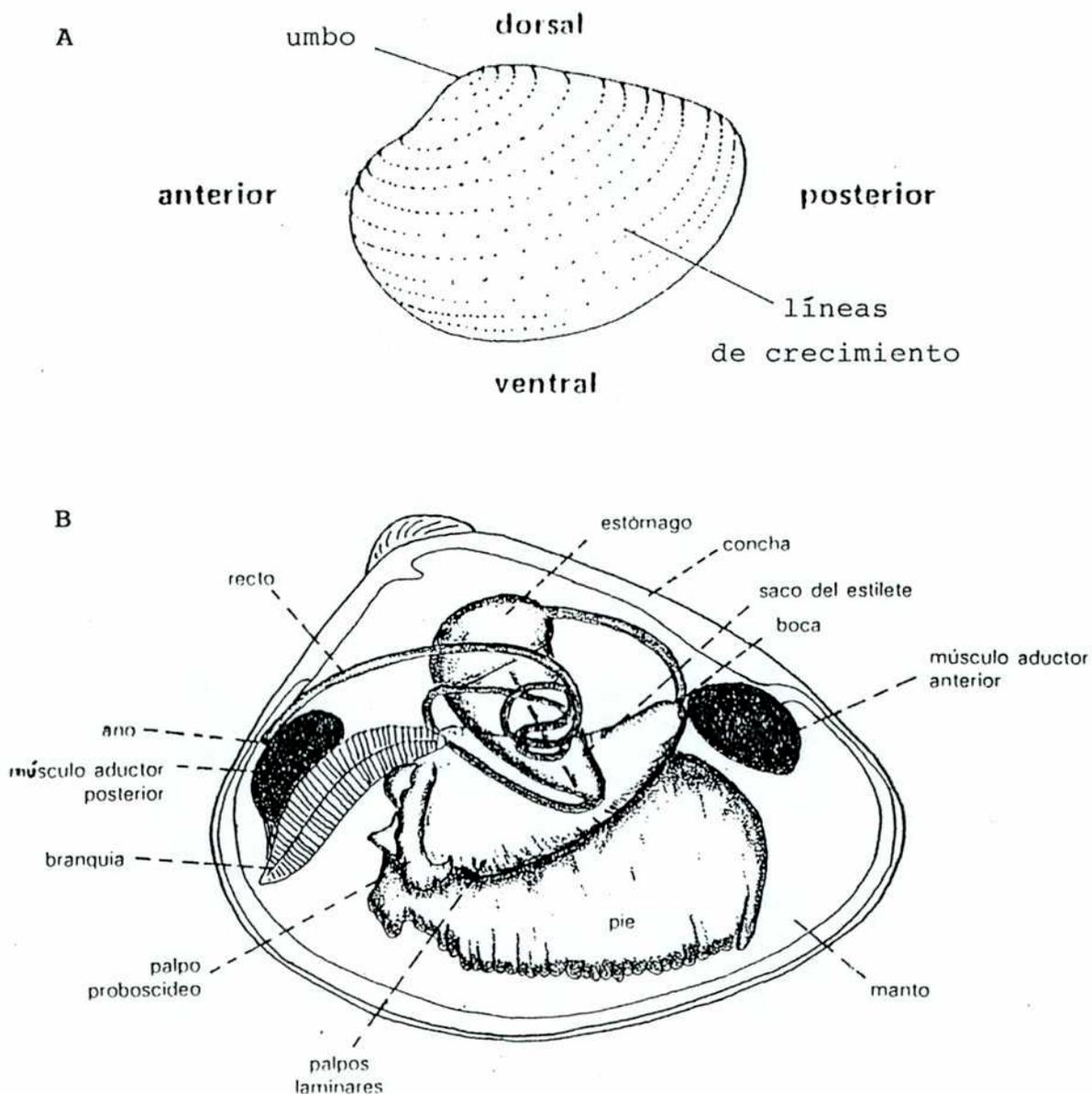


Fig. 9.: Moluscos bivalvos: A. Vista externa de una valva; B. Anatomía interna.

pie se mueve por venas hacia los riñones y luego es conducida hacia las branquias, donde se oxigena y se dirige a la aurícula del corazón. En la mayoría de los casos, la sangre de los bivalvos es incolora, puesto que carecen de hemoglobina. Otros pigmentos, como la hemocianina, ocupan su lugar (Gardiner, 1978; Barnes, 1987; Weisz, 1987).

Las branquias constituyen, a la vez, las superficies permea-

bles más relevantes que posibilitan el ingreso de las sustancias químicas contaminantes en los organismos acuáticos (Benson et al., 1987). Por ello, introduciremos una básica y breve descripción de las mismas.

Las branquias

El término branquia se emplea para designar varias estructuras de diferentes tipos, a través de las cuales se realiza el intercambio gaseoso en diversos organismos acuáticos (Gardiner, 1978).

En la mayor parte de los peces cartilagosos, las branquias están colocadas en depresiones, separadas unas de otras, que comunican por un lado con la faringe y por el otro con el exterior. En los peces óseos, las branquias están formadas por una serie de laminillas sostenidas por cuatro a seis arcos branquiales, el conjunto está cerrado por el opérculo. El agua que penetra por la boca pasa por las branquias y sale por las hendiduras branquiales, en el caso de peces cartilagosos, o por las hendiduras operculares, en peces óseos (Randall, 1990).

En moluscos y crustáceos, las branquias se hallan encerradas en cámaras. Una corriente de agua o aire, según el caso, se mantiene en movimiento por entre las branquias, ya sea por medio de la acción ciliar, por desplazamientos del animal, o por el propio movimiento de dicha corriente. La branquia típica de un molusco está constituida sobre un eje central, a través del cual circulan los vasos que transportan la sangre o la hemolinfa y desde el que se originan ramificaciones laterales en forma de filamentos delgados. Estos filamentos se hallan además plegados, de manera de aumentar su superficie, en forma de láminas. El epitelio de estas láminas es ciliado y allí se verifica el intercambio gaseoso (Gardiner, 1978; Barnes, 1987; Randall, 1990).

Las branquias se prolongan a partir de la pared corporal, a la cual están normalmente unidas, en la llamada cavidad paleal, la cual les ofrece cierta protección. Esto es particularmente importante en aquellos moluscos que viven en barros o arenas, animales del bentos, ya que evita que las branquias se dañen o ensucien. En gastrópodos y bivalvos, la ventilación de la cavidad paleal se realiza por acción de las cilias de las superficies de los fila-

mentos. En dicha cavidad existe también una glándula hipobranquial, que segrega un mucus a fin de limpiar el agua que circula por las branquias de partículas diversas, como sedimentos, materia fecal, etc. (Gardiner, 1978). Para la entrada y salida del agua, en algunas especies de lamelibranquios, se encuentran una especie de tubos, más o menos largos, llamados "sifones", distinguiéndose el sifón branquial, de entrada, y el sifón cloacal, de salida (Barnes, 1987; Randall, 1990).

El epitelio branquial constituye el sitio donde también tienen lugar otros procesos vitales para los organismos acuáticos, tales como la regulación iónica, el balance ácido-base y la excreción de desechos nitrogenados (Evans, 1987; Randall, 1990).

En algunos moluscos gastrópodos y especialmente en los bivalvos, las branquias se han adaptado, también, a la captura y separación del alimento. Estos organismos aprovechan la corriente de agua que circula por las branquias para obtener alimento, por medio de un proceso de filtración del plancton disuelto en dicha corriente. La mayoría de los bivalvos lamelibranquios se alimenta de pequeñas partículas de plancton, fundamentalmente fitoplancton. En el caso de los mejillones de la especie Mytilus, éstos pueden filtrar todas las partículas de entre 3 a 5 μm y la mitad de las partículas de 1 a 2 μm de diámetro. Las partículas filtradas quedan atrapadas por el mucus secretado de tal manera que, a continuación y por medio de movimientos ciliares, pasan al surco alimenticio que conduce al estómago (Barnes, 1987).

En este tipo de invertebrados, que se conocen como **filtradores**, es muy difícil distinguir, en condiciones naturales, la proporción de contaminantes que ingresa a través de la fase acuosa o de la dieta. El resultado final es que se caracterizan por presentar una capacidad particularmente elevada, en relación al resto de los organismos acuáticos, para incorporar diversas sustancias químicas contaminantes, entre ellas elementos metálicos (Waldichuk, 1974).

Reservas energéticas: los hidratos de carbono y su metabolismo

La mayor parte de los organismos del reino animal obtienen su energía a partir de la oxidación de carbohidratos, lípidos y pro-

teínas. Los moluscos, especialmente los bivalvos, en cambio, tienen un metabolismo energético preferentemente orientado a la utilización de carbohidratos, particularmente glucógeno (Hunt, 1970; Zwaan y Wijsman, 1976; Hemminga et al., 1985; Mayer et al., 1992).

Como sabemos, el glucógeno está presente en todos los animales y constituye la mayor reserva de energía y de almacenamiento de carbohidratos. Consiste en un polímero ramificado de unidades de glucopiranosas, unidas entre sí por enlaces α 1 \rightarrow 4 glucosídicos y en los puntos de entrecruzamiento mediante enlaces α 1 \rightarrow 6 (Hunt, 1970; Lehninger, 1972).

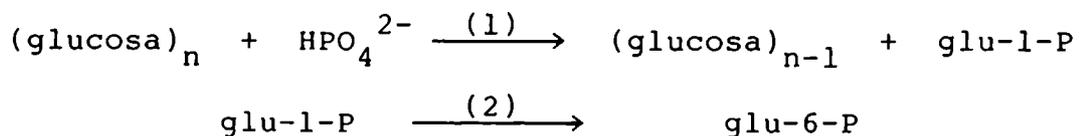
Mientras que la estructura general se mantiene a través de todo el reino animal, la estructura fina está sujeta a grandes variaciones, mayores que las que se habían supuesto en un principio, las cuales se verifican tanto entre las distintas especies, como también entre los diferentes tejidos. Las diferencias entre los diversos polímeros residen principalmente en el largo de las cadenas lineales y en el grado de entrecruzamiento. Las diferencias en los pesos moleculares de los distintos polímeros pueden ser más aparentes que reales, consecuencia de los procedimientos de extracción que emplean los diversos autores. Recientes estudios de análisis de glucógeno, realizados por cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución, revelaron que en moluscos bivalvos el largo de la cadena oscila entre 11 y 13 unidades y el grado de polimerización varía desde 3 o 4 hasta 35 (Hunt, 1970; Matsui et al., 1993).

En gastrópodos y bivalvos, las reservas de dicho polisacárido se localizan en casi todos los tejidos, muchas veces en células específicas, las cuales se reconocen como "células de glucógeno". Su apariencia recuerda a los adipositos, aunque el material de reserva es un hidrato de carbono y no un lípido. Estudios con glucosa marcada han demostrado que la marca se incorpora al glucógeno allí almacenado. El rol de estas células en el metabolismo energético aún no está completamente esclarecido (Zwaan y Wijsman, 1976; Hemminga et al., 1985; Geraerts, 1992).

En mamíferos, y en animales omnívoros en general, las distintas etapas y los mecanismos de regulación del metabolismo de hidratos de carbono están muy bien definidos y caracterizados (Pilkis y Claus, 1991). Por otra parte, existen buenas razones para considerar que los mismos procesos básicos se verifican en

las células aerobias de todo tipo. Sin embargo, hay que reconocer que la mayor parte de los estudios no han incluido especies acuáticas, por tanto, la información disponible para estos organismos aún no es completa, habiéndose encontrado algunas diferencias (Christiansen y Klungsoyr, 1987; Coulson, 1987).

Las etapas principales de la glucogenolisis en mamíferos involucran dos enzimas: la glucógeno-fosforilasa (1) y la fosfoglucomutasa (2), que permiten la separación de unidades de glucosa a partir del glucógeno, para entrar en la vía glucolítica, según las reacciones:

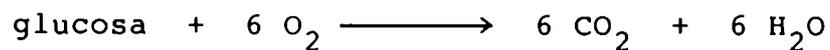


La fosforilasa puede actuar repetidamente sobre el enlace glucosídico α 1 \rightarrow 4 de las cadenas del glucógeno, hasta que encuentra puntos de ramificación, con enlaces α 1 \rightarrow 6, los cuales no puede atacar. Llegado a este punto, se requiere de la participación de la enzima α 1 \rightarrow 6 glucosidasa, que hidroliza esa unión. En músculo esquelético, la fosforilasa se encuentra en dos formas: una activa (fosforilasa a) y otra con mucho menor actividad (fosforilasa b), que no son interconvertibles por las mismas enzimas. Las concentraciones relativas de ambas fosforilasas permiten una efectiva regulación de la glucogenolisis (Lehninger, 1972; Pilkis y Claus, 1991).

En cierta especie de truchas, Morata et al.(1982) encontraron únicamente la forma activa de la fosforilasa. En adición, la glucogenolisis puede también proceder por otra vía, en la cual por la acción de la amiloglucosidasa se produce la hidrólisis de unidades de glucosa a partir de glucógeno, que a continuación son fosforiladas por medio de una hexoquinasa. En peces, se discute todavía el rol de las amilasas en el catabolismo del glucógeno, ya que algunos estudios han demostrado que exhiben una actividad menor en relación a la fosforilasa (Christiansen y Klungsoyr, 1987). En moluscos bivalvos, también se discute la relevancia de un mecanismo sobre el otro, aunque según Zaba (1981) ambos mecanismos estarían igualmente implicados.

En condiciones aeróbicas, el catabolismo de la glucosa se ve

rifica primero por el ciclo de Embden-Meyerhof y, luego, por el ciclo de Krebs. Mediante estos procesos, las células obtienen la máxima energía. La reacción de oxidación total es la siguiente:



En condiciones anaeróbicas el proceso se frena antes, rindiendo productos ácidos que deben ser eliminados y, por consiguiente, no son susceptibles de ulterior empleo. De esta forma, para obtener la misma cantidad de energía se deben consumir mayores cantidades de glucosa. Por ejemplo, en el músculo esquelético, en condiciones anaeróbicas, el piruvato es oxidado a lactato (por la lactato deshidrogenasa), el cual frente a un esfuerzo intenso se acumula y pasa a la sangre, produciendo un estado de acidosis transitoria y fatiga muscular.

En peces, las enzimas de la glicólisis y del ciclo de Krebs han sido todas caracterizadas. En líneas generales, responden en medida análoga a las de mamífero, aunque los mecanismos de regulación son algo diferentes (Christiansen y Klungsoyr, 1987).

Las rutas anaerobias alternativas parecen ser más importantes en algunos invertebrados, particularmente en aquellos que, aún siendo aerobios, deben sobrevivir durante ciertos períodos, más o menos prolongados, en condiciones de escaso aporte de oxígeno o, bien, anaerobias. Tal es el caso de los organismos del bentos, cuyo hábitat son lodos y sedimentos, o de ciertos bivalvos fijos (caso de mejillones) que viven a expensas de la acción de las mareas. Diversos ácidos, distintos del láctico, pueden producirse como consecuencia del metabolismo anaerobio y esos organismos han desarrollado varios mecanismos para inactivarlos o eliminarlos. Dichos animales pueden soportar la consiguiente pérdida de energía ya que disponen de abundante alimento y/o desarrollan escasa actividad muscular. En el metabolismo anaerobio de muchos bivalvos se ha comprobado que el principal producto formado es el succinato, el cual podría originarse por interrupción de la vía glicolítica a nivel del fosfoenolpiruvato e incorporación de una molécula de dióxido de carbono (Zwaan y van Marrewijk, 1973; Zwaan y Wijsman, 1976; Zaba y Davies, 1980; Holwerda et al., 1984; Storey, 1985).

ORGANISMOS ESPECÍFICOS SELECCIONADOS

Diversas especies de gastrópodos acuáticos han sido empleadas en estudios de bioacumulación y, en mayor medida, en bioensayos agudos o crónicos (Brown et al., 1974; Benfield y Buikema, 1980; Murray, 1981; Watton y Hawkes, 1984).

La elección de dichos organismos obedece a diferentes causas, según el caso. En primer término, porque suelen estar ampliamente distribuidos en muchos sistemas marinos, de estuarios o de agua dulce, disponiéndose de abundante material para su análisis. En segundo lugar, porque muchas especies de gastrópodos pueden ser fácilmente criadas y mantenidas en condiciones de laboratorio, disponiéndose de organismos en un mismo estado de salud, edad, sexo, desarrollo y sometidos a la misma dieta (Benfield y Buikema 1980).

Para el presente trabajo, se seleccionaron ejemplares de Ampullaria insularum para realizar los estudios de bioacumulación. En los bioensayos agudos, se utilizaron ejemplares de Ampullaria canaliculata y de Biomphalaria glabrata.

Representantes de varios géneros de la familia Ampullariidae se encuentran ampliamente distribuidos en los cinco continentes y algunos de ellos han adquirido una gran propagación en la cuenca del Río de la Plata. Así, mientras que los organismos de la especie A. insularum se distribuyen principalmente en ambientes lóticos, de los ríos Paraguay, Paraná, Uruguay y de la Plata; los de la especie A. canaliculata prefieren ambientes lénticos de lagunas, charcas o pantanos (de Castellanos y Fernández, 1976).

Ambas especies se caracterizan por poseer una conchilla relativamente grande, globosa y generalmente umbilicada. Se trata de gastrópodos pulmonados, poseen sexos separados y son capaces de resistir diversos tipos de aguas, incluso aquellas de salinidad variable. Viven de tres a cuatro años y son de rápido crecimiento en primavera y verano, mientras que en invierno se sumergen en el fango o viven refugiados en raíces de plantas sumergidas. Se alimentan preferentemente de ciertas especies vegetales autóctonas (de Castellanos y Fernández, 1976).

Los ejemplares de Biomphalaria glabrata son gastrópodos de agua dulce, pulmonados, que se distribuyen en las zonas tropicales de América Central y del Sur. Debido a su pequeño tamaño, aún

adultos, se facilita el equipamiento y el espacio necesario para su crianza y mantenimiento en condiciones de laboratorio, siendo a la vez visibles a simple vista. Por ello, han sido ampliamente recomendados como "organismos indicadores" en bioensayos agudos o crónicos (Münzinger, 1987).

Si bien no se trata de una especie local, ha sido incluido en los estudios de letalidad, para comparar su comportamiento con los resultados que figuran en la literatura.

Estos organismos son hermafroditas. En su desarrollo embriogénico se distinguen cuatro estadios, hasta llegar al individuo adulto. En general, resultan muy sensibles frente a diversos contaminantes, a pesar de que son capaces de adaptarse a rangos relativamente amplios de alcalinidad, temperatura y pH (Münzinger, 1987).

Diversas especies de moluscos bivalvos han sido frecuentemente recomendadas y empleadas en numerosos programas de monitoreo (Goldberg et al., 1983; Viarengo y Canesi, 1991). Siguiendo esa tendencia, organismos de la especie Neocorbicula limosa, fueron empleados para la realización de los estudios de bioacumulación, efectuados durante tres temporadas. Posteriormente, se utilizaron también en bioensayos agudos.

El género Neocorbicula se distribuye preferentemente en las costas orientales de América del Sur, desde las Guianas hasta el Río de la Plata. Son organismos hermafroditas y no se han distinguido estados larvales. Las poblaciones se encuentran normalmente distribuidas en pequeñas agregaciones de individuos con directa línea de descendencia. El largo medio de sus valvas es de aproximadamente 20,5 mm y la altura media de 17,1 mm (Parodiz y Hennings, 1965).

Conviene mencionar que algunos autores han descripto a estos bivalvos como pertenecientes al género Corbiculidae. Las controversias acerca de su correcta clasificación parecen haber surgido desde las primeras descripciones. Sin embargo, otros autores han confirmado las diferencias taxonómicas entre los organismos del género Corbicula, los cuales se distribuyen naturalmente en Europa y Asia, y fueron introducidos en los Estados Unidos por la década del '50, con los ejemplares de Neocorbicula, que se encuentran en América del Sur (Parodiz y Hennings, 1965).

V. EFECTOS DE LOS ELEMENTOS METÁLICOS SOBRE ORGANISMOS ACUÁTICOS

INGRESO DE LOS ELEMENTOS

La incorporación de elementos metálicos, al igual que de otras sustancias químicas contaminantes, en organismos acuáticos puede verificarse a partir de distintos medios. Así, en peces se considera que la mayor carga de contaminantes ingresa a partir de la fase acuosa y del alimento (Mc Cracken, 1987; Hogstrand y Haux, 1991; WHO, 1992). Para invertebrados básicamente ocurre lo mismo, aunque en el caso de organismos del bentos se suma también la incorporación a través de los sedimentos y del material en suspensión (Landner, 1988; Luoma, 1988; Mc Cracken, 1987).

Teniendo en cuenta que en animales acuáticos las branquias y el tracto gastrointestinal constituyen las principales interfaces entre el organismo, su alimento y la columna de agua, se considera que los tejidos que constituyen esos órganos representan las mayores vías de ingreso para los contaminantes (Dorigan et al., 1987).

La importancia relativa de los distintos medios aún no ha sido esclarecida, y es muy difícil hacerlo, ya que depende de múltiples y variados factores, los que progresivamente iremos tratando. La tendencia general ha consistido en investigar la incorporación de los elementos a través de la fase acuosa, considerando que este aporte es muy superior al de la dieta, a pesar de que algunos autores han enfatizado su importancia (Beijer y Jernelöv, 1986; Depledge y Rainbow, 1990; Laurén, 1991).

La magnitud de los elementos que ingresan a partir de la fase acuosa depende por un lado de las propiedades físico-químicas del medio, que determinará la especiación del metal, o sea su biodisponibilidad, las cuales ya anteriormente hemos tratado. Por otro, depende de las características de cada organismo y de la existencia de los diversos mecanismos de control o regulación que puedan exhibir (Rainbow et al., 1993). De esta manera, frente a un dado nivel de biodisponibilidad de un elemento en la fase acuosa el ingreso dependerá del área de las superficies permeables y de la naturaleza de la barrera constituida por las membranas de dichas superficies, que interpone el organismo ante el medio (Depledge y Rainbow, 1990).

La mayoría de los estudios de laboratorio que intentan aclarar este tema, han puesto de manifiesto una serie de factores susceptibles de incidir en la incorporación de contaminantes a través de los distintos medios.

En peces, el proceso de alimentación está perfectamente diferenciado del de respiración. Por consiguiente, se asume que en estos organismos realmente la mayor parte del ingreso de contaminantes se verifica a través de la fase acuosa (Laurén, 1991). Sin embargo, obviamente, el grado de contaminación presente en el alimento, determinará su potencial aporte en la carga corporal total del animal. En ambientes marinos, donde la mayor parte del cadmio está complejado con iones Cl^- , disminuyendo su biodisponibilidad en relación a los sistemas de agua dulce, la importancia relativa de la fase acuosa puede atenuarse, mientras que el aporte de la dieta puede llegar a ser más significativo (WHO, 1992).

En mejillones (M. edulis) se demostró que para los elementos Zn, Mn, Fe y Co, la incorporación más importante se verificaba a través de la dieta, siendo considerablemente menor a través de la fase acuosa (Waldichuk, 1974).

En ostras, se encontró una mayor incorporación de cadmio en los animales alimentados con fitoplancton no contaminado, que en los mantenidos sin alimentación, posiblemente debido a un aumento del flujo de agua circulante en los animales alimentados. Otro estudio reveló, además, que la incorporación de cadmio resultaba mayor en verano que en invierno, también por causas similares, inducidas en este caso por el incremento en la temperatura del agua (WHO, 1992).

En presencia de sedimentos, el ingreso de cadmio por la fase acuosa, en almejas, se vio severamente disminuído con respecto al observado en animales expuestos únicamente por agua (WHO, 1992).

En relación al plomo, su ingreso a los distintos organismos acuáticos está fundamentalmente influído por los distintos factores físico-químicos que condicionan su biodisponibilidad en el sistema acuático. Como únicamente una pequeña proporción está disuelta en el agua, la incorporación a través de la fase acuosa no resultará tan importante como en el caso del cadmio, a la vez que aumenta, comparativamente, la proporción susceptible de ser incorporada por la dieta y/o sedimentos, particularmente en sistemas contaminados (WHO, 1989).

MECANISMOS DE INGRESO

Actualmente está muy bien establecido que el ingreso de las diversas sustancias químicas a las células se puede realizar a través de una gran variedad de mecanismos. Cuando se trata de elementos metálicos, el mecanismo específico que predomine en cada caso dependerá del metal en cuestión, su especiación química, la especie biológica en consideración, así como también del tipo celular involucrado (Dallinger, 1994a).

Se considera que en branquias de ciertos mejillones (Mytilus edulis) una importante proporción de cadmio ingresa por un mecanismo de simple difusión pasiva. Las evidencias que sostienen esta hipótesis han demostrado que el ingreso del metal no está afectado por la temperatura; la presencia de otros metales, como zinc, cobre, mercurio, plomo o hierro; y es insensible a la presencia de bloqueantes de canales iónicos o inhibidores metabólicos. Para que este proceso sea posible, es imprescindible que ingresen especies no cargadas, en este caso complejos de tipo $CdCl_2$, los cuales pueden constituir la mayor proporción del metal en ambientes marinos (Carpene y George, 1981; Dallinger, 1994a).

Sin embargo, la mayoría de los elementos metálicos presentes en sistemas acuáticos naturales se encuentran como especies iónicas cargadas. Por lo tanto, dichas especies no son capaces de ingresar a las células mediante un proceso de simple difusión. Así, para algunas sustancias se ha reconocido la existencia de sistemas transportadores más o menos específicos. Básicamente, en un sistema transportador pueden distinguirse tres procesos (Oxender, 1972; Eckert, 1990):

- unión del soluto a un sitio receptor,
- translocación del complejo a través de la membrana,
- costo energético asociado.

En algunos casos, el transporte en condiciones fisiológicas no implica un gasto de energía, recibiendo el nombre de "difusión facilitada" (Oxender, 1972; Eckert, 1990).

En relación a los elementos metálicos esenciales mayoritarios, como el Na, K y Ca, están bien caracterizados los diversos siste-

mas de transporte, que involucran bombas enzimáticas dependientes de ATP y canales iónicos, a fin de garantizar los niveles intra- y extracelulares fundamentales para la fisiología celular. Para los elementos esenciales minoritarios, casos del cobre, hierro y zinc, entre otros, se considera que ingresan mediante transportadores específicos de membrana, aunque algunos aspectos del proceso no están todavía completamente aclarados (Stacey y Klaassen, 1981; Blazka y Shaikh, 1992).

En relación a los elementos tóxicos, para los que no se ha reconocido un rol esencial, casos del cadmio, mercurio y plomo, entre otros, no se han identificado mecanismos específicos para su transporte, ni tampoco se considera que se desarrollen como consecuencia de una exposición. Por ello, se asume que el proceso de ingreso se verifica a expensas de los mismos sistemas de transporte disponibles para los elementos esenciales. Esta consideración surge de las distintas evidencias de competición o interacción que se verifican para el ingreso de elementos esenciales, en distintos tipos celulares, en presencia de metales no esenciales (Foulkes, 1988; Blazka y Shaikh, 1992).

Recientemente, se ha propuesto un modelo general para explicar el ingreso de elementos tóxicos en organismos acuáticos, el cual se esquematiza en la Figura 10. Se considera que los distintos cationes libres (generalmente hidratados) se unen a proteínas transportadoras, ubicadas en la membrana celular de las superficies permeables de los organismos. Dicha unión se verificaría a través de enlaces con átomos de azufre o nitrógeno, presentes en dichas proteínas, rindiendo complejos que se internalizan pasivamente hacia el interior de la célula. Una vez en éstas, los cationes interaccionan con ligandos de muy alta afinidad por los metales, formando complejos no difusibles, que promueven el continuo ingreso de los elementos, aun en contra de un gradiente de concentración, a la vez que dificultan su salida (Brezonik et al., 1991; Rainbow et al., 1993; Dallinger, 1994a). Oportunamente, discutiremos las características de estos complejos intracelulares.

Los estudios cinéticos indican que se trata de un proceso bifásico, con una primera etapa rápida (equilibrio 1 de la Fig.10), seguido de la etapa de internalización, más lenta (equilibrio 2), la cual controlaría la velocidad (Brezonik et al., 1991).

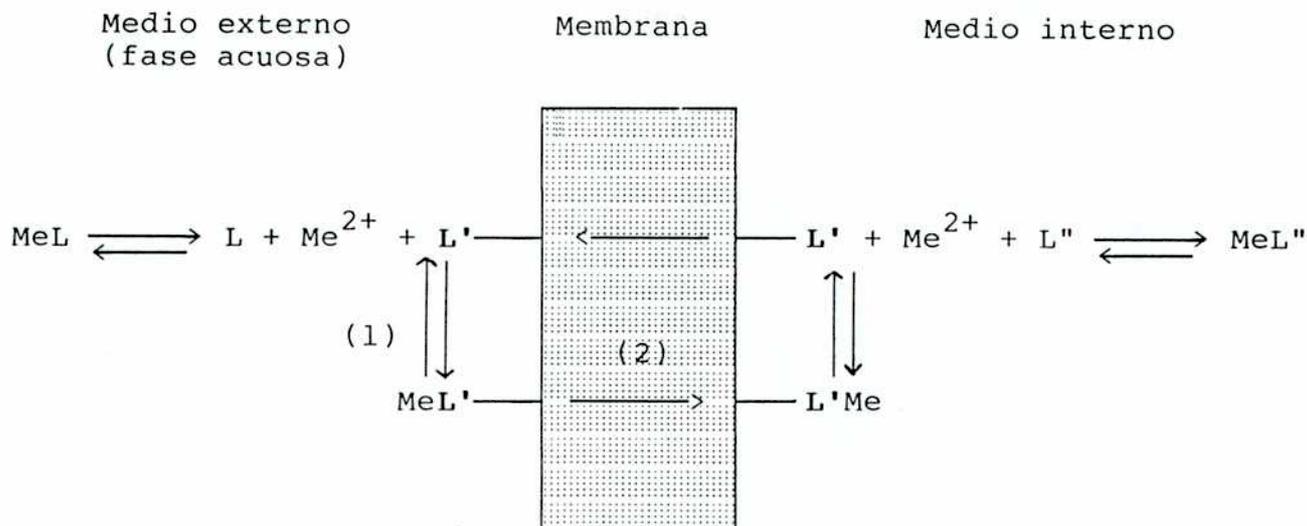


Fig.10.: Esquema del modelo propuesto para el ingreso de elementos metálicos a través de membranas celulares mediante difusión facilitada.

En hepatocitos de ratas se comprobó la existencia de un mecanismo muy similar al descrito, para el ingreso de cadmio. En este caso, la primera etapa involucraría uniones a grupos SH- de componentes de la membrana celular (Gerson y Shaikh, 1984). La segunda etapa no requiere energía, aunque sí es dependiente de la temperatura (Blazka y Shaikh, 1992). Se sabe que un descenso de la temperatura afecta la fluidez de las membranas plasmáticas, por lo tanto se afectarán aquellos procesos que involucren cambios en la conformación de las proteínas y se inhibirán los movimientos de transporte a través de las mismas (Krasne et al., 1971). Sin embargo, conviene señalar que los cambios de temperatura, así como también otros factores, pueden tener distinta incidencia entre las diferentes especies, particularmente entre organismos poiquiloterms y vertebrados mamíferos.

No obstante, tampoco se descarta que una cierta proporción de elementos tóxicos pueda ser incorporada a través de otros mecanismos, incluyendo aquellos que involucren un transporte activo (Brezonik et al., 1991; Laurén, 1991; Rainbow et al., 1993).

Por ejemplo, el cadmio tiene un radio iónico muy similar al del calcio (109 y 114 pm, respectivamente) y, por lo tanto, es

susceptible de ser incorporado a través de los mecanismos de transporte disponibles para éste (Rainbow et al., 1993). De hecho, está bien establecido que en sistemas acuáticos de baja dureza, aumenta la proporción de cadmio incorporada por los organismos (Laurén, 1991). Así, en la literatura se reporta que el cadmio, en ciertas concentraciones, es capaz de inhibir a la Ca^{2+} -ATPasa y/o a los canales de calcio, en branquias de diversos peces (Verbost et al., 1988; Laurén, 1991).

En relación a moluscos bivalvos, Hemelraad et al. (1990a) documentaron alteraciones en los niveles de Na, K y Ca intra- y extracelular, por exposición crónica al cadmio, mientras que Roesijadi y Unger (1993) demostraron que, en branquias, cierta proporción de dicho metal puede ingresar a través de canales de calcio.

Como ya hemos señalado, no todos los elementos tóxicos emplearán en la misma medida los diversos mecanismos de transporte disponibles. En distintos sistemas celulares se han encontrado diferencias entre el ingreso de cadmio y de mercurio, u otro metal (Gerson y Shaikh, 1984; Laurén, 1991; Blazka y Shaikh, 1992; Blazka et al., 1992; Foulkes y Bergman, 1993; Rainbow et al., 1993). Incluso, dentro de un mismo organismo, los mecanismos puestos en juego para el ingreso en los distintos tejidos serán diferentes, lo que conduce a que ciertos órganos se caractericen por presentar mayores o menores niveles de acumulación, tal como seguidamente veremos (Foulkes, 1988; Blazka et al., 1992).

Por lo tanto, no podemos asumir que el ingreso de plomo en organismos acuáticos transcurra exactamente igual al del cadmio, si bien el modelo básico sigue, en principio, siendo válido. Lamentablemente, hasta el momento, se dispone de pocos estudios específicos sobre los efectos y mecanismos de acción de este metal en dichos organismos. Esta falta de referencias nos acompañará durante los distintos aspectos que se irán tratando en este trabajo.

Las interacciones que se verifican entre el plomo y el calcio, tanto a nivel bioquímico, celular y sistemático, están en cambio ampliamente reconocidas en numerosas especies de vertebrados. Se sabe que por efecto de una dieta rica en calcio disminuye la absorción gastrointestinal de plomo y viceversa (Meredith et al., 1977; Streckis, 1982).

En branquias de peces se ha sugerido que el plomo podría ser

internalizado a través de un transportador proteico de calcio, dependiente de vitamina D (Laurén, 1991).

En invertebrados, también se registran interacciones entre el plomo y el calcio, especialmente en aquellos organismos que tienen altos requerimientos del último para la conformación de sus valvas. En estas especies, ya sean terrestres o acuáticas, se puede verificar una mayor absorción de plomo, al igual que de otros elementos tóxicos (Beeby, 1991). Además, según estudios de Meyer et al. (1991) cangrejos expuestos a soluciones de plomo y cadmio terminaron acumulando menor cantidad de ambos elementos, que aquellos expuestos a cada uno de los metales separadamente. Por consiguiente, se verificaría una interacción entre ambos tóxicos, a nivel de la fase de absorción.

Para finalizar, debemos destacar que cuando los elementos están unidos o asociados a macromoléculas o a las superficies de partículas no son capaces, por su tamaño, de atravesar las membranas celulares. En estos casos, la incorporación de los contaminantes puede verificarse mediante procesos de pinocitosis o fagocitosis (Depledge y Rainbow, 1990; Dallinger, 1994a).

VÍAS DE DISTRIBUCIÓN

Una vez que los contaminantes ingresan en los organismos, sufren un proceso de distribución a través del sistema circulatorio. En líneas generales, este proceso está principalmente determinado por los siguientes factores (Guarino, 1987):

- flujo sanguíneo
- disponibilidad y propiedades de las proteínas plasmáticas
- naturaleza de las barreras hematotisulares

Cada uno de esos factores adopta características muy diversas según sea la clase y la especie del organismo acuático que estamos considerando. Específicamente en peces, se ha establecido que los elementos metálicos se distribuyen a través de la sangre. Sin embargo, todavía no se han identificado ni estudiado todos los posibles componentes involucrados, especialmente en relación a las proteínas plasmáticas. Además, la información que pueda dis-

ponerse para una especie no siempre puede ser extrapolada a otra, aún cuando ambas pertenezcan a la misma clase.

El nivel de flujo sanguíneo, determinado por la frecuencia cardíaca, constituye el principal factor que influencia el proceso de distribución. Se estima que la frecuencia cardíaca en peces es aproximadamente un décimo de la observada en ratones (600 pulsaciones/minuto). En algunas almejas es aún menor, de aproximadamente 20 pulsaciones/minuto (Barnes, 1987; Guarino, 1987).

El rango total de proteínas plasmáticas en organismos acuáticos es considerablemente menor al observado en mamíferos. Algunas fracciones proteicas suelen incluso estar ausentes en los primeros (Guarino, 1987).

En base a esos dos factores, la magnitud del proceso de distribución tendería a ser comparativamente menor que en mamíferos. Sin embargo, como contrapartida, la naturaleza de las barreras hematotisulares, especialmente la hematoencefálica, generalmente es más simple y facilita la distribución en los distintos tejidos (Guarino, 1987)

En diversas especies de invertebrados acuáticos, los elementos metálicos se distribuyen por medio de la hemolinfa. Este proceso puede verificarse a través de los compuestos proteicos allí presentes, entre los que se destacan las proteínas transportadoras de oxígeno, que pueden ser moléculas de hemoglobina o hemocianina, según la especie; o bien, algún otro tipo de proteína transportadora de metales esenciales, similares a las transferrinas y capaces de unir diversos elementos. En aquellas especies que carecen de proteínas transportadoras de oxígeno en la hemolinfa, los metales pueden asociarse y ser transportados por los hemocitos, equivalentes a los elementos figurados de la serie blanca. Tampoco se descarta que puedan distribuirse simplemente en forma disuelta en la hemolinfa (Howard y Simkiss, 1981; Depledge y Rainbow, 1990). Por consiguiente, el grado y la magnitud de la unión de los metales asociados a cada uno de esos componentes proteicos dependen de las disponibilidades de cada especie en particular. Sólo se pueden establecer principios básicos ya que se desconoce aún la exacta composición de las hemolinfas en la mayoría de los invertebrados acuáticos.

DISTRIBUCIÓN EN TEJIDOS

Actualmente, no quedan dudas de que las concentraciones de elementos metálicos trazas en el tejido total, expresadas en peso húmedo, de casi todas las especies acuáticas estudiadas hasta ahora, exceden ampliamente a los niveles presentes en la fase acuosa, cuando menos, en un orden de magnitud (Depledge y Rainbow, 1990).

Este proceso de acumulación resultante, puede atribuirse a varias causas. Los organismos pueden ser incapaces de regular el ingreso o de estimular la eliminación de los metales, aún cuando éstos se presenten en niveles excesivos. Pero también puede ser, simplemente, el resultado de la necesidad de los organismos de incorporar elementos para satisfacer sus requerimientos fisiológicos normales. Lamentablemente, aún es muy difícil discernir cuál de esos factores desempeña el rol más relevante frente a cada elemento y a cada organismo en particular (Depledge y Rainbow, 1990).

Lo cierto es que, a partir del sistema circulatorio, los metales se pueden incorporar, en mayor o menor grado, a los distintos tejidos. En líneas generales, se considera que este proceso de distribución no es uniforme, aunque en algunos casos particulares, se ha encontrado un alto grado de especificidad (Depledge y Rainbow, 1990; Hogstrand y Haux, 1991).

Un factor de suma importancia a tener en cuenta, es la naturaleza del metal en cuestión. Los elementos esenciales presentan una distribución más homogénea en los distintos órganos, para satisfacer los requerimientos fisiológicos y tienden a acumularse preferentemente en aquellos destinados a su reserva, aún cuando su ingreso supere ampliamente las necesidades del organismo. Los no esenciales tienden a acumularse en órganos o tejidos que posibiliten su excreción, salvo cuando se mimeticen con elementos esenciales y terminen adoptando el patrón de distribución de éstos. Por lo tanto, "a priori", no se puede considerar que todos los metales se concentren en un determinado órgano o tejido (Depledge y Rainbow, 1990).

Otro factor a considerar, y que no puede quedar relegado con el anterior, es la magnitud y duración de la exposición de los organismos. Frente a niveles de exposición muy elevados, la dis-

tribución puede alcanzar órganos que, de otro modo, no se verían afectados. El tiempo que transcurre, permite establecer una mayor o menor distribución en los distintos tejidos (Depledge y Rainbow 1990; Hogstrand y Haux, 1991).

Estas consideraciones resultan básicas para poder interpretar este proceso y comprender algunas aparentes discrepancias que se señalan en la literatura. De acuerdo a ellas, el patrón de acumulación que presenten los organismos en la naturaleza, no siempre resultará igual o comparable con el de aquellos sometidos a concentraciones, más o menos elevadas, de uno o más contaminantes, en condiciones controladas de laboratorio (Carmichael et al., 1980). Sin embargo, podemos establecer algunos lineamientos generales, que nos permitan identificar aquellos órganos o tejidos donde normalmente tienden a acumularse la mayoría de los elementos, especialmente en relación a organismos que estén sujetos a un cierto grado de contaminación.

Según la literatura, la concentración de metales en el cuerpo entero de peces recolectados en la naturaleza, incluso de aquellos procedentes del mismo sistema acuático, es altamente variable según la especie (Koli et al., 1978; Mc Cracken, 1987). Esto no debiera resultar sorprendente si se tiene en cuenta que el proceso de acumulación depende del tamaño, la edad, el sexo, los hábitos nutricionales y las características fisiológicas de las distintas especies. Por consiguiente, esos valores de concentración de elementos no reflejan necesariamente los niveles ambientales y, por ende, no resultan parámetros útiles como indicadores de contaminación (Mc Cracken, 1987; Dixon y Newman, 1991).

Mediante estudios de campo, diversos autores han demostrado que los elementos metálicos se distribuyen preferentemente en los siguientes tejidos de peces: hígado, riñón, cerebro, branquias y epitelios (Salánki et al., 1982; Hilmy et al., 1987; Saleh et al., 1988; Winger et al., 1990). Se considera que, generalmente, los niveles de metales en músculo se mantienen bajos, aun en organismos provenientes de sitios relativamente contaminados. Teniendo en cuenta que gran parte de la masa corporal del pez está constituida por músculo, se explica así por qué el contenido del individuo entero no refleja el contenido de elementos en el ambiente (Sprague, 1987).

Ahora bien, para una misma especie, los niveles hallados en el

cuerpo entero de organismos de la naturaleza, comparados con aquellos expuestos a niveles ambientales, en condiciones controladas de laboratorio, resultaron ser bastante coincidentes (Mc Cracken, 1987).

En base a estudios de laboratorio, se pudo comprobar, asimismo, que cada metal presenta un patrón de distribución diferente. Por ejemplo, el cobre se acumula preferentemente en hígado; en cambio, el zinc se distribuye en tejido epitelial, músculo y huesos (Hogstrand y Haux, 1991). En cuanto al cadmio, algunos autores consideran que se localiza en su mayor parte en hígado, seguido por riñón y, por último, en branquias (Mc Cracken, 1987). Sin embargo, otros reportan que la acumulación en hígado y en riñón resulta casi equivalente (Sprague, 1987; Hogstrand y Haux, 1991).

En diversas especies de moluscos gastrópodos se ha demostrado que el hepatopáncreas, o glándula digestiva, presenta en general los máximos niveles de acumulación (Möller, 1978; Howard y Simkiss, 1981; Reineskog y Petersson, 1990). Este tejido puede actuar como sitio de almacenamiento, temporal o permanente, frente a la presencia de niveles excesivos de elementos, de manera de amortiguar sus efectos tóxicos (Depledge y Rainbow, 1990). Sin embargo, con respecto al plomo, cantidades comparables parecen localizarse también en el tejido duro (Möller, 1978; Reineskog y Petersson, 1990).

Diversos autores coinciden en que, en general, las branquias presentan los mayores niveles de elementos en moluscos bivalvos de sistemas dulceacuícolas o marinos naturales, especialmente en relación a cadmio, cobre, hierro, manganeso, plomo y zinc. Las vísceras, el pie, el músculo aductor y el manto acumulan cantidades muy variables entre sí, de acuerdo al metal analizado (Salánki et al., 1982; Mc Cracken, 1987; Ray y Mc Leese, 1987; Balogh, 1988).

Sin embargo, merece destacarse que la elevada concentración en las branquias puede no corresponder a una verdadera acumulación, sino, más bien, a un fenómeno de adsorción superficial sobre el mucus. El contenido de elementos en vísceras se deriva del material proveniente de las branquias y se encuentra localizado en el tracto digestivo y, especialmente, en riñones (Mc Cracken, 1987). Los estudios con bivalvos expuestos en condiciones controladas de

laboratorio, también señalan al tejido renal como el principal sitio de acumulación (Carmichael et al., 1980). En algunos organismos se han encontrado, además, importantes cantidades de metales, como cadmio, en las valvas, alcanzando, incluso, niveles del mismo orden a los observados en el tejido blando (Mc Cracker, 1987).

DISTRIBUCIÓN A NIVEL INTRACELULAR

Una vez que los metales alcanzan a penetrar en las células se distribuyen en distintas estructuras, mediante los siguientes procesos (Viarengo, 1989):

Interacción con los grupos tioles (SH-) de diversas moléculas, como aminoácidos, péptidos y proteínas.

Compartimentalización en el sistema lisosomal.

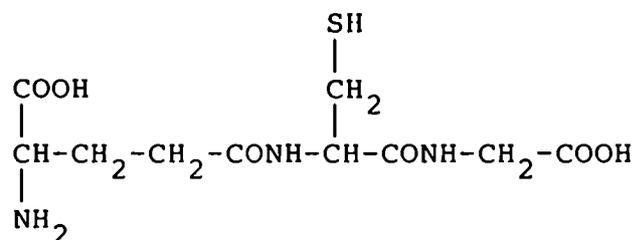
Acumulación en gránulos de naturaleza inorgánica.

Se considera que las variadas formas de interacciones químicas o de compartimentalización que se verifican a nivel intracelular, actúan como sistemas de detoxificación, protegiendo los procesos bioquímicos normales frente a las alteraciones que, de otro modo, se producirían como consecuencia de la presencia de elementos metálicos en niveles tóxicos. Además, estos procesos tienden a confinar a los elementos en determinados tejidos, previniendo su redistribución (Carmichael y Bondy, 1981; Nott, 1991). Así, mediante estudios de microanálisis con rayos X se ha podido establecer que los sistemas de detoxificación operan principalmente en las glándulas digestivas de moluscos gastrópodos marinos y en el tejido renal de moluscos bivalvos (Nott, 1991). Justamente, esos tejidos presentan los más altos niveles de acumulación.

Grupos tiólicos no proteicos: glutati6n

Se considera que el glutati6n (GSH) es el compuesto ti6lico, de naturaleza no proteica, m6s abundante e importante en las células animales, así como también en la mayoría de las plantas y

bacterias. El compuesto, descubierto por Hopkins en 1921, fue identificado años más tarde como un tripéptido: la γ -L-glutamil-L-cisteinil-glicina, cuya fórmula se describe a continuación (Meister y Anderson, 1983; Orrenius y Moldéus, 1984; Kosower, 1989):



En base a su actividad bioquímica el grupo tiol, aportado por el aminoácido cisteína, resulta sin lugar a dudas el más importante de todos los potenciales grupos reactivos (Kosower, 1989; Mannervik et al., 1989).

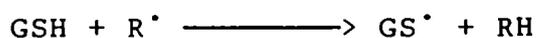
El compuesto se biosintetiza a partir de los aminoácidos libres, por medio de las enzimas γ -glutamil cisteína sintetasa y glutation sintetasa. Su degradación comienza por la separación del grupo γ -glutamil, reacción catalizada por la γ -glutamil transferasa (Meister y Anderson, 1983; Orrenius y Moldéus, 1984).

El tripéptido puede ser oxidado, formando glutatió disulfuro (GSSG), pero sólo un muy pequeño porcentaje se encuentra en las células como tal, en relación a los niveles de la forma reducida (GSH), que alcanzan aproximadamente el 99,5 % del total (Anderson 1985).

El glutatió debe su importancia al hecho de estar involucrado en un gran número de funciones vitales para las células, entre las que se destacan, a nivel fisiológico, su rol en el mantenimiento de la integridad de la membrana y en la organización del citoesqueleto, la síntesis de proteínas y ADN, la modulación en la conformación de las proteínas y de la actividad enzimática, la promoción de la liberación de neurotransmisores (Orrenius y Moldéus, 1984; Kosower, 1989; Mannervik et al., 1989).

Asímismo, este compuesto exhibe un rol relevante dentro de la toxicología por estar involucrado en numerosos procesos de biotransformación, tanto sea de compuestos endógenos como de xenobióticos. Gracias a estas reacciones, se considera que el glutatió protege a las células frente a una amplia gama de agentes nocivos (Meister y Anderson, 1983; Kosower, 1989; Bannai, 1991).

En líneas generales se ha establecido que el glutatión puede actuar como agente nucleofílico, reductor o atrapante de radicales libres (Orrenius y Moldéus, 1984; Mannervik et al., 1989; Bannai, 1991; Chan y Cherian, 1992). Al respecto, brevemente comentaremos que mediante las reacciones de adición o sustitución nucleofílica se forman derivados conjugados, los cuales pueden ser excretados en la orina. Las reacciones en las que actúa como agente reductor conducen a la formación de glutatión disulfuro. Frente a radicales libres se pueden verificar, en forma general, dos tipos de reacciones:



En relación a los elementos metálicos, el glutatión se comporta como un ligando polidentado, disponiendo de dos grupos carboxílicos, uno amino y dos amidos, además del tiólico, como potenciales sitios de unión (Christie y Costa, 1984; Rabenstein, 1989). Los complejos metálicos que se forman permiten la diferenciación de los elementos en dos categorías:

metales que, en niveles trazas, catalizan la oxidación del GSH a GSSG a través de la formación de complejos intermediarios.

Ejemplos: Cu^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} y Cr^{6+} .

metales que forman complejos de coordinación muy estables, provocando interferencias en el ciclo normal de interconversión entre el GSH y el GSSG, encargado de asegurar los altos niveles de la forma reducida, necesarios para las células.

Ejemplos: Cd^{2+} , Hg^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} y Zn^{2+} .

Debido a la gran afinidad del glutatión por muchos metales, se considera que los complejos resultantes deben desempeñar, sin dudas, un importante rol en la toxicidad de dichos elementos. Algunos autores sostienen que estos complejos estarían involucrados en la incorporación y en la eliminación de dichos metales. Por otra parte, la influencia del glutatión en la toxicidad ha demostrado ser altamente dependiente del metal en cuestión. La estructura química de los complejos resultantes ha sido extensa-

mente estudiada, no obstante su significación biológica aún no está completamente aclarada (Christie y Costa, 1984; Rabenstein, 1989).

Grupos tiólicos proteicos: metalotioneínas

Las metalotioneínas (MT) son proteínas no enzimáticas, que exhiben una importante capacidad para unir ciertos cationes divalentes de elementos metálicos, entre ellos Ag^{2+} , Au^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , o incluso monovalentes, como la especie Cu^+ . Reciben ese nombre en base al alto número de metales que pueden unir y de grupos tioles que presentan. Inicialmente, fueron aisladas por Margoshes y Vallee (1957) a partir de la corteza renal de equinos. Posteriormente, fueron purificadas, determinándose su secuencia de aminoácidos y sus estructuras moleculares (Kägi y Vallee, 1960; Hamer, 1986; Kägi y Kojima, 1987; Kägi y Schäffer, 1988; Lu y Stillman, 1993).

Estas proteínas se caracterizan por su bajo peso molecular, usualmente entre 6 y 10 kDa, y contienen aproximadamente unos 60 residuos de aminoácidos en total, de los cuales un alto porcentaje, que oscila entre el 20 y el 30 %, corresponde a la cisteína (Cys). Además, presentan de 6 a 8 residuos de lisina, de 7 a 10 serinas y un único residuo de metionina acetilada, como aminoácido terminal. La mayoría de los residuos de cisteína se presentan como secuencias de tipo: Cys-X-X-Cys, Cys-X-Cys o Cys-Cys. Las metalotioneínas carecen de residuos aromáticos e hidrofóbicos. Son solubles en agua y considerablemente termoestables (Hamer, 1986; Kägi y Kojima, 1987; Kägi y Schäffer, 1988; Dallinger, 1994b).

Las uniones con los elementos metálicos se verifican a través de los átomos de azufre del aminoácido cisteína. Los complejos resultantes presentan una absorbancia característica al ultravioleta, variable según el metal involucrado (254 nm para cadmio, 270 nm para cobre y 220 nm para zinc). Se considera que se unen entre 6 y 7 átomos metálicos por cada molécula de proteína. La afinidad frente a los distintos elementos sigue el orden:



(Hamer, 1986; Kägi y Kojima, 1987; Kägi y Schäffer, 1988; Dallinger, 1994b).

Con el correr de los años, diversas proteínas con similar capacidad para unir elementos metálicos, aunque no siempre con estructuras análogas a las recién descritas, fueron aisladas en un gran número de organismos animales, incluyendo mamíferos, reptiles, aves, peces e invertebrados; en hongos y bacterias, así como también en diversas especies vegetales (Stone y Overnell, 1985; Hamer, 1986; Viarengo, 1989; Rauser, 1990; Olsson, 1994). Por ello, para clarificar la nomenclatura, las metalotioneínas se han clasificado en tres categorías, en base a sus estructuras moleculares (Fowler et al., 1987; Dallinger, 1994b):

Clase I: polipéptidos en los cuales los aminoácidos de cisteína se localizan en forma muy similar a la observada en las MT obtenidas del tejido renal equino.

Clase II: polipéptidos en los cuales la localización de los aminoácidos de cisteína se diferencia apreciablemente con la observada en las proteínas del tejido renal equino.

Clase III: polipéptidos de bajo peso molecular que contienen cisteína y que se encuentran principalmente en plantas, como las fitoquelatinas. Estas últimas, no serían sintetizadas por ribosomas, sino que derivarían del metabolismo del glutatión ya que en su composición intervendrían únicamente los aminoácidos γ -glutámico, cisteína y glicina (Grill et al., 1985; Rauser, 1990).

En todas las especies de vertebrados estudiadas hasta el momento, se encontraron al menos dos proteínas isomorfas, denominadas metalotioneínas MT-I y MT-II, en base a sus comportamientos cromatográficos en columnas de DEAE celulosa. Incluso, existiría un número no completamente determinado aún, de isoproteínas entre las MT-I, según se comportamiento electroforético, las cuales suelen ser denominadas mediante letras, por ejemplo MT-Ia, etc. (Karin, 1985; Hamer, 1986; Kägi y Kojima, 1987),

La mayoría de las proteínas aisladas de tejidos de mamíferos exhiben estructuras moleculares casi idénticas a las inicialmente aisladas de la corteza renal de equinos (Clase I). Sin embargo,

aquellas que proceden de organismos más distanciados en la escala zoológica, pueden presentar diferencias más significativas. Algunas de ellas tienen un mayor o menor peso molecular, otras pueden presentar diversos residuos aromáticos, diferente número de átomos metálicos ligados a ellas, o bien, menor proporción de cisteína, en relación a las descritas para las clásicas metalotioneínas Clase I. Incluso, se han descrito otros polipéptidos, la mayoría aislados de invertebrados, que si bien exhiben una alta capacidad para unir metales, especialmente cadmio, carecen por completo del aminoácido cisteína (Stone y Overnell, 1985; Ray y Mc Leese, 1987; Dallinger, 1994b). Por ello, merece destacarse que en muchos trabajos se adjudica la categoría de metalotioneínas a ciertas proteínas únicamente en base a sus comportamientos en cromatografía por permeación de geles, empleando Sephadex G-75, o a sus características espectrales, sin llegar a realizar estudios de la composición y secuencia de aminoácidos (Ray y Mc Leese, 1987).

Por lo tanto, si bien en numerosas especies acuáticas, principalmente aquellas de ambientes marinos que hasta el momento han sido las más estudiadas, entre ellas peces, crustáceos, moluscos, anélidos (Mc Leese et al., 1987; Viarengo, 1989; Depledge y Rainbow, 1990; Hogstrand y Haux, 1991; Olsson, 1994) se han caracterizado verdaderas metalotioneínas, Clase I o II, también se han aislado otros polipéptidos aún no completamente caracterizados, lo que obliga a manejarnos con cautela en relación a su nomenclatura (Stone y Overnell, 1985; Ray y Mc Leese, 1987; Viarengo, 1989). En truchas, por ejemplo, se ha comprobado que existen otras proteínas que si bien exhiben una gran afinidad por ciertos metales como el cadmio, especialmente durante una exposición crónica, no tienen ninguna relación estructural con las clásicas metalotioneínas (Thomas et al., 1983; Thomas et al., 1985). En otros casos, además, se han encontrado compuestos más complejos, de mayor peso molecular, los cuales, aparentemente, serían dímeros o trímeros de metalotioneínas (Ray y Mc Leese, 1987).

Estas proteínas se localizan principalmente en el citoplasma de las células, aunque también han sido detectadas en lisosomas y en el núcleo, en éste último especialmente durante el desarrollo embrionario. En vertebrados, los niveles de mayor concentración se verifican en hígado y riñón, mientras que en invertebrados

predominan en la glándula digestiva o hepatopáncreas (Kägi y Schäffer, 1988; Dallinger, 1994b).

El rol fisiológico que desempeñan las metalotioneínas todavía no ha sido completamente esclarecido, a pesar que comenzó a ser debatido desde su descubrimiento. La mayoría de los investigadores consideran que estas proteínas están involucradas en los siguientes procesos (Brady, 1982; Karin, 1985; Viarengo, 1989; Chubatsu y Meneghini, 1993):

control extracelular (homeostasis) e intracelular de algunos elementos esenciales, como cobre y zinc.

donores de iones Zn^{2+} para ciertas apoenzimas, entre las que figuran la anhidrasa carbónica, la fosfatasa alcalina, termolisina y aldolasa.

en ciertos invertebrados, serían capaces de reactivar a la hemocianina, pigmento respiratorio que contiene iones Cu^+ .

detoxificación de ciertos metales tóxicos, como cadmio, mercurio, oro y plata.

protección de las células contra el estrés oxidativo, actuando como secuestradores de radicales libres hidroxilos y superóxido.

regulación de ciertos genes.

Recientemente, se ha identificado un tercer isomorfo, denominado MT-III, el cual actuaría como un factor inhibitorio del crecimiento neuronal. Este isomorfo presenta todas las características de las clásicas metalotioneínas, aunque posee siete aminoácidos adicionales. Se ha demostrado que los niveles de MT-III se encuentran disminuidos en los pacientes con la enfermedad de Alzheimer (Uschida, 1992; Olsson, 1994).

Por consiguiente, estas proteínas constituyen un campo de estudio en verdad fascinante, ya que parecen satisfacer diferentes demandas celulares, interviniendo en distintos procesos regulatorios y no solamente como un sistema de detoxificación, tal como fueron consideradas en un principio (Hamer, 1986; Olsson, 1994). De todos modos, es indiscutida la alta afinidad que exhiben para ligar a distintos cationes tóxicos, disminuyendo los niveles de elementos libres y, por ende, sus efectos citotóxicos.

En base a distintas experiencias, tanto "in vivo" como "in

vitro", se considera, teniendo en cuenta las constantes de afinidad, que los cationes Cd^{2+} , Hg^{2+} e incluso Cu^{2+} , en determinadas concentraciones serían capaces de desplazar al Zn^{2+} inicialmente unido a las metalotioneínas. Como consecuencia de este intercambio se impediría que los cationes más tóxicos tengan oportunidad de interactuar con otros componentes intracelulares sensibles de desencadenar efectos tóxicos. A cambio, se liberarían iones Zn^{2+} , considerablemente menos tóxicos (Christie y Costa, 1984; Viarengo, 1989).

Los elementos metálicos, además, son capaces de inducir la síntesis de metalotioneínas, tanto en experiencias "in vivo" como "in vitro". Los mecanismos involucrados en dicha inducción en organismos invertebrados parecen ser muy similares a los que se verifican en mamíferos. La estimulación parece depender de la síntesis, a nivel nuclear, de un polímero A que contiene ARN mensajero para codificar metalotioneínas. Este proceso conduce a la formación de apotioneínas que inmediatamente se unirán con el exceso de cationes libres. Por consiguiente, la inducción transcurre a través de un mecanismo de retroalimentación positivo. Diversos estudios han demostrado que el zinc resulta el inductor más potente, mientras que el cobre es el más débil (Christie y Costa, 1984; Hamer, 1986; Kägi y Schäffer, 1988; Viarengo, 1989; Olsson, 1994).

El fenómeno de inducción de metalotioneínas, por acción de elementos metálicos, permite explicar, además, el desarrollo de tolerancia o adaptación fisiológica, que experimentan los diversos organismos expuestos a dichos contaminantes (Cherian y Nordberg, 1983; Depledge y Rainbow, 1990; Hogstrand y Haux, 1991). Mamíferos pretratados con dosis subletales de zinc o cadmio, resultaron menos sensibles a una posterior exposición con dosis mayores de cadmio. Específicamente, se ha documentado una disminución en la letalidad, en la hepatotoxicidad, así como también menor daño testicular (Goering y Klaassen, 1983 y 1984). En forma análoga, se ha comprobado que el desarrollo del fenómeno de tolerancia, en muchas especies acuáticas, también es consecuencia, en muchos casos, de la inducción de metalotioneínas (Overnell et al., 1987; Chan et al., 1989; Viarengo, 1989; Dallinger, 1994b; Olsson, 1994).

En base a ello, diversos autores han resaltado la importancia

del estudio del nivel de metalotioneínas como parámetro bioquímico indicador del grado de contaminación a que están expuestos los organismos acuáticos en el ambiente (Haux y Förlin, 1988; Chan et al., 1989; George y Olsson, 1994).

Muchas veces se ha caído en la tentación de considerar a esta inducción como una respuesta específica de los organismos frente a determinados niveles de contaminación por metales. No obstante, hay que destacar que otros factores estresantes pueden desencadenar el mismo efecto. En la literatura se han descrito numerosas sustancias químicas, inductoras de la síntesis de metalotioneínas, entre las que se destacan diversas hormonas y mensajeros secundarios, factores de crecimiento, agentes inflamatorios y citoquinas, promotores cancerígenos, vitaminas, antibióticos y agentes citotóxicos. La inducción también se verifica frente a diversas condiciones fisiopatológicas, derivadas no sólo de perturbaciones químicas, sino también físicas. Sin embargo, se considera que todos esos factores resultan inductores menos potentes en relación a los elementos metálicos (Hamer, 1986; Overnell et al., 1987; Kägi y Schäffer, 1988; Olsson, 1994).

Compartimentalización en el sistema lisosomal

Actualmente está bien establecido el rol que desempeñan los lisosomas en relación a la disponibilidad de diversos elementos metálicos, en un gran número de especies biológicas (Fowler, 1987; Viarengo, 1989).

Brevemente recordaremos que los lisosomas son las principales organelas destinadas a los procesos de digestión intracelular. Entre ellas, se distinguen los lisosomas primarios, recién formados, libres aún de sustrato para digerir, y los lisosomas secundarios, que contienen el material a ser digerido. En los casos en que la digestión sea incompleta, se pueden originar los llamados cuerpos residuales o lisosomas terciarios (de Robertis et al., 1986; Stryer, 1988).

Distintos trabajos han demostrado que en algunos organismos acuáticos, expuestos a elementos metálicos, se producen alteraciones tanto cuali- como cuantitativas en los lisosomas.

Hemelraad et al., (1990b) observaron un aumento en el número de lisosomas presentes en el tejido renal de almejas, expuestas a niveles subletales de cadmio durante 12 semanas. Los autores consideran que este hecho puede ser consecuencia de una estimulación de la actividad de endocitosis de componentes intracelulares.

En la glándula digestiva de ciertos gastrópodos, expuestos a concentraciones de cadmio variables durante 28 días, el aumento del número y del tamaño de los lisosomas resultó ser dependiente del nivel de exposición (Marigómez et al., 1989). Se observaron también alteraciones en la estructura, permeabilidad e integridad de la membrana lisosomal. Estos autores consideran que el aumento en el tamaño de estas organelas puede ser consecuencia de la fusión de lisosomas secundarios, debido a la desestabilización de las membranas, originando estructuras mayores.

Franchini et al., (1991) encontraron un aumento en el número de lisosomas secundarios, de forma, tamaño y densidad variables, en el tejido hepático de peces expuestos a 5 mg de Pb. L⁻¹, el cual comienza a observarse a las 24 hs. de la exposición y se vuelve evidente tras 48 hs.

Experiencias más recientes, han permitido establecer un posible mecanismo para estos procesos. Se considera que las lipofuscinas lisosomales desempeñan un rol fundamental para la unión de elementos metálicos. Las lipofuscinas consisten en lisosomas terciarios, en los cuales se acumulan los productos finales no degradables, derivados de los procesos de peroxidación de lípidos, en forma de polímeros insolubles, que contienen lípidos oxidados y algunas proteínas. Los metales pueden interactuar con los grupos acídicos de tales lípidos oxidados y/o proteínas presentes en la región externa de las lipofuscinas, o bien quedar atrapados en su interior, durante la formación de tales organelas (George et al., 1982; Viarengo, 1989).

Acumulación en gránulos

La presencia de metales contenidos en gránulos intracelulares ha sido ampliamente documentada en diversos tipos de células de vertebrados y de numerosas especies de invertebrados (Simkiss,

1979; Brown, 1982; Mason y Simkiss, 1982; Fowler, 1987; Viarengo, 1989).

En base a su composición química, se pueden distinguir tres tipos de gránulos, según sean los compuestos inorgánicos que prevaalezcan (Simkiss, 1979; Brown, 1982; Viarengo, 1989):

- * gránulos que contienen hierro.
- * gránulos que contienen cobre.
- * gránulos que contienen calcio.

En parte, la presencia de estas estructuras no debe asombrarnos, ya que en vertebrados el hierro se encuentra normalmente acumulado en gránulos ricos en ferritina, principalmente abundantes en reticulocitos y hepatocitos. Estos depósitos constituyen el aporte de hierro para cubrir los requerimientos de diversas enzimas y proteínas, especialmente la hemoglobina y los citocromos. El sistema de la ferritina también se encuentra presente en diversos invertebrados, como anélidos, algunos moluscos e insectos, al igual que en diferentes especies del reino vegetal (Simkiss, 1979).

Ya hemos mencionado que en algunos organismos invertebrados, por ejemplo ciertos crustáceos y moluscos, la proteína transportadora de oxígeno requiere de cobre, en vez de hierro. Por tanto, en el hepatopáncreas se localizan gránulos que presentan átomos de cobre asociado con un ligando que contiene azufre, los cuales actúan como un sistema de depósito para satisfacer los requerimientos de la síntesis de hemocianina (Simkiss, 1979; Viarengo, 1989). Se considera, además, que estos gránulos también pueden intervenir como secuestradores del exceso de cobre, cuando éste presenta concentraciones elevadas en el organismo. De hecho, en animales expuestos durante largos períodos a altos niveles del metal, se encuentra una alta densidad de gránulos, que no se observa en animales de sitios no contaminados (Brown, 1982).

En moluscos, los gránulos que contienen calcio pueden subdividirse en dos tipos (Doyle et al., 1978; Brown, 1982; Mason y Simkiss, 1982; Viarengo, 1989):

- * Tipo A: presentan fundamentalmente carbonato de calcio de pureza relativamente alta.
- * Tipo B: son aquellos en los cuales el calcio se deposita con sales de fosfatos y/o pirofosfatos, junto con una am-

plia variedad de otros potenciales elementos, tales como Mg, Mn, Zn, Cd, Pb, Fe, entre otros.

Los gránulos de calcio parecen cumplir funciones fisiológicas vitales y diversas.

En moluscos, y en otros invertebrados, estarían involucrados en la formación y reparación de las valvas y estructuras calcáreas que los recubren, localizándose principalmente en el epitelio del manto (Brown, 1982). Se trataría fundamentalmente de gránulos de tipo A, a partir de los cuales el calcio puede ser rápidamente liberado (Viarengo, 1989).

Los gránulos tipo B parecen ser más insolubles y estar relacionados con procesos de excreción, almacenamiento, movilización y/o detoxificación (Brown, 1982). Se localizan preferentemente en todos aquellos órganos involucrados en las funciones digestivas, metabólicas y de eliminación, como ser glándulas digestivas y riñón (Brown, 1982). Estas concreciones parecen estar rodeadas por una membrana, la cual sería responsable de formar un microambiente que promueve la precipitación de un exceso de iones Ca^{2+} , al igual que la de otros cationes divalentes potencialmente tóxicos (Greaves et al., 1984; Viarengo, 1989).

La eficacia de estos gránulos en la detoxificación de elementos metálicos fue comprobada en experiencias en las cuales se examinaron ciertas relaciones de tipo presa/predador. Alimentando invertebrados carnívoros con diversos tejidos, provenientes de sus presas naturales, y que presentaban una alta densidad de gránulos, ricos en zinc o en manganeso, se pudo comprobar que las deposiciones posteriores del animal presentaban un espectro de rayos X similar al observado en los tejidos. Por lo tanto, se pudo concluir que dichos metales no estaban disponibles para ser asimilados por el sistema digestivo del predador. De esta manera, se comprobó que los gránulos no parecen favorecer la biomagnificación de los elementos metálicos allí contenidos, a través de la cadena alimentaria (Nott, 1991).

Otras estructuras con alta capacidad para contener metales, especialmente plomo, mercurio, selenio y arsénico, son los llamados cuerpos de inclusión nuclear. Se han detectado en células de mamíferos y de algunas especies acuáticas (Mahaffey et al., 1981; Fowler, 1987).

Estos cuerpos de inclusión, a diferencia de los gránulos que acabamos de describir, no parecen estar involucrados en algún proceso fisiológico conocido. Sin embargo, en base a estudios en ratas, también podrían constituir un mecanismo de defensa de las células, al captar e inmovilizar a los elementos tóxicos circulantes.

Su formación no está completamente esclarecida. Se considera que ciertas proteínas citosólicas, con alta afinidad por metales, serían las responsables de transportar al plomo hacia el núcleo. En éste, el metal se asociaría con proteínas nucleares inducibles y ricas en grupos carboxílicos. La unión del metal con las proteínas citosólicas puede resultar marcadamente disminuída por la presencia de iones Cd^{2+} ; o aumentada en presencia de Fe^{2+} . Lo mismo sucedería con el proceso de translocación nuclear (Mistry, 1986).

Relevancia de los distintos procesos

Es difícil establecer, frente a un dado nivel y tipo de contaminante, en un cierto organismo, cuál de los tres procesos que hemos reseñado anteriormente, tiene mayor o menor relevancia.

Por ejemplo, Carmichael y Bondy (1981) comprobaron que, en el tejido renal de cierto bivalvo expuesto, las concreciones de calcio efectivamente incorporaban cadmio. Regoli et al (1992), en cambio, documentaron que en otra especie de bivalvo expuesto a cadmio, si bien aumentaba el número de concreciones de calcio en dicho tejido, éstas no contenían niveles detectables del metal tóxico.

En un trabajo realizado por George y Pirie (1979) sobre la distribución intracelular de cadmio, en tejido renal de mejillones, los autores encontraron que:

por estudios de microanálisis de rayos X, el 85 % del metal se encontraba asociado a las membranas de estructuras granulares de calcio tipo B, junto con otros elementos.

tras la homogeneización y fraccionamiento, por centrifugación diferencial del tejido, la mayor proporción de cadmio estaba localizada en el citosol.

Ahora bien, estos resultados, aparentemente contradictorios, podrían, en principio, atribuirse a variaciones interespecíficas, o al empleo de tratamientos de exposición o metodologías analíticas diferentes. Sin embargo, también hay que tener presente que estos tres mecanismos no son completamente independientes entre sí.

En primer lugar, debe considerarse que los lisosomas intervienen en los procesos normales de degradación y recambio de las proteínas citoplasmáticas. Entre ellas se encuentran las metalotioneínas, cuya vida media, aparentemente, resulta muy variable según la especie y el tejido en consideración. En hígado o riñón de ratas expuestas a cadmio, su vida media oscila entre 3 y 5 días. En invertebrados acuáticos, aún no se disponen de referencias suficientes; pero Bebianno y Langston (1993), la han calculado en unos 25 días, para mejillones del género Mytilus. De todas maneras, el recambio de esas proteínas es mucho más rápido que la eliminación de cadmio, cuya vida media fue estimada en 300 días, según ese mismo reporte. Por consiguiente, todos aquellos elementos, como el cadmio, cobre o zinc, capaces de unirse a dichas proteínas, pueden ser transportados a los lisosomas durante el proceso de degradación proteica (Simkiss, 1979; Fowler, 1987; Nott, 1991).

En el caso de los depósitos de cobre o de hierro sobre sus respectivas proteínas, también son degradados a través de los lisosomas. Además, puede verificarse una recirculación de metales a nivel intracelular. Los elementos que inicialmente se incorporan a los lisosomas o bien mediante la degradación proteica, dado el bajo pH presente en esas organelas, pueden pasar al citoplasma y allí estimular la síntesis de metalotioneínas y/o ser secuestrados dentro de las concreciones minerales o de los cuerpos de inclusión nuclear (Simkiss, 1979; Fowler, 1987).

En adición, es posible que, al menos en ciertas especies de moluscos, los gránulos o concreciones minerales puedan derivar de lipofuscinas. Ciertos estudios practicados sobre las concreciones renales de mejillones expuestos en su ambiente natural, han demostrado que estos gránulos son cuerpos residuales que presentan, entre otros, un componente orgánico con las mismas propiedades de las lipofuscinas. Dichas concreciones, sin embargo se diferenciarían de las clásicas lipofuscinas de mamíferos en dos aspectos

fundamentales. En primer lugar, porque estas últimas en condiciones normales, no son excretadas, sino que permanecen dentro del organismo durante toda su vida. En cambio, los gránulos observados en los bivalvos suelen ser activamente eliminados a través del tracto urinario. En segundo término, los cuerpos residuales presentes en dichos mejillones serían capaces de incorporar mayor proporción de elementos metálicos, que sus análogos de mamíferos (George et al., 1982; de Robertis et al., 1986).

INTERACCIONES NOCIVAS A NIVEL SUBCELULAR

En líneas generales, se considera que cuando los mecanismos de compensación se saturan, resultan superados o dañados; por la presencia de un exceso de elementos metálicos, sobrevienen los efectos tóxicos (Luoma y Carter, 1991). Sin embargo, no debe olvidarse que las interacciones que pueden verificarse entre los iones metálicos y el glutatión, reducen los niveles del tripéptido disponible para diversos procesos fisiológicos vitales de las células. Por consiguiente, esta disminución contribuye, de un modo indirecto, a inducir una mayor susceptibilidad de la célula a las acciones adversas de estos contaminantes (Christie y Costa, 1984).

Aún no se han esclarecido completamente los mecanismos directos responsables de los efectos tóxicos de los elementos metálicos a nivel subcelular (Viarengo, 1989). La información disponible permite enumerar una serie de interacciones nocivas, comprobadas en algunas especies acuáticas. Sin embargo, todavía no se pueden establecer con certeza los mecanismos primarios más relevantes, para cada metal o para cada organismo en particular. Por el momento, se han reconocido:

- a) efectos sobre las membranas plasmáticas,
- b) efectos sobre las enzimas citoplasmáticas,
- c) efectos sobre mitocondrias,
- d) efectos sobre el núcleo.

a) La membrana plasmática es la primera estructura celular que puede resultar blanco de la acción de los elementos metálicos. Se ha demostrado que estos elementos pueden unirse a diversas pro-

teínas y fosfolípidos de la membrana. Algunas de esas proteínas son enzimas que desempeñan un rol fisiológico fundamental en organismos acuáticos. Tal es el caso de la ATP-asa Na/K dependiente, encargada de mantener y regular los niveles de concentración iónica, tanto en especies de aguas dulces como marinas o de estuarios (Towle, 1981). La inhibición de esta enzima por metales ha sido ampliamente documentada en diversas especies (Christie y Costa, 1984; Viarengo, 1989; Hemelraad et al., 1990a; Kinne-Saffran et al., 1993). Como resultado de esa inhibición se modifica el potencial electroquímico de la membrana y los niveles corporales totales de sodio. Por consiguiente, ambos parámetros han sido propuestos como indicadores de contaminación (Grippio y Dunson, 1991; Borseth et al., 1992).

La estructura de la membrana puede también resultar alterada por la iniciación del conocido proceso de peroxidación de lípidos. La destrucción de los lípidos poliinsaturados se inicia con la reacción de éstos con especies de oxígeno reactivas formando radicales libres lipídicos e hidroperóxidos semiestables, promoviendo una oxidación en cadena de los radicales libres. Se considera que muchos elementos metálicos pueden afectar directamente este proceso, mediante la inducción de radicales libres superóxido; o, en forma indirecta, a través de la inhibición de los procesos normales encargados de neutralizar a dichas especies reactivas (Christie y Costa, 1984).

Adicionalmente, se ha demostrado que metales como el cadmio, cobre o mercurio, interfieren con el transporte de aminoácidos a nivel de membranas (Viarengo, 1989; Foulkes, 1991).

b) Los metales pueden alterar la actividad de las diversas enzimas citoplasmáticas mediante dos posibles mecanismos (Jackim, 1974; Viarengo, 1989):

provocando el desplazamiento y sustituyendo al metal fisiológicamente asociado con la proteína.

mediante la unión a los diversos grupos funcionales de la molécula, como sulfhidrilos, carboxilos, imidazólicos, entre otros.

Las interacciones resultantes pueden conducir a una inhibición o a una estimulación de la actividad enzimática. En algunos casos,

también, se han encontrado respuestas bifásicas, dependiendo de la concentración del elemento (Jackin, 1974; Viarengo, 1989). En hígado y riñón de peces, se ha documentado que, al igual que sucede en mamíferos vertebrados, la enzima ácido α -aminolevúlico dehidrasa (ALA-D) resulta inhibida por plomo (Jackin, 1974). Por consiguiente, esta enzima ha sido reiteradamente señalada como un conveniente parámetro bioquímico, para evaluar el nivel de exposición y/o acumulación de dicho metal en organismos acuáticos (Landner, 1988). Cabe destacar, sin embargo, que en relación a un determinado elemento, todas estas interacciones pueden tener mayor o menor intensidad según los distintos tejidos, aún cuando se trate del mismo organismo.

c) Se ha demostrado que las mitocondrias pueden acumular altos niveles de elementos metálicos. Estas organelas están involucradas, entre otras funciones, en la síntesis aeróbica de ATP. Las interacciones adversas de los metales se pueden demostrar mediante la disminución de los niveles de ATP, o a través del parámetro conocido como "carga energética de adenilato" (CEA), el cual puede variar entre 0 y 1, y se define según la fórmula (Viarengo, 1989; Mayer et al., 1992):

$$CEA = \frac{ADP}{ATP} + 0,5 \frac{ADP}{ATP} + ADP + AMP$$

Descensos significativos de este parámetro se han encontrado en mitocondrias de diversos tejidos de bivalvos expuestos a cadmio al igual que una reducción en la capacidad oxidativa de estas organelas (Giesy et al., 1983; Hemelraad et al., 1990c). Diversos autores han encontrado también que los metales pueden producir cambios en la estructura de las mitocondrias, el desacople de los procesos de fosforilación oxidativa, y una disminución en las actividades de algunas enzimas del ciclo de Krebs, entre ellas la malato-deshidrogenasa y la isocitrato-deshidrogenasa (Hemelraad et al., 1990b; Franchini et al., 1991; Bolognani-Fantin et al., 1992).

d) Los metales pueden inducir una gama muy amplia de efectos variados en el núcleo celular. Se considera que una vez que los elementos llegan al núcleo pueden aumentar la síntesis de ARN-

mensajero, de esta manera se explicaría la inducción de las metalotioneínas (Viarengo, 1989). Estudios "in vitro" han demostrado interferencias con los procesos de replicación y transcripción, así como en los mecanismos de reparación de los ácidos nucleicos. Para algunos elementos se están estudiando sus posibles efectos carcinogénicos (Christie y Costa, 1984). Algunos estudios "in vivo" parecen certificar esos hallazgos. Franchini et al. (1991) encontraron un aumento de heterocromatina en el núcleo de hepatocitos de peces expuestos a plomo, con lo cual podrían afectarse los procesos de transcripción y la síntesis proteica. Se ha comprobado también que el cobre produce efectos adversos sobre los cromosomas y aumenta la frecuencia de nucleótidos no complementarios en el ADN (Sagripanti et al., 1991).

OBJETIVOS

"El principio de todo es el agua; todo está hecho de agua y en agua volverá a convertirse todo".

Tales de Mileto
(625-547 a.C.)

En las primeras secciones de este trabajo se han comentado distintos aspectos relacionados con la problemática derivada de la contaminación ambiental. Se ha destacado que diversos elementos metálicos son considerados como sustancias de singular interés ecotoxicológico, debido fundamentalmente a su toxicidad y persistencia, así como también por la magnitud de sus emisiones, especialmente las de origen antropogénico. A causa de éstas, se ha producido la movilización de esos elementos en niveles tremendamente superiores a los resultantes de los procesos naturales. De este modo, se han alterado profundamente sus ciclos geoquímicos ambientales y, por ende, sus ciclos biológicos.

Muchas de las sustancias químicas derivadas de la actividad antropogénica se emiten a los sistemas acuáticos, afectando principalmente a los estuarios y a las zonas costeras.

El Río de la Plata constituye el último eslabón de la cuenca del Plata, una de las más importantes del mundo. Innumerables industrias, muchas de ellas asentadas directamente sobre sus costas o sobre sus principales afluentes, intentan satisfacer las variadas necesidades materiales demandadas por los habitantes de la ciudad de Buenos Aires y sus alrededores, que constituyen las zonas más densamente pobladas de nuestro país.

Los núcleos poblacionales generan a su vez una gran cantidad de residuos y desechos domésticos y urbanos, los cuales junto con las emisiones industriales, aunadas a las derivadas de la actividad portuaria, se descargan en el Río de la Plata, en su mayor parte sin ningún tipo de tratamiento previo.

Paralelamente, bebemos de sus aguas y pretendemos disfrutar de sus costas...

Por ello, si bien "el agua es el principio de todo...", tal como enuncia Tales de Mileto; también puede ser "el fin de mucho".

Pese a ello, según nuestro propio conocimiento y de acuerdo a lo documentado por Moretto et al. (1993) se han encarado muy pocos estudios sobre el nivel de contaminación por elementos metálicos en zonas costeras del Río de la Plata.

Por consiguiente, en un intento por revertir en parte esa situación y de efectuar un aporte para evaluar el grado de contaminación, los objetivos generales perseguidos en el presente trabajo de tesis han sido los siguientes:

- * el monitoreo del sistema acuático.
- * el estudio de algunos efectos tóxicos en invertebrados acuáticos, especialmente moluscos bivalvos, por medio de bioensayos agudos, expuestos a distintos niveles de cadmio o plomo.

Para concretar dichos objetivos, la primera etapa del presente proyecto comprendió un monitoreo ambiental y un monitoreo biológico, mediante la realización de análisis químicos, a fin de determinar los niveles de algunos elementos metálicos (principalmente cadmio y plomo, entre otros) en muestras de aguas, sedimentos y de diversos tejidos de peces e invertebrados, recolectados en zonas costeras del Río de la Plata.

La segunda etapa, consistió en la realización de bioensayos agudos ($t = 96$ hs), en condiciones controladas de laboratorio, a fin de estimar el porcentaje de letalidad y la capacidad de bioacumulación de algunos invertebrados acuáticos, expuestos a distintas concentraciones de cadmio o plomo. Seguidamente, se investigaron otras respuestas biológicas, niveles de glucógeno y de grupos tioles, en moluscos bivalvos expuestos a concentraciones subletales de cadmio o plomo.

Teniendo en cuenta los distintos aspectos discutidos en la Introducción de este trabajo, se puede concluir que nuestra capacidad para predecir con certeza la toxicidad de los metales presentes en sistemas acuáticos depende básicamente de la comprensión del comportamiento que pueden exhibir en el ambiente. Los elementos no reaccionan allí según los dictados de la química clásica, sino que interaccionan con diversas sustancias orgánicas o inorgánicas, así como también con los distintos organismos del ecosistema. La presencia de otras sustancias químicas afectan la especiación de cada elemento en particular, la cual condiciona su

biodisponibilidad y ésta, a su vez, su toxicidad.

En base a ello, para los análisis en muestras de aguas, se ha intentado desarrollar un método que permitiera evaluar la carga total de elementos potencialmente biodisponibles presentes en la fase acuosa.

Asimismo, las respuestas biológicas de los organismos expuestos a concentraciones subletales de cadmio o plomo, se han investigado en presencia o ausencia de ácidos húmicos. Tal como ya hemos detallado, dichas sustancias constituyen los principales ligandos orgánicos naturales que pueden influir en la especiación y biodisponibilidad de los metales en sistemas acuáticos.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'W. Wang'.A handwritten signature in black ink, appearing to be 'E. Whitten'.

Tesis
2721
t.2
ej.2

Universidad de Buenos Aires

F. C. E. N.

Contaminantes Metálicos en el Río de la Plata:
Monitoreo del Sistema Acuático y Estudio de
Algunos Efectos Tóxicos en Moluscos Bivalvos
por Medio de Bioensayos

Noemí R. Verrengia Guerrero

1995

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Contaminantes Metálicos en el Río de La Plata:
Monitoreo del Sistema Acuático y Estudio de Algunos
Efectos Tóxicos en Moluscos Bivalvos por Medio de Bioensayos**

Noemí R. Verrengia Guerrero

Director de Tesis: Dra. Eva M. Kesten
Consejero: Dr. Edgardo J. Wood

Toxicología y Química Legal
Departamento Química Biológica - FCEN - UBA

Tesis presentada para optar al Título de
Doctora de la Universidad de Buenos Aires

1995

Tomo II

Í N D I C E G E N E R A L

INTRODUCCIÓN

TOMO I

Página

	Prólogo	1
I.	Elementos Metálicos: Su Importancia Ambiental y Biológica	5
II.	Sistemas Acuáticos	12
	* El Sistema Acuático del Río de La Plata	15
III.	Ecotoxicología	21
III.1.	Etapas de la Ecotoxicología	23
III.2.	Fuentes de Contaminación	27
III.3.	Procesos de Distribución	28
III.3.1.	Distribución de Contaminantes en Sistemas Acuáticos	29
	* Especiación y Biodisponibilidad de Elementos Metálicos	29
	* Principales Ligandos	32
	Sustancias húmicas	33
	* Subcompartmentos del Sistema Acuático:	
	- Fase acuosa soluble	36
	- Material coloidal	39
	- Sedimentos del lecho y material en suspensión	40
	- Superficies biológicas	44
III.4.	Procesos de Transformación	46
	* Persistencia de Algunos Contaminantes	49
III.5.	Procesos de Transporte	51
III.6.	Efectos sobre los Organismos	54
	* Bioacumulación, Bioconcentración y Biomagnificación	55

	- Parámetros de bioacumulación y de bioconcentración	57
	* Respuestas de los Organismos	58
	* Resistencia y Tolerancia	61
	* Origen de las Respuestas y Propagación de los Efectos sobre los Ecosistemas	63
III.7.	Herramientas de la Ecotoxicología	67
III.7.1.	Monitoreo Ambiental	67
III.7.2.	Monitoreo Biológico	69
	* Evaluación Biológica	70
	* Bioensayos	75
	- Bioensayos Predictivos	76
	Microcosmos, Mesocosmos y Limnocorrales	79
	- Bioensayos de Evaluación o Monitoreo	80
IV.	Algunas Características de los Organismos Acuáticos Seleccionados para este Trabajo	82
	* Moluscos Gastrópodos	83
	* Moluscos Bivalvos o Pelecípodos	85
	- Las Branquias	88
	- Reservas Energéticas: Los hidratos de carbono y su metabolismo	89
	* Organismos Específicos Seleccionados	93
V.	Efectos de los Elementos Metálicos sobre Organismos Acuáticos	95
	* Ingreso de los Elementos	95
	* Mecanismos de Ingreso	97
	* Vías de Distribución	101
	* Distribución en Tejidos	103
	* Distribución a Nivel Intracelular	106
	- Grupos tioles no proteicos: Glutati6n	106
	- Grupos tioles proteicos: Metalotio- neínas	109
	- Compartimentalizaci6n en el sistema lisosomal	114
	- Acumulaci6n en gránulos	115
	- Relevancia de los distintos procesos	118
	* Interacciones Nocivas a Nivel Subcelular	120

**CAPÍTULO I.: DETERMINACIÓN DE ELEMENTOS METÁLICOS EN
MUESTRAS DE AGUAS.**

I.1.	Introducción	127
	Fuentes de Variación	127
	Recolección de las Muestras	128
	Pretratamiento de las Muestras	131
	Tratamiento y Análisis	133
	Condiciones de Trabajo	133
	Estudios Realizados	135
I.2.	Materiales y Métodos	136
I.2.1.	Optimización de la Metodología:	
I.2.1.1.	Recolección de las Muestras	136
I.2.1.2.	Materiales, Reactivos y Condiciones de Trabajo	136
I.2.1.3.	Estudio de la Influencia de Distintos Pretratamientos	137
I.2.1.4.	Tratamiento y Análisis de las Muestras	137
I.2.1.5.	Método de Pretratamiento Adoptado para el Análisis de la Fracción Recuperable	139
I.2.1.6.	Estudio del Posible Rol Interferente del Hierro	140
I.2.1.7.	Estudio de Conservación de las Muestras	140
I.2.2.	Análisis de Elementos Metálicos en Muestras de Aguas del Río de la Plata:	
I.2.2.1.	Recolección de las Muestras	141
I.2.2.2.	Metodología de Análisis	141
I.3.	Resultados y Discusión	143
I.3.1.	Análisis de Algunos Factores que Influyen en la Etapa de Pretratamiento de las Muestras	143
I.3.2.	Método Seleccionado para el Análisis de la Fracción Recuperable	145

- I.3.3. Estudios Complementarios
- I.3.3.1. Estudio del Posible Rol Interferente del Hierro en la Determinación de Plomo
- I.3.3.2. Estudio de Conservación de las Muestras
- I.3.4. Análisis de Elementos Metálicos en Muestras de Aguas del Río de la Plata

CAPÍTULO II.: DETERMINACIÓN DE ELEMENTOS METÁLICOS EN MUESTRAS DE SEDIMENTOS

- II.1. **Introducción**
 - Estudios Realizados
- II.2. **Materiales y Métodos**
 - II.2.1. Recolección de las Muestras
 - II.2.2. Materiales, Reactivos y Condiciones de Trabajo
 - II.2.3. Tratamiento de las Muestras
 - II.2.4. Procesos de Digestión y Análisis
 - II.2.5. Métodos Estadísticos
- II.3. **Resultados y Discusión**
 - II.3.1. Estudio de la Eficiencia de Distintos Procesos de Digestión
 - II.3.2. Niveles de Elementos Metálicos en Muestras de Sedimentos
 - II.3.2.1. Factores de Concentración
 - II.3.2.2. Comparación con Reportes Bibliográficos
 - II.3.3. Estudios Complementarios

CAPÍTULO III.: DETERMINACIÓN DE ELEMENTOS METÁLICOS EN MUESTRAS DE TEJIDOS BIOLÓGICOS

- III.1. **Introducción**
 - Estudios Realizados
- III.2. **Materiales y Métodos**
 - III.2.1. Recolección de las Muestras
 - III.2.2. Tratamiento y Análisis de las Muestras de Tejidos Biológicos

- III.2.3. Análisis de las Muestras de Sedimentos
- III.2.4. Tratamiento y Análisis de las Valvas de Moluscos Bivalvos
- III.2.5. Materiales, Reactivos y Condiciones de Trabajo
- III.2.6. Cálculos y Métodos Estadísticos

- III.3. Resultados y Discusión
- III.3.1. Niveles de Elementos Metálicos en Hígado de Peces
- III.3.2. Niveles de Elementos Metálicos en Hepatopáncreas de Gastrópodos
- III.3.3. Niveles de Elementos Metálicos en Moluscos Bivalvos
 - III.3.3.1. Influencia del Ambiente Físico y Factores de Bioacumulación
 - III.3.3.2. Estudios Complementarios
 - III.3.3.3. Comparación con Reportes Bibliográficos

CAPÍTULO IV.: BIOENSAYOS

- IV.1. **Introducción**
 - Tipos de Bioensayos
 - Selección de los Organismos
 - Recolección y Transporte de Moluscos Bivalvos
 - Aclimatación de los Organismos
 - Tipos de Agua a Emplear en los Bioensayos
 - Estudios Realizados

- IV.2. **Materiales y Métodos**
 - IV.2.1. Organismos Seleccionados
 - IV.2.2. Medio Acuoso
 - IV.2.3. Bioensayos
 - IV.2.4. Estudios de Letalidad
 - IV.2.5. Estudios de Bioacumulación
 - IV.2.6. Determinaciones de Glucógeno
 - IV.2.7. Determinaciones de Grupos Tioles

IV.2.8.	Cálculos y Métodos Estadísticos	254
IV.3.	Resultados y Discusión	256
IV.3.1.	Bioensayos Agudos con Algunos Invertebrados Acuáticos:	
IV.3.1.1.	Estudios de Letalidad	256
IV.3.1.2.	Estudios de Bioacumulación	261
IV.3.2.	Bioensayos Agudos con Moluscos Bivalvos:	
IV.3.2.1.	Influencia de los Ácidos Húmicos en la Toxicidad de Cadmio o Plomo	266
IV.3.2.2.	Efectos del Cadmio o del Plomo sobre los Niveles de Glucógeno	273
IV.3.2.3.	Efectos del Cadmio o del Plomo sobre los Niveles de Grupos Tioles	278
IV.3.2.4.	Discusión de los Resultados	283
	RESUMEN Y CONCLUSIONES	291
	BIBLIOGRAFÍA	301

ABREVIATURAS UTILIZADAS

AAS	Espectrofotometría de absorción atómica
Ac H	Ácidos húmicos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	5'-difosfato de adenosina
AMP	5'-monofosfato de adenosina
APDC	Aminopirrolidinditiocarbamato
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	5'-trifosfato de adenosina
ATP asa	Adenosina trifosfatasa
BPC	Bifenilos policlorados
CE ₅₀	Concentración efectiva 50
CL ₅₀	Concentración letal 50
Cys	Cisteína
DDC	Dietilditiocarbamato
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
DPTA	Ácido diaminopropanoltetraacético
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico)
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FBA	Factor de bioacumulación
FBC	Factor de bioconcentración
FC	Factor de concentración
FCEN	Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
GSH	Glutación, forma reducida
GSSG	Glutación disulfuro u oxidado
HAP	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
Inv	Invierno
MIBC	Metilisobutilcetona
MT	Metalotioneína
NTA	Ácido nitriloacético
ppb	partes por billón
ppm	partes por millón
Pque Ecol	Parque Ecológico
Prim	Primavera
Pto	Puerto
SDS	Dodecil-sulfato de sodio
SH-	Grupo(s) tiol(es)
signif	significativo

TCA	Ácido tricloroacético
tej	Tejido
TGI	Tracto gastrointestinal
transf	Transformación
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
Ver	Verano

PARTE

EXPERIMENTAL

CAPITULO I

Determinación de elementos metálicos en muestras de aguas

I.1. INTRODUCCIÓN

El monitoreo de aquellos elementos metálicos de interés ecotoxicológico en muestras de aguas naturales, constituye una primera aproximación para evaluar el impacto de su liberación en los sistemas acuáticos. Sin embargo, en los últimos años, se han suscitado numerosas discusiones y controversias en relación a los datos reportados en la literatura. Muchos autores sostienen que una gran parte de esos datos no son confiables, argumentando que las muestras pudieron ser objeto de eventuales contaminaciones, durante las distintas etapas de recolección y procesamiento (Ashton y Chan, 1987; GESAMP, 1987; Portmann et al., 1987; Flegal y Coale, 1989; Nriagu et al., 1993). Empleando protocolos estrictamente diseñados para evitar estos problemas, se ha encontrado que los niveles de muchos metales trazas en muestras de aguas provenientes de los Grandes Lagos, Canadá, considerados como sistemas "contaminados", son comparables, o incluso menores, a los niveles normalmente presentes en muestras de altamar, supuestamente libres aún de contaminación (Nriagu et al., 1993).

Con la implementación de mejoras en las metodologías analíticas y en las condiciones de trabajo, se están obteniendo valores menores que los registrados en estudios y programas de monitoreo previos. Por consiguiente, actualmente se descartan gran parte de esos datos, y han quedado anuladas las posibilidades de establecer las verdaderas tendencias de estos contaminantes a través del tiempo (Smith et al., 1987).

FUENTES DE VARIACIÓN

Para entender la magnitud y naturaleza de los problemas que pueden presentarse cuando se intenta determinar los niveles de concentración de elementos metálicos en muestras de aguas naturales, es necesario:

- a) Conocer las características naturales de cada sistema acuático particular.
- b) Tener presente la complejidad analítica del proceso involucrado desde el momento de la toma de la muestra, hasta la determinación final.

A pesar que cada sistema puede presentar una matriz y una composición característica, se considera, en forma casi unánime, que las fuentes de variación más relevantes están asociadas con los aspectos metodológicos del proceso (Robertson, 1968; Bruland et al., 1979; APHA-AWWA-WPCF, 1980; GESAMP, 1987; Smith et al., 1987; Portmann et al., 1987; Smith y Alexander, 1989; Nriagu et al., 1993).

Básicamente, se puede asumir que el proceso analítico consta de cuatro etapas: recolección,
pretratamiento,
tratamiento y
análisis de las muestras.

Por consiguiente, pasaremos a analizar, aunque más no sea en forma concisa, la potencial relevancia de cada una de dichas etapas.

RECOLECCION DE LAS MUESTRAS

Cuando se pretende analizar muestras alejadas de las costas es imprescindible disponer de una embarcación, la cual puede introducir contaminaciones de elementos metálicos por desprendimiento de pinturas, productos de corrosión, humos o cenizas de los motores, entre los principales factores (Robertson, 1968; Batley y Gardner, 1977; Mart, 1979a). Por tanto se aconseja el empleo de botes de goma, sin motor, teniendo en cuenta la dirección de los vientos, a fin de minimizar la incorporación de partículas atmosféricas (Ross, 1986; Nriagu, 1993).

Si se requieren muestras a diferentes profundidades es necesario contar con el instrumental adecuado, el cual no debería introducir impurezas metálicas. Diversos muestreadores han sido especialmente diseñados a tal fin (Batley y Gardner, 1977; Mart, 1979a; Harper et al., 1989; Nriagu, 1993). Además, ya hemos señalado que naturalmente pueden existir gradientes verticales de concentración de elementos metálicos en la columna de agua. Así, las muestras más superficiales estarán particularmente enriquecidas por diversos contaminantes, incluidos los metálicos, como consecuencia de las deposiciones atmosféricas, que se concentran inicialmente en la microsuperficie (Ashton y Chan, 1987). Por otra parte, otros autores sostienen que en muestras más profundas,

es posible que se incorporen microorganismos del bentos, los cuales exhiben un alto potencial de acumulación, contribuyendo a reflejar niveles falsamente más elevados de ciertos elementos (Smith y Alexander, 1989). Por consiguiente, se recomienda el análisis de las llamadas "muestras subsuperficiales", que convencionalmente se obtienen a un nivel de 0,5 m, por debajo de la columna de agua (Harper et al., 1989; Nriagu et al., 1993).

Sin embargo, el factor más decisivo en esta etapa, por otra parte ineludible, es el relacionado con la elección del recipiente destinado al almacenamiento de las muestras, así como los cuidados necesarios para su correcta conservación, hasta el momento del análisis.

Los niveles de ocurrencia de elementos metálicos trazas en muestras de aguas de lagos, ríos o mares, se hallan en rangos de $\mu\text{g.L}^{-1}$ o aún menores, de ng.L^{-1} , según la fracción que estemos analizando, como posteriormente veremos. Por tanto, es necesario adoptar las máximas precauciones a fin de obtener datos confiables y representativos (Bruland et al., 1979; Laxen y Harrison, 1981; Ashton y Chan, 1987).

El recipiente puede no sólo ser responsable de introducir errores por exceso en las determinaciones (contaminación), sino también errores por defecto.

Las contaminaciones pueden ser consecuencia de la liberación de impurezas metálicas presentes en el material del recipiente (Mart, 1979b; Laxen y Harrison, 1981). Obviamente, los materiales en base a polímeros sintéticos ofrecen las menores posibilidades de contaminación. Sin embargo, aún estos recipientes pueden presentar impurezas, como consecuencia del empleo de catalizadores y matrices metálicas, requeridos en su manufactura (Karin et al., 1975; Batley y Gardner, 1977; Moody y Lindstrom, 1977; APHA-AWWA-WPCF, 1980; Ashton y Chan, 1987). En un intento por resolver estas cuestiones, Moody y Lindstrom (1977) encararon el estudio de 12 clases de diferentes materiales, a fin de analizar el contenido intrínseco de impurezas metálicas. Según sus resultados, los recipientes de polietileno lineal y los de Teflon, demostraron poseer los niveles más bajos de elementos y, por lo tanto, se consideran los más adecuados para el análisis de una amplia gama de elementos no volátiles, confirmando lo enunciado anteriormente por Karin et al., (1975). Hasta la fecha, la mayor parte

de los investigadores han confirmado esa elección, aunque, por cierto, los envases de polietileno lineal han tenido una mayor aceptación, debido a su menor costo y alta durabilidad (Batley y Gardner, 1977; APHA-AWWA-WPCF, 1980; Laxen y Harrison, 1981; Ashton y Chan, 1987; Harper et al., 1989; Nriagu et al., 1993).

Los errores por defecto pueden ser consecuencia de fenómenos de adsorción, que se verifiquen, mediante un proceso de intercambio iónico, entre las especies catiónicas de los metales y las paredes del recipiente, debido a la existencia de una doble capa cargada sobre la superficie interior de éste (Subramanian et al., 1978; Laxen y Harrison, 1981; Masee et al., 1981). Afortunadamente, los envases de polietileno y de Teflon, también presentan las menores propiedades adsorptivas, en relación a otros materiales (Batley y Gardner, 1977; Masee et al., 1981).

De todos modos, para minimizar la liberación de impurezas metálicas, así como para desactivar los sitios iónicos que favorecen el fenómeno de adsorción, es necesario efectuar un correcto lavado de los recipientes, previo al almacenamiento de las muestras (Laxen y Harrison, 1981; Masee et al., 1981; Ashton y Chan, 1987; Harper et al., 1989).

En general, el primer paso del lavado consiste en el empleo de detergente, a fin de remover vestigios de grasa o aceites, enjuagando luego con abundante agua ultrapura (Mart, 1979 a y b; APHA-AWWA-WPCF, 1980; Ashton y Chan, 1987; Harper et al., 1989; Nriagu et al., 1993).

A continuación, siguen una serie de lavados que, según los autores, pueden practicarse:

únicamente con HNO_3 (Karin et al., 1975; Subramanian et al., 1978; Ashton y Chan, 1987).

únicamente con HCl (Mart, 1979b).

o empleando sucesivamente ambos ácidos (Moody y Lindstrom, 1977; APHA-AWWA-WPCF, 1980; Nriagu et al., 1993).

En todos los casos se utilizan los ácidos concentrados o en proporciones diversas, y durante tiempos de contacto variados.

De este modo, aún cuando todos los autores recalcan la necesidad e importancia de un proceso de lavado previo de los recipientes, no hay coincidencias, suficientemente generalizadas, en cuanto a su procedimiento. La elección del método es todavía un

tanto arbitraria (Laxen y Harrison, 1981; Ashton y Chan, 1987).

PRETRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS

El proceso de pretratamiento está orientado a la separación de la fracción de la muestra a analizar, así como a su adecuada conservación hasta el momento de análisis (APHA-AWWA-WPCF, 1980; Ashton y Chan, 1987).

Diversas instituciones de protección ambiental o salud pública (US EPA, 1971; APHA-AWWA-WPCF, 1980) reconocen el estudio de las siguientes categorías:

- a- **fracción soluble:** obtenida por filtración a través de 0,45 μm de tamaño de poro.
- b- **fracción en suspensión:** es la retenida en el filtro anterior.
- c- **fracción total:** muestras sin filtrar.
- d- **fracción recuperable:** muestras sin filtrar, tratadas con ácidos minerales diluïdos.

Estas definiciones, obviamente, son puramente arbitrarias, pero se asignan para normalizar la metodología entre los distintos laboratorios y para facilitar las comparaciones de los resultados.

Ante la dificultad que representa estudiar todas las fracciones, la mayor parte de los autores efectúan, y recomiendan, las determinaciones de elementos metálicos en la fracción soluble. Las especies disueltas serían las más susceptibles de transferirse a las aguas potables suministradas por lagos o ríos (Mart, 1979b; Smith et al., 1987).

El proceso de filtración es uno de los más críticos en cuanto a las posibilidades de contaminación de las muestras. Por ello, los análisis de la fracción soluble han resultado los más controvertidos.

Desde hace tiempo se ha establecido que los filtros tipo Millipore, uno de los más difundidos, presentan relativamente altos niveles de cromo y zinc, así como cobalto, cesio, hierro y antimonio (Robertson, 1968). Por consiguiente, se impone un lavado previo de los filtros, que se puede realizar con soluciones ácidas de HNO_3 o HCl (Batley y Gardner, 1977; Harper et al., 1989;

Nriagu et al.,1993).

El equipo de filtración deberá estar especialmente diseñado, con materiales libres de impurezas metálicas y escrupulosamente limpio. Los motores de las bombas empleadas para facilitar el filtrado deberán impedir contaminaciones de aceite o humos. Finalmente, este proceso deberá realizarse en un ambiente controlado "libre de polvos", como el que más adelante detallaremos (Batley y Gardner, 1977; Mart, 1979b; Ashton y Chan, 1987; Harper et al.,1989; Nriagu et al.,1993).

Además, la filtración de las muestras deberá realizarse en el menor tiempo posible, una vez recolectada, a fin de impedir modificaciones apreciables en su composición.

Sin embargo, debería tenerse presente que el análisis de la fracción soluble no es siempre la mejor aproximación para todos los estudios (Ashton y Chan, 1987). Diversos trabajos han demostrado el rol fundamental que desempeñan las partículas en suspensión en el proceso de distribución, transporte y acumulación de diversos contaminantes, entre ellos los metálicos, tal como ya hemos discutido (Baker et al.,1983; Trefry et al.,1985; Portmann et al.,1987). Por ello, en ocasiones el material en suspensión también debería ser incluido en el proceso de medición (Ashton y Chan, 1987).

Ahora bien, aún cuando se hayan prelavado convenientemente los recipientes para contener las muestras, se pueden verificar procesos de adsorción o precipitación de compuestos metálicos, durante el tiempo de almacenamiento y hasta el momento de análisis. Ambos fenómenos dependen, en gran medida y en relación directa, del pH de las muestras (Batley y Gardner, 1977; Subramanian et al.,1978; Mart, 1979b; Laxen y Harrison, 1981; Masee et al.,1981). Por ello, para conservar las especies metálicas en solución, se recurre al agregado de ácido mineral concentrado, como agente preservante. De esta manera, se minimizan las pérdidas que pudieran ocurrir durante el almacenamiento. En general, se emplea HNO_3 (Subramanian et al.,1978; Laxen y Harrison, 1981; Olsen et al.,1983; Harper et al.,1989; Nriagu et al.,1993) o HCl , (Robertson, 1968; Bruland et al.,1979; Masee et al.,1981) de modo que el pH final resulte < 2 . El agente preservante debe agregarse una vez realizada la filtración de las muestras (APHA-AWWA-WPCF, 1980). Sin embargo, algunos autores han realizado esos

pasos en forma inversa.

Obviamente, la introducción del agente conservante modifica la composición original de las muestras y no puede aplicarse en estudios de especiación de elementos metálicos.

TRATAMIENTO Y ANALISIS

En virtud de los bajos niveles de ocurrencia de los elementos metálicos en aguas naturales, con frecuencia, suele ser necesario efectuar un tratamiento de concentración de las muestras, antes de proceder a su análisis (Bruland et al., 1979; Sturgeon et al., 1980; Flegal y Coale, 1989; Harper et al., 1989; Nriagu et al., 1993).

Uno de los tratamientos más difundidos consiste en la formación de complejos metálicos con agentes quelantes como el aminopirrolidínditiocarbamato (APDC), el dietilditiocarbamato (DDC), o una mezcla de ambos, los cuales tienen la capacidad de quelar a un amplio número de elementos, permitiendo su determinación simultánea. Estos complejos son luego extraídos con solventes orgánicos. El análisis se puede efectuar directamente sobre la fase orgánica, empleando un equipo de absorción atómica con atomización en la llama. En otros casos, dicha fase orgánica se reextrae con soluciones ácidas, y luego se inyecta en un horno de grafito del mismo tipo de equipo (Kinrade y Van Loon, 1974; Dellien y Persson, 1979; Subramanian y Méranger, 1979; Olsen et al., 1983; Ashton y Chan, 1987; Flegal y Coale, 1989; Nriagu et al., 1993).

El tratamiento mediante el empleo de resinas de intercambio iónico, comercialmente conocidas como Chelex-100, ha ido declinando debido a que diversos autores han cuestionado el porcentaje de recuperación para muchos elementos y porque se requieren grandes volúmenes de muestras (Bruland et al., 1979; Ashton y Chan, 1987).

CONDICIONES DE TRABAJO

Todos los reactivos deben ser de calidad ultrapura o, en caso contrario, convenientemente purificados. Agua de ultrapureza se obtiene por bidestilación en destiladores de vidrio o cuarzo.

Todo el material debe ser de vidrio, tipo Pyrex o similar, convenientemente prelavado con soluciones ácidas y, luego, escrupulosamente enjuagado con agua ultrapura. Por ninguna razón se emplean materiales conteniendo elementos metálicos (Batley y Gardner, 1977; Ashton y Chan, 1987; Nriagu et al., 1993).

La manipulación de las muestras se realiza empleando guantes de látex, evitando todo tipo de contacto directo (Ashton y Chan, 1987; Nriagu et al., 1993).

Desde hace algunos años, se requiere también que las condiciones ambientales de los laboratorios destinados a la determinación de metales trazas en la fracción soluble, estén estrictamente controladas. Para ello, se exige un "laboratorio ultralimpio", libre de polvos y partículas atmosféricas, para lo cual se debe filtrar el aire del recinto. Se pretende que el número de partículas por m³ de aire sea igual o menor a 100, lo que usualmente se conoce como laboratorio "Clase 100". Estos ambientes son especialmente diseñados y constan normalmente de dos cámaras, en una de las cuales se ubica el instrumento de análisis (normalmente un espectrofotómetro de absorción atómica), mientras que la otra se destina a los distintos procesos de preparación de las muestras (Ashton y Chan, 1987; Nriagu et al., 1993).

ESTUDIOS REALIZADOS

Para concretar los objetivos específicos de este capítulo se procedió, en primer lugar, a seleccionar una secuencia experimental que estuviera dentro de las posibilidades de nuestro laboratorio y que, a la vez, constituyera una buena aproximación desde el punto de vista ecotoxicológico. Para optimizar y evaluar los alcances de la metodología seleccionada se efectuaron los siguientes estudios:

Análisis de algunos factores que influyen en la etapa de pretratamiento de las muestras de aguas, derivados del empleo de distintos elementos filtrantes, agentes conservantes y orden de filtración.

Selección de un tratamiento que permitiera la determinación simultánea de cinco elementos metálicos: cadmio, cobalto, hierro, níquel y plomo.

Estudio del posible rol interferente del hierro en la determinación de plomo.

Evaluación de la estabilidad de las muestras a través del tiempo.

En base a todos esos estudios, se pudo satisfacer el principal objetivo de este capítulo, el cual se enuncia a continuación:

Determinación de los elementos cadmio, cobalto, hierro, níquel y plomo, en la fracción recuperable de muestras de aguas, costeras y subsuperficiales, del Río de la Plata.

I.2. MATERIALES Y MÉTODOS

I.2.1. OPTIMIZACIÓN DE LA METODOLOGÍA

I.2.1.1. Recolección de las muestras

Muestras de aguas del Río de la Plata, costeras y subsuperficiales (aproximadamente 0,50 m por debajo del nivel de agua), fueron recolectadas a la altura de la Ciudad Universitaria, Buenos Aires, Argentina, durante el período de octubre de 1987 a diciembre de 1988. Para ello, se emplearon recipientes de polietileno lineal, de 1,5 o 2,0 L de capacidad.

I.2.1.2. Materiales, reactivos y condiciones de trabajo

Todo el material de laboratorio empleado fue de vidrio de borosilicato o de polietileno lineal, convenientemente prelavado.

El proceso de lavado comprendió dos etapas. En la primera se empleó detergente neutro, abundante agua corriente de red y finalmente agua ultrapura para un correcto enjuague. A continuación, los recipientes de polietileno destinados a la toma y conservación de las muestras, usados por primera vez, se trataron con solución de HNO_3 , 50 % v/v, durante 48-72 hs. Luego, se enjuagaron con abundante agua ultrapura. Una vez en uso, estos recipientes, al igual que el material de vidrio, se trataron con solución de HNO_3 10 %, v/v, durante un lapso mínimo de 24 hs.

Agua ultrapura fue obtenida mediante un proceso de bidestilación, empleando destilador de vidrio tipo Pyrex.

En todos los casos se emplearon drogas y reactivos, calidad pureza analítica, marca Merck o similar.

Las soluciones patrón de Cd, Co, Fe, Ni y Pb, fueron preparadas a partir de ampollas Titrisol, Merck, conteniendo $1,000 \pm 0,000$ g del metal en cuestión, por dilución con HNO_3 1 %, v/v. Diluciones apropiadas de cada elemento se efectuaron empleando también solución de HNO_3 1 %, v/v.

Durante todas las operaciones de laboratorio se descartó el empleo de materiales metálicos, procurando que el ambiente se mantuviera libre de excesos de polvos y humos. Para la manipulación de las muestras se utilizaron guantes de polietileno.

I.2.1.3. Estudio de la influencia de distintos pretratamientos

Para efectuar el estudio de la influencia de algunos factores que influyen en la etapa de pretratamiento, sobre la determinación de Fe, se recolectaron simultáneamente cuatro muestras de agua de río. Cada una de ellas fue dividida en cuatro fracciones iguales, que se denominaron: I, II, III y IV.

La fracción I se filtró a través de un filtro Millipore, de 0,45 μm , antes de las dos horas posteriores a la recolección de las muestras. El filtrado, fracción soluble, se dividió a su vez en dos alícuotas: Ia y Ib. A la Ia se le agregó HNO_3 concentrado, a razón de 3 mL de ácido por cada litro de muestra, verificando que el pH resultante fuera < 2 . A la Ib se le agregó una mezcla de $\text{HNO}_3 + \text{HCl}$, 1:1, también en relación 3 mL.L^{-1} .

La fracción II se dividió, primero, en dos alícuotas: IIa y IIb, a cada una de las cuales se agregaron los mismos ácidos que a Ia y Ib. Inmediatamente después las fracciones se filtraron a través de un filtro Millipore de 0,45 μm .

La fracción III se dividió en dos alícuotas: IIIa y IIIb, a las cuales se agregaron HNO_3 o la mezcla de $\text{HNO}_3 + \text{HCl}$, en relación 3 mL.L^{-1} , respectivamente. Ambas alícuotas se dejaron reposar durante 24 hs a temperatura ambiente (tratamiento ácido) y, luego, se filtraron a través de papel de filtro banda azul (filtración lenta), obteniéndose en cada caso una fracción "recuperable".

La fracción IV se trató con HNO_3 concentrado (3 mL.L^{-1}) y no se efectuó ningún tipo de filtración, por lo que representó la fracción total.

Cada fracción fue analizada por duplicado, según la técnica que se describe a continuación.

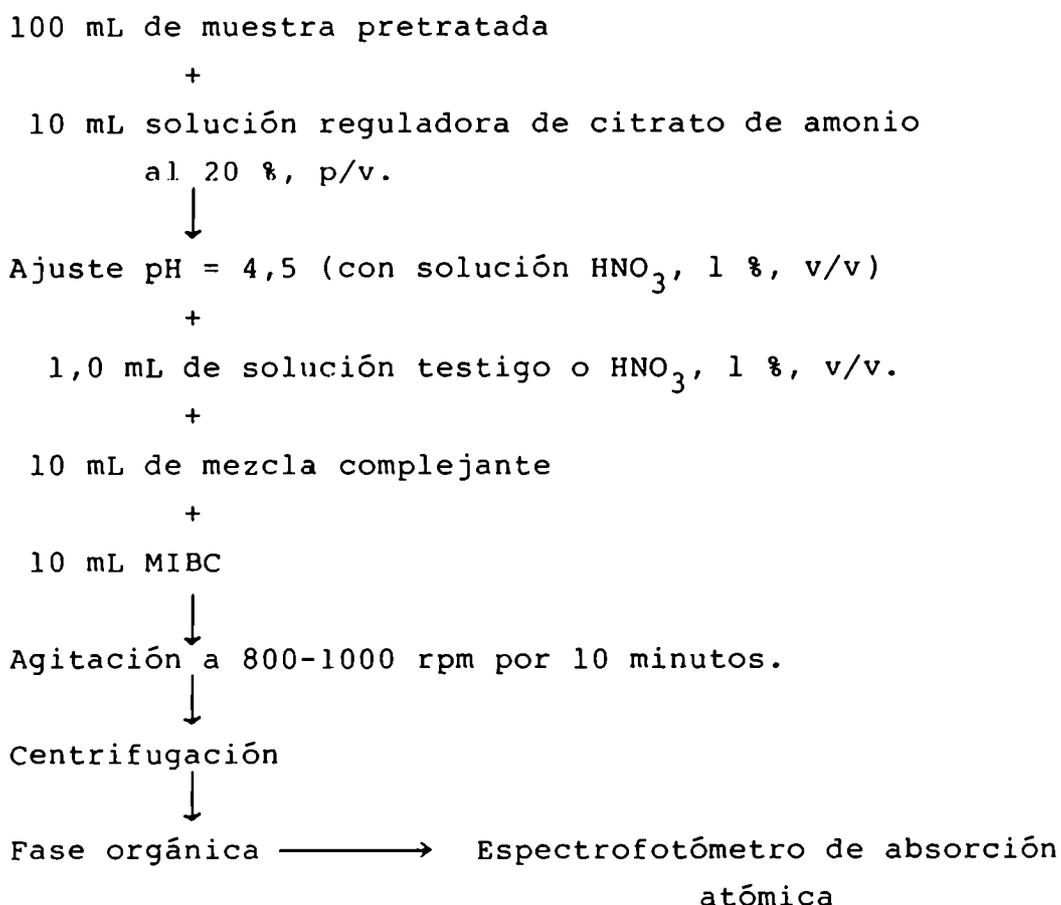
Para efectuar el estudio estadístico de los resultados, en este caso, se empleó la prueba "t" de Student, al nivel $p < 0,05$ (Sokal y Rohlf, 1969).

I.2.1.4. Tratamiento y análisis de las muestras

Básicamente, la técnica de tratamiento empleada es similar a la descrita por Subramanian y Méranger (1979), con la excepción de la sustitución del agente complejante aminopirrolidínditiocar-

bamato (APDC) por una mezcla de aminopirrolidínditiocarbamato (APDC) y dietilditiocarbamato (DDC), siguiendo las recomendaciones bibliográficas (Kinrade y Van Loon, 1974; Bruland et al., 1979; Flegal y Coale, 1989). La mezcla complejante consistió en una solución acuosa conteniendo 2 % de APDC (sal sódica o de amonio), p/v, y 2 % de DDC (sal sódica), p/v. La solución fue preparada en el momento de uso, purificándose por agitación con metil-isobutilcetona (MIBC).

El método de tratamiento empleado se detalla en el siguiente esquema:



La muestra fue colocada en una ampolla de decantación, tipo Squibb, con robinete de Teflon. El ajuste del pH se efectuó empleando tiras reactivas.

Una vez separada la fase orgánica, los elementos fueron cuantificados por espectrofotometría de absorción atómica, por atomización directa en una llama de aire-acetileno. Debido a la inestabilidad de los complejos formados, las lecturas debieron efectuarse inmediatamente después de la extracción (Dellien y Persson, 1979; Subramanian y Méranger, 1979).

Se empleó un equipo Varian AA 575, equipado con lámpara de deuterio como corrector del ruido de fondo. Para su operación se siguieron las recomendaciones dadas por el fabricante. Las lecturas de los distintos elementos se efectuaron a las siguientes longitudes de onda: 228,8 nm para cadmio; 240,7 nm para cobalto; 372,0 nm para hierro; 232 nm para níquel y 283,3 nm para plomo.

Paralelamente con las muestras, se efectuaron blancos de reactivos, empleando agua ultrapura, para detectar cualquier posible contaminación accidental que se verificara durante el procedimiento. Los análisis demostraron, en todos los casos, que no se obtenían valores detectables para ninguno de los elementos estudiados.

La cuantificación de los distintos metales se efectuó mediante la técnica de agregado patrón, a fin de compensar cualquier efecto de matriz. Para ello, se adicionó a blancos y a muestras un volumen de 1,0 mL de soluciones patrón de los distintos elementos, diluídas convenientemente.

En todas las determinaciones realizadas durante la etapa de optimización de la metodología, cada muestra fue analizada por duplicado.

La completa recuperación de los metales fue demostrada mediante el agregado de un segundo volumen (10 mL) de MIBC. El análisis de esta fase orgánica arrojó valores no detectables para todos los elementos estudiados, cuando se empleaba la mezcla de agentes complejantes, garantizando una completa transferencia desde la fase acuosa a la orgánica, durante la primera extracción.

La precisión del método fue probada empleando muestras de agua de río (n = 6), adicionadas con diluciones apropiadas de los distintos metales, y se expresa en función del coeficiente de variación.

La linealidad se investigó empleando muestras de agua de río, adicionadas con diferentes diluciones de las soluciones patrón.

I.2.1.5. Método de pretratamiento adoptado para el análisis de la fracción recuperable

Para todos los estudios subsiguientes, los análisis se efectuaron en la fracción recuperable. Una vez recolectada, la muestra fue pretratada con un volumen de 3 mL de HNO_3 concentrado por

cada litro de agua. Se dejó reposar por 24 hs a temperatura ambiente. Luego, las muestras se filtraron a través de un papel de filtro (banda azul) de filtración lenta y se conservaron a una temperatura de 4 °C, hasta el momento de análisis.

I.2.1.6. Estudio del posible rol interferente del hierro

En primer término, para las determinaciones de plomo, se partió de un volumen suficiente de agua ultrapura adicionada con HNO_3 concentrado (3 mL.L^{-1}) y con solución patrón de plomo, de modo tal que la concentración resultante fuera de 50 ug Pb.L^{-1} . Dicho volumen, o muestra "artificial", fue dividido en tres alícuotas. La primera, (a), se reservó directamente para su análisis. Sobre la segunda, se agregó un volumen de 5 mL de solución acuosa de ácido ascórbico 20 %, p/v, por cada 100 mL de muestra: alícuota (b). A la tercera, se le agregó un volumen adecuado de solución patrón de hierro, de modo tal que la concentración final resultara $1,0 \text{ mg Fe.L}^{-1}$: alícuota (c). Seguidamente, se efectuaron las determinaciones de plomo en las alícuotas (a), (b) y (c), empleando la metodología de tratamiento y análisis ya descripta.

Para las determinaciones de hierro, sobre otras alícuotas (a) y (b) se adicionó solución patrón de hierro para obtener una concentración final de $1,0 \text{ mg Fe.L}^{-1}$ en ambas.

En segundo término, se recolectó suficiente agua de río, de manera de obtener 5 fracciones. Cada fracción se dividió en dos alícuotas. La primera se reservó directamente para su análisis: alícuota (a). A la segunda, se le agregó solución de ácido ascórbico 20 %, en igual proporción que antes. Previamente, las muestras habían sido pretratadas según I.2.1.5. Sobre las alícuotas (a) y (b) se efectuaron determinaciones de hierro y plomo.

I.2.1.7. Estudio de conservación de las muestras

Se recolectó un volumen suficiente de agua de río, el cual fue dividido en 5 fracciones. Cada fracción se pretrató según I.2.1.5. y luego se efectuaron análisis de hierro y plomo, transcurridos 1 y 15 días posteriores a la recolección. Adicionalmente, se realizaron análisis sobre otras 5 fracciones de agua de río, adicionadas con solución patrón de plomo.

I.2.2. ANÁLISIS DE ELEMENTOS METÁLICOS EN MUESTRAS DE AGUAS DEL RÍO DE LA PLATA

I.2.2.1. Recolección de las muestras

Para realizar el presente trabajo de monitoreo se fijaron cinco zonas de muestreo, las cuales se detallan a continuación:

- a) Puerto de Olivos
- b) Costanera Norte, altura Ciudad Universitaria (FCEN)
- c) Puerto de Buenos Aires
- d) Parque Ecológico, Costanera Sur
- e) Balneario de Quilmes

De este modo, se abarcó una longitud costera total de aproximadamente 35 km, con tres estaciones de muestreo ubicadas en la ciudad de Buenos Aires: (b), (c) y (d); una al norte, (a), y otra al sur, (e), de la misma, según puede observarse en el mapa de la Figura I.1.

En todos los casos, se recolectaron muestras de aguas costeras y subsuperficiales (aproximadamente 0,50 m de profundidad respecto del nivel del agua), empleando recipientes de polietileno prelavados según I.2.1.2.

Los muestreos se efectuaron durante dos temporadas. La primera comprendida en el período enero/1989 hasta el 21/marzo/1989, que denominaremos VERANO'89. La segunda, desde el 21/junio/1989 hasta el 21/setiembre/1989 y denominada INVIERNO'89.

I.2.2.2. Metodología de análisis

Una vez recolectadas las muestras y transportadas al laboratorio, se separó un volumen de aproximadamente 50 mL, en el cual se determinó el pH empleando un pH-metro.

El análisis de los distintos elementos metálicos fue realizado en la llamada fracción recuperable. Para ello, se efectuó el pretratamiento indicado en I.2.1.5. y el tratamiento descrito en I.2.1.4. Para este estudio, cada muestra fue analizada por triplicado. Se efectuaron determinaciones de cinco metales: cadmio, cobalto, hierro, níquel y plomo.

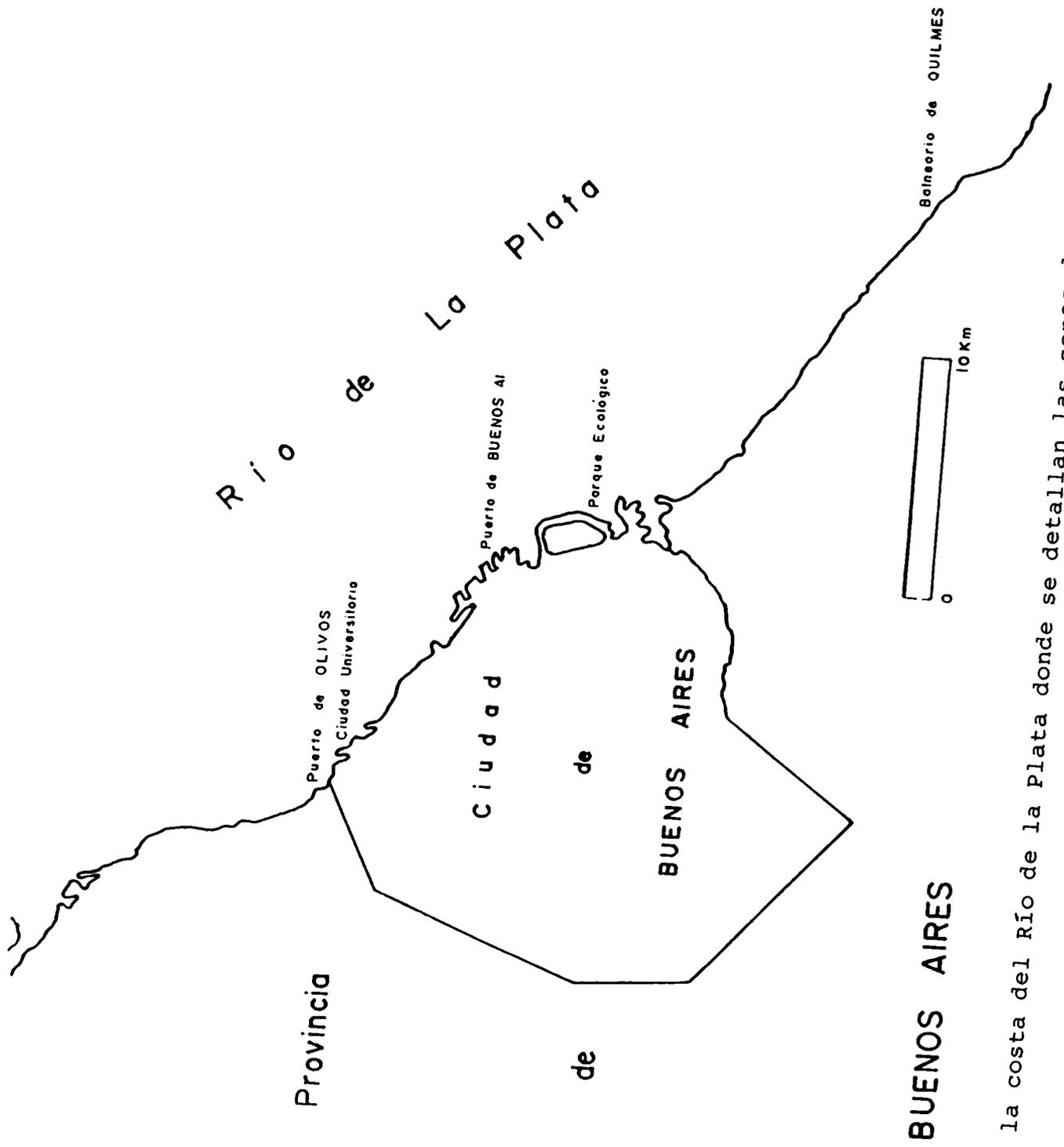


Fig.I.1.1.: Mapa de la costa del Río de la Plata donde se detallan las zonas de muestreo.

I.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

I.3.1. ANÁLISIS DE ALGUNOS FACTORES QUE INFLUYEN EN LA ETAPA DE PRETRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS

A fin de poner de manifiesto la incidencia de algunas variables metodológicas en la determinación de elementos metálicos en aguas naturales, se procedió a cuantificar el contenido de hierro en muestras procedentes de la misma zona, empleando diversos elementos filtrantes y agentes conservantes. En este estudio nos limitamos al análisis de hierro, ya que por ser un elemento que se encuentra en niveles de ocurrencia significativamente más elevados que otros metales contaminantes, su determinación resulta menos comprometida por posibles fenómenos de contaminación accidental. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla I.1.

Los valores de hierro en la fracción soluble (fracción I) estuvieron siempre por debajo del límite de detección, ya sea empleando HNO_3 o la mezcla de $\text{HNO}_3 + \text{HCl}$ como agentes conservantes. Nriagu et al. (1993) han reportado niveles de hierro aún menores, que van desde 0,3 hasta 2,3 $\mu\text{g.L}^{-1}$, en la fracción soluble de aguas de lagos, trabajando con todo el rigor metodológico, incluido un ambiente "Clase 100".

Cuando se invirtió el proceso, o sea cuando las muestras fueron primero acidificadas y luego filtradas (fracciones II), obtuvimos valores detectables. En este caso, por empleo de la mezcla $\text{HNO}_3 + \text{HCl}$, el valor medio de concentración del elemento fue ligeramente superior con respecto al obtenido empleando únicamente HNO_3 (prueba "t" de Student, nivel $p < 0,05$).

Los valores obtenidos en la fracción recuperable (fracciones III) resultaron significativamente superiores a los de las dos fracciones anteriores. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas empleando HNO_3 o la mezcla $\text{HNO}_3 + \text{HCl}$. De todos modos, resultaron inferiores a los obtenidos en las muestras sin filtrar, Fe total, adicionadas con HNO_3 (fracción IV).

En base a estas experiencias se puede concluir que el tipo de elemento filtrante y el orden en que se realiza la filtración, resultan factores de singular importancia durante la etapa de pretratamiento de las muestras. Puede observarse que por el simple hecho de alterar ese orden, o sea acidificando primero y

Tabla I.1.: Valores de concentración de Fe según técnica de pretratamiento.

Pretratamiento	Concentración Fe (mg.L ⁻¹)	Pretratamiento	Concentración Fe (mg.L ⁻¹)
Fracción Ia Filtro 0,45 um HNO ₃	<0,10	Fracción Ib Filtro 0,45 um HNO ₃ + HCl	<0,10
Fracción IIa HNO ₃ Filtro 0,45 um	0,57±0,03	Fracción IIb HNO ₃ + HCl Filtro 0,45 um	0,70±0,04
Fracción IIIa HNO ₃ x 24 hs. Filtro banda azul	0,92±0,05	Fracción IIIb HNO ₃ + HCl x 24 hs. Filtro banda azul	0,95±0,05
Fracción IV HNO ₃ Sin filtrar	1,38±0,07		

(n = 4)

filtrando inmediatamente después, se obtienen valores perfectamente detectables. En cambio, el elemento no fue detectado en la clásica fracción soluble. Algunos autores han reportado datos efectuando este pretratamiento en forma invertida (Sakai et al., 1986; Bordalo Costa y Peneda, 1989). Por consiguiente, sus resultados no pueden ser válidamente comparados con los análisis de la clásica fracción soluble.

Merece además destacarse que al realizar nuestras experiencias nos encontramos con un inconveniente al separar la fracción soluble. Aproximadamente a las 24 horas de obtener el filtrado, las muestras presentaron una singular turbidez, como consecuencia de la aparición de material en suspensión y precipitado, aún cuando se mantenían refrigeradas. Por consiguiente, las determinaciones de hierro en la fracción soluble debieron realizarse en un lapso de 2 a 6 horas posteriores a la filtración, de manera de obtener valores reproducibles.

En la gran mayoría de los reportes que hemos consultado no se documentan inconvenientes similares, tras la separación de la fracción soluble. Sin embargo, Batley y Gardner (1977) consideran que durante el almacenamiento de las muestras pueden verificarse algunos procesos biológicos y/o físico-químicos que modifiquen sus características. Así, en algunos casos se ha demostrado que la presencia de partículas en ciertas muestras marinas podía ser atribuída al desarrollo de un marcado crecimiento bacteriano (Batley y Gardner, 1977). Por otra parte, en aquellas aguas que contengan una apreciable cantidad de ácidos húmicos se puede producir su precipitación, como consecuencia del agregado de ácidos minerales, necesarios para la correcta conservación de las muestras (Luoma, 1988). En el caso particular de las aguas del Río de la Plata ambas causas podrían estar contribuyendo a la aparición de partículas en suspensión y precipitadas.

I.3.2. MÉTODO SELECCIONADO PARA EL ANÁLISIS DE LA FRACCIÓN RECUPERABLE

Ante la dificultad que representa estudiar todas las fracciones, la mayor parte de los autores efectúan y recomiendan las determinaciones de elementos metálicos en la fracción soluble. Se considera que las especies disueltas, presentes en los sistemas

acuáticos naturales, serían las más susceptibles de transferirse a las aguas que se destinan al consumo humano (Mart, 1979b; Smith et al., 1987). Sin embargo, también se reconoce que ésta puede no ser la mejor aproximación en todos los estudios, especialmente desde un punto de vista ambiental (Ashton y Chan, 1987).

De acuerdo a lo enunciado por Gibbs (1973), resulta fundamental poder establecer si los elementos metálicos presentes en aguas naturales se encuentran:

- * en solución, resultando fácil y rápidamente biodisponibles.
- * adsorbidos o asociados con sustancias orgánicas o inorgánicas del material en suspensión, a partir de los cuales se requieren procesos químicos para liberarlos.
- * formando parte de las estructuras cristalinas del material en suspensión, de modo tal que prácticamente no resultan biodisponibles.

Anteriormente hemos discutido con cierto detalle que la incorporación de los elementos metálicos en los distintos organismos acuáticos puede verificarse no sólo a través de la fase acuosa, sino también a partir del material en suspensión o de los sedimentos del lecho. Si bien es muy difícil establecer la importancia relativa de cada una de esas vías, las cuales a su vez dependerán de los hábitos de nutrición y del hábitat particular en que se desarrollan los diferentes organismos del sistema, es un hecho que éstos no disponen de un filtro de 0,45 μm de tamaño de poro.

Teniendo en cuenta la acidez de los sistemas digestivos de la mayoría de los organismos acuáticos, pueden producirse procesos de solubilización o desorción de elementos, inicialmente asociados a las partículas ingeridas. De este modo, la carga efectiva de metales realmente absorbida por la biota, excedería los niveles presentes en la fracción soluble.

De hecho, Mc Conchie y Lawrance (1991) reportaron una elevada concentración de cadmio acumulada en ciertos moluscos bivalvos, la cual no podía correlacionarse con los niveles ambientales presentes en la fracción soluble ni en los sedimentos. Este estudio reveló también que efectivamente una gran proporción de cadmio era liberada a partir de las partículas en suspensión, especialmente de aquellas con alto porcentaje de óxidos de hierro, como consecuencia del bajo pH digestivo.

En base a todos estos argumentos, consideramos que el análisis de elementos metálicos en la fracción recuperable, puede constituir una mejor aproximación para evaluar el impacto ecotoxicológico de estos contaminantes en los sistemas acuáticos naturales. Durante las 24 horas en que las muestras sin filtrar se hallan en contacto con HNO_3 , se desorbería y/o solubilizaría una cierta proporción de elementos asociada o adherida al material en suspensión. Por ello, estos análisis podrían constituir una mejor aproximación para estimar la cantidad total de elementos potencialmente biodisponibles, presentes en la fase acuosa y no solamente en la fracción soluble. Otros autores han encarado procedimientos similares para evaluar la reactividad y la biodisponibilidad de elementos metálicos en muestras de sedimentos (Trefry et al., 1985).

En base a los resultados obtenidos en la Tabla I.1., los análisis de la fracción recuperable arrojaron valores intermedios entre los de las fracciones soluble y total. Por consiguiente, estas determinaciones no están tan sujetas a problemas de contaminación accidental de las muestras. De este modo, no resulta imprescindible disponer de un laboratorio "Clase 100", como lo es para el análisis de la fracción soluble. Por otro lado, el filtrado resultante de la fracción recuperable no presentó aparición de precipitados ni material en suspensión, que dificultaran su análisis.

El tratamiento de las muestras consistió en la concentración de los elementos mediante la formación de complejos y su extracción con un solvente orgánico (MIBC). Nuestros estudios demostraron que empleando la mezcla de dos agentes complejantes (APDC y DDC) se obtenía una mayor eficiencia en la complejación, en concordancia con otros reportes de literatura (Kinrade y Van Loon, 1974; Bruland et al., 1979; Flegal y Coale, 1989).

Este tratamiento, si bien es considerado un tanto laborioso por algunos autores (Olsen et al., 1983), ha resultado ser suficientemente sensible, selectivo y específico, para la determinación de un buen número de elementos. Debido a su eficacia, se suele recurrir a esta técnica para realizar estudios de intercalibración, a fin de convalidar resultados obtenidos por otros métodos de análisis (Flegal y Coale, 1989; Pucci et al., 1989).

La metodología optimizada permitió la determinación simultánea de cinco metales: cadmio, cobalto, hierro, níquel y plomo.

La precisión del método fue probada en muestras de aguas de río adicionadas con los distintos elementos. En la Tabla I.2. se expresan los coeficientes de variación obtenidos, así como los rangos en los cuales fue probada y demostrada la linealidad.

Tabla I.2.: Coeficientes de variación y rangos de linealidad de elementos metálicos en la fracción recuperable de aguas de río.

elemento	CV %	rango lineal
cadmio	3,3 %	0- 6,4 ug.L ⁻¹
cobalto	4,8 %	0-80 ug.L ⁻¹
hierro	4,2 %	0-10 mg.L ⁻¹
níquel	5,5 %	0-60 ug.L ⁻¹
plomo	6,5 %	0-80 ug.L ⁻¹

I.3.3. ESTUDIOS COMPLEMENTARIOS:

I.3.3.1. Estudio del posible rol interferente del hierro en la determinación de plomo

Una vez adoptado el método que acabamos de detallar, se observó que la fase orgánica adquiriría un marcado color oscuro, tras efectuar la extracción. Este hecho nos llevó a investigar las posibles causas que pudieran producir tal coloración. En primera instancia, pensamos que podría tratarse de sustancias de naturaleza orgánica, presentes en las aguas naturales, que hubieran sido coextraídas, por razones de mayor solubilidad, en la fase de MIBC. Sin embargo, esta suposición fue descartada al realizar una experiencia con muestras de agua de río, pero omitiendo el agregado de agentes complejantes, por cuanto en este caso la

fase orgánica presentó una coloración similar a la del solvente puro. Por consiguiente, no serían compuestos orgánicos los responsables de tal coloración.

Si se trataba entonces de sustancias de naturaleza inorgánica, podía asumirse que fuera justamente algún elemento metálico, el cual rindiera un complejo coloreado. Considerando que el hierro es uno de los elementos mayoritarios, decidimos analizar una muestra "artificial" de agua destilada, adicionada con solución de hierro, de manera tal que la concentración resultante fuera similar a los niveles observados en las muestras de agua de río. Tras el tratamiento de dicha muestra, se observó una marcada coloración oscura en la fase orgánica.

Ahora bien, si el hierro presentaba niveles de concentración mucho más elevados que los otros elementos y, además, rendía complejos intensamente coloreados, existía la posibilidad de que su presencia interfiriera en las determinaciones de aquellos metales. Por esta razón, Dellien y Persson (1979) sugirieron el empleo de ácido ascórbico al 20 %, a fin de minimizar el efecto interferente del hierro en la determinación de plomo.

Para aclarar este punto, decidimos investigar esta posibilidad, empleando muestras de agua bidestilada, adicionadas con cantidades conocidas de los dos elementos en cuestión. Nuestros resultados se muestran en la Tabla I.3. A. En primer lugar, a la muestra (a), que contiene una concentración de 50 ug Pb.L^{-1} , le asignamos un 100 % de absorbancia para la señal de plomo. La muestra (b), la cual contiene plomo más ácido ascórbico, mostró idéntico porcentaje de absorbancia. Finalmente, en la muestra (c), adicionada con plomo más hierro, puede observarse que la señal del primero no varió apreciablemente por efecto del segundo.

Como las muestras "artificiales" no son completamente representativas del sistema acuático natural (Ashton y Chan, 1987), investigamos qué sucedía en muestras de agua de río. Determinando los niveles de plomo y de hierro, en presencia o ausencia de ácido ascórbico, no observamos diferencias significativas para la señal de plomo (Tabla I.3. B).

Tabla I.3.: Estudio del posible rol interferente del Fe en la determinación de Pb.

A	
Muestras de agua bidestilada con:	Señal de Pb % absorbancia
(a) 50 ug Pb.L ⁻¹	100 %
(b) 50 ug Pb.L ⁻¹ + ác. ascórbico	100 %
(c) 50 ug Pb.L ⁻¹ + 1,0 mg Fe.L ⁻¹	97,1 %
B	
Muestras de agua de río con:	Señal de Pb % absorbancia
(a) 23,1 ug Pb.L ⁻¹ y 0,94 mg Fe.L ⁻¹	100 %
(b) Idem (a) + ác. ascórbico	97,8 %

(n = 5)

A continuación, investigamos si la propia señal del hierro resultaba afectada por el agregado de ácido ascórbico. Muestras de agua bidestilada, con una concentración de 1,0 mg Fe.L⁻¹, presentaron una ligera disminución de la señal del hierro (aproximadamente 6 %), en presencia de ácido ascórbico, según se muestra en la Tabla I.4. A. Cuando se analizaron muestras de agua de río (Tabla I.4. B), la señal del hierro disminuyó en forma aún más marcada (aproximadamente 18 %) en las alícuotas adicionadas con ácido ascórbico.

Tabla I.4.: Estudio del efecto del ácido ascórbico en la determinación de Fe.

A	
Muestras de agua bidestilada con:	Señal de Fe % absorbancia
(a) 50 ug Pb.L ⁻¹ + 1,0 mg Fe.L ⁻¹	100 %
(b) Idem (a) + ác. ascórbico	94 %
B	
Muestras de agua de río con:	Señal de Fe % absorbancia
(a) 23,1 ug Pb.L ⁻¹ y 0,94 mg Fe.L ⁻¹	100 %
(b) Idem (a) + ác. ascórbico	82 %
(n = 5)	

En base a estas experiencias se puede concluir que aun cuando el hierro se encuentra en niveles de concentración mucho más elevados y rinde un complejo intensamente coloreado, no se observaron interferencias en la determinación de plomo. Estos resultados se contraponen con los obtenidos previamente por Dellien y Persson (1979), quienes recomendaron el agregado de una solución de ácido ascórbico para disminuir dicha interferencia. Por otra parte, en nuestro estudio observamos que al emplear dicha solución disminuía la absorbancia de la señal del hierro, especialmente en las muestras de aguas naturales.

Por ambas razones, descartamos el agregado de ácido ascórbico, durante el tratamiento de las muestras.

I.3.3.2. Estudio de conservación de las muestras

La conservación de las muestras también fue objeto de estudio. Para ello, se realizaron determinaciones de hierro y de plomo en la fracción recuperable, transcurridos 1 y 15 días posteriores a la recolección. Los resultados se muestran en las Figuras I.2. A, análisis de hierro, y I.2. B, análisis de plomo.

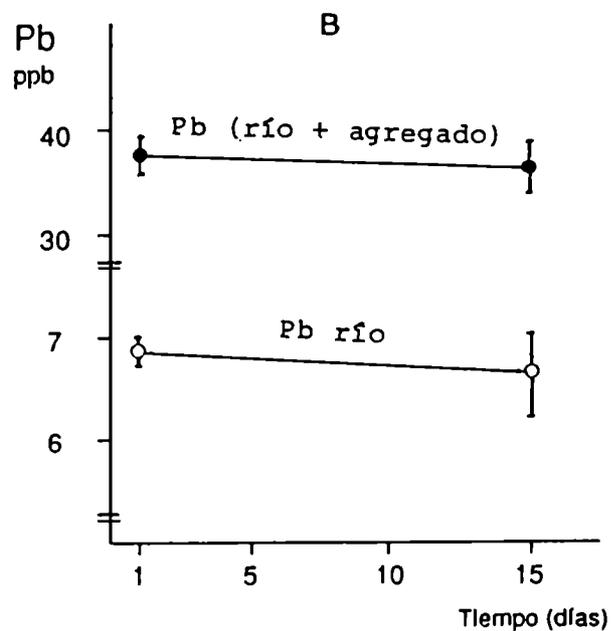
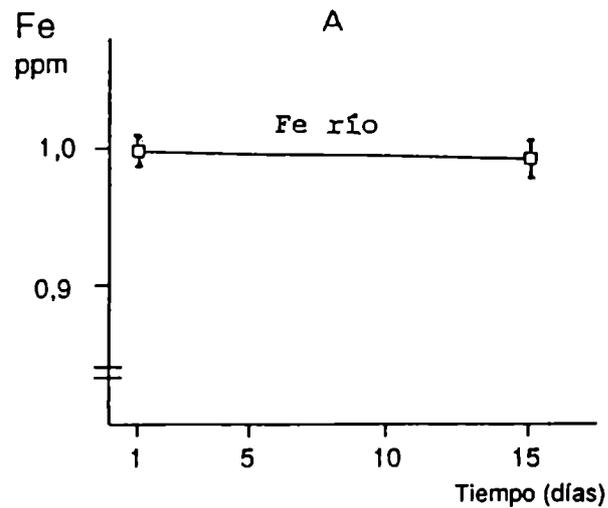


Fig. I.2.: Estudios de estabilidad de las muestras.

Dichos resultados indican que durante el lapso estudiado, no se observan alteraciones apreciables en los niveles de concentración para ambos elementos. Muestras naturales, adicionadas con plomo, también mostraron una correcta conservación (Figura I.2.B).

Para obtener resultados confiables, diversos autores recalcan la necesidad de efectuar los análisis en lapsos relativamente cortos, de manera de reducir al mínimo los tiempos de contacto de las muestras con el recipiente (Batley y Gardner, 1977; Massee et al., 1981). En base a este estudio de estabilidad, se dispone de un plazo de al menos 15 días, para la realización de la etapa de tratamiento.

I.3.4. ANÁLISIS DE ELEMENTOS METÁLICOS EN MUESTRAS DE AGUAS DEL RÍO DE LA PLATA

Una vez optimizada la metodología, se realizó un pequeño trabajo de monitoreo para determinar los niveles de concentración de elementos metálicos en muestras recolectadas de diferentes zonas costeras del Río de la Plata. Los resultados obtenidos durante dos muestreos, uno en verano y otro en invierno de 1989, se presentan en la Tabla I.5.

Los elementos cadmio y cobalto fueron detectados únicamente en la zona del Puerto de Buenos Aires, en el muestreo de verano. Los otros metales, níquel, hierro y plomo, presentaron niveles considerablemente variables.

Por cierto, está bastante bien establecido que los niveles de elementos en muestras de aguas naturales, pueden presentar una alta variabilidad (Lietz y Galling, 1989). Incluso, algunos autores se limitan a reportar rangos de concentración, antes que valores medios (Finerty et al., 1990).

En nuestro caso, estas variaciones pueden ser debidas a numerosas causas.

Con respecto a las distintas zonas de muestreo, hay que considerar que pueden estar sujetas a los efectos de una gama muy amplia y diversa de descargas industriales, domésticas o urbanas, dado que se trata de una de las áreas más densamente pobladas del país.

Mientras que en Puerto de Olivos se desarrollan básicamente

Tabla I.5.: Rangos y valores medios de concentración de elementos metálicos en la fracción recuperable de muestras de aguas del Río de la Plata.

		pH	Cadmio ug.L ⁻¹	Cobalto ug.L ⁻¹	Níquel ug.L ⁻¹	Plomo ug.L ⁻¹	Hierro mg.L ⁻¹
Puerto de Olivos	Ver. (n=5)	7,0	<0,2	<2,0	<0,5	8,8-12,9 10,8	0,28-0,42 0,35
	Inv. (n=4)	7,3	<0,2	<2,0	1,9-3,6 2,5	6,1- 8,0 7,0	0,32-0,52 0,41
Ciudad Universitaria	Ver. (n=4)	7,5	<0,2	<2,0	8,2-9,7 9,0	4,9- 8,9 6,9	0,56-0,69 0,64
	Inv. (n=4)	7,0	<0,2	<2,0	3,5-3,9 3,7	16,7-19,6 18,2	1,05-1,63 1,34
Pto. de Buenos Aires	Ver. (n=4)	6,8	<0,2-0,4 0,3	<2,0-3,0 2,5	1,8-7,3 4,3	2,4-58,6 28,1	0,68-1,26 0,97
	Inv. (n=6)	6,0	<0,2	<2,0	0,6-3,7 2,0	4,2-18,4 9,4	0,57-0,77 0,70
Club de Pesca	Ver. (n=4)	6,0	<0,2	<2,0	<0,5	12,5-16,4 14,5	0,93-1,01 0,96
	Inv. (n=4)	6,0	<0,2	<2,0	<0,5-2,8 1,6	9,9-13,7 11,3	0,86-0,98 0,92
Balneario de Quilmes	Ver. (n=6)	8,0	<0,2	<2,0	0,5-1,3 0,9	6,1- 6,7 6,4	0,53-0,64 0,57
	Inv. (n=8)	6,5	<0,2	<2,0	1,1-4,6 3,0	9,6-23,7 19,1	1,29-1,31 1,30

actividades recreativas y deportivas, el Puerto de Buenos Aires concentra las principales operaciones portuarias del país.

En las cercanías de Ciudad Universitaria, diversos efluentes, conteniendo numerosos residuos industriales, se liberan en su mayor parte sin ningún tipo de tratamiento previo. La zona del Club de Pesca, en Costanera Sur, se encuentra limitando directamente con el Puerto de Buenos Aires. En las cercanías del Balneario de Quilmes, se descargan no sólo residuos industriales muy diversos, sino que también se suman descargas domésticas y de redes cloacales, en su mayor parte sin adecuados tratamientos previos.

Además, una gran parte de la costa del río está sujeta a continuos procesos de rellenado, con materiales de dudosa procedencia, afectando especialmente las zonas de Capital Federal.

Por otra parte, el Río de la Plata presenta una hidrodinámica natural de por sí muy compleja. Por un lado, está sujeto a las descargas de los ríos Paraná y Uruguay, en un sentido, que se contraponen con las corrientes marinas del océano Atlántico.

En el río desembocan también una serie de afluentes, que si bien no presentan un caudal comparable, se considera públicamente que están altamente contaminados, como los ríos Reconquista, Arroyo Maldonado y Riachuelo.

En vista de la compleja situación a que puede estar sometida cada una de las distintas zonas de muestreo, no puede resultar sorprendente encontrar una amplia variabilidad en los resultados.

Además, teniendo en cuenta que se realizó un solo muestreo en cada temporada, no es posible establecer tendencias o variaciones temporales.

Nuestros resultados tampoco pueden ser válidamente comparados con datos reportados en la literatura. La información bibliográfica a nuestro alcance consistía, invariablemente, en análisis practicados sobre la fracción soluble, en suspensión y/o total.

Sin embargo, consideramos que a través del análisis de la fracción recuperable, se podría estimar la reactividad y biodisponibilidad potencial de la carga de elementos metálicos presentes tanto en la fase acuosa disuelta, como en el material en suspensión. El método resulta suficientemente confiable y reproducible para la determinación simultánea de cinco metales: cadmio, cobalto, hierro, níquel y plomo. Por otra parte, los datos obtenidos a través de este limitado monitoreo, pueden constituir una línea de

base para efectuar comparaciones con futuros monitoreos, entre las mismas zonas, o, incluso, frente a otros sistemas acuáticos.

CAPITULO II

Determinación de elementos metálicos en muestras
de sedimentos

II.1. INTRODUCCIÓN

La contaminación de los sedimentos es quizás la consecuencia más grave ocasionada por la liberación de sustancias tóxicas en los cuerpos de agua. El problema es de una magnitud tal, que aún no está completamente esclarecido (Landrum y Robbins, 1990).

Ya hemos mencionado, al analizar los procesos de distribución, que los sedimentos del lecho constituyen el principal depósito para los contaminantes metálicos. Además, los metales inicialmente asociados a estas partículas, pueden llegar a redisolverse, pasando a la fase acuosa, en respuesta a diversos cambios en las condiciones ambientales.

Debido a ello, se considera que la contaminación de los sedimentos representa una severa amenaza y un riesgo a mediano o largo plazo, para la calidad de las aguas y el bienestar de las comunidades biológicas (Marcus, 1989; Mc Intosh, 1991).

Recordemos, además, que los distintos organismos biológicos pueden incorporar sustancias químicas contaminantes no sólo a partir de la fase acuosa, sino también mediante la ingesta de partículas de sedimentos. Esta última vía de incorporación suele resultar de singular importancia para la fauna del bentos, especialmente para aquellas especies filtradoras. Estos organismos, que seleccionan su alimento en base al tamaño o la densidad del material particulado, inadvertidamente pueden incorporar partículas de sedimentos que se hayan mezclado con el fitoplancton o zooplancton, según sean sus hábitos nutricionales (Luoma, 1988; Mc Intosh, 1991).

En la literatura, numerosos reportes dan cuenta de una clara correlación entre el grado de contaminación de los sedimentos y diversas modificaciones nocivas en ecosistemas marinos o de agua dulce, en organismos del bentos. Algunas de esas evidencias se han obtenido a partir de programas de monitoreo de campo, los cuales demuestran una alta carga de contaminantes en la biota de sistemas que presentan altos niveles de contaminación en los sedimentos. Muchos de esos organismos presentan una incidencia de carcinomas mayor a la esperada, entre otros efectos tóxicos (Landrum y Robbins, 1990).

Por consiguiente, los estudios orientados a establecer los niveles de concentración de sustancias químicas en este subcompar-

timiento pueden resultar el método más efectivo y de menor costo para evaluar el impacto de las diversas actividades antropogénicas sobre los ambientes acuáticos (Bradford y Horowitz, 1988; Förstner, 1990). Incluso, en numerosos programas de monitoreo de calidad de aguas, se practican únicamente análisis de concentración de elementos metálicos en muestras de sedimentos, ya que éstos resultan más rápidos, económicos y presentan menos dificultades metodológicas que las determinaciones en muestras de aguas (Marcus y Scott, 1990).

Pese a ello, tratar de establecer mediante criterios puramente numéricos el grado de contaminación de los sedimentos resulta, al menos hasta el momento, una meta aún no alcanzada. Hasta 1989 no existía, en los Estados Unidos de América, un criterio oficial que permitiera fijar los niveles de concentración máximos permitidos de numerosos contaminantes, a excepción de los bifenilos policlorados (Marcus, 1989).

La concentración de metales totales en muestras de sedimentos, provenientes de distintos sistemas acuáticos presenta una considerable variabilidad. Esta variabilidad no surge simplemente por diferencias en el grado de contaminación. La distribución de sustancias químicas en dichas muestras, especialmente de aquellas que exhiben una elevada persistencia, constituye un proceso dinámico, ligado principalmente a las características físicas, químicas, geológicas e hidrológicas de las cuencas (Bordalo Costa y Peneda, 1989; Marcus, 1989; Förstner, 1990; Pardo et al., 1990).

La capacidad de los distintos tipos de sedimentos para concentrar contaminantes depende, en gran medida, de la composición química así como de la estructura de las partículas (Marcus, 1989; Förstner, 1990).

Por ello, a pesar del gran interés científico que surge por la relevancia que pueden exhibir los contaminantes asociados a este subcompartimiento, aún no es posible conocer detalladamente el comportamiento de los mismos y los potenciales efectos tóxicos que pueden devenir en los distintos organismos expuestos.

Limitaciones de tipo metodológico, en gran medida, obstaculizan este entendimiento. Aún en la actualidad, es difícil poder establecer con exactitud el contenido total de elementos metálicos asociados a los sedimentos. Este tipo de determinaciones requieren de una completa disolución o descomposición de las

muestras, la cual no siempre es posible. Debido a ello, es usual efectuar los análisis en la llamada "fracción recuperable total", la cual representa una proporción de elementos variable respecto al total, que se obtiene a través de un ataque químico convenientemente definido (Horowitz, 1988).

En la literatura se han descrito diferentes procedimientos que involucran procesos de digestión con ácidos minerales fuertes y concentrados, empleados solos o en proporciones diversas. Entre éstos se destacan los siguientes: HNO_3 , HCl , $\text{HNO}_3 + \text{HCl}$, $\text{HNO}_3 + \text{HClO}_4$, $\text{HNO}_3 + \text{HCl} + \text{HClO}_4$, $\text{HNO}_3 + \text{HF}$, $\text{HNO}_3 + \text{HClO}_4 + \text{HF}$, etc. (Ritter et al., 1978; Breder, 1982; Cabrera et al., 1984; Sakai et al., 1986; Marcus et al., 1988; Harper et al., 1989; Malm, et al., 1989).

En primera instancia, podría asumirse que un ataque que involucre al HF resultaría el método más efectivo para establecer el contenido total de metales. Sin embargo, ni siquiera este tratamiento llega a ser completo, puesto que aún así quedan residuos sólidos sin disolver o atacar (Breder, 1982; Harper et al., 1989). Incluso, algunos autores no encontraron diferencias significativas en la cuantificación de elementos, mediante procesos de digestión en presencia o ausencia de dicho ácido (Breder, 1982).

Según se ha mencionado oportunamente, el tamaño de partícula representa uno de los factores claves en el control de los procesos de transporte de sedimentos y de transferencia de sustancias químicas entre la fase acuosa y el material particulado. En base a ello, se considera que las partículas más pequeñas, con mayor área superficial y por ende mayor capacidad de adsorción, tienen más relevancia en los programas de monitoreo u otros estudios de contaminación. Por consiguiente, se acostumbra realizar una separación de las partículas en base a su tamaño, generalmente mediante un proceso de filtración, previo a la determinación de contaminantes (Sakai et al., 1986; Horowitz, 1988; Lai, 1988; Luoma, 1988; Harper et al., 1989).

Finalmente, merece destacarse que los niveles de concentración de contaminantes en las capas superficiales de los sedimentos del lecho reflejan el nivel de contaminación ocasionado por las descargas más recientes. Algunos autores han encarado, incluso, estudios a distintas profundidades, los cuales pueden resultar de gran utilidad, puesto que, en alguna medida, proveen un registro

de la evolución del sistema a través del tiempo. Obviamente, para estos estudios se requiere conocer el grado de sedimentación natural, a fin de poder establecer correlaciones temporales válidas (De Laune et al., 1989; Förstner, 1990).

ESTUDIOS REALIZADOS

Para este capítulo se realizaron los siguientes estudios:

Estudio de la eficacia de distintos procesos de digestión de muestras de sedimentos.

Determinación de los niveles de concentración de ocho elementos metálicos: cadmio, cobalto, cobre, cromo, hierro, níquel, plomo y zinc, en muestras de sedimentos costeros y superficiales del Río de la Plata.

Estudio de la evolución de los niveles de contaminantes metálicos en muestras de sedimentos a través del tiempo.

II.2. MATERIALES Y MÉTODOS

II.2.1. Recolección de las muestras

Para completar el trabajo de monitoreo ambiental de elementos metálicos en el sistema acuático del Río de la Plata, se recolectaron muestras de sedimentos en las mismas zonas previamente fijadas para la toma de muestras de aguas (I.2.2.1.) a excepción del Puerto de Buenos Aires. En esta última, no nos fue posible acceder a los sedimentos. Por consiguiente, las zonas seleccionadas y las fechas de recolección de las muestras correspondientes a las temporadas verano e invierno de 1989 se presentan en el siguiente cuadro:

zonas	muestreos	
	verano'89	invierno'89
* Puerto de Olivos	7/marzo	25/agosto
* Costanera Norte, altura Cdad. Universitaria: FCEN	7/marzo	14/agosto
* Parque Ecológico, Costanera Sur	1/marzo	17/julio
* Balneario de Quilmes	5/enero	8/agosto

Muestras adicionales de sedimentos se recolectaron en las zonas de Puerto de Olivos y Balneario de Quilmes, a fin de evaluar la evolución de los niveles de contaminantes a través del tiempo. En Puerto de Olivos, los muestreos se realizaron en las siguientes fechas: 4/noviembre/1988 (primavera'88); 4/marzo/1990 (verano'90); 4/julio/1990 (invierno'90) y 10/noviembre/1990 (primavera'90). En Balneario de Quilmes, el muestreo adicional se realizó el 5/marzo/1990 (verano'90).

En todos los casos, se recolectaron muestras superficiales (0-5 cm), de la zona de intermarea, mediante el empleo de espátulas de plástico, y se colocaron en bolsitas de polietileno.

II.2.2. Materiales, reactivos y condiciones de trabajo

La calidad de las drogas y reactivos, el procedimiento de lavado del material y las condiciones de trabajo fueron las mismas que las descritas en el capítulo anterior (I.2.1.2.).

II.2.3. Tratamiento de las muestras

Una vez en el laboratorio, los sedimentos fueron colocados en bandejas de cartón y se dejaron secar primero al aire y, luego, en estufa a 90-100 °C, durante 3-4 hs. A continuación, se molieron en un mortero de ágata y se filtraron por un tamiz plástico de 20 Mesh.

II.2.4. Procesos de digestión y análisis

Para el estudio de la eficiencia de distintos procesos de digestión se emplearon los siguientes tratamientos:

- a) HNO_3 concentrado (c)
- b) HNO_3 (c) + HCl (c), en proporción 3 : 1
- c) HNO_3 (c) + HClO_4 , en proporción 3 : 1

Aproximadamente 1 gramo de muestra fue transferido a un tubo de 25 mL, agregando unos 6 mL de HNO_3 o la mezcla de ácidos correspondiente. Las muestras fueron digeridas por vía húmeda, a 100-120 °C, durante 5-6 hs como mínimo, hasta reducir el volumen inicial a unos 0,5 mL.

Para todos los análisis de monitoreo se empleó exclusivamente el tratamiento a) con HNO_3 (c).

Una vez finalizado el proceso de digestión, el extracto se diluyó con HNO_3 1 %, v/v, y el residuo se separó por centrifugación a 2000-3000 rpm, durante 15-20 minutos. El sobrenadante fue transferido a un tubo graduado, llevando el volumen final a 10,0 mL con HNO_3 1 %, v/v.

Los análisis se efectuaron en un espectrofotómetro de absorción atómica, Varian AA 575, mediante la directa aspiración del sobrenadante en una llama de aire-acetileno, según las condiciones recomendadas por el fabricante. En todos los casos, se empleó

una lámpara de deuterio para corregir el ruido de fondo. Se cuantificaron ocho elementos metálicos y las lecturas correspondientes se efectuaron a las siguientes longitudes de onda: 228,8 nm para cadmio; 240,7 nm para cobalto; 357,9 nm para cromo; 324,7 nm para cobre; 248,3 nm para hierro; 232,0 nm para níquel; 217,0 nm para plomo, y 213,9 nm para zinc.

La cuantificación de los distintos elementos se realizó mediante curvas de calibración con soluciones patrones, una vez establecido el rango de linealidad y que no se verificaban interferencias por efecto de matriz, mediante determinaciones efectuadas por el método de agregado patrón.

Cada muestra se analizó como mínimo por duplicado. Cada 3 o 4 muestras, se intercaló un tubo conteniendo unos 2 g de sedimentos, tratado análogamente, a fin de verificar la eficiencia del proceso de digestión.

Por cada 6 muestras se corrió simultáneamente un blanco de reactivos que recibió idéntico tratamiento, para detectar cualquier impureza presente o contaminación accidental que se verificara durante el proceso. Los análisis demostraron, en todos los casos, valores no detectables.

II.2.5. Métodos estadísticos

Para comparar los niveles de concentración de los diversos elementos, según los distintos procesos de digestión, se empleó el método de análisis de varianzas (ANOVA), recurriendo en algunos casos al método modificado, que se aplica cuando no se verifica homocedasticidad en los datos (Sokal y Rohlf, 1969).

Para comparar los niveles de concentración a través de las distintas zonas o temporadas de muestreo, se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (Sokal y Rohlf, 1969).

En todos los casos se trabajó a un nivel de significación de las pruebas $p < 0,05$.

II.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

II.3.1. ESTUDIO DE LA EFICIENCIA DE DISTINTOS PROCESOS DE DIGESTIÓN.

En la Introducción de este capítulo hemos señalado que los niveles de concentración de metales en la llamada fracción recuperable total de muestras de sedimentos dependen del tratamiento de digestión empleado. Pero también hay que tener presente que, frente a un dado tratamiento, se pueden encontrar diferencias según sea la naturaleza y la composición geoquímica de las propias partículas, las cuales son características de cada cuenca en particular. Por consiguiente, nuestro primer estudio consistió en investigar los niveles de elementos obtenidos mediante distintos tratamientos ácidos, empleando:

- (a) únicamente HNO_3 ,
- (b) una mezcla de $\text{HNO}_3 + \text{HCl}$, en proporción 3:1,
- (c) una mezcla de $\text{HNO}_3 + \text{HClO}_4$, en proporción 3:1.

Para el estudio completo, se seleccionaron muestras procedentes de las zonas de Puerto de Olivos y del Balneario de Quilmes. Ambas zonas han estado relativamente libres, hasta el momento, de procesos de rellenado de terrenos, a la vez que no han sufrido la descarga masiva de desechos y residuos, tal como se han producido en la mayor parte de las áreas costeras a lo largo de la Capital Federal. En base a ello, consideramos que esas muestras estarían constituidas por partículas mejor representativas de la naturaleza y composición de los sedimentos típicos del sistema del Río de la Plata.

Por esas mismas razones, nos limitamos a seleccionar una única zona, Parque Ecológico, ubicada en Capital Federal, para el presente estudio.

En la Tabla II.1. se muestran los valores de concentración para los ocho elementos metálicos analizados, obtenidos aplicando los distintos tratamientos ya descriptos.

En la muestra recolectada en la zona de Puerto de Olivos no se observaron diferencias significativas en función de los tratamientos para ninguno de los elementos, a excepción del cobalto. Para este metal, los valores máximos se obtuvieron tras el empleo

Tabla II.1.: Valores medios y desviación estándar de concentración de elementos metálicos en muestras de sedimentos según distintos tratamientos.

	Pto. Olivos.	Pque. Ecol.	Bal. Quilmes
Cadmio ($\mu\text{g.g}^{-1}$)			
HNO ₃	<0,01	<0,01	<0,01
HNO ₃ + HCl	<0,01	- -	<0,01
HNO ₃ + HClO ₄	<0,01	0,12 ± 0,06 *	<0,01
Cobalto ($\mu\text{g.g}^{-1}$)			
HNO ₃	1,4 ± 0,1	2,5 ± 0,5	3,9 ± 0,3
HNO ₃ + HCl	2,0 ± 0,5 *	- -	3,6 ± 0,3
HNO ₃ + HClO ₄	1,2 ± 0,1	2,9 ± 0,8	4,8 ± 0,5 *
Cobre ($\mu\text{g.g}^{-1}$)			
HNO ₃	3,1 ± 0,5	13,1 ± 6,0	5,3 ± 0,2
HNO ₃ + HCl	2,5 ± 0,1	- -	5,4 ± 0,1
HNO ₃ + HClO ₄	3,1 ± 0,8	11,4 ± 1,4	6,6 ± 0,6 *
Cromo ($\mu\text{g.g}^{-1}$)			
HNO ₃	4,0 ± 0,1	3,3 ± 0,9	13,6 ± 0,2
HNO ₃ + HCl	4,0 ± 0,1	- -	13,2 ± 0,2
HNO ₃ + HClO ₄	4,0 ± 0,1	4,2 ± 1,0	16,6 ± 1,4 *
Hierro (mg.g^{-1})			
HNO ₃	5,0 ± 0,1	5,9 ± 0,7	10,5 ± 0,8
HNO ₃ + HCl	4,7 ± 0,2	- -	11,3 ± 0,7
HNO ₃ + HClO ₄	5,7 ± 1,0	7,1 ± 0,7 *	13,3 ± 0,5 *
Níquel ($\mu\text{g.g}^{-1}$)			
HNO ₃	1,4 ± 0,7	4,1 ± 0,5	4,8 ± 0,9
HNO ₃ + HCl	1,6 ± 0,8	- -	4,6 ± 0,1
HNO ₃ + HClO ₄	1,7 ± 0,7	3,6 ± 0,7	4,8 ± 0,3
Plomo ($\mu\text{g.g}^{-1}$)			
HNO ₃	2,9 ± 0,5	52,4 ± 20,5	9,9 ± 0,3
HNO ₃ + HCl	2,2 ± 0,3	- -	9,2 ± 0,1
HNO ₃ + HClO ₄	2,4 ± 0,1	50,1 ± 26,8	11,8 ± 0,8 *
Zinc ($\mu\text{g.g}^{-1}$)			
HNO ₃	17,8 ± 4,2	51,2 ± 18,4	82,1 ± 3,2
HNO ₃ + HCl	15,1 ± 0,9	- -	82,2 ± 2,3
HNO ₃ + HClO ₄	21,6 ± 5,2	49,2 ± 9,0	101,0 ± 8,5 *

(n=6). * diferencias significativas (p<0,05).

de la mezcla $\text{HNO}_3 + \text{HCl}$, no encontrándose diferencias significativas entre el uso de HNO_3 solamente o de la mezcla $\text{HNO}_3 + \text{HClO}_4$.

En el caso de la muestra de la zona del Balneario de Quilmes, en cambio, se observaron leves diferencias, estadísticamente significativas al nivel estudiado, para los elementos cobalto, cobre, cromo, hierro, plomo y zinc. En estos casos se observó, además, que las diferencias se producían frente al tratamiento con la mezcla $\text{HNO}_3 + \text{HClO}_4$, la cual permitió una mayor recuperación de dichos elementos, en relación al empleo de HNO_3 puro o la mezcla $\text{HNO}_3 + \text{HCl}$. Estadísticamente, entre estos dos últimos tratamientos no se encontraron diferencias apreciables. Para los elementos cadmio y níquel, en cambio, no se registraron diferencias significativas frente a los distintos tratamientos.

Cuando se analizó el comportamiento de la muestra recolectada en el Parque Ecológico, ya se disponían datos de las otras dos zonas. De este modo, ya se sabía que entre los tratamientos (a) y (b) no se verificaban, en general, diferencias apreciables. Por consiguiente, decidimos obviar el tratamiento (b).

En la Tabla II.1. se puede notar, además, que los niveles de concentración de elementos obtenidos al analizar esta muestra presentaron, en general, mayor variabilidad. En gran parte, dicha variabilidad puede ser atribuida a la mayor heterogeneidad del material presente en esta zona. Para los elementos cobalto, cobre, cromo, níquel, plomo y zinc no se encontraron diferencias significativas. En el caso del hierro, se obtuvieron valores levemente mayores al emplear la mezcla $\text{HNO}_3 + \text{HClO}_4$. La diferencia más relevante se observó con respecto al cadmio, puesto que únicamente con el empleo de dicha mezcla se pudieron registrar valores detectables.

Merece destacarse, sin embargo, que a pesar de que frente a ciertos elementos en algunas muestras se observaron diferencias estadísticamente significativas, los valores promedios obtenidos no difieren demasiado entre sí.

En primer lugar, salvo para la determinación de cobalto en la muestra de Puerto de Olivos, en todos los otros casos, las diferencias se encontraron entre los tratamientos (a) y (c).

Para estimar el error porcentual que se cometería por el empleo de HNO_3 puro, (a), en vez de utilizar la mezcla $\text{HNO}_3 + \text{HClO}_4$, (c), se calculó el cociente entre las diferencias de promedios

entre ambos tratamientos y el valor obtenido con el tratamiento (a), o sea la relación:

$$\text{Error porcentual} = \frac{|\bar{x}(a) - \bar{x}(c)|}{\bar{x}(a)} \cdot 100$$

para aquellos elementos que arrojaron diferencias significativas. Se obtuvieron los siguientes valores:

Zona Parque Ecológico:

* Para Fe = 20 %

Zona Balneario de Quilmes:

* Para Co = 23 %.

* Para Cu = 25 %.

* Para Cr = 22 %

* Para Fe = 27 %.

* Para Pb = 19 %.

* Para Zn = 23 %.

Para la muestra de Puerto de Olivos, la relación anterior fue calculada para establecer el error porcentual entre los tratamientos (a) y (b). El valor obtenido para cobalto resultó igual a 30 %.

Por lo tanto, el máximo error que puede cometerse por empleo de HNO₃ puro en vez de alguna de las otras dos mezclas no parece exceder, en ningún caso, el 30 %. En base a ello, éste fue el procedimiento que seleccionamos para la digestión de las muestras en todos los estudios subsiguientes.

Dicho tratamiento ha sido, además, ampliamente recomendado y utilizado por otros autores (Bradford y Horowitz, 1988; Harper et al., 1989; Jordao y Nickless, 1989; Sadig y Alam, 1989).

II.3.2. NIVELES DE ELEMENTOS METÁLICOS EN MUESTRAS DE SEDIMENTOS.

A continuación, encaramos un pequeño trabajo de monitoreo para determinar los niveles de concentración de ocho elementos metálicos (cadmio, cobalto, cobre, cromo, hierro, níquel, plomo y zinc) en muestras de sedimentos costeros, del Río de la Plata, recolectadas durante las temporadas verano e invierno de 1989. Dicho estudio permitiría satisfacer diversos objetivos:

establecer las zonas de mayor contaminación por esos elementos.
determinar cuáles eran los metales que se presentaban en mayores niveles de concentración.

efectuar comparaciones con otras zonas y, eventualmente, con futuros monitoreos.

estimar los factores de concentración según los niveles de elementos presentes en muestras de sedimentos, en relación con los determinados en la fase acuosa.

En primer lugar, los datos obtenidos se han graficado empleando los llamados diagramas de bloques y se presentan en las Figuras II.1. hasta la II.8., según los elementos. Sobre los bloques están representados los valores máximos y mínimos, que corresponden al rango. Cada bloque en sí contiene el 50 % de los datos, siendo sus límites los valores que representan el 25 y el 75 % del total de datos. Los diagramas de bloques permiten visualizar en forma rápida y fácil, la distribución de los resultados obtenidos según las zonas y durante las dos temporadas de estudio (Tukey, 1977). Además, ya han sido empleados por otros autores, en trabajos previos (Umweltbundesamt, 1991).

Para efectuar el análisis de la variación de los niveles de concentración de elementos metálicos, a través de las distintas zonas, tuvimos que recurrir a una prueba no paramétrica, ya que las distribuciones de los datos no eran normales ni se verificaba homocedasticidad. Por consiguiente, se eligió la prueba de Kruskal-Wallis (Sokal y Rohlf, 1969). La hipótesis nula de las pruebas no paramétricas, no está justamente relacionada con algún parámetro específico, como lo es el valor medio en el caso del análisis de varianzas, sino que concierne a la distribución de las variables. En estos casos, se trata de averiguar si las dis-

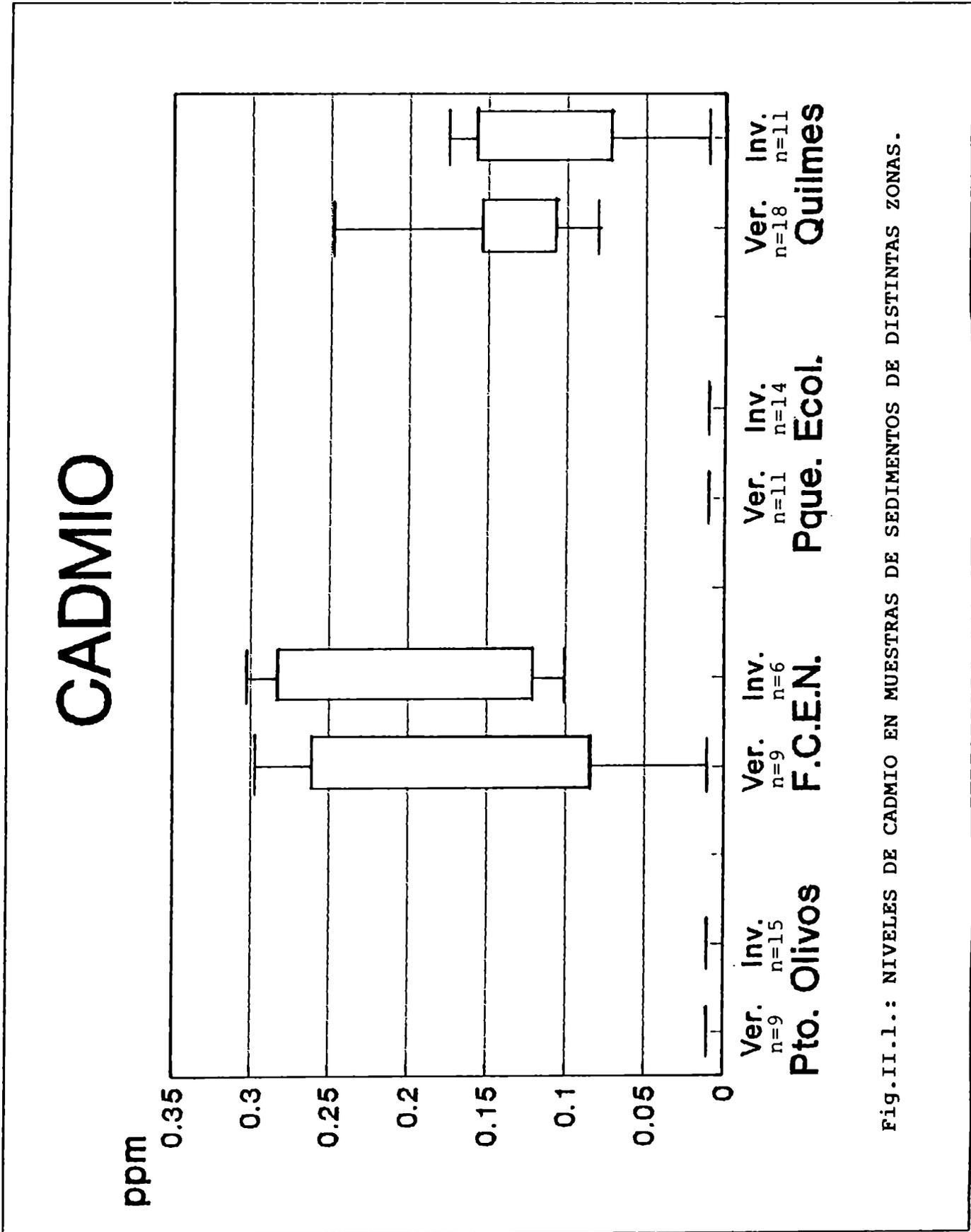


Fig.II.1.1.: NIVELES DE CADMIO EN MUESTRAS DE SEDIMENTOS DE DISTINTAS ZONAS.

COBALTO

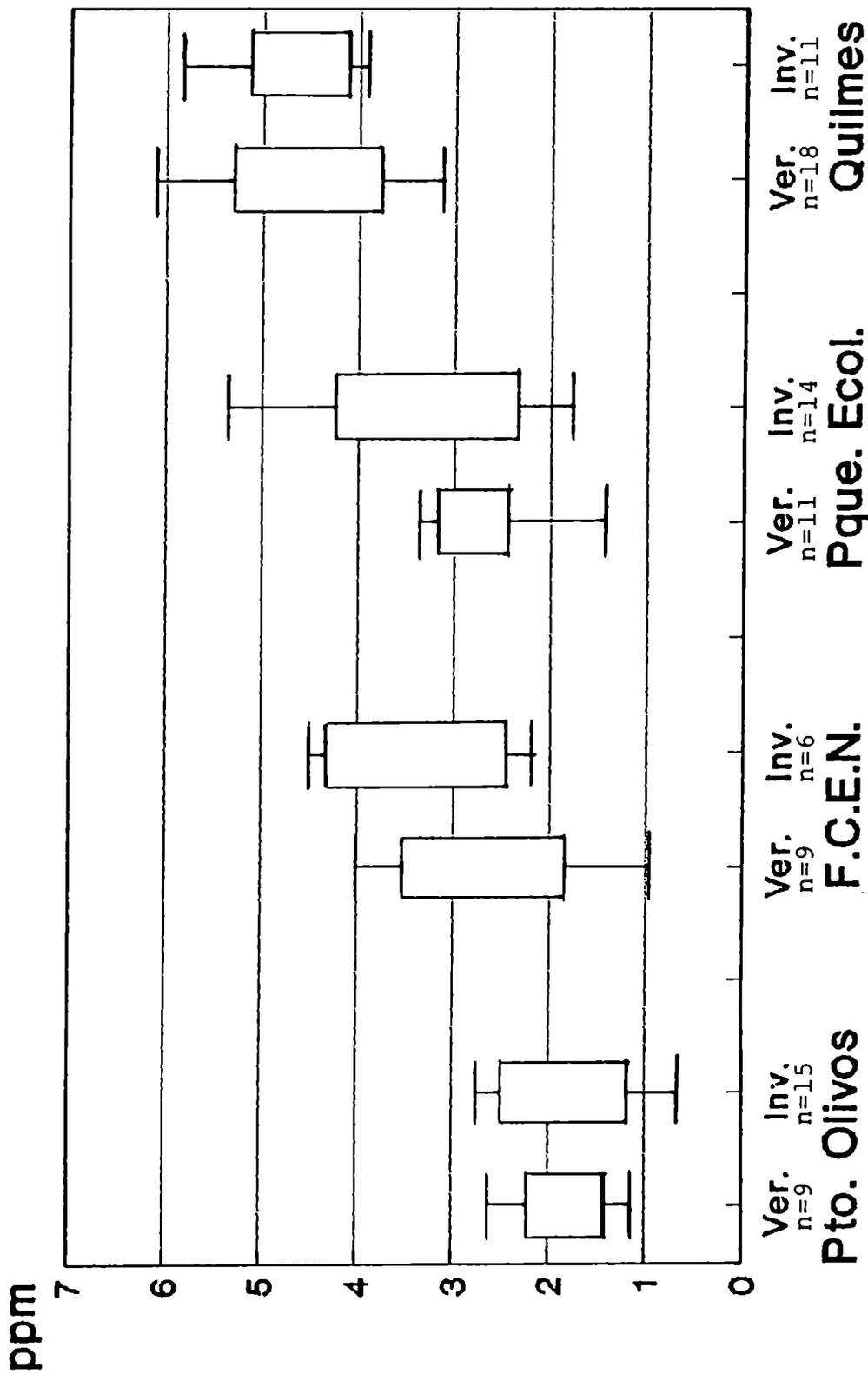


Fig.II.2.: NIVELES DE COBALTO EN MUESTRAS DE SEDIMENTOS DE DISTINTAS ZONAS.

COBRE

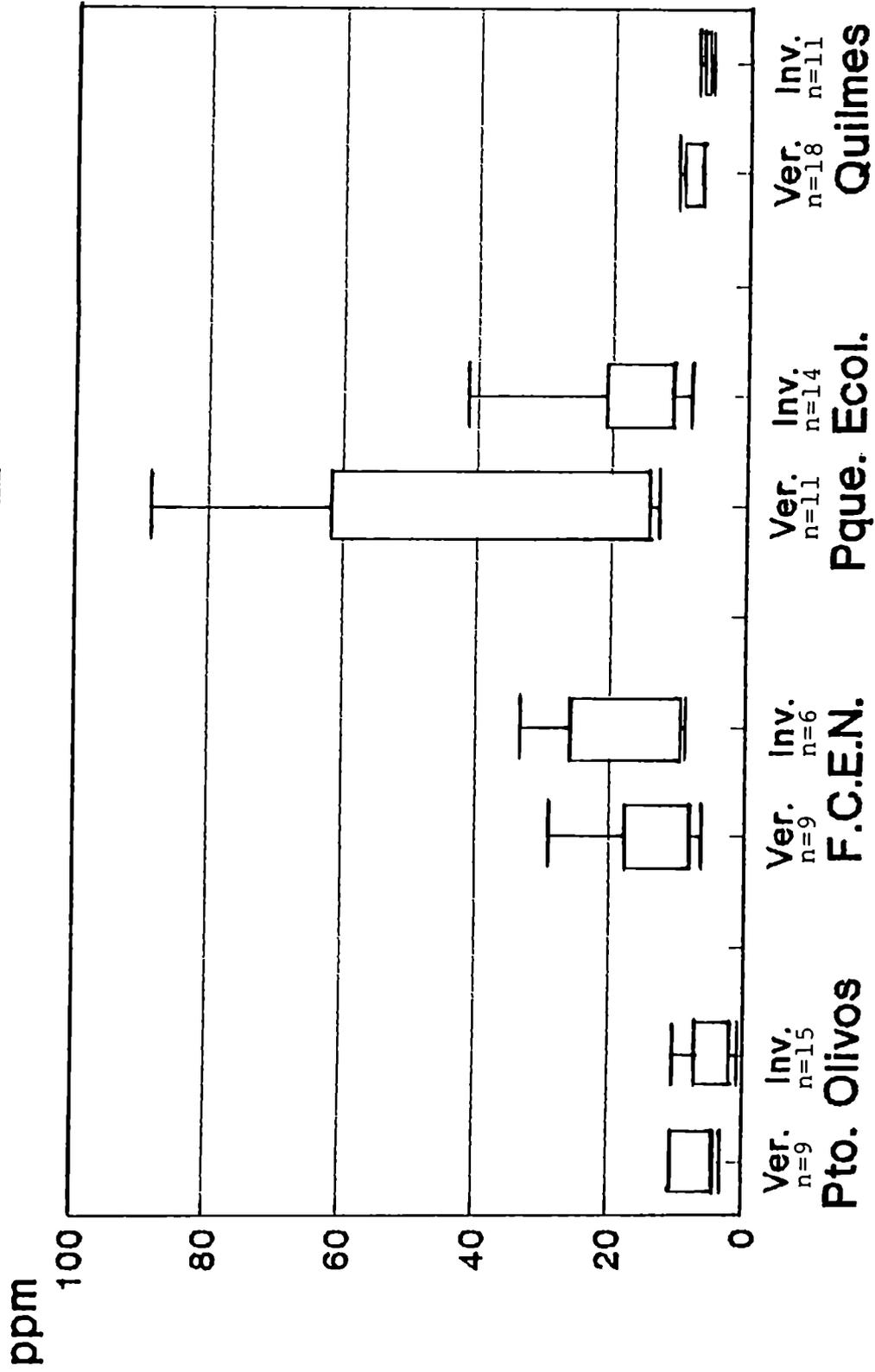


Fig.II.3.: NIVELES DE COBRE EN MUESTRAS DE SEDIMENTOS DE DISTINTAS ZONAS.

CROMO

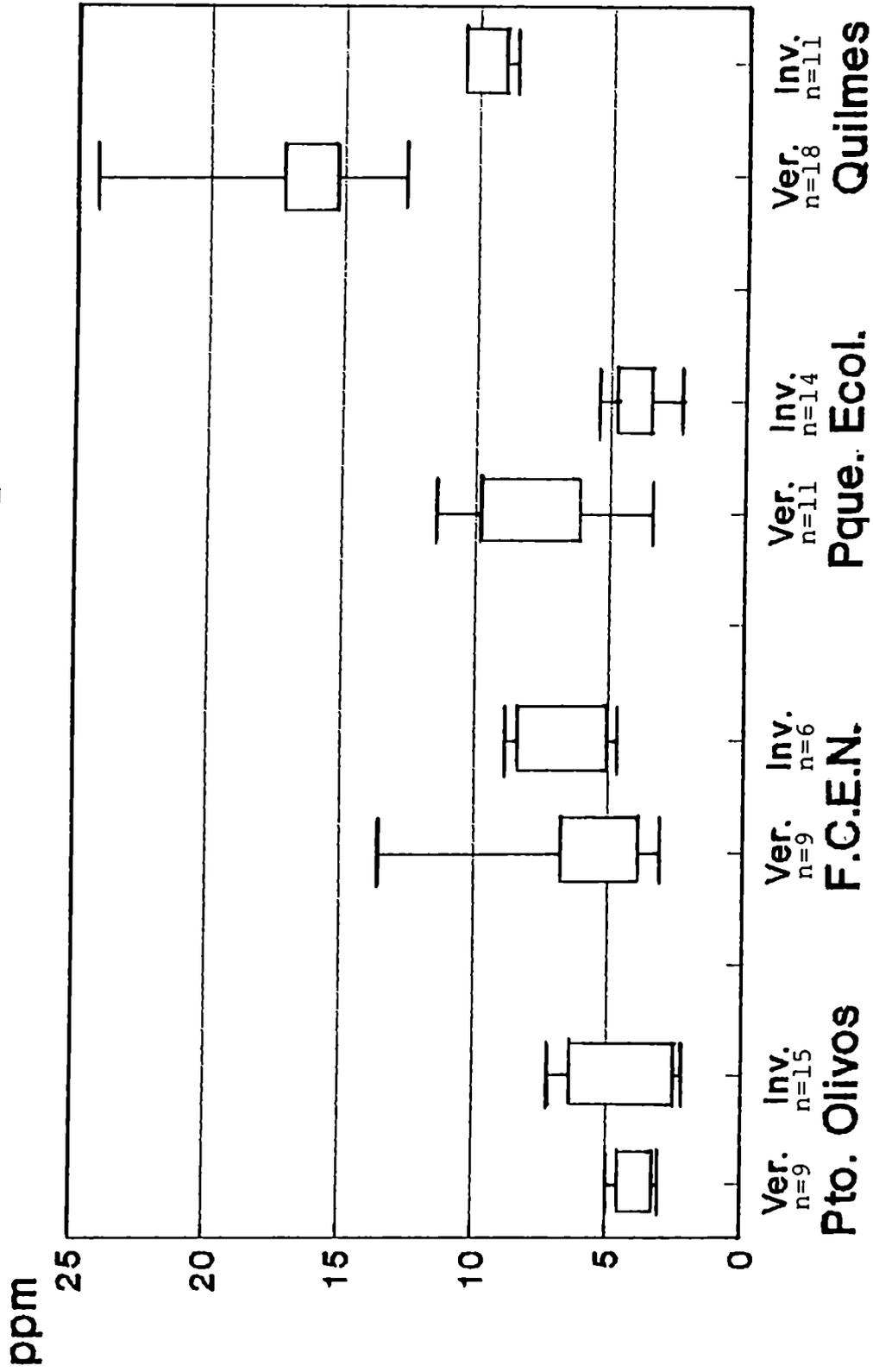


Fig. II.4.: NIVELES DE CROMO EN MUESTRAS DE SEDIMENTOS DE DISTINTAS ZONAS.

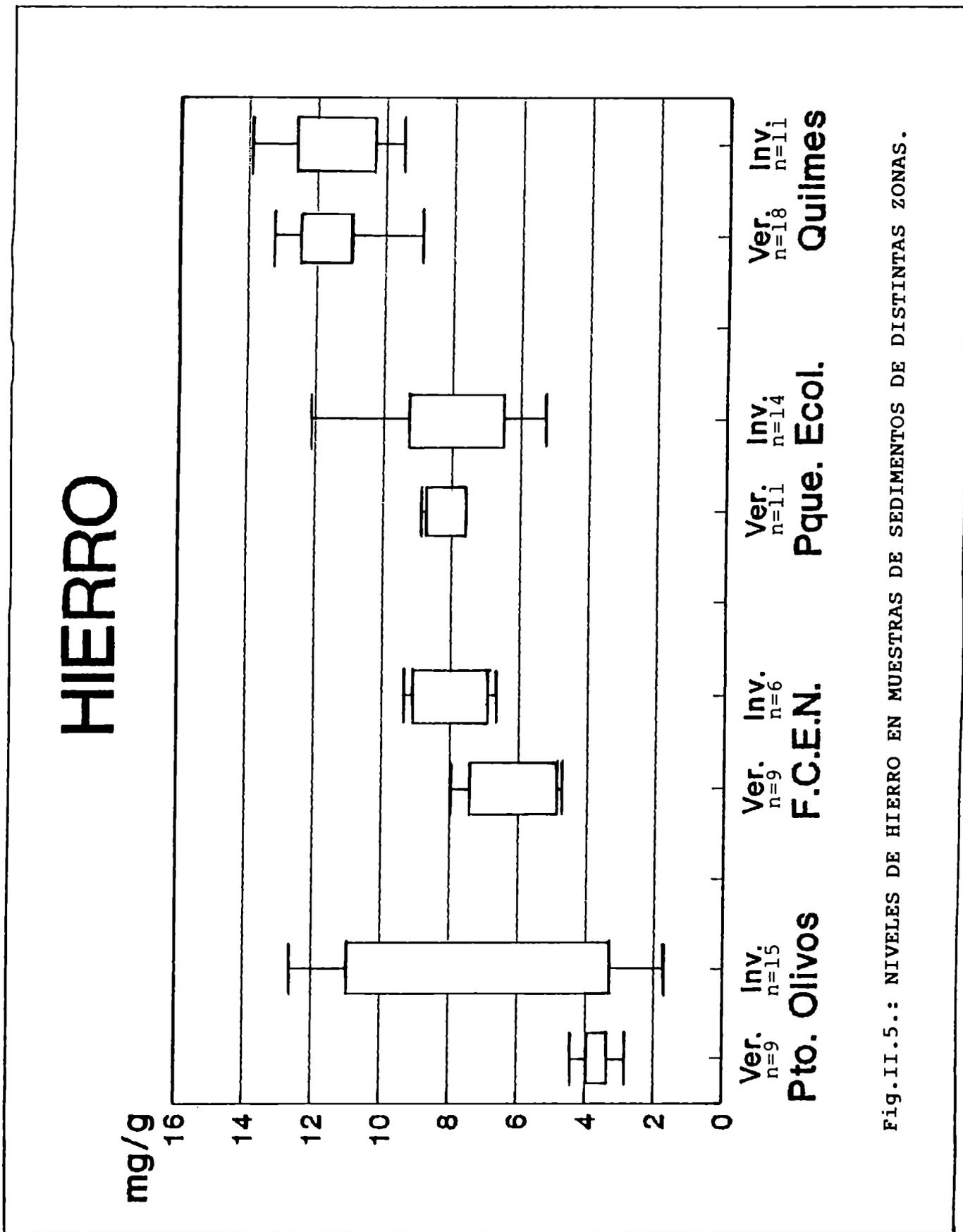


Fig.II.5.: NIVELES DE HIERRO EN MUESTRAS DE SEDIMENTOS DE DISTINTAS ZONAS.

NIQUEL

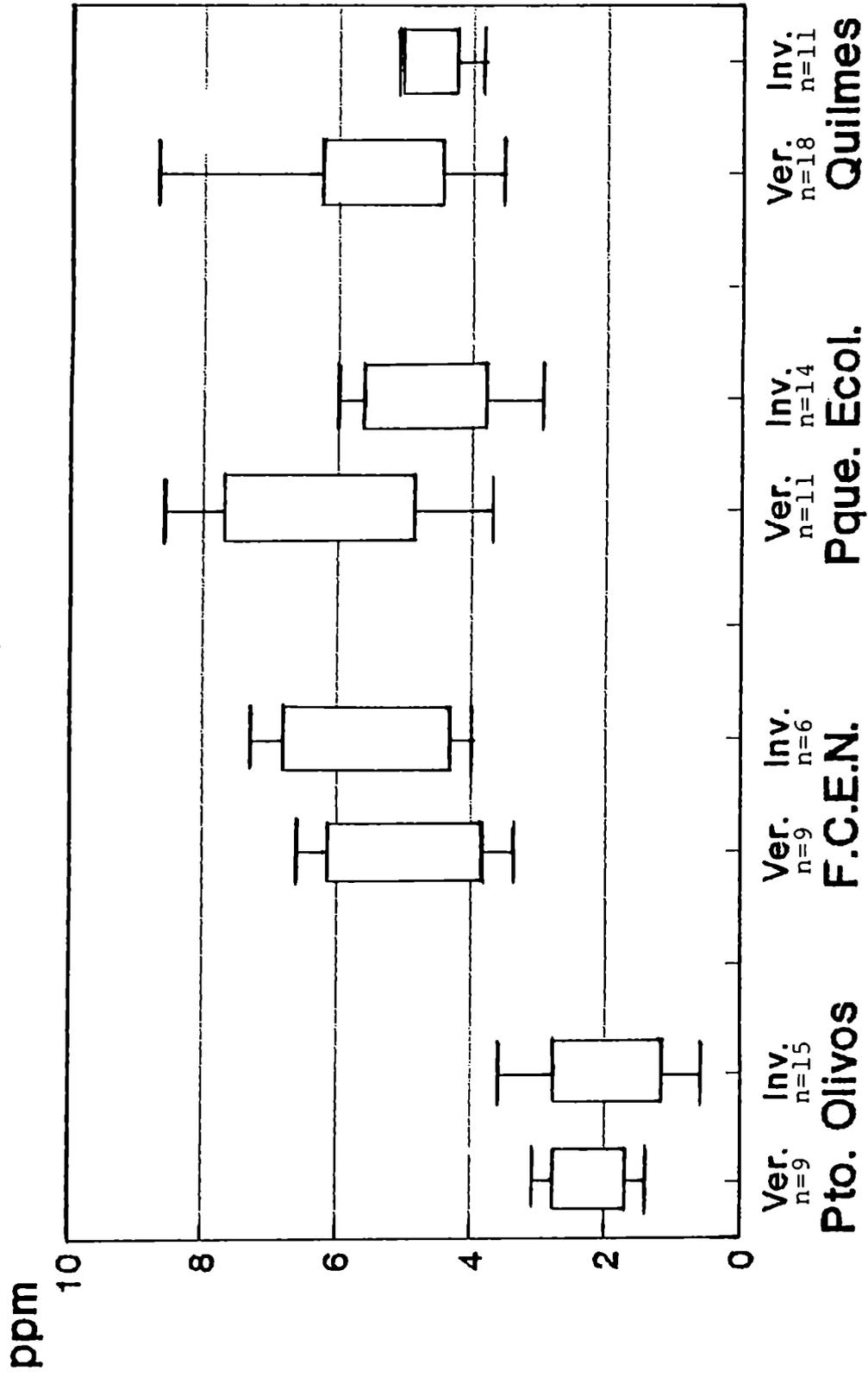


Fig.II.6.: NIVELES DE NIQUEL EN MUESTRAS DE SEDIMENTOS DE DISTINTAS ZONAS.

PLOMO

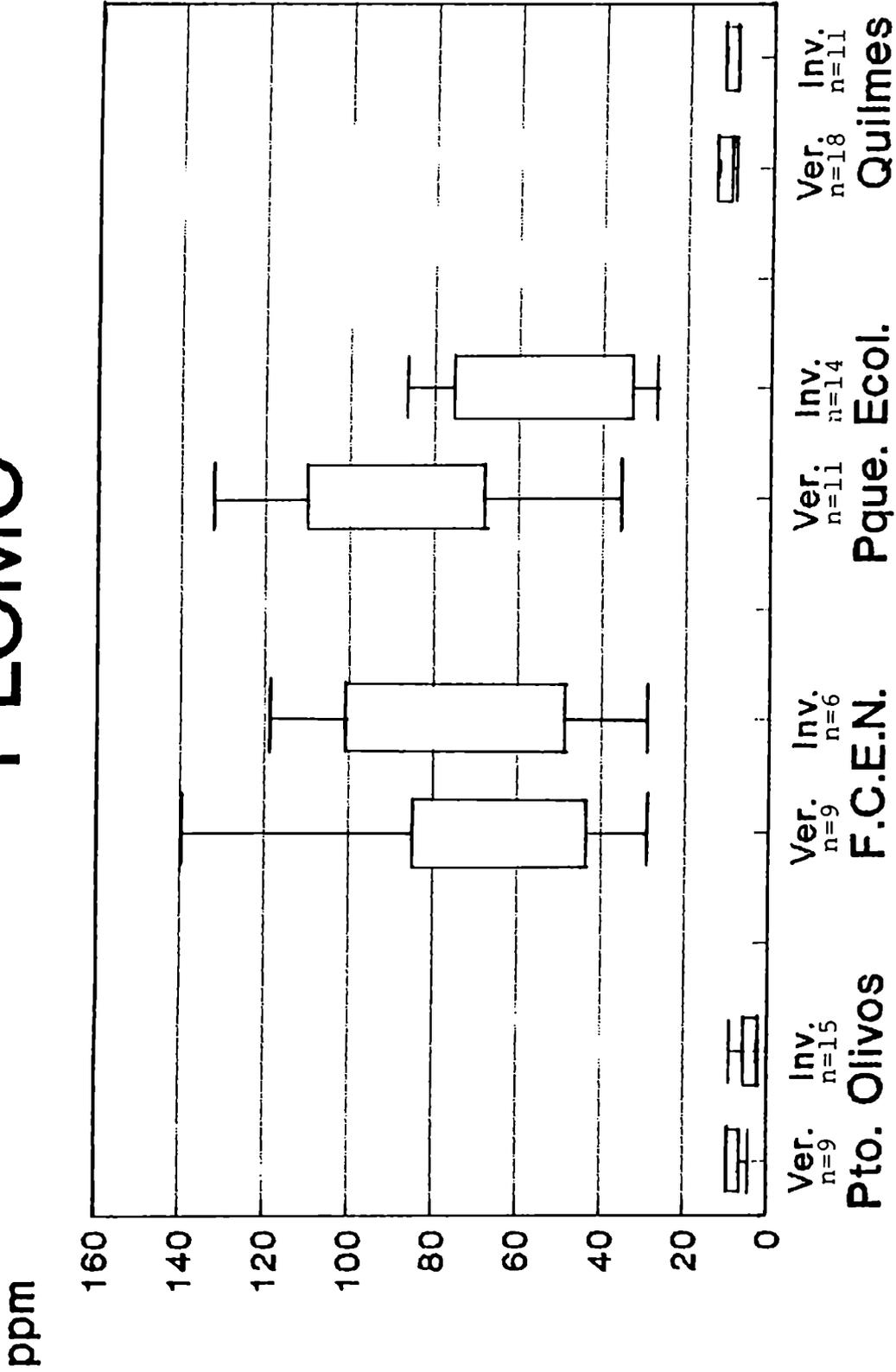


Fig.II.7.: NIVELES DE PLOMO EN MUESTRAS DE SEDIMENTOS DE DISTINTAS ZONAS.

ZINC

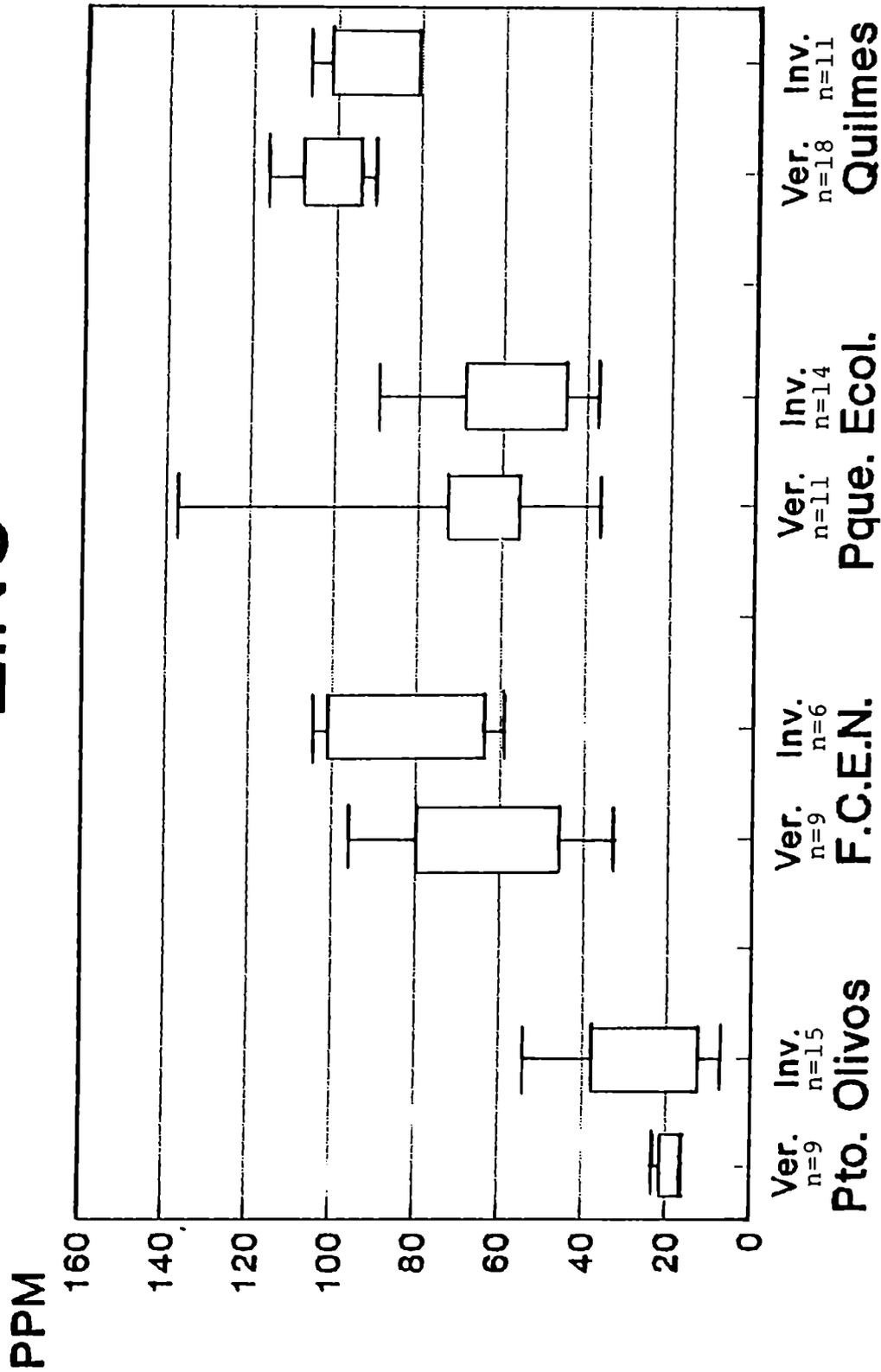


Fig.II.8.: NIVELES DE ZINC EN MUESTRAS DE SEDIMENTOS DE DISTINTAS ZONAS.

tribuciones pueden pertenecer o no a una misma población.

Durante la temporada verano'89, se observó que las concentraciones de todos los metales analizados eran marcadamente diferentes a través de las cuatro zonas de muestreo.

Con respecto al cadmio, únicamente fue detectado en las zonas de F.C.E.N. y Balneario de Quilmes, no existiendo diferencias en las distribuciones entre éstas.

Los niveles de cobalto, cromo, hierro y zinc, presentaron una tendencia creciente en sentido norte a sur. Para el hierro, las distribuciones en las cuatro zonas resultaron significativamente diferentes. En los casos del cobalto, cromo y zinc, en cambio, no se observaron diferencias apreciables entre las zonas ubicadas en Capital Federal.

Con respecto al cobre, los mayores niveles de concentración se registraron en las zonas de la Capital, resultando en Parque Ecológico más altos que a la altura de la F.C.E.N.. Las distribuciones en Puerto de Olivos y Balneario de Quilmes no mostraron diferencias significativas.

Los menores valores de níquel se observaron en la zona de Puerto de Olivos, no habiendo diferencias apreciables entre las otras tres zonas.

El plomo presentó los niveles más altos en las zonas de F.C.E.N. y Parque Ecológico, no encontrándose diferencias significativas entre ambas. Los niveles registrados en Puerto de Olivos, ligeramente menores a los de Quilmes, fueron, en conjunto, singularmente más bajos.

Durante la temporada de invierno'89 nuevamente se observó que las concentraciones de todos los metales diferían marcadamente a través de las cuatro zonas.

La única diferencia observada para el cadmio fue una disminución en los niveles en la zona de Quilmes. Éstos fueron menores en relación a los registrados durante el verano, en la misma zona, y con respecto a los de F.C.E.N., durante el invierno.

Para cobalto, se mantuvo la tendencia de concentraciones crecientes en sentido norte-sur, sin que se registraran diferencias significativas entre F.C.E.N. y Parque Ecológico. Dentro de cada zona, las diferencias por temporada no resultaron apreciables, aunque se observó mayor variabilidad.

Los niveles máximos de cobre se siguieron encontrando en las

dos zonas de Capital Federal, aunque en esta temporada no se observaron diferencias significativas entre ambas, debido a una disminución en los niveles en Parque Ecológico. Las distribuciones de los valores de concentración en Puerto de Olivos y Quilmes fueron comparables.

Los niveles de cromo en Parque Ecológico también disminuyeron en forma apreciable con respecto a los registrados durante el verano. En invierno, no presentaron diferencias significativas con los observados en Puerto de Olivos. También disminuyeron en la zona del Balneario de Quilmes, aunque continuaron siendo los niveles máximos con respecto a los otros muestreos.

En el caso del hierro, durante el invierno se verificó un incremento de concentración en las zonas de Puerto de Olivos y F.C.E.N.. El resultado fue que en esa temporada únicamente los niveles en Quilmes resultaron mayores que en las otras tres zonas, las cuales no presentaron diferencias significativas entre sí.

Para níquel, la situación entre las zonas permaneció básicamente igual a la del verano. No obstante, los niveles en Parque Ecológico y en Balneario de Quilmes descendieron ligeramente en la temporada de invierno.

Los máximos niveles de plomo continuaron registrándose en las dos zonas de Capital Federal, aunque se observó una disminución en Parque Ecológico, respecto a los valores del verano.

Para zinc, la tendencia creciente norte-sur se mantuvo, con la excepción del descenso registrado en la zona de Parque Ecológico. En F.C.E.N. y en Quilmes se encontraron diferencias leves, estadísticamente no significativas, en ambas temporadas de estudio.

En líneas generales, los resultados obtenidos en el presente trabajo, permiten concluir que las diferencias en los niveles de concentración de los diversos metales, entre las distintas zonas, resultaron más marcadas que las diferencias por cambio de temporada. Así, independientemente de las temporadas, en Puerto de Olivos no se detectó cadmio, a la vez que se encontraron los menores niveles de concentración para los elementos cobalto, cobre, cromo, níquel, plomo y zinc. En F.C.E.N. y Parque Ecológico se encontraron los niveles más altos de cobre y plomo. En el Balneario de Quilmes, se registraron los niveles más altos de cobalto, cromo, hierro y zinc. En cambio, las concentraciones de cobre y

plomo resultaron tan bajas como las observadas en Puerto de Olivos.

Resulta muy difícil poder interpretar estos resultados. Recordemos que todas estas zonas de estudio están sometidas a múltiples y variadas fuentes de contaminación, según hemos discutido en el punto I.3.4. del capítulo anterior. Sin embargo, se puede intentar arriesgar algunas hipótesis, ya que los niveles de concentración en muestras de sedimentos presentan un carácter "más conservativo", en relación a los observados en muestras de aguas. Esto surge como consecuencia de la menor variabilidad, ya sea por factores temporales o, incluso, ambientales, que presentan los contaminantes asociados a los sedimentos. A la vez, los niveles de ocurrencia son significativamente más altos, dado que los sedimentos constituyen, prácticamente, el subcompartimiento ambiental de mayor acumulación (Lietz y Galling, 1989; Förstner, 1990).

Ahora bien, teniendo en cuenta el sentido de la corriente del Río de la Plata, resultaría plausible, en principio, encontrar menores niveles de contaminación en la zona de Puerto de Olivos. Aguas abajo, en Balneario de Quilmes, se registrarían los niveles más altos. En esta zona, una serie de descargas directas aunadas con otras fuentes de emisión, procedentes de Capital Federal y parte de sus alrededores, contribuirían a incrementar los niveles de contaminación.

Esta hipótesis resulta bastante coherente con gran parte de nuestros resultados. En Puerto de Olivos, se registraron los menores niveles de concentración para casi todos los elementos en estudio, salvo el hierro durante el invierno '89. Pero aún así, esos niveles no fueron superiores a los que se observaron en las otras dos zonas de Capital Federal. Por otra parte, los máximos niveles de cobalto, cromo, hierro y zinc, así como valores detectables de cadmio, se encontraron en el Balneario de Quilmes.

Merece destacarse, que en el partido de Berazategui (unos pocos Km al sur de Quilmes) se verifica la mayor liberación de descargas cloacales, provenientes de la ciudad de Buenos Aires y parte de sus alrededores. Por acción de los vientos del sur y de las corrientes marinas, una parte de dichas descargas podría dispersarse aguas arriba. Por consiguiente, una cierta proporción de cobalto, hierro y zinc, podría provenir de la materia fecal y otros fluídos biológicos, los cuales suelen presentar altos nive-

les de dichos elementos, entre otros (Süss, 1978; Rosopulo et al., 1980; Lake et al., 1989).

Sin embargo, de ninguna manera se descarta la incidencia, simultánea, de efluentes de origen industrial. Éstos serían, muy probablemente, los principales responsables del incremento en los niveles de cromo.

Un poco más difícil, resulta explicar los elevados niveles de cobre y plomo que se encontraron en las zonas de F.C.E.N. y Parque Ecológico. En gran parte, por la continua descarga de residuos y procesos de relleno que allí se verifican. De todos modos, se podría arriesgar una hipótesis para el plomo.

Durante el año 1989, se comercializaban, en nuestro país, exclusivamente naftas conteniendo alquilos de plomo, como antidetonantes. Por consiguiente, teniendo en cuenta el alto tráfico automotor que se verifica en la ciudad de Buenos Aires, una gran proporción del metal podría provenir de deposiciones atmosféricas y desagües urbanos, que terminarían alcanzando esas zonas costeras del sistema acuático, asociándose con los sedimentos. De hecho, otros autores han documentado mayores niveles de plomo en sedimentos, como consecuencia del empleo de ese tipo de naftas (Morgan y Bretthauer, 1977; Lai, 1988).

II.3.2.1. FACTORES DE CONCENTRACIÓN

Cuando se calculan los factores de concentración mediante la relación entre los valores de concentración promedios de elementos metálicos en sedimentos y en la fase acuosa, según la fórmula:

$$\text{factor de concentración: FC} = \frac{|\bar{x}| \text{ sedimentos}}{|\bar{x}| \text{ aguas}}$$

se obtienen los resultados que se presentan en la Tabla II.2.:

Tabla II.2.: Factores de concentración.

	Pto.Olivos	F.C.E.N.	Pque.Ecol.	Quilmes
Cadmio				
Ver.		>1.000		>700
Inv.		>1.100		>550
Cobalto				
Ver.	>900	>1.500	>1.350	>2.200
Inv.	>950	>1.700	>1.600	>2.350
Níquel				
Ver.	>4.600	544	>12.400	6.111
Inv.	800	1.486	2.938	1.533
Plomo				
Ver.	676	10.072	6.110	1.719
Inv.	586	4.049	4.487	529
Hierro				
Ver.	10.286	9.844	8.438	20.526
Inv.	13.171	6.119	8.370	8.923

Esa relación suele ser también conocida como "coeficiente de

distribución", por cuanto permite estimar la proporción de elementos asociados a los sedimentos en relación a los presentes en la fase acuosa (Malm et al., 1989).

En todos los casos, los valores de dichos factores resultan muy superiores a 1. Por consiguiente, queda así demostrado el importante rol que desempeñan los sedimentos del lecho como principales depósitos de acumulación de estos elementos, dentro del marco físico del ambiente acuático.

En base a esos resultados se puede apreciar, en primer lugar, que frente a cada metal se encuentra una cierta variabilidad en los factores de concentración, a través de las distintas zonas de muestreo y durante las dos temporadas de estudio. Dicha variabilidad es debida, fundamentalmente, a las variaciones en los niveles de metales en la fase acuosa, según ya ha sido discutido en el Cap. I.3.4.

Para cadmio, cobalto y en algunos casos níquel, sólo se puede estimar un factor de concentración mínimo, por cuanto esos elementos no fueron detectados en la fase acuosa (Tabla I.5.)

En general, los valores más altos se encuentran para el hierro. Estos resultados pueden atribuirse a que este elemento forma parte constitutiva de las partículas de sedimentos. Otros autores han encontrado también los valores más elevados para dicho metal (Bordalo Costa y Peneda, 1989; Malm et al., 1989).

Según la bibliografía, los valores medios recomendados para áreas costeras no deberían exceder de 5×10^4 para hierro, 1×10^5 para níquel y 2×10^5 para plomo (IAEA, 1985). Nuestros valores, son considerablemente menores, entre 1 y 2 órdenes de magnitud más bajos. Sin embargo, hay que tener en cuenta que los primeros, al igual que los reportados por otros autores, están determinados en base a los niveles de concentración de metales en la fase acuosa soluble. Nuestras determinaciones se realizaron en la fracción recuperable, considerablemente más enriquecida en contaminantes. Por consiguiente, las comparaciones directas no resultan válidas, a la vez que era esperable obtener valores menores en nuestro estudio.

II.3.2.2. COMPARACIÓN CON REPORTES BIBLIOGRÁFICOS

Ya hemos mencionado que las comparaciones con datos reportados en la literatura provenientes de diferentes sistemas acuáticos, pueden tener únicamente un valor orientativo, por diversas razones.

En primer lugar, una cierta proporción de elementos metálicos estará naturalmente asociada o formando parte de la matriz de las partículas de sedimentos, la cual todavía no es posible diferenciar de la fracción debida a la contaminación por actividades antropogénicas. Además, dicha proporción puede ser altamente variable, según las características geológicas de la cuenca (Bradford y Horowitz, 1988).

Por otra parte, los distintos autores que citaremos suelen realizar el proceso de filtración a través de tamices de distintos tamaño de poro, a la vez que emplean diferentes ácidos o mezclas, para efectuar el tratamiento de digestión. En algunos casos, ni siquiera se documenta estrictamente toda la metodología, mientras que en otros, no es posible acceder a ella.

Entre todos los reportes consultados, tratamos de elegir aquellos que a nuestro criterio, fueran más relevantes, para intentar efectuar algunas comparaciones, a fin de poder establecer cuales serían los elementos metálicos mayoritarios en sedimentos de las zonas costeras del Río de la Plata que hemos analizado. Finalmente diremos que limitamos las referencias a muestras de sedimentos superficiales de sistemas de agua dulce.

En la Tabla II.3. se presentan los rangos y valores medios de concentración de elementos metálicos durante las dos temporadas de estudio, en muestras de sedimentos del Río de la Plata. Por su parte, en la Tabla II.4. se muestran datos correspondientes a los niveles de dichos contaminantes en sedimentos provenientes de distintos sistemas acuáticos.

El trabajo de Friant (1979), sobre muestras del río Kennebec, Nueva Inglaterra - USA, corresponde a una zona relativamente no industrializada, durante la época del estudio.

El trabajo de Marcus et al. (1988) fue realizado en la costa sur de Carolina, USA, sobre un estuario relativamente prístino y las muestras fueron tomadas en tres parques recreativos.

Al río Pisuerga (Pardo et al., 1990), que fluye a través de

Tabla II.3.: Rangos y valores medios de concentración de elementos metálicos en sedimentos del Río de La Plata durante verano e invierno '89.

	Cadmio ug.g ⁻¹	Cobalto ug.g ⁻¹	Cobre ug.g ⁻¹	Cromo ug.g ⁻¹	Hierro mg.g ⁻¹	Níquel ug.g ⁻¹	Plomo ug.g ⁻¹	Zinc ug.g ⁻¹
Pto.Olivos	<0,01	0,7-2,8 1,8	0,8-10,3 5,1	2,2- 7,2 4,2	1,7-11,4 4,8	0,6-3,6 2,1	2,0- 9,4 5,2	7,3-54,2 23,2
F.C.E.N.	0,08-0,30 0,21	1,0-4,5 3,1	6,5-33,3 15,0	3,1-13,6 6,1	4,7- 9,4 7,1	3,4-7,3 5,2	29,1-139,9 71,1	33,0-104,4 71,9
Pque.Ecol.	<0,01	1,4-5,4 3,0	8,4-88,6 20,4	2,3-11,5 5,8	5,3-12,1 7,8	3,0-8,6 5,4	27,0-132,5 70,3	36,5-137,2 62,0
Quilmes	0,06-0,25 0,13	3,1-6,1 4,5	5,5-10,6 7,7	8,6-24,2 14,3	8,9-13,9 11,7	3,5-8,7 5,2	8,5-13,3 10,6	0,7-116,4 97,7
rangos de las 4 zonas	<0,01-0,30	0,7-6,1	0,8-88,6	2,2-24,2	1,7-13,9	0,6-8,7	2,0-132,5	7,3-137,2

Tabla II.4.: Niveles de elementos metálicos en sedimentos de distintos sistemas acuáticos.

	Cadmio ug.g ⁻¹	Cobalto ug.g ⁻¹	Cobre ug.g ⁻¹	Cromo ug.g ⁻¹	Hierro mg.g ⁻¹	Níquel ug.g ⁻¹	Plomo ug.g ⁻¹	Zinc ug.g ⁻¹
Friant, 1979			3,6-10,6	<0,02-0,88			<0,02-1,38	4-24
Marcus et al.,1988	<1,0		5 -11	5 - 35		5-31	5 -46	6-50
Río Pisuerga (Pardo et al.,1990)	1,05	11,41	66,53			46,51	15,77	245,49
Sakai et al.,1986	0,20		22	32			24	152
Río Shatt al-Arab (a)	0,2	17,3	33,9	107,2	6,80	655	16,1	25,7
(b)	0,03	17,4	39,6	48,1	6,21	57,2	19,0	25,8
Bordalo Costa y Peneda (1989)	-		75	44	37	34	78	351
Río Rin modera. cont.	0,4		86	121	- -	152	155	520
Río Rin alta/ cont. (Malm et al.,1989)	28		376	397	37	167	333	1096
Río Nilo Cairo	0,15		76	182		92	32	186
Río Nilo Cairo (Nriagu, 1992)	2,7		974	1500		66	163	1520

(a) Abaychi y Dou-Abul, 1985; (b) Abaychi y Al-Saad, 1988.

Valladolid, España, se descargan efluentes industriales y municipales; mientras que al río Toyohira, Japón, (Sakai et al., 1986), además se suman descargas mineras. Ambos son ríos interiores.

El río Shatt al-Arab, en cambio, desagua en el golfo de Arabia. Se considera que fundamentalmente está afectado por descargas industriales y agrícolas. En este caso, se documentan valores de muestreos realizados en distintos años. A partir de ellos, se puede observar que los valores para cadmio, cromo y níquel, reportados en el año 1988, son menores. Según los autores, Abaychi y Al-Saad (1988), esa disminución puede ser atribuída a la menor actividad industrial y naviera, registrada durante el lapso entre ambos muestreos.

El trabajo de Bordalo Costa y Peneda (1989) corresponde a muestras recolectadas del estuario de Sado, Portugal, el cual recibe descargas industriales y domésticas.

Finalmente, se dan valores correspondientes al río Rin y al río Nilo, aguas arriba y aguas abajo de la ciudad de El Cairo, como ejemplos de sistemas que han sido o están considerados como severamente contaminados (Malm et al., 1989; Nriagu, 1992).

En general, los niveles de cadmio en sedimentos del Río de la Plata se encontraron por debajo de aquellos provenientes de sistemas considerados como severamente contaminados, ríos Rin y Nilo, aguas abajo de El Cairo. Sin embargo, los niveles registrados en F.C.E.N. y Balneario de Quilmes fueron similares a los que se observaron en los ríos Toyohira y Shatt al-Arab, según el reporte de 1985; a la vez que resultaron sólo ligeramente menores a los del río Rin moderadamente contaminado.

Pocos autores documentan valores de cobalto, pero según los reportes disponibles, los niveles en sedimentos del Río de la Plata fueron aproximadamente un orden de magnitud menores.

En cuanto al cobre, los datos en el Río de la Plata presentaron una alta variabilidad, según las zonas. Así, los niveles más bajos, que se observaron en Puerto de Olivos y en Quilmes, fueron comparables a los valores de los sistemas menos contaminados (datos de Friant, 1979, y de Marcus et al., 1988). En cambio, en las zonas de F.C.E.N. y especialmente Parque Ecológico se alcanzaron valores más altos, comparables, en promedio, a los datos de Sakai et al., 1986.

En conjunto, los niveles de cromo únicamente fueron superiores

a los reportados por Friant (1979), y ligeramente menores a los de Marcus et al. (1988), estando muy por debajo de los sistemas más contaminados.

Frente al hierro, también, se disponen de pocos datos para comparar. Nuestros resultados fueron del orden de los valores del río Shatt al-Arab, menores al promedio del río Rin severamente contaminado.

Los niveles de níquel resultaron, en líneas generales, considerablemente menores a todos los datos de literatura, especialmente en relación a los sistemas mediana- o severamente contaminados.

Los niveles de plomo en el Río de la Plata también presentaron alta variabilidad. Así, los valores en Puerto de Olivos y Balneario de Quilmes fueron comparables, o incluso menores, a los de los sistemas menos contaminados. En cambio, en las zonas de Capital Federal se encontraron niveles promedios más altos, similares a los reportados por Bordalo Costa y Peneda (1989), aunque aproximadamente la mitad en relación al río Rin moderadamente contaminado y al Nilo, aguas abajo de El Cairo.

Los niveles de zinc en Puerto de Olivos resultaron muy similares a los del río Shatt al-Arab. Los aumentos observados en las otras zonas de muestreo del Río de la Plata no llegaron nunca a superar los reportes de literatura para sistemas con cierto grado de contaminación.

Por consiguiente, en líneas generales y dentro de ciertos límites, podemos concluir que los niveles de los elementos cobalto y níquel, en muestras del Río de la Plata, han resultado bastante bajos, en relación a los registrados en otros sistemas acuáticos. Los niveles de cobre, cromo, hierro y zinc, fueron comparables a aquellos observados en sistemas con descargas industriales, domésticas y/o agrícolas. En cambio, los valores de cadmio y plomo que se alcanzaron en algunas zonas del Río de la Plata, fueron más cercanos a los registrados en sistemas moderadamente contaminados.

II.3.3. ESTUDIOS COMPLEMENTARIOS

Para estudiar la posible evolución temporal de las concentraciones de elementos metálicos en muestras de sedimentos, decidimos efectuar diversas determinaciones en sucesivas temporadas. Para este estudio se seleccionaron muestras recolectadas en Puerto de Olivos y Balneario de Quilmen, las cuales, como ya ha sido discutido, permiten evaluar en forma más precisa la situación del sistema acuático del Río de la Plata.

En la zona de Puerto de Olivos se realizaron varios muestreos, analizando muestras recolectadas durante primavera'88 (Prim.'88), verano'89 (Ver.'89), invierno'89 (Inv.'89), verano'90 (Ver.'90), invierno'90 (Inv.'90) y primavera'90 (Prim.'90). Los resultados obtenidos para los elementos cadmio, cobalto, cobre, cromo, hierro, níquel, plomo y zinc, se muestran en las Figuras II.9 a II.16, respectivamente; empleando, otra vez, diagramas de bloques.

En general, los datos presentaron una alta variabilidad, así como también marcadas diferencias a través de los distintos muestreos.

El cadmio fue detectado únicamente en primavera'88.

En verano'90 se obtuvieron los niveles más altos de concentración para los elementos cobalto, cobre, cromo, hierro, níquel y plomo; los cuales, en todos los casos, resultaron significativamente diferentes con el resto de las temporadas.

Para zinc, los niveles máximos se verifican igualmente en verano'90, pero éstos no presentaron diferencias significativas con los obtenidos en primavera'88.

Salvo en el caso del cadmio, para el resto de los elementos se observó una tendencia decreciente al pasar de la primavera'88 hacia el invierno'89, donde se registraron valores menores, para luego alcanzar los niveles más altos durante el verano'90. En invierno'90 volvieron a declinar, mostrando, otra vez, una tendencia creciente en primavera'90.

CADMIO

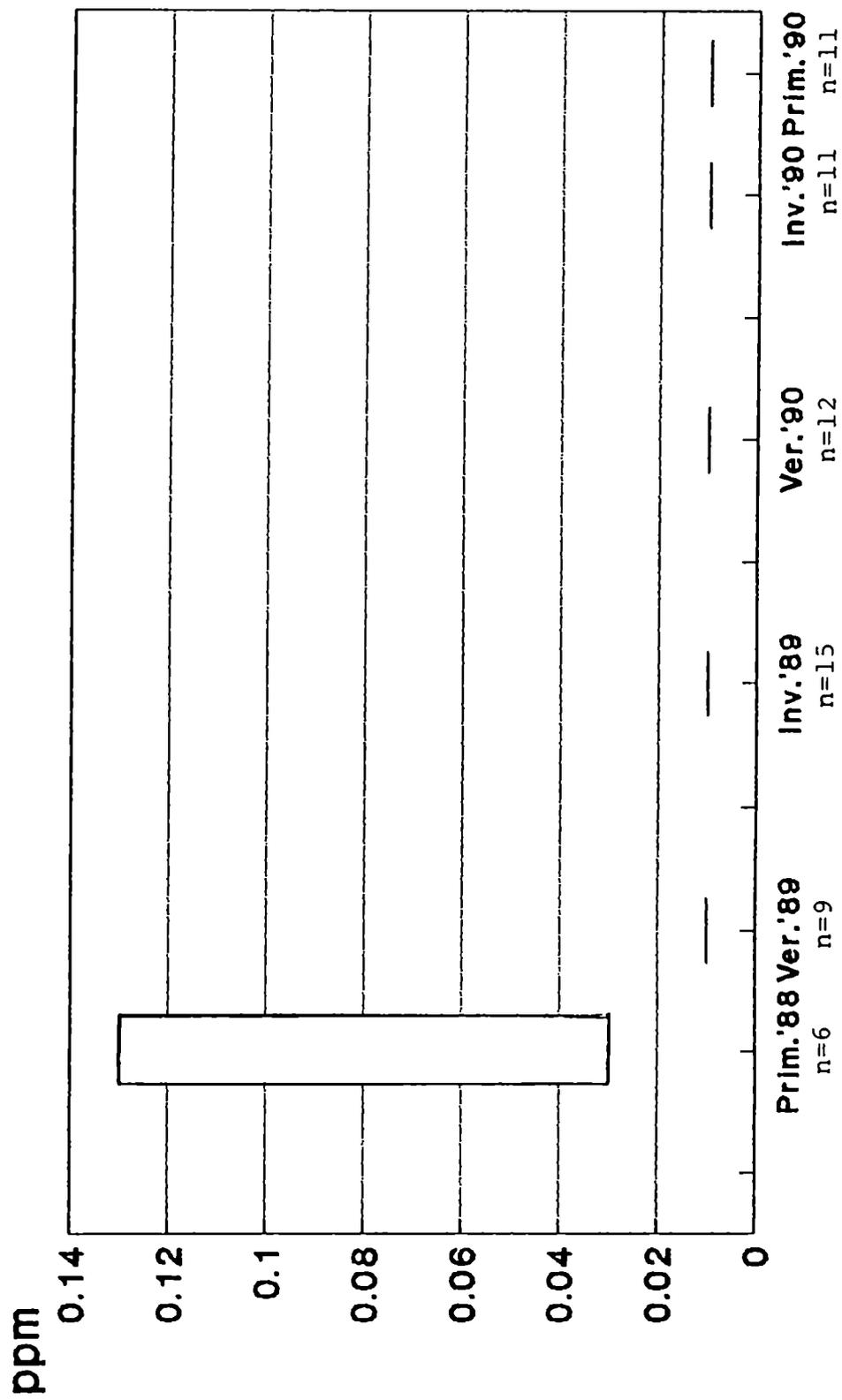


Fig.II.9.: NIVELES DE CADMIO EN SEDIMENTOS DEL PUERTO DE ÓLIVOS A TRAVÉS DEL TIEMPO.

COBALTO

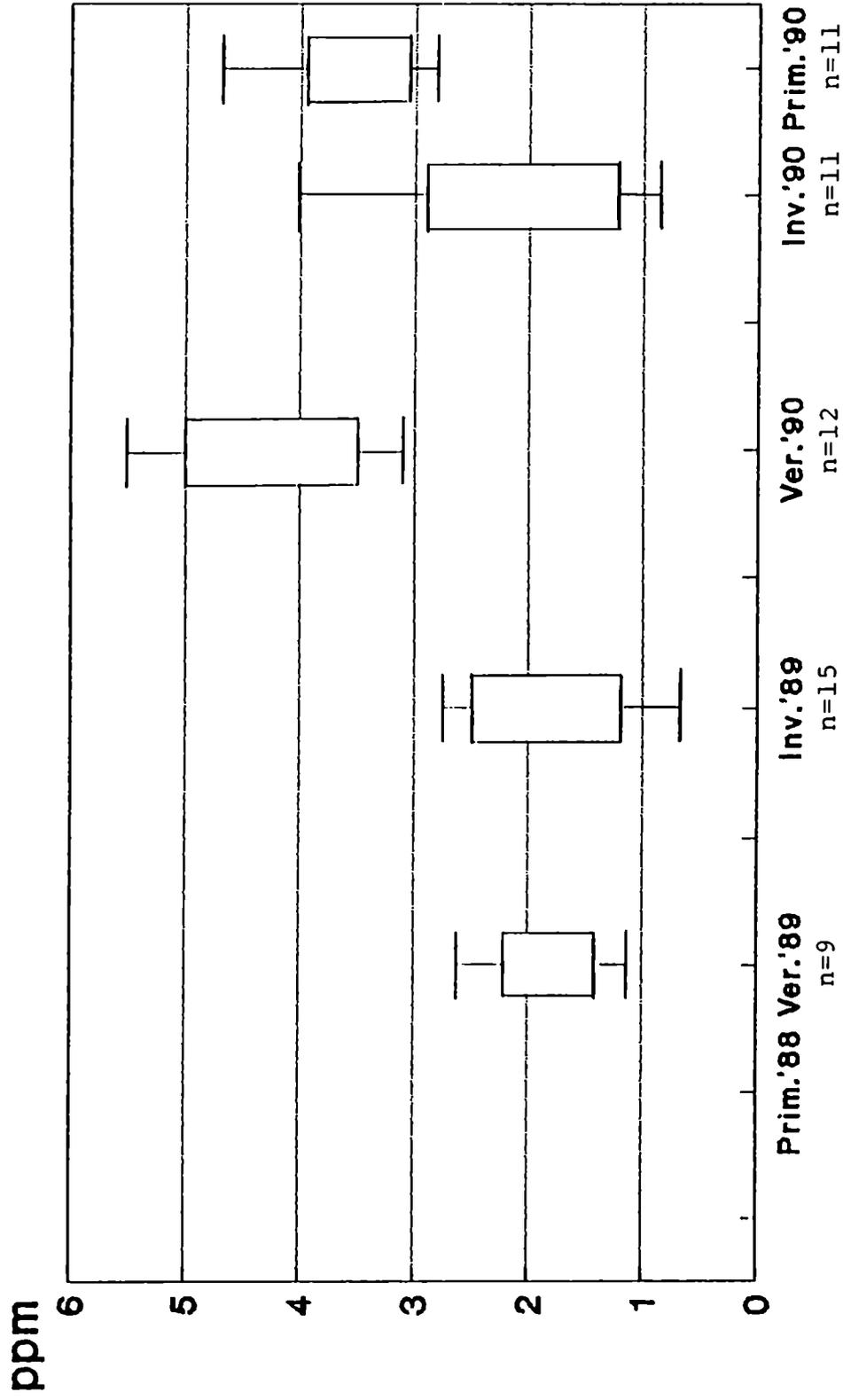


Fig.II.10.: NIVELES DE COBALTO EN SEDIMENTOS DEL PUERTO DE OLIVOS A TRAVES DEL TIEMPO.

COBRE

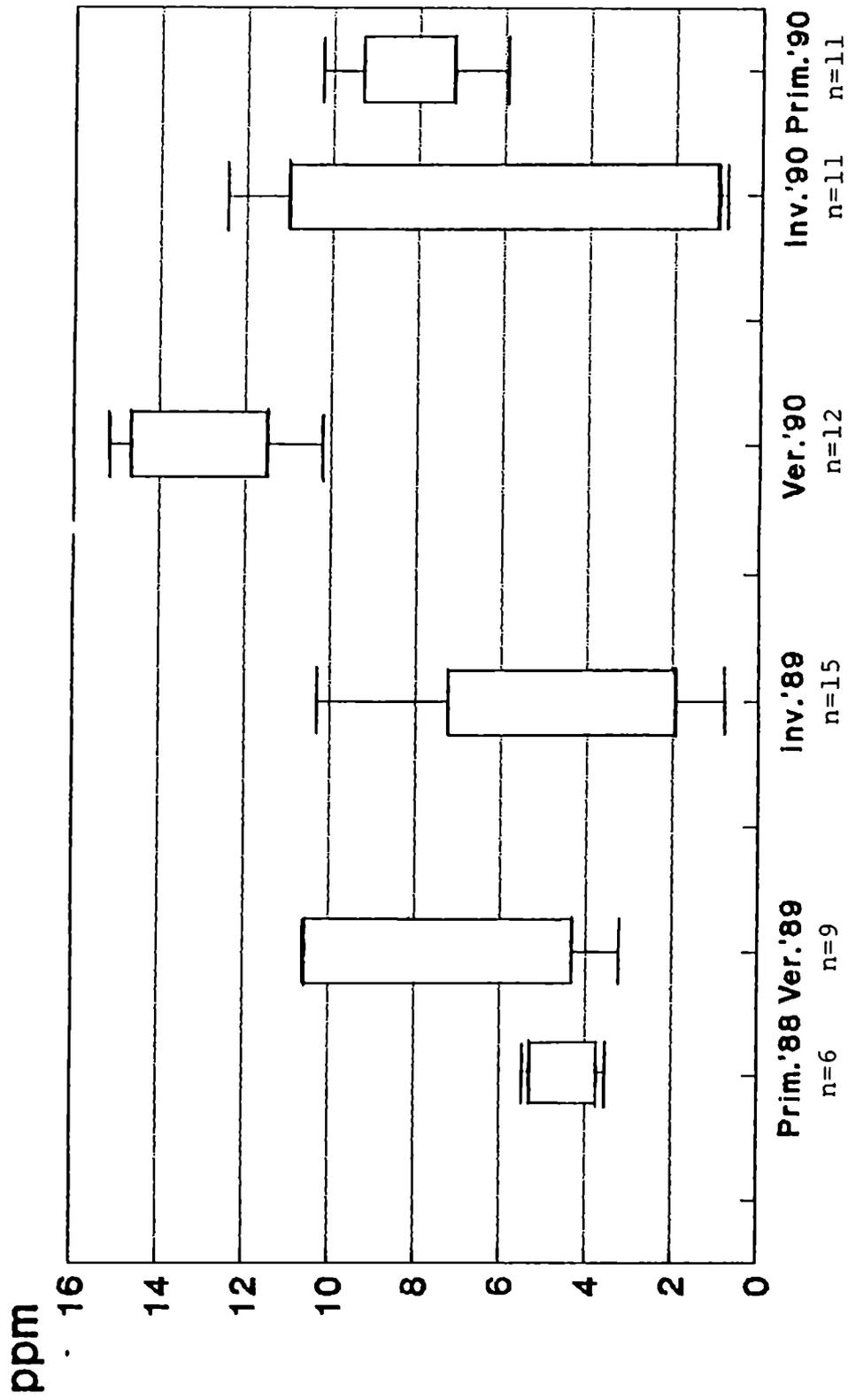


Fig.II.11.: NIVELES DE COBRE EN SEDIMENTOS DEL PUERTO DE OLIVOS A TRAVES DEL TIEMPO.

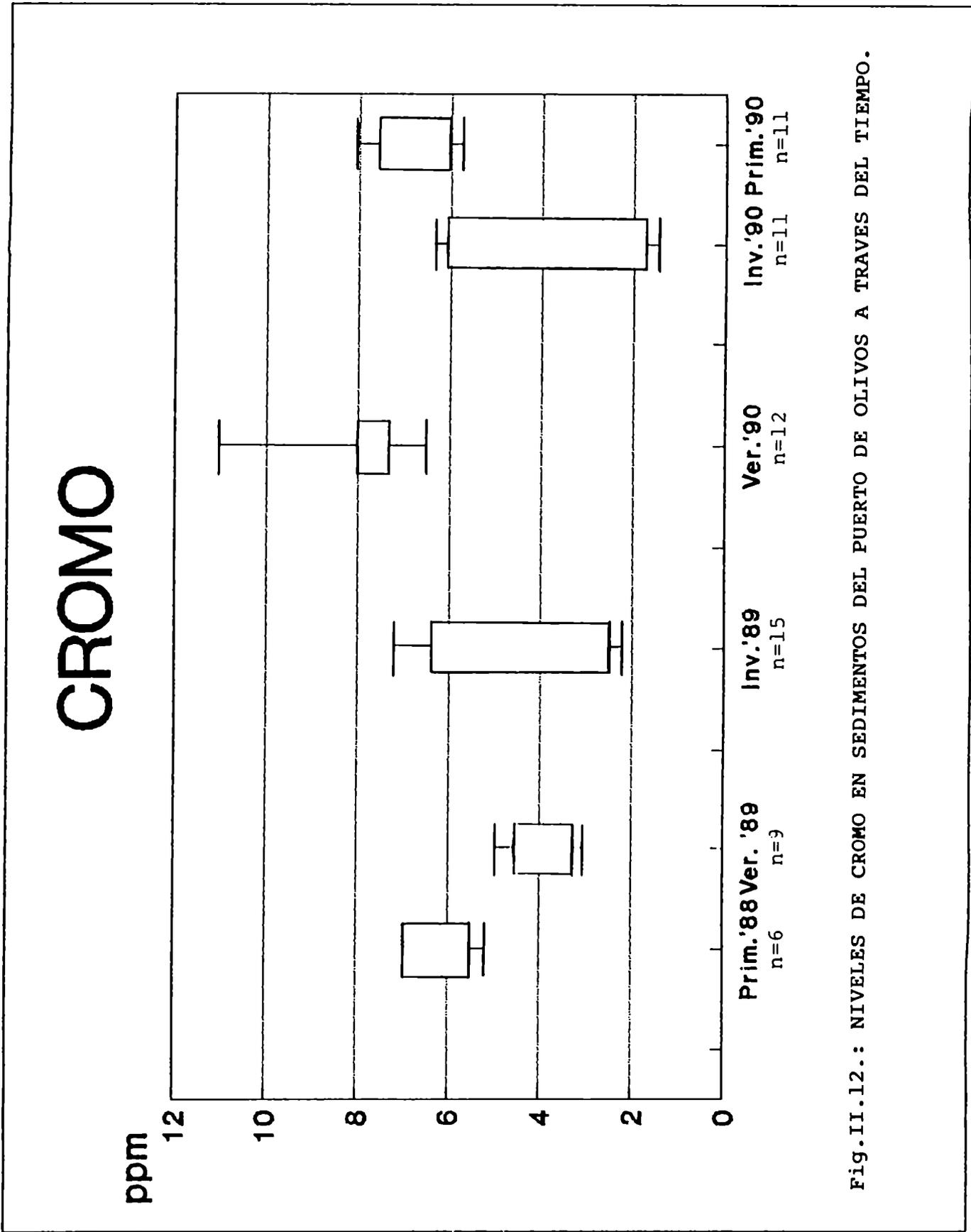


Fig.II.12.: NIVELES DE CROMO EN SEDIMENTOS DEL PUERTO DE OLIVOS A TRAVES DEL TIEMPO.

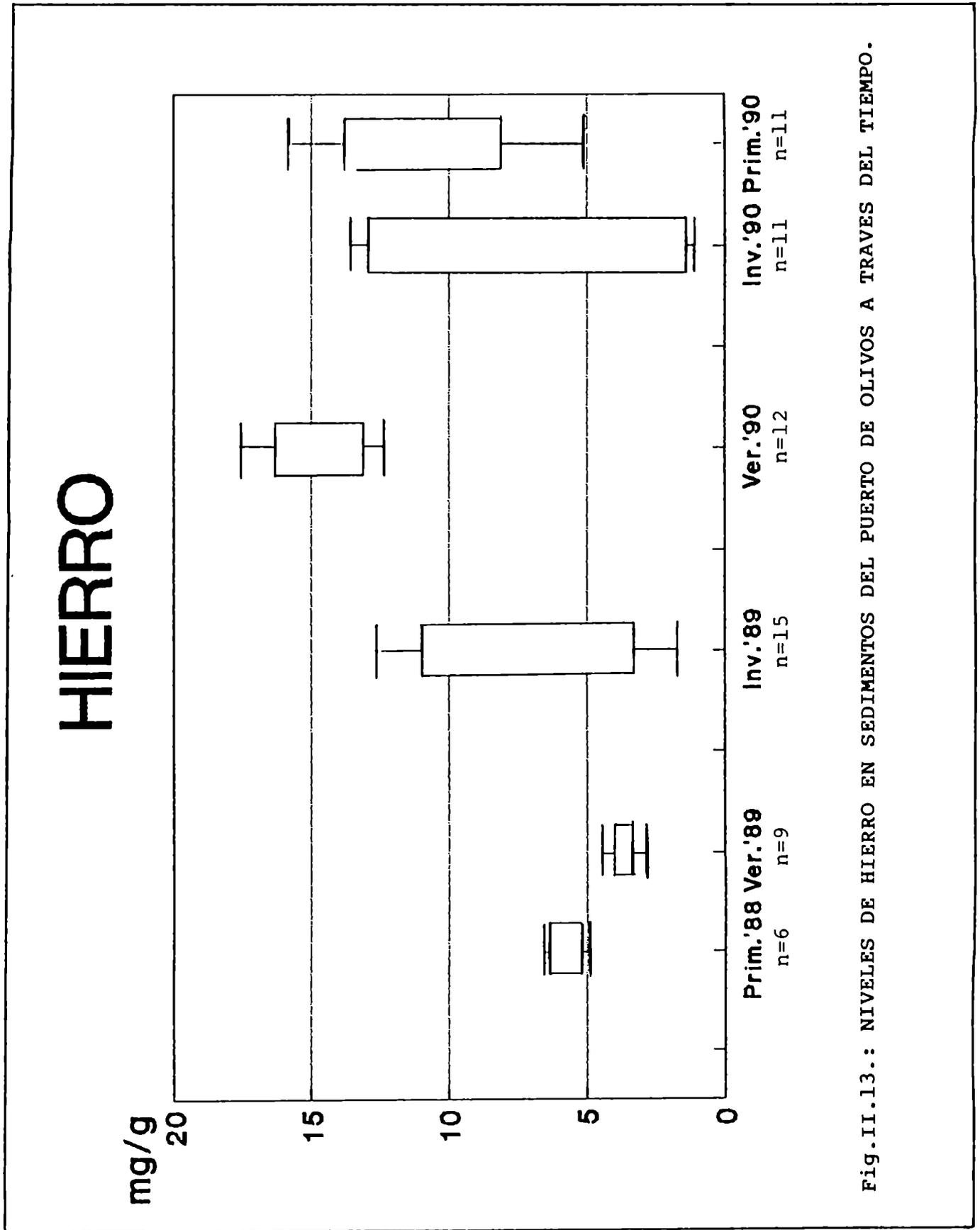


Fig.II.13.: NIVELES DE HIERRO EN SEDIMENTOS DEL PUERTO DE OLIVOS A TRAVES DEL TIEMPO.

NIQUEL

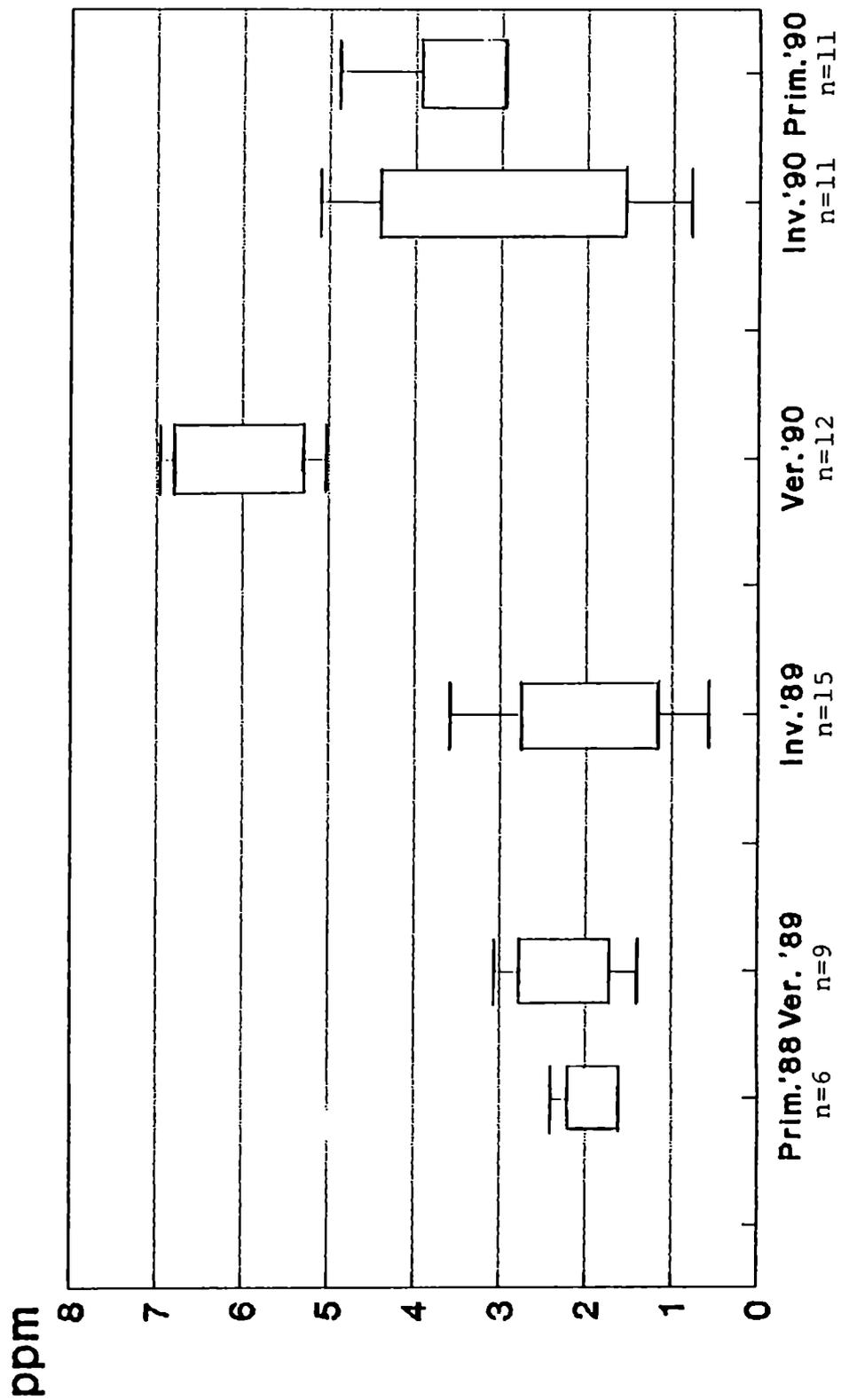


Fig.II.14.: NIVELES DE NIQUEL EN SEDIMENTOS DEL PUERTO DE OLIVOS A TRAVES DEL TIEMPO.

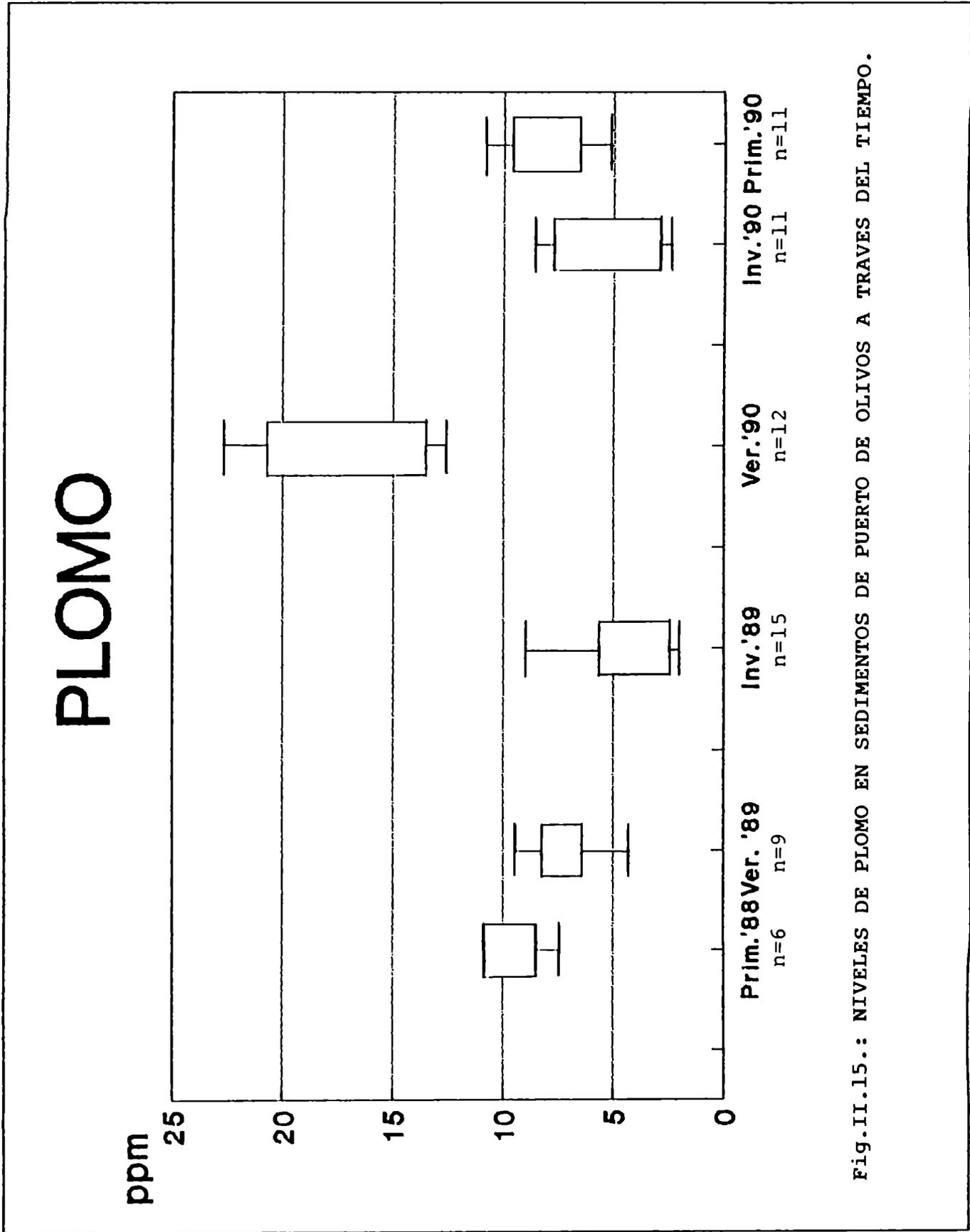


Fig.II.15.: NIVELES DE PLOMO EN SEDIMENTOS DE PUERTO DE OLIVOS A TRAVES DEL TIEMPO.

ZINC

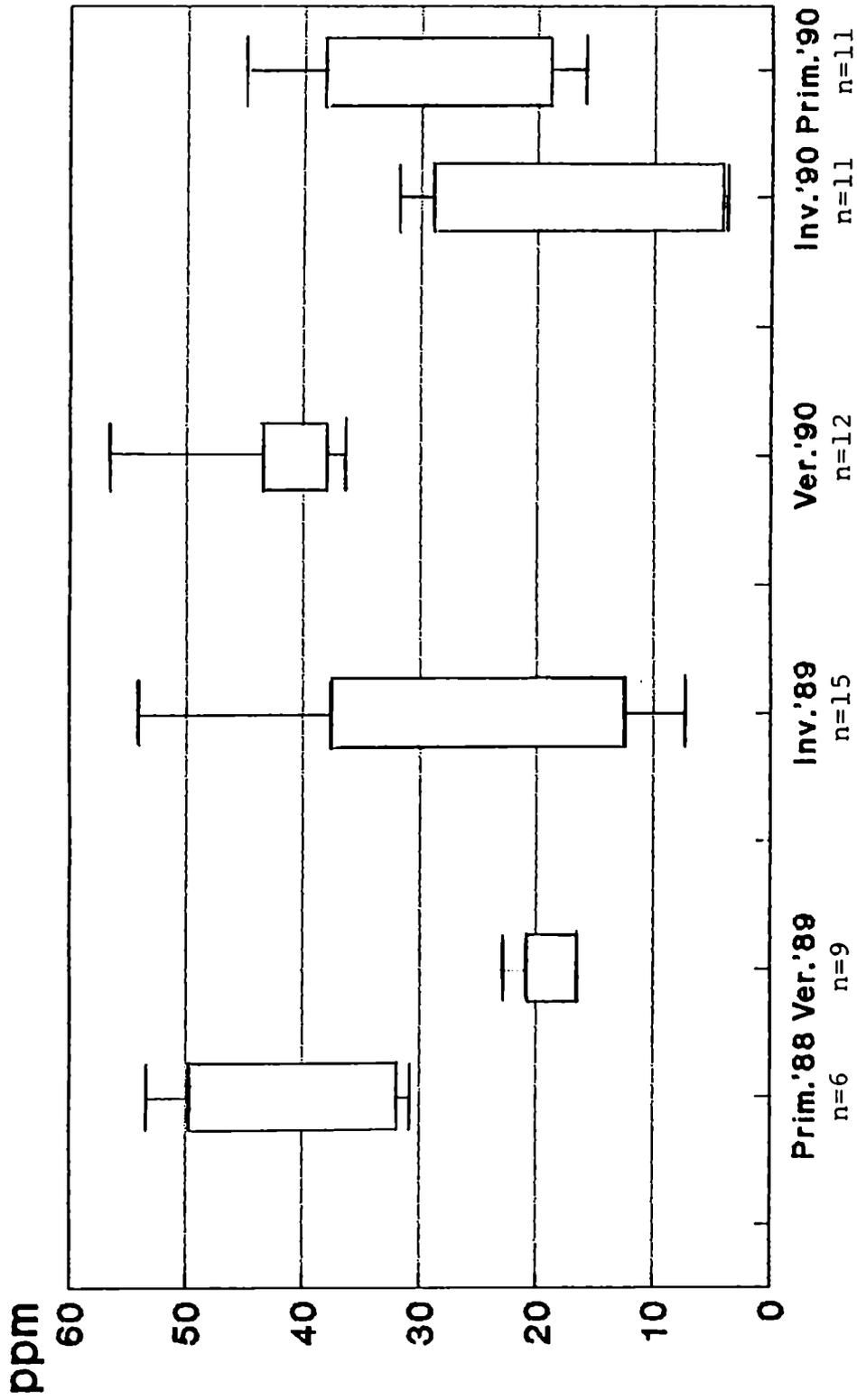


Fig.II.16.: NIVELES DE ZINC EN SEDIMENTOS DE PUERTO DE OLIVOS A TRAVES DEL TIEMPO.

En la zona del Balneario de Quilmes se realizó un solo muestreo adicional, durante verano'90 (Ver.'90), para comparar con los valores obtenidos durante verano e invierno de 1989. Los rangos y los valores medios de concentración de los ocho elementos en estudio se presentan en la Tabla II.5.

Tabla II.5.: Rangos y valores medios de concentración de elementos metálicos en sedimentos del Balneario de Quilmes.

	Ver.'89 (n=19)	Inv.'89 (n=11)	Ver.'90 (n=21)
Cadmio ug.g ⁻¹	0,08-0,25 0,14	* 0,06-0,18 0,10	<0,01
Cobalto ug.g ⁻¹	3,1 - 6,1 4,4	3,9 -5,8 4,7	3,3 - 5,2 4,1
Cobre ug.g ⁻¹	6,8 -10,6 8,5	5,5 - 7,5 6,5	5,2 - 7,1 5,8
Cromo ug.g ⁻¹	12,7 -24,2 17,1	* 8,6 -10,5 9,5	* 12,2 -19,0 14,0
Hierro mg.g ⁻¹	8,9 -13,2 11,7	9,5 -13,9 11,6	9,5 -13,8 11,2
Níquel ug.g ⁻¹	3,5 - 8,7 5,5	3,9 - 5,1 4,6	3,5 - 6,1 4,4
Plomo ug.g ⁻¹	8,8 -13,3 11,0	8,5 -11,7 10,1	8,8 -17,5 12,3
Zinc ug.g ⁻¹	90,9-116,4 93,8	80,7-106,4 91,3	78,4-109,1 87,7

* diferencias significativas entre ambas temporadas.

Esos datos reflejan, en líneas generales, una situación bastante diferente a la observada en Puerto de Olivos, aún cuando para esta zona se dispuso de un menor número de muestreos. En primer lugar, en Balneario de Quilmes los niveles de concentración de elementos metálicos presentaron, en cada temporada, menor variabilidad. Además, para la mayoría de los elementos, o sea para cobalto, cobre, hierro, níquel, plomo y zinc, no se observaron diferencias significativas a través del tiempo de estudio.

Los niveles de cadmio mostraron una tendencia decreciente, a tal punto que este metal no fue detectado en ninguna muestra durante verano'90.

El caso del cromo fue diferente, ya que se registraron mayores niveles durante ambos muestreos de verano, obteniéndose los valores mínimos en invierno'89.

En algunos sistemas acuáticos no se han registrado variaciones temporales apreciables, en los niveles de contaminantes metálicos presentes en sedimentos (Marcus et al.,1988). En otros, las variaciones temporales que se producen han sido atribuidas a diversos factores, entre los que se destacan la ocurrencia de descargas industriales limitadas a ciertos períodos específicos, los regímenes pluviales o la dinámica del fitoplancton (Cabrera et al.,1984; Kaiser et al.,1989).

En base a los resultados obtenidos en Puerto de Olivos y Balneario de Quilmes, podemos asumir que diferentes factores parecerían estar influyendo en cada zona.

Como ya hemos señalado, en Puerto de Olivos se desarrollan básicamente actividades náuticas deportivas y se encuentra una guardería para embarcaciones con motores a explosión. Dichas actividades se intensifican durante primavera y verano; por consiguiente, podrían ser parcialmente responsables de los incrementos en los niveles de contaminación, especialmente de metales como el plomo.

Por las costas del Balneario de Quilmes, en cambio, no se encuentran prácticamente embarcaciones. Se trata de un lugar destinado al esparcimiento, que cuenta únicamente con un club de pescadores. Además, si bien puede estar sujeta a la descarga de diversos efluentes industriales, aparentemente no se habrían verificado cambios apreciables en dichas descargas, durante el tiempo de estudio, salvo en relación a los elementos cadmio y cromo.

CAPITULO III

Determinación de elementos metálicos en muestras
de tejidos biológicos

III.1. INTRODUCCIÓN

Ya hemos señalado que los estudios de bioacumulación consisten en la determinación de los niveles de sustancias químicas contaminantes, presentes en los diversos organismos o tejidos biológicos.

Desde un punto de vista ambiental, los análisis practicados en diferentes organismos permiten identificar aquellas especies con mayor capacidad para acumular contaminantes. El objetivo ideal de estos estudios consiste en determinar aquella especie que más y mejor se acerque al concepto de indicadora o centinela de contaminación. En forma práctica, permiten establecer el grado de incorporación real de los contaminantes, independientemente de cual haya sido la vía de ingreso o la especiación química de la sustancia en el medio. También, permiten identificar aquellos compuestos o elementos que pueden biomagnificarse a través de las cadenas alimentarias (Laskowski y Maryanski, 1993).

Si, en cambio, esos estudios se realizan sobre diferentes tejidos, posibilitan explicar la real distribución de los contaminantes en los organismos, como consecuencia de la exposición ambiental. De este modo, se pueden predecir o identificar los órganos o tejidos blancos más probables de acción de los tóxicos. A partir de allí, se podrán implementar bioensayos, en condiciones de laboratorio, a fin de investigar los probables mecanismos involucrados. Según hemos señalado anteriormente (Sección V), diversos autores han demostrado que la acumulación de elementos metálicos se verifica principalmente en los tejidos no-comestibles de peces, tales como hígado, riñón, cerebro, branquias y epitelios superficiales. Según los elementos, la distribución en hígado y/o riñón se considera mayoritaria (Saleh et al., 1988; Winger et al., 1990). En el caso de moluscos gastrópodos, el hepatopáncreas ha demostrado ser el órgano de mayor acumulación (Möller, 1978; Reineskog y Petersson, 1990).

Por consiguiente, este tipo de evaluación biológica integrada con análisis químicos, constituye uno de los mejores instrumentos y un punto de partida fundamental para estimar el impacto ambiental derivado de la presencia de sustancias contaminantes sobre los ecosistemas (Karr, 1987; Courtemanch et al., 1989).

En un sentido más concreto y pragmático los estudios de

bioacumulación permiten (Winger et al., 1990):

- * documentar los niveles de contaminantes presentes en la biota.
- * establecer líneas de base para efectuar comparaciones válidas con futuros monitoreos que empleen los mismos organismos.
- * analizar las posibles correlaciones entre los niveles de contaminantes presentes en la biota y en su entorno ambiental.

Diversas especies de moluscos bivalvos han sido extensamente recomendadas y empleadas en numerosos programas de monitoreo de sistemas acuáticos, tanto en relación a contaminantes metálicos como orgánicos (Goldberg et al., 1983; Mäkelä et al., 1991; Viarengo y Canesi, 1991).

Estos organismos presentan ciertas características por las cuales son considerados como especies indicadoras particularmente apropiadas para los estudios de bioacumulación. En principio, exhiben una muy amplia distribución geográfica, siendo posible encontrarlos en numerosas zonas costeras marinas o ribereñas, al igual que en la mayoría de los estuarios. Son organismos sésiles (caso de los mejillones) o de muy escasa movilidad (almejas), que se desarrollan en la zona de influencia de las mareas. Justamente debido a esta particular distribución, son capaces de reflejar la situación de las zonas costeras, usualmente las más comprometidas por los problemas de contaminación. Se trata de organismos particularmente resistentes a un gran número de perturbaciones, ya que normalmente están sujetos a diversos cambios ambientales, entre ellos a las fluctuaciones de las mareas. Por ende, están especialmente adaptados a variaciones que se produzcan en la temperatura, en los niveles de oxígeno, en la disponibilidad de nutrientes, en la salinidad, etc. (Goldberg et al., 1983; Coimbra y Carraca, 1990; Massabuau et al., 1991; Viarengo y Canesi, 1991). Recordemos además que por tratarse de organismos filtradores, los moluscos bivalvos pueden acumular altos niveles de sustancias químicas contaminantes en sus tejidos.

Teniendo en cuenta que varias especies de moluscos bivalvos se caracterizan por su pequeño tamaño, se ha adoptado el criterio, bastante generalizado, de analizar el tejido blando total de esos organismos (Friant, 1979; Sadig y Alam, 1989; Coimbra y Carraca, 1990; Chou y Uthe, 1991).

Algunos estudios recomiendan, además, la necesidad de eliminar el tracto gastrointestinal y su contenido previamente al análisis de las muestras. Esto obedece al hecho de que una cantidad significativa de elementos metálicos podría estar presente en el material particulado ingerido por los organismos, pero no realmente incorporado en sus tejidos (Latouche y Mix, 1982; Luoma, 1988).

Ahora bien, merece destacarse que los niveles de concentración de elementos metálicos en los organismos acuáticos, especialmente en moluscos, no dependen únicamente de los niveles presentes en su entorno físico ni de las variantes condiciones ambientales a las que están sometidos. Otros factores, de naturaleza biológica y/o fisiológica, ejercen su propia influencia.

En primer lugar, el grado de acumulación depende de cada especie en particular. Por consiguiente, las comparaciones entre los niveles de acumulación presentes en distintas especies, aún cuando éstas estén estrechamente relacionadas, nunca deben interpretarse con un sentido estricto, ya que sólo pueden tener un valor orientativo. Otros factores relevantes a considerar son el sexo; el tamaño o la edad de los organismos; su madurez, especialmente en cuanto al estadio de su ciclo reproductivo, o la época del año, así como también los mecanismos de regulación disponibles. Todos esos factores han sido ampliamente reconocidos en la literatura (Latouche y Mix, 1982; Lobel, 1987; Khan et al., 1989; Coimbra y Carraca, 1990; Tarazona et al., 1991).

En ciertos casos, la incidencia de algunas de esas variables puede ser minimizada o analizada a través de un adecuado diseño experimental. Por ejemplo, para estudiar la influencia del factor sexual, las determinaciones se efectúan en forma separada sobre cada uno de los sexos.

Por otra parte, la variación de un dado parámetro biológico o bioquímico en función del tamaño o peso de un organismo, se suele expresar a través de la llamada "ecuación alométrica" (Heusner, 1987; Hayton y Schultz, 1991; Newman y Heagler, 1991). Dicha expresión surge de la Alometría, la cual consiste en el estudio de las relaciones de tamaño y sus consecuencias. La ecuación general, también conocida como "ecuación de potencia", se puede escribir mediante la siguiente expresión:

$$y = a \cdot x^b$$

donde y = parámetro biológico o bioquímico en estudio,
 x = tamaño o peso del organismo,
y "a" y "b" son constantes.

La expresión anterior puede ser fácilmente transformada en una ecuación lineal tomando logaritmos, de este modo:

$$\log y = a + b \log x$$

A través de ella, es factible analizar la posible relación entre el contenido de sustancias contaminantes en función del peso de los organismos (Heusner, 1987; Hayton y Schultz, 1991; Newman y Heagler, 1991). De hecho, diversos autores han aplicado dicha ecuación para investigar las correlaciones de diversos elementos metálicos en organismos acuáticos (Boyden, 1974; Chou y Uthe, 1991; Díaz et al., 1992).

ESTUDIOS REALIZADOS

Para este capítulo se realizaron los siguientes estudios:

Determinación de ocho elementos metálicos: cadmio, cobalto, cobre, cromo, hierro, níquel, plomo y zinc, en muestras de tejido hepático de peces.

Determinación de seis elementos metálicos: cadmio, cobre, cromo, níquel, plomo y zinc, en hepatopáncreas de gastrópodos de la especie A. insularum.

Determinación de ocho elementos metálicos: cadmio, cobalto, cobre, cromo, hierro, níquel, plomo y zinc, en el tejido blando total, con y sin tracto gastrointestinal, de moluscos bivalvos de la especie N. limosa, recolectados durante tres temporadas (verano, invierno y primavera de 1991).

Estudio de la influencia de los niveles ambientales de contaminantes metálicos sobre los niveles presentes en los tejidos biológicos.

Estudio de los niveles de acumulación de cadmio y plomo en muestras de valvas de los moluscos bivalvos.

III.2. MATERIALES Y MÉTODOS

III.2.1. Recolección de las muestras

Dos especies de peces, Odontesthes bonariensis y Pimelodus clarias, fueron recolectadas por pescadores deportivos en la zona del Club de Pesca, Costanera Sur, Buenos Aires, el 7 de mayo de 1988. Inmediatamente después de su recolección, se separó cuidadosamente el tejido hepático, el cual fue colocado en recipientes plásticos prelavados, mantenidos a $T = 4 \text{ }^{\circ}\text{C}$, y transportados al laboratorio.

Ejemplares de gastrópodos, de la especie Ampullaria insularum, fueron recolectados el 17 de febrero de 1988, de la misma zona, en forma manual, colocados en recipientes plásticos y transportados al laboratorio.

Moluscos bivalvos, de la especie Neocorbicula limosa, se recolectaron en la zona del Parque Ecológico, aledaña al Club de Pesca, Costanera Sur, Buenos Aires. La recolección se realizó en la zona de intermareas, en forma manual. Los organismos se dispusieron en baldes plásticos, con un nivel suficiente de agua de río y fueron transportados al laboratorio. Los muestreos se efectuaron los días 1 de marzo, 17 de agosto y 15 de Octubre de 1991, correspondientes a las temporadas verano 1991, invierno 1991 y primavera 1991.

Simultáneamente con la recolección de los organismos invertebrados, se recolectaron muestras de sedimentos superficiales, circundantes, las cuales se colocaron en bolsitas de polietileno.

III.2.2. Tratamiento y Análisis de las muestras de tejidos biológicos

Una vez en el laboratorio, se procedió a separar el hepatopáncreas de los gastrópodos. Esta operación fue supervisada por el Dr. Daniel E. Nahabedian, del laboratorio de Invertebrados, Departamento de Ciencias Biológicas, F.C.F.N., UBA.

Los moluscos bivalvos fueron sacrificados en nuestros laboratorios, mediante la apertura manual de sus valvas, y el tejido blando total fue cuidadosamente removido. El lote inicial de or-

ganismos fue dividido en dos, en uno de los cuales se separó el tracto gastrointestinal, mientras que el otro se mantuvo intacto.

Los distintos tejidos provenientes de las diferentes especies fueron secados suavemente sobre papel de filtro, pesados y colocados en tubos de 15 ó 25 mL de capacidad. A continuación se efectuó un proceso de digestión, empleando un volumen apropiado (entre 2 y 4 mL) de HNO_3 concentrado, según recomendaciones de literatura (Harper et al., 1989) y calentando a 100 - 120 °C, hasta la completa destrucción de la materia orgánica.

Una vez concluída esta etapa, las muestras fueron diluídas a un volumen final de 5,0 mL, con HNO_3 , 1%, centrifugadas (3000 g x 15-20 minutos) y transferidas a otro tubo, de modo de separar cualquier residuo remanente o precipitado. Los distintos elementos metálicos fueron determinados en un espectrofotómetro de absorción atómica Varian 575 AA, mediante la directa atomización en una llama de aire acetileno y empleando una lámpara de deuterio, para corregir el ruido de fondo. Las lecturas se efectuaron a las mismas longitudes de onda empleadas para el análisis de las muestras de sedimentos (II.2.4.).

La cuantificación de los distintos elementos se efectuó mediante el empleo de curvas de calibración, obtenidas a partir de diluciones apropiadas de soluciones patrones de cada metal. Previamente se había comprobado la exactitud de los análisis, mediante el método de agregado patrón, sobre los diferentes tejidos.

En todos los casos, se efectuó como mínimo un blanco de reactivos, cada 5 o 6 muestras, digerido paralelamente con éstas. En ningún caso se obtuvieron valores detectables de los distintos elementos en estudio.

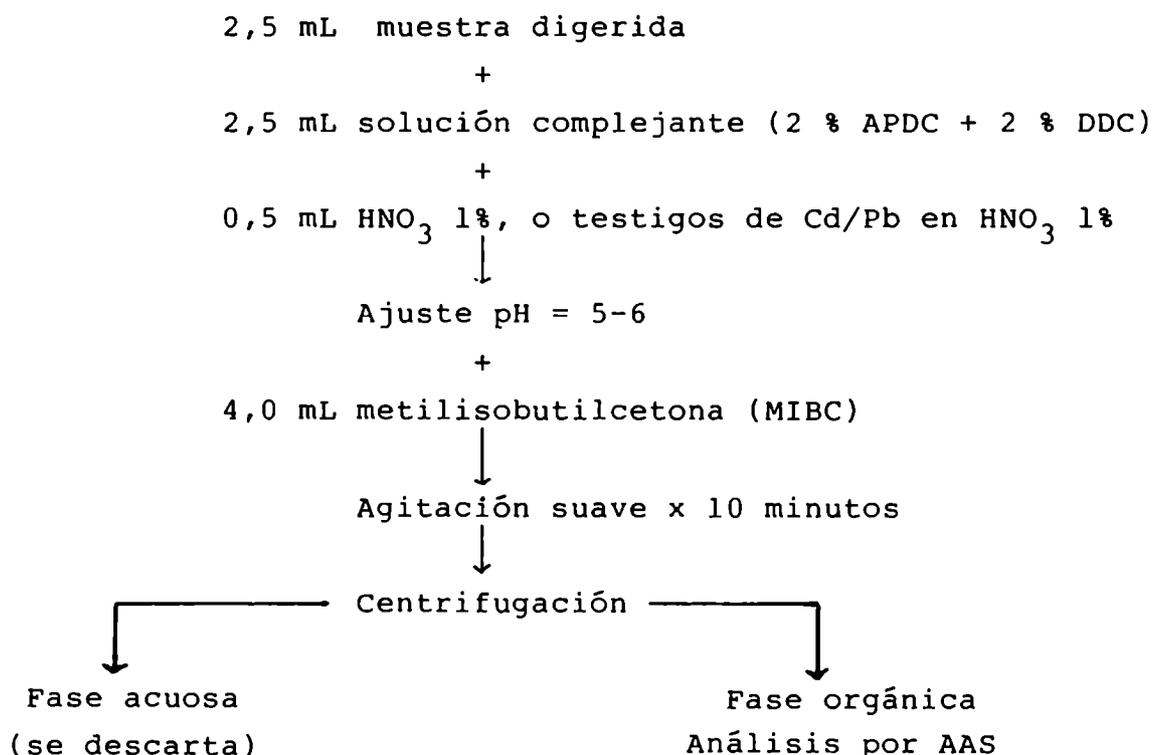
III.2.3. Análisis de las muestras de sedimentos

Para los análisis de elementos metálicos en muestras de sedimentos se procedió según la metodología general descripta oportunamente en II.2.3 y II.2.4.

III.2.4. Tratamiento y análisis de valvas de moluscos bivalvos

Se analizaron muestras de valvas de organismos de la especie Neocorbicula limosa recolectados el 17 de agosto de 1991 (temporada invierno'91). Una vez separado escrupulosamente el tejido blando total, las valvas se lavaron dos veces con agua bidestilada y fueron rápidamente secadas en estufa a 40-50 °C de temperatura. Seguidamente, se pesaron, se fraccionaron y se colocaron en un tubo de ensayos para su digestión. Este proceso se realizó con 1,5-2,0 mL de HNO₃ concentrado, dejando actuar en frío hasta que hubiese terminado el desprendimiento de CO₂. A partir de ese momento, se agregaron otros 2,0 mL de HNO₃ concentrado y se completó el proceso, calentando a una temperatura de 100 °C durante 4-5 hs. El residuo se llevó a un volumen final de 10,0 mL con solución de HNO₃ 1 %, v/v.

Si bien algunos autores consideran que estos digestos pueden ser directamente analizados por espectrofotometría de absorción atómica (Bourgoin et al.,1992), en nuestro caso observamos no sólo interferencias para la determinación de plomo, debidas al exceso de calcio, sino también problemas por taponamientos del mechero. Por consiguiente, se efectuó un tratamiento de formación de complejos y extracción con solventes orgánicos, similar al empleado para el análisis de las muestras de aguas, según el siguiente esquema:



Los análisis se efectuaron en un equipo de absorción atómica Varian AA 575, con lámpara de deuterio, por directa atomización de la fase orgánica en una llama de aire-acetileno. Las lecturas se realizaron a 228,8 nm y 283,3 nm de longitud de onda para cadmio y plomo respectivamente.

Cada muestra fue analizada por duplicado. La cuantificación de ambos metales se efectuó mediante la técnica de agregado patrón.

Cada seis muestras, se intercaló un blanco de reactivos, empleando HNO₃ concentrado, a fin de verificar que no se produjeran contaminaciones accidentales, el cual recibió los mismos tratamientos que las valvas.

III.2.5. Materiales, reactivos y condiciones de trabajo

Análogas a las descriptas en I.2.1.2.

III.2.6. Cálculos y Métodos estadísticos

Los factores de bioacumulación (FBA) fueron calculados a partir de la siguiente fórmula:

$$FBA = \frac{|\bar{x}| \text{ en tejidos biológicos}}{|\bar{x}| \text{ en sedimentos}}$$

donde $|\bar{x}|$ = valor medio de concentración del elemento X.

Para analizar la dependencia entre el contenido de elementos metálicos (y) en función del peso húmedo (x) de los organismos, se recurrió a la ecuación alométrica:

$$\log y = a + b \log x$$

En todos los casos en que se obtuvieron regresiones significativas, los distintos parámetros de la recta fueron calculados por el método de cuadrados mínimos, empleando el programa QUATTRO PRO

4,0. Seguidamente, se emplearon las técnicas de regresión funcional, descritas por Ricker. Este método resulta más apropiado cuando la variable independiente x ha sido determinada con cierto error o está sujeta a una variación inherente. En este caso, la ordenada al origen (u) y la pendiente (v) de la regresión funcional:

$$y = u + v x$$

se calculan a partir de los parámetros obtenidos inicialmente por cuadrados mínimos, según las fórmulas:

$$v = \frac{b}{r} \quad \text{y} \quad u = \log y_m - b \log x_m$$

donde y_m y x_m son los valores medio de y y x , respectivamente, y r = coeficiente de regresión (Newman y Heagler, 1991).

Los errores en los parámetros se estimaron en el intervalo del 95 % de confianza.

Para determinar si las variaciones en el contenido de los elementos podían adjudicarse a cambios por temporada, o eran una simple consecuencia de las diferencias en el peso de los organismos, se empleó el método de análisis de covarianzas (ANCOVA) (Cochran y Cox, 1964).

Para determinar si existían diferencias significativas en los niveles de elementos metálicos en las muestras de sedimentos, durante las distintas temporadas, se recurrió a la prueba de Kruskal-Wallis (Sokal y Rohlf, 1969).

En todos los casos se trabajó al nivel $p < 0,05$.

III.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III.3.1. NIVELES DE ELEMENTOS METÁLICOS EN HÍGADO DE PECES.

La Tabla III.1. muestra los valores medios de concentración de elementos metálicos en muestras de tejido hepático de peces.

Tabla III.1.: Niveles de concentración de elementos metálicos en hígado de peces ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ peso húmedo).

elemento	<u>O.bonariensis</u>	<u>P. clarias</u>
	$\bar{x} \pm \text{DE}^*$ (n=3)	$\bar{x} \pm \text{DE}^*$ (n=6)
Cadmio	<0,03	0,05 \pm 0,03
Cobalto	<0,2	<0,2
Cobre	4,73 \pm 0,56	9,14 \pm 0,45
Cromo	<0,1	<0,1
Hierro	176,7 \pm 48,3	74,0 \pm 18,2
Níquel	<0,5	<0,5
Plomo	4,9 \pm 1,5	0,35 \pm 0,14
Zinc	94,4 \pm 14,9	30,3 \pm 8,6

* valor medio y desviación estándar.

n = número de muestras.

En la especie O. bonariensis (pejerrey) se encontraron mayores niveles de hierro, plomo y zinc, mientras que en P. clarias (bagre) se observaron los valores más altos de cadmio y cobre. En ambas especies, los elementos cobalto, cromo y níquel no fueron detectados.

Teniendo en cuenta que los organismos fueron recolectados simultáneamente de la misma área y en el mismo día, las diferencias

que se observan en los niveles de concentración para los distintos elementos entre ambas especies, pueden atribuirse fundamentalmente a factores biológicos y/o fisiológicos intrínsecos de cada especie. En estos organismos no fue posible establecer el sexo ni estimar la edad. Además, se sabe que estas especies poseen hábitos nutricionales y hábitats diferentes.

De todos modos, los niveles de concentración que se registraron en dichas muestras fueron, en todos los casos, mayores que los niveles obtenidos en la fracción recuperable de muestras de aguas (Capítulo I.3.4.). Por consiguiente, se pudo comprobar un claro fenómeno de bioacumulación en el hígado de esas especies de peces, en relación a la fase acuosa.

Si bien las comparaciones con reportes de otros autores no permiten evaluar estrictamente el impacto ambiental ni los posibles efectos tóxicos derivados de la presencia de un dado nivel de contaminantes en especies diferentes y provenientes de distintos sistemas acuáticos, constituyen una suerte de marco de referencia, al cual es muy difícil abstraerse.

Así, por ejemplo, los niveles de cobre, plomo y zinc encontrados en este estudio, son mayores que los reportados por Salanki et al. (1982) en una especie de pez no-predador de agua dulce. Para cobre resultan entre 2,2 y 4,2 veces mayores; para plomo, entre 2,6 y 36 veces más altos, y para zinc, entre 6,7 y 20 veces. En cambio, los niveles de cadmio, resultaron muy similares.

Nuestros valores de cobre y plomo se encuentran dentro del rango reportado en un monitoreo realizado durante 1975 por el gobierno del Reino Unido, en el cual se analizaron especies marinas recolectadas en altamar. Los niveles de zinc en P. clarias (bagre) también se ubican dentro del rango establecido en dicho programa, pero en la especie O. bonariensis resultan alrededor de 3 veces mayores (Murray, 1981).

III.3.2. NIVELES DE ELEMENTOS METÁLICOS EN HEPATOPÁNCREAS DE GASTRÓPODOS.

En la Tabla III.2. se presentan los niveles de concentración de elementos metálicos en hepatopáncreas de gastrópodos de la especie Ampullaria insularum. Adicionalmente, se presentan los valores obtenidos en muestras de sedimentos circundantes, así como los factores de acumulación correspondientes.

Tabla III.2.: Niveles de concentración de elementos metálicos en hepatopáncreas de gastrópodos, en sedimentos y factores de acumulación.

elemento	hepatopáncreas	sedimentos	factores de acumulación
	(n = 7) $\bar{x} \pm DE^*$ ug.g ⁻¹ peso húmedo	(n = 6) $\bar{x} \pm DE^*$ ug.g ⁻¹ peso seco	
Cadmio	1,6 ± 0,3	0,08 ± 0,04	20
Cobre	17,6 ± 5,5	36,3 ± 14,5	0,48
Cromo	<0,7	22,6 ± 4,8	<0,03
Níquel	6,6 ± 2,3	6,7 ± 0,4	0,99
Plomo	15 ± 16	61,0 ± 10,9	0,25
Zinc	399 ± 57	123 ± 10	3,24

* valor medio y desviación estándar.

n = número de muestras.

En primer lugar, se puede observar que los niveles de concentración de cadmio, cobre, níquel, plomo y zinc observados en el hepatopáncreas de estos gastrópodos son considerablemente más altos que los hallados en el tejido hepático de peces. Con respecto

al cromo tampoco fue detectado en los moluscos, mientras que para los elementos cobalto e hierro no se efectuaron determinaciones.

Por otra parte, los factores de acumulación para cadmio y zinc resultaron superiores a 1, indicando que el hepatopáncreas de este organismo es capaz de acumular a dichos elementos por encima de los niveles presentes en los sedimentos. En el caso del níquel, los niveles de concentración en ambas muestras resultaron prácticamente iguales. En cambio para cobre y plomo, los factores de acumulación fueron menores de la unidad.

De esta manera, en el hepatopáncreas de Ampullaria insularum se ha encontrado el siguiente orden de acumulación:

Cd >> Zn > Ni > Cu > Pb >> Cr

Motivados por estos resultados, consideramos que este organismo podría llegar a ser un posible candidato local adecuado como indicador de contaminación por elementos metálicos. Sin embargo, el 7 de mayo de 1988, menos de tres meses después de nuestro primer muestreo (el 17 de febrero) no pudimos encontrar ningún animal vivo. Persistimos en nuestra búsqueda, suponiendo que esa situación podía atribuirse a ciclos biológicos estacionales, pero, hasta la fecha, no volvimos a encontrar animales en la zona. Mientras tanto, una sucesión bastante continua de procesos de rellenado del terreno y depósitos de escombros y otros residuos, modificaron el ambiente físico de esa zona de muestreo.

De esta manera, aún cuando se considera que diversos elementos metálicos pueden ser responsables de una disminución en la riqueza y en la diversidad de especies de las comunidades acuáticas, a menudo suele ser extremadamente difícil establecer las causas primarias de tales alteraciones (Sheehan y Winner, 1984; Kelly et al., 1987; Mackie, 1989; Clements, 1991).

Por consiguiente, no podemos concluir que la desaparición de estos gastrópodos en esa zona de muestreo haya sido consecuencia de altos niveles de concentración de ciertos metales, como tampoco resultado de las modificaciones que se produjeron en su entorno ambiental. No obstante, ambos factores pudieron haber estado involucrados.

III.3.3. NIVELES DE ELEMENTOS METÁLICOS EN MOLUSCOS BIVALVOS.

En la Tabla III.3. se detallan los rangos de concentración de los diferentes metales, analizados en el tejido blando total de moluscos bivalvos de la especie Neocorbicula limosa, con y sin tracto gastrointestinal (TGI), a través de las tres temporadas de estudio.

En primera instancia y mediante una simple observación de esos rangos se pueden obtener algunas conclusiones preliminares.

El cobalto se encuentra por debajo del límite de detección, tanto en las muestras de tejido blando total, como en aquellas en las que el tracto gastrointestinal fue eliminado, durante las tres temporadas de estudio.

En cuanto al níquel, el número de muestras en las cuales no se detecta al elemento aumenta en el invierno'91, y es aún mayor durante la primavera'91.

En las muestras libres de tracto gastrointestinal, el plomo es detectado únicamente en primavera'91.

Para el resto de los elementos, los resultados demuestran que, en general, no se obtienen variaciones muy marcadas entre los análisis practicados sobre el tejido blando total con y sin tracto gastrointestinal, ya que los rangos tienden a solaparse.

Por otra parte, los niveles de concentración de cadmio, cobre y plomo parecen aumentar en primavera'91, por cuanto los rangos resultan más altos. Para zinc, en cambio, los valores más altos parecen registrarse durante el verano'91, en las muestras libres de tracto gastrointestinal. Con respecto al cromo y al hierro, no se pueden obtener mayores conclusiones en base únicamente a sus rangos.

Ahora bien, por tratarse de un monitoreo de campo, no siempre es posible seleccionar adecuadamente el tamaño de los organismos. De hecho, para el presente trabajo se encontraron rangos de peso variables, especialmente en relación a las muestras libres de tracto gastrointestinal, tal como puede apreciarse en la Tabla III.4.

Tabla III.3.: Rangos de concentración de elementos metálicos en muestras de tejidos blandos de N. limosa (ug.g¹ peso húmedo).

	Verano'91	Invierno'91	Primavera'91
Cadmio			
tej.total	- -	0,33- 0,41	0,42- 0,59
libre TGI	0,13- 0,27	0,22- 0,30	0,42- 0,67
Cobalto			
tej.total	- -	<0,2	<0,2
libre TGI	<0,2	<0,2	<0,2
Cobre			
tej.total	- -	10,3 - 17,8	8,3 - 39,4
libre TGI	8,1 - 16,5	7,6 - 16,9	12,9 - 32,7
Cromo			
tej.total	- -	0,79- 1,01	0,49- 1,15
libre TGI	0,73- 1,31	0,54- 0,92	0,51- 0,84
Hierro			
tej.total	- -	- -	29,7 -410,1
libre TGI	81,1 -192,3	81,9 -206,9	44,7 -302,3
Níquel			
tej.total	- -	0,20- 0,72	<0,19- 0,80
libre TGI	0,13- 0,57	<0,10- 0,52	<0,10- 0,54
Plomo			
tej.total	- -	0,67- 1,23	1,26- 3,46
libre TGI	<0,5	<0,5	1,11- 3,86
Zinc			
tej.total	- -	26,3 - 31,0	16,9 - 27,3
libre TGI	30,0 - 47,4	20,7 - 31,4	18,3 - 26,8

(- -) no determinado

Tabla III.4.: Niveles de peso de tejidos blandos de N. limosa (mg peso húmedo).

(a) Tejido blando total

	Verano'91	Invierno'91	Primavera'91
rango		371 - 743	341 - 833
$\bar{x} + DE^*$		570 \pm 140	598 \pm 154
n		55	48

(b) tejido blando libre TGI

rango	59 - 320	115 - 409	190 - 395
$\bar{x} + DE^*$	172 \pm 80	279 \pm 97	313 \pm 54
n	74	50	62

$\bar{x} + DE^*$ = valor medio y desviación estándar.

n = número de muestras.

Durante el verano'91 los rangos de peso, así como el valor medio, de los bivalvos analizados libres de tracto gastrointestinal fueron considerablemente menores en relación a los valores de los otros dos muestreos. En cambio, las diferencias no resultaron tan marcadas en los pesos del tejido blando total.

De este modo, para establecer si las variaciones observadas en los rangos de concentración de algunos metales reflejaban verdaderas diferencias en el contenido de esos elementos, o eran una simple consecuencia de las diferencias de peso de los organismos, se empleó la ecuación alométrica. Para ello, el primer paso consistió en determinar si existía una buena correlación entre el contenido de elementos (y) en función del peso húmedo de los tejidos blandos de los bivalvos (x). Por consiguiente, se calcularon los coeficientes de correlación cuadráticos r^2 , tanto para

los datos originales como para los resultantes de aplicar la transformación logarítmica. Los valores obtenidos se muestran en la Tabla III.5.

Con respecto al contenido de los elementos cadmio, cobre, cromo y zinc, se obtuvieron muy buenas correlaciones en función del peso de los organismos, con y sin tracto gastrointestinal, durante las tres temporadas de estudio, con valores de r^2 muy cercanos a uno, los cuales en general mejoran al aplicar la transformación logarítmica.

En cambio, para el hierro se obtuvieron valores de r^2 considerablemente bajos, que en general no resultaron estadísticamente significativos.

Para níquel, los valores de r^2 no fueron calculados, en algunos casos, debido a la gran proporción de muestras en las cuales dicho elemento no fue detectado.

En el caso del plomo, no se observó correlación significativa en las muestras de tejido blando total durante el invierno'91. En cambio, en primavera'91, los valores de r^2 fueron cercanos a la unidad.

Díaz et al. (1992) reportaron que para los elementos plomo, níquel, zinc, cadmio y cobre (en ese orden) se obtenían los mayores coeficientes de correlación cuadráticos, en función del peso húmedo de cierto molusco. El valor más bajo ($r^2 = 0,394$) se registraba para el hierro. En dicho trabajo no se analizó el comportamiento del cromo. Por consiguiente, en líneas generales, nuestros resultados coinciden apreciablemente con ese reporte, en cuanto a los elementos que presentan valores más altos de r^2 , con algunas excepciones, como las del níquel y plomo en aquellas temporadas en las cuales ninguna o pocas muestras arrojaron valores detectables.

En nuestro caso, los bajos coeficientes de correlación cuadráticos que se encontraron para el hierro pueden responder a la gran variabilidad observada en los niveles de este elemento, en relación al peso de los organismos con y sin tracto gastrointestinal. Lobel (1987) encontró también un alto grado de variabilidad en los niveles de zinc, analizando los tejidos blandos de ciertos bivalvos marinos, procedentes tanto de estuarios contaminados como de lagos relativamente libres de contaminación. Dicha variabilidad parece ser fundamentalmente debida a los variantes

Tabla III.5.: Coeficientes de correlación cuadráticos (r^2) entre el contenido de elementos metálicos (y) y el peso húmedo de los tejidos blandos (x).

	Verano'91		Invierno'91		Primavera'91	
	originales	transf. log	originales	transf. log	originales	transf. log
Cadmio	- -	- -	0,9824	0,9872	0,8727	0,9216
tej.total	- -	- -	0,9824	0,9872	0,8727	0,9216
libre TGI	0,6558	0,7927	0,9224	0,9482	0,9053	0,9334
Cobre	- -	- -	0,8939	0,9289	0,8863	0,8863
tej.total	- -	- -	0,8939	0,9289	0,8863	0,8863
libre TGI	0,9847	0,9877	0,7784	0,8932	0,4495 *	0,7511
Cromo	- -	- -	0,9613	0,9758	0,8682	0,8651
tej.total	- -	- -	0,9613	0,9758	0,8682	0,8651
libre TGI	0,8954	0,9120	0,7925	0,7747	0,8107	0,8478
Hierro	- -	- -	- -	- -	0,4618 *	0,6329
tej.total	- -	- -	- -	- -	0,4618 *	0,6329
libre TGI	0,7066	0,6284	0,1125 *	0,2711 *	0,3291 *	0,4315 *
Níquel	- -	- -	0,6946	0,7332	(a)	(a)
tej.total	- -	- -	0,6946	0,7332	(a)	(a)
libre TGI	0,4177	0,2128 *	(a)	(a)	(a)	(a)
Plomo	- -	- -	0,0628 *	0,0280 *	0,8280	0,9273
tej.total	- -	- -	0,0628 *	0,0280 *	0,8280	0,9273
libre TGI	- -	- -	- -	- -	0,9323	0,9547
Zinc	- -	- -	0,9073	0,9264	0,8567	0,8533
tej.total	- -	- -	0,9073	0,9264	0,8567	0,8533
libre TGI	0,8471	0,8806	0,8810	0,8925	0,6195	0,6260

- - no determinado, * no significativo ($p < 0,05$), (a) no calculable.

niveles de zinc presentes en el riñón, aunque no se encontró ninguna explicación para justificarla. En aquellos casos en que se observa una alta variabilidad individual en los niveles de elementos metálicos presentes en tejidos biológicos, las cuales no pueden ser atribuidas a la influencia de factores ambientales o fisiológicos, se denomina "variabilidad inherente" (Boyden y Phillips, 1981; Lobel, 1987). Tal situación podría estar presentándose para el hierro en los bivalvos que hemos analizado.

Seguidamente, se calcularon los parámetros a y b de la ecuación alométrica, en todos aquellos casos en que se obtuvieron correlaciones significativas. Los resultados se presentan en la Tabla III.6.

Las regresiones resultaron estadísticamente significativas para los elementos cadmio, cobre, cromo y zinc, durante las tres temporadas de estudio en todos los casos.

Para el hierro, no se obtuvieron regresiones significativas, aun cuando se verificaran correlaciones aceptables.

Con respecto a níquel y plomo, sólo se calcularon los parámetros respectivos en aquellos casos en que se dispuso de suficientes valores detectables.

A partir de las ecuaciones lineales se pueden obtener importantes conclusiones. Así, según sea el valor de la pendiente, b, se pueden presentar tres casos diferentes (Boyden, 1974):

- * $b < 1$, y aproximadamente igual a 0,750; cuando los organismos de menor tamaño o peso poseen mayor contenido del contaminante en relación a los de mayor tamaño o peso.
- * $b = 1$; cuando el contenido del contaminante resulta independiente del tamaño o peso de los organismos.
- * $b > 1$; cuando los organismos de mayor tamaño o peso presentan mayor contenido del contaminante que los de menor tamaño o peso.

Además, mediante la comparación de las regresiones, es posible establecer la real variación del contenido de los contaminantes en función del peso de los organismos. Por ello, para una mejor visualización e interpretación de los resultados se han representado gráficamente las rectas correspondientes al contenido de los elementos cadmio, cobre, cromo, plomo y zinc, en función del peso

Tabla III.6.: Parámetros de la regresión logarítmica: Contenido de metal (y) = a + b log (x)

	Verano'91		Invierno'91		Primavera'91	
	a ± error	b ± error	a ± error	b ± error	a ± error	b ± error
Cadmio						
tej.total	- -	- -	-0,416±0,017	0,980±0,079	-0,770±0,052	1,171±0,129
libre TGI	0,051±0,087	0,649±0,149	-0,356±0,040	0,907±0,075	-2,585±0,032	1,919±0,194
Cobre						
tej.total	- -	- -	-3,627±0,067	1,649±0,322	-5,588±0,127	3,440±0,357
libre TGI	-2,834±0,042	1,423±0,071	-3,151±0,104	1,495±0,231	-7,295±0,169	3,309±0,673
Cromo						
tej.total	- -	- -	-3,939±0,031	1,326±0,148	-5,169±0,084	1,752±0,231
libre TGI	-3,239±0,082	1,093±0,139	-2,847±0,088	0,869±0,166	-5,402±0,049	1,886±0,302
Hierro						
tej.total	- -	- -	- -	- -	- -	regresión no signif.
libre TGI	regresión no signif.	regresión no signif.	correlación no signif.	correlación no signif.	correlación no signif.	correlación no signif.
Níquel						
tej.total	- -	- -	4,865±0,140	1,567±0,668	- -	no calculable
libre TGI	correlación no signif.	correlación no signif.	no calculable	no calculable	no calculable	no calculable
Plomo						
tej.total	- -	- -	correlación no signif.	correlación no signif.	-6,015±0,068	3,844±0,342
libre TGI	no calculable	no calculable	no calculable	no calculable	-9,766±0,061	2,220±0,207
Zinc						
tej.total	- -	- -	-1,369±0,039	0,937±0,187	-2,182±0,068	1,182±0,163
libre TGI	-0,913±0,068	0,769±0,116	-1,607±0,065	1,018±0,144	-1,199±0,067	0,819±0,262

del tejido blando total o libre de tracto gastrointestinal, en las Figuras III.1. hasta III.5., respectivamente.

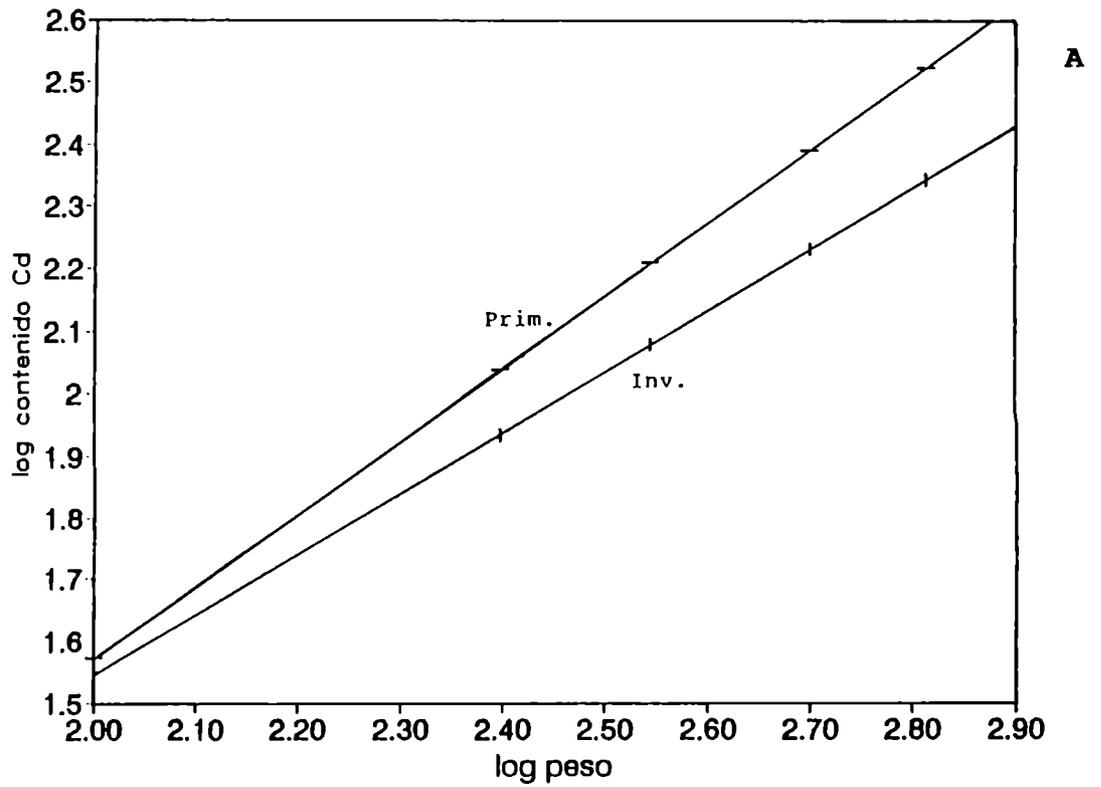
En las muestras de tejido blando total, no se observan diferencias significativas en el contenido de cadmio, entre invierno y primavera (Fig. III.1.A). En cambio, en las muestras libres de tracto gastrointestinal el contenido de cadmio aumenta en primavera, por cuanto se obtiene una mayor pendiente, mientras que no se registran diferencias significativas entre las otras dos temporadas (Fig. III.1.B). En invierno no se observan diferencias apreciables entre los organismos analizados con y sin tracto gastrointestinal. En primavera, esas diferencias resultan estadísticamente significativas, siendo mayor el contenido en los organismos libres de tracto gastrointestinal. Este hecho podría atribuirse a un bajo nivel de cadmio asociado al material particulado ingerido por los bivalvos, pero el cual sería rápidamente incorporado en sus tejidos blandos.

En base a las ecuaciones de las rectas, el contenido de cobre aumenta en primavera, en ambos tipos de muestras (Fig. III.2. A y B). Entre verano e invierno no se observan diferencias significativas en las muestras libres de tracto gastrointestinal (Fig. III. 2.B). Sin embargo, a diferencia del cadmio, en ningún caso se encuentran diferencias apreciables entre los organismos analizados con o sin tracto gastrointestinal.

El contenido de cromo no presenta variaciones apreciables durante las tres temporadas de estudio, dentro del rango de pesos estudiado, a pesar de los aumentos observados en las pendientes en primavera (Fig. III.3. A y B). Tampoco resultan significativas las diferencias entre los análisis practicados en el tejido blando total o libre de tracto gastrointestinal.

Las rectas para el plomo muestran la gran diferencia que existe en el contenido del metal en el tejido total o libre de tracto gastrointestinal durante primavera (Fig. III.4.). Estos resultados demuestran que la mayor parte de este elemento se encontraría asociada a las partículas ingeridas por los organismos, pero no verdaderamente unida a los tejidos blandos.

La situación del zinc es bastante similar a la observada para el cromo, por cuanto no se encuentran diferencias apreciables en el contenido del elemento durante las temporadas de estudio, ni entre las muestras con o sin tracto gastrointestinal (Fig.III.5.).



*: diferencias significativas entre temporadas.

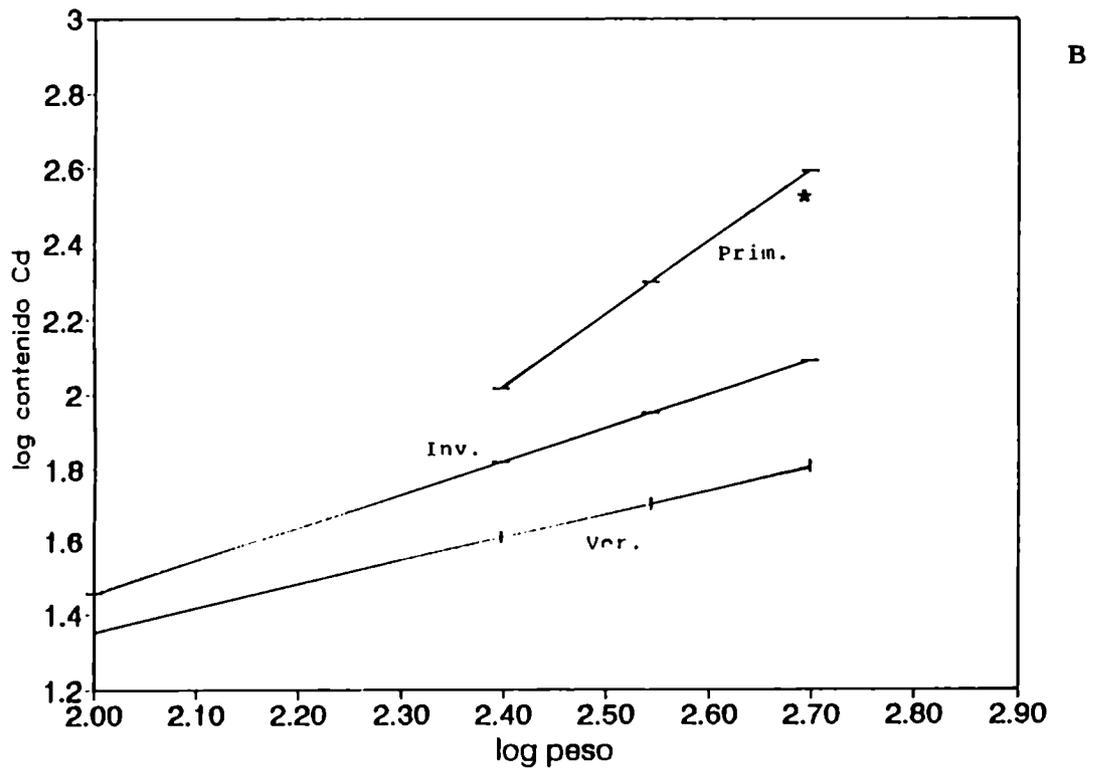


Fig.III.1.: Relaciones entre el contenido de cadmio (ng) en función del peso (mg) A: del tejido blando total, y B: del tej. blando libre de TGI, de bivalvos recolectados durante distintas temporadas.

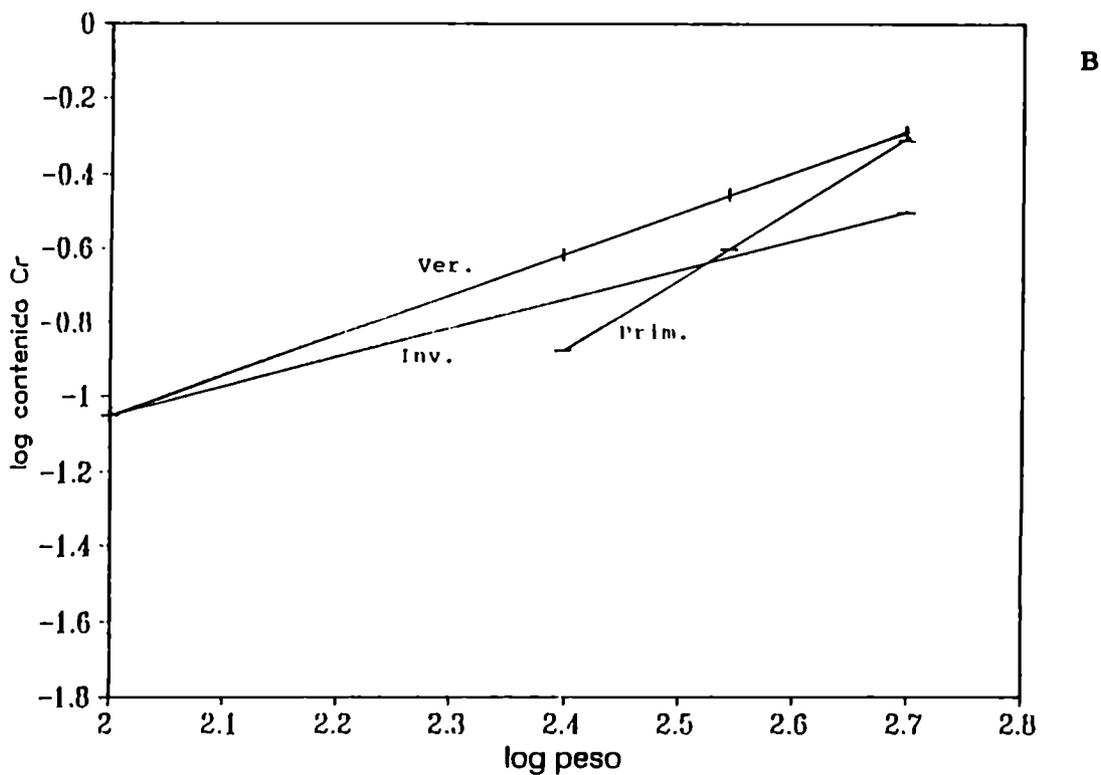
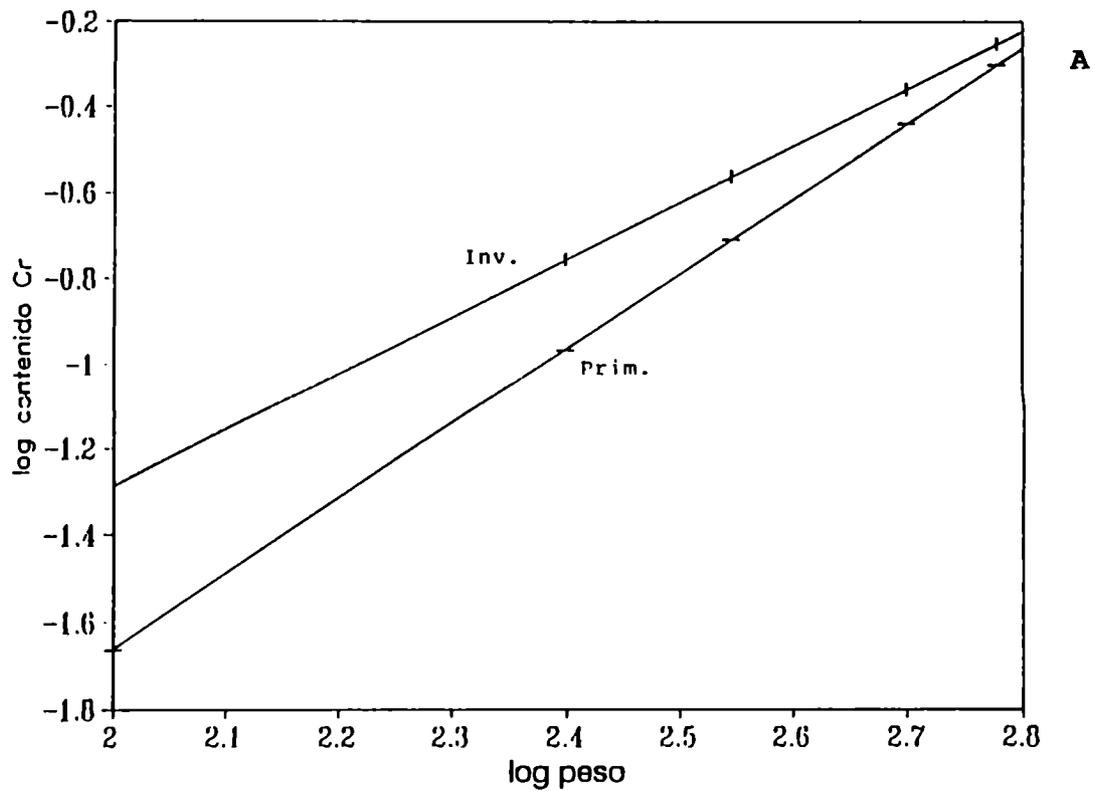
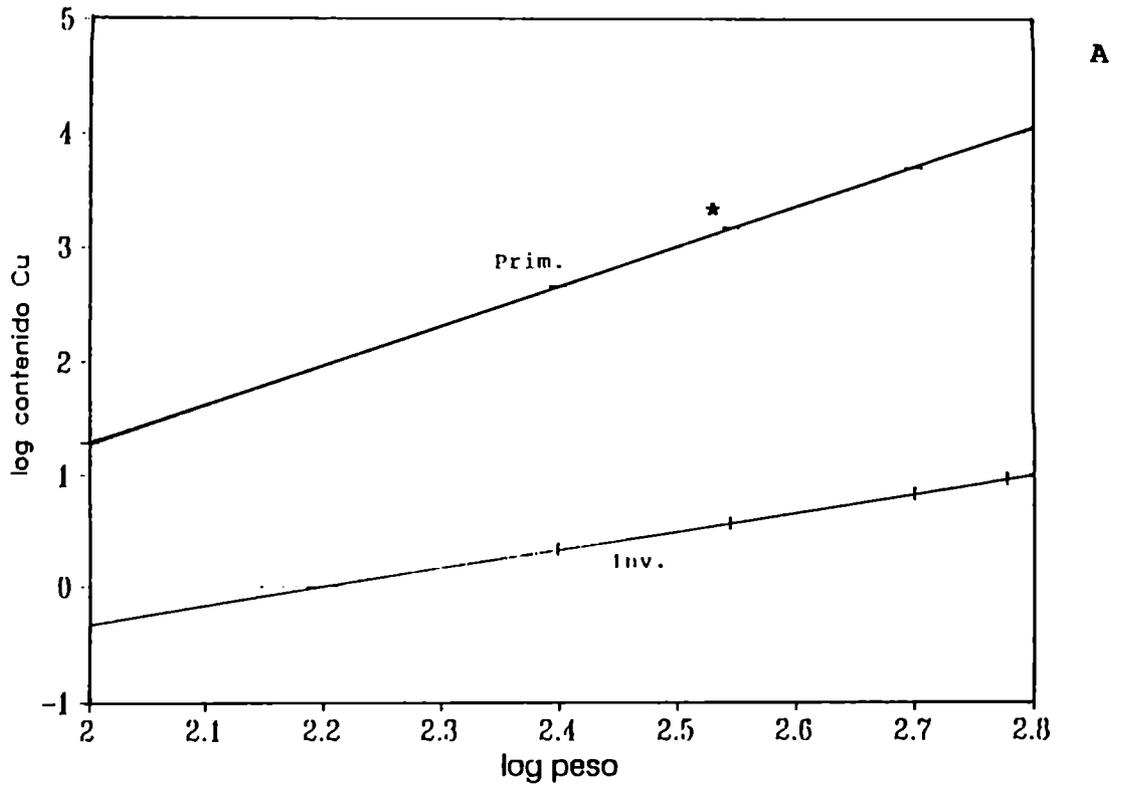


Fig.III.3.: Relaciones entre el contenido de cromo (ug) en función del peso (mg) A: del tejido blando total, y B: del tej. blando libre de TGI, de bivalvos recolectados durante distintas temporadas.



*: diferencias significativas entre temporadas.

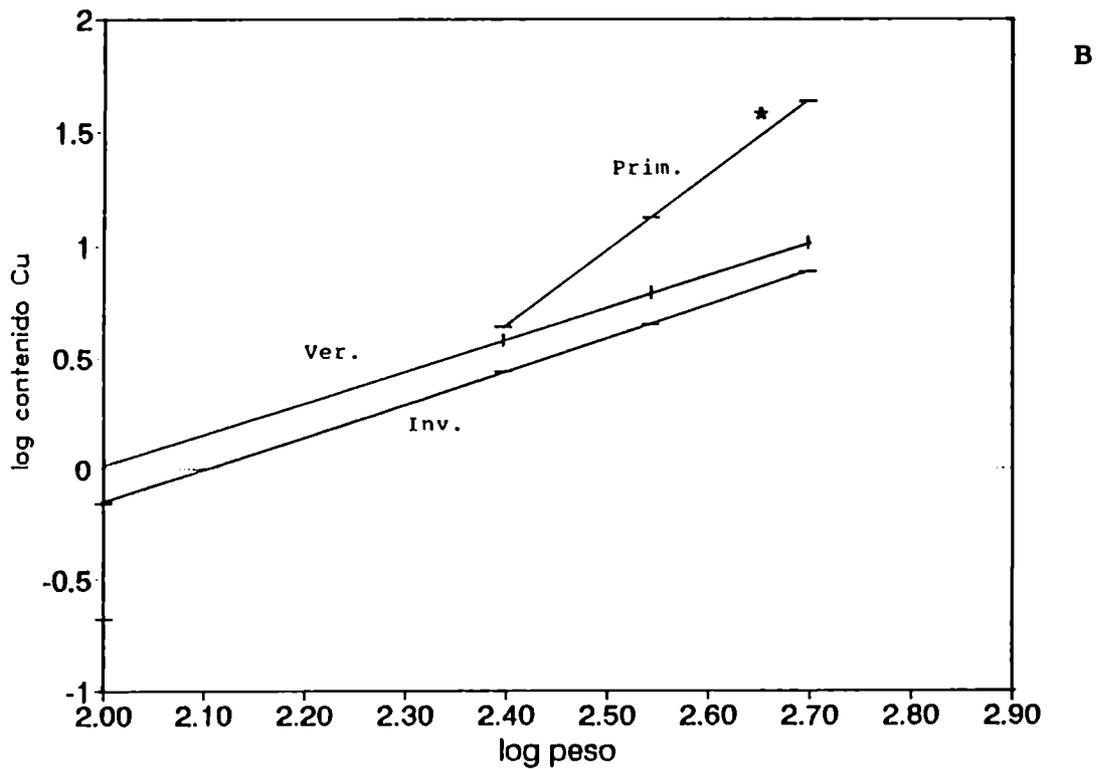


Fig.III.2.: Relaciones entre el contenido de cobre (ug) en función del peso (mg) A: del tejido blando total, y B: del tej. blando libre de TGI, de bivalvos recolectados durante distintas temporadas.

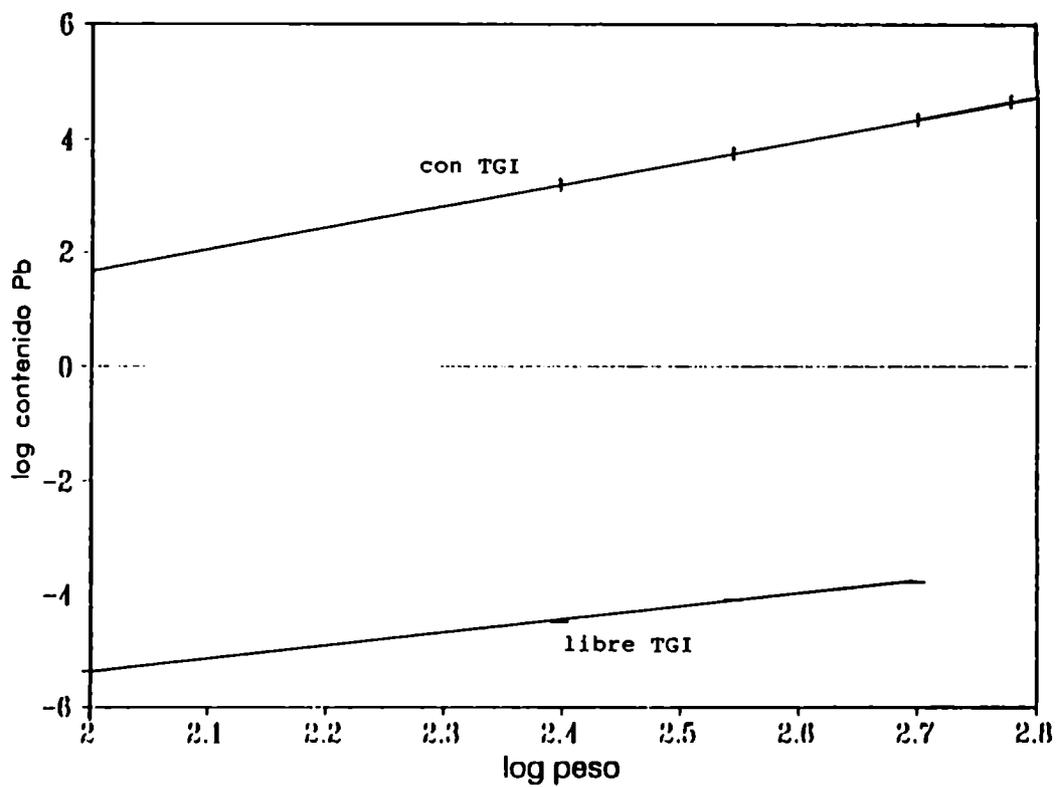
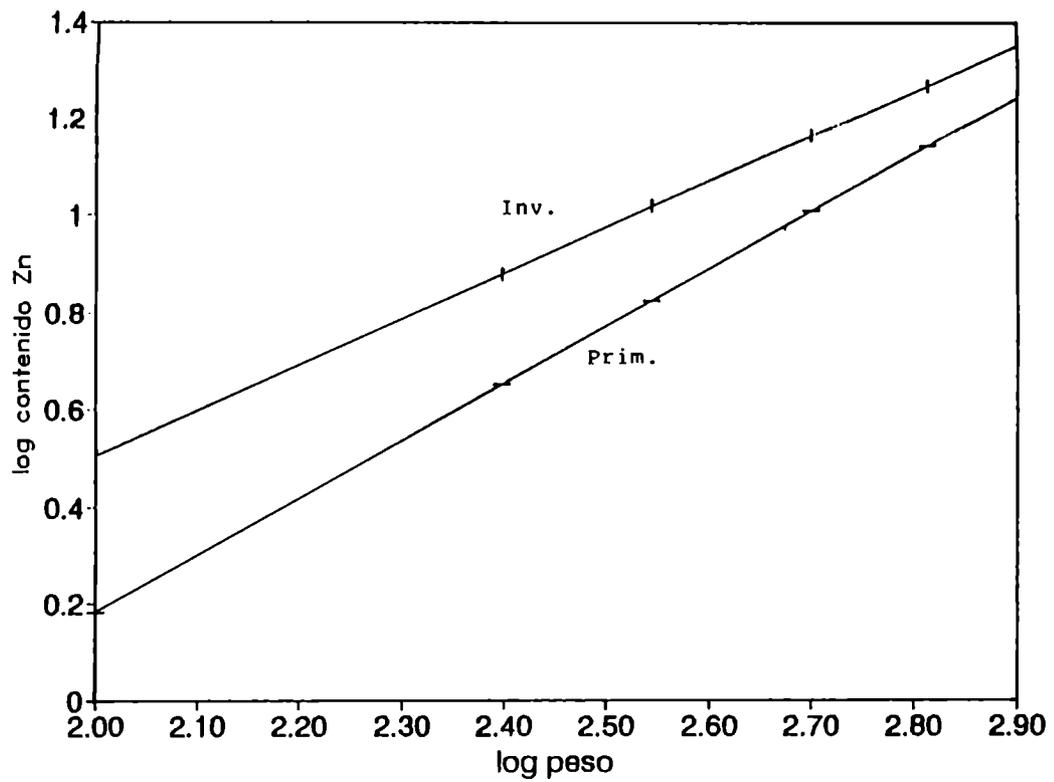
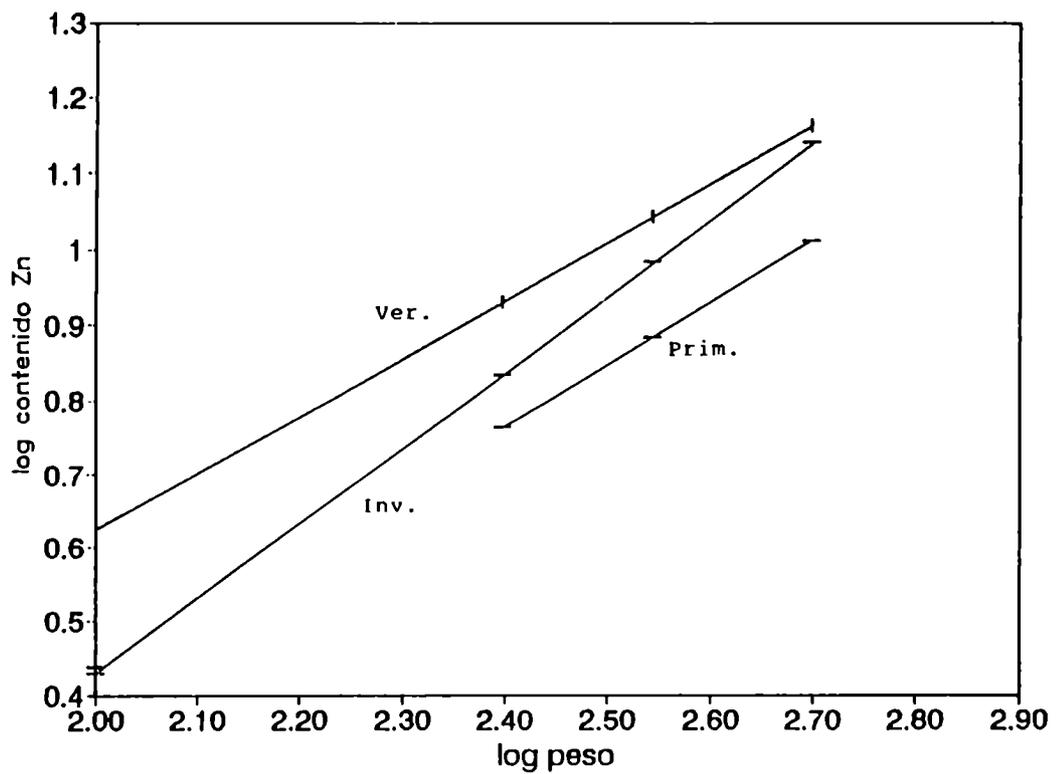


Fig.III.4.: Relaciones entre el contenido de plomo (ug) en función del peso (mg) del tejido blando total con y sin TGI, de bivalvos recolectados en Prim.'91.



A



B

Fig.III.5.: Relaciones entre el contenido de zinc (ug) en función del peso (mg) A: del tejido blando total, y B: del tej. blando libre de TGI, de bivalvos recolectados durante distintas temporadas.

En base a este estudio, se puede demostrar que para cadmio, en las muestras libres de tracto gastrointestinal, y para cobre, en ambos tipos de muestras, se verifica realmente un aumento en los niveles de concentración de ambos metales, los cuales no pueden ser atribuidos a las variaciones en el peso de los organismos en estudio.

Además, los resultados obtenidos para cadmio y plomo, ponen en evidencia la necesidad de eliminar el tracto gastrointestinal para poder evaluar la verdadera cantidad de esos metales unida a los tejidos blandos, tal como lo recomendaban Latouche y Mix (1982).

Por otra parte, los niveles de cromo y zinc en los organismos analizados no exhiben variaciones temporales apreciables durante las temporadas de estudio.

III.3.3.1. INFLUENCIA DEL AMBIENTE FÍSICO Y FACTORES DE BIOACUMULACIÓN

A continuación decidimos investigar si las variaciones observadas en los niveles de elementos metálicos en los moluscos bivalvos estudiados podían correlacionarse con cambios en los niveles ambientales de esos elementos.

Para ello, era necesario determinar los niveles de concentración en alguno de los subcompartimientos del sistema acuático. Por consiguiente, se analizaron muestras de sedimentos superficiales, recolectadas en el entorno de los bivalvos. Esta elección respondió a varias causas. En primer lugar, ya hemos discutido que los sedimentos reflejan con mejor precisión el grado de contaminación por elementos metálicos en sistemas acuáticos. Los análisis resultan más simples, rápidos y confiables, en relación a las determinaciones sobre la fase acuosa. Además, previamente otros autores no han podido obtener buenas correlaciones entre los niveles de contaminantes en muestras de aguas y los presentes en los tejidos blandos de organismos acuáticos, especialmente cuando se trata de especies del bentos (Mc Conchie y Lawrance, 1991; Díaz et al., 1992).

Los rangos de concentración así como los valores medios de elementos metálicos en las muestras de sedimentos se presentan en la Tabla III.7., mientras que en la Tabla III.8. se muestran los factores de bioacumulación resultantes.

En las muestras de sedimentos analizadas no se encontraron niveles de cadmio detectables. Por consiguiente, los factores de bioacumulación sólo pudieron ser estimados en base al límite de detección del elemento. Los valores resultantes fueron muy superiores a 1, aun cuando éstos han sido estimados a partir del contenido total extractable de cadmio en las muestras de sedimentos. Estos datos ponen de manifiesto que los organismos de N. limosa son capaces de acumular al metal en una proporción tal, que supera ampliamente los niveles ambientales. Según la literatura, está ampliamente comprobado el alto potencial de acumulación de cadmio en diversas especies acuáticas (Beijer y Jernelöv, 1986; Bewers et al., 1987; Mc Cracken, 1987; Mc Leese et al., 1987). Esta elevada acumulación, surgiría de una constante incorporación del elemento, el cual rápidamente se fijaría en los tejidos

Tabla III.7.: Rangos y valores promedios de concentración de elementos metálicos en muestras de sedimentos.

	Ver.'91 (n=11)	Inv.'91 (n=14)	Prim.'91 (n=11)
Cadmio ug.g ⁻¹	<0,01	<0,01	<0,01
Cobalto ug.g ⁻¹	1,4 - 3,4 2,7	1,8 - 5,4 3,2	1,8 - 5,9 3,6
Cobre ug.g ⁻¹	13,0 - 88,6 * 30,8	8,4 - 41,4 16,0	7,4 - 19,6 14,5
Cromo ug.g ⁻¹	3,4 - 11,5 * 7,9	2,3 - 5,4 * 4,2	7,2 - 15,9 9,2
Hierro mg.g ⁻¹	7,7 - 8,9 8,1	5,3 - 12,1 7,7	6,4 - 10,8 7,9
Níquel ug.g ⁻¹	3,7 - 8,6 6,2	3,0 - 6,0 4,8	3,4 - 10,9 6,2
Plomo ug.g ⁻¹	35,5 - 132,5 88,6	27,0 - 86,3 50,7	25,8 - 125,9 71,9
Zinc ug.g ⁻¹	36,5 - 137,2 69,9	37,5 - 89,6 56,9	41,4 - 98,6 63,7

* diferencias significativas entre ambas temporadas.

Tabla III.8.: Factores de bioacumulación.

	Ver.'91	Inv.'91	Prim.'91
Cadmio			
tej.total	- -	>36	>50
libre TGI	>20	>26	>53
Cobalto			
tej.total	- -	<0,063	<0,056
libre TGI	<0,074	<0,063	<0,056
Cobre			
tej.total	- -	0,86	2,03
libre TGI	0,41	0,71	1,58
Cromo			
tej.total	- -	0,21	0,09
libre TGI	0,12	0,17	0,08
Hierro			
tej.total	- -	- -	0,013
libre TGI	0,016	0,017	0,015
Níquel			
tej.total	- -	0,094	<0,081
libre TGI	0,055	<0,092	<0,071
Plomo			
tej.total	- -	0,016	0,031
libre TGI	<0,006	<0,010	0,035
Zinc			
tej.total	- -	0,51	0,33
libre TGI	0,55	0,49	0,35

(- -): no determinado.

blandos, pero no sería prácticamente eliminado. Algunos autores han demostrado, en otras especies de bivalvos, que el cadmio no resulta ser fácilmente excretado, aun cuando los organismos hayan sido transferidos a un medio libre de contaminación durante lapsos de hasta tres meses (Chou y Uthe, 1991). Además, los bajos niveles del metal presentes en sedimentos confirmarían la hipótesis enunciada anteriormente para explicar por qué, en primavera, los organismos libres de tracto gastrointestinal tenían mayor contenido de cadmio, en relación a los análisis del tejido blando total. Lamentablemente, al no poder detectar al elemento en las muestras de sedimentos, no podemos establecer si dicho aumento responde a cambios ambientales que no pudimos percibir, o a algún factor fisiológico susceptible de variaciones estacionales. Al respecto, diversos autores han encontrado que el grado de acumulación de cadmio, en diversos moluscos, resulta más elevado durante primavera y otoño. Este hecho parece ser coincidente con el período de fertilidad de los organismos, durante el cual, mediante estímulos hormonales, se verificaría una inducción de metalotioneínas que fijarían al metal (Coimbra y Carraca, 1990; Díaz et al., 1992).

Los niveles de cobalto en las muestras de sedimentos no presentaron cambios muy apreciables durante las tres temporadas de estudio. Ya hemos señalado que este metal, a pesar de su rol esencial, no ha sido detectado en las muestras de tejidos blandos de bivalvos. Por consiguiente, los factores de acumulación sólo pudieron ser estimados en función del límite de detección del elemento en las muestras biológicas.

Los niveles de cobre en las muestras de sedimentos presentaron una tendencia decreciente a través del tiempo, especialmente marcada entre verano e invierno. Los niveles de concentración de este metal en los moluscos bivalvos exhibieron una tendencia inversa, con valores significativamente más altos en primavera. Por consiguiente, los factores de acumulación aumentaron a través del tiempo, registrándose valores superiores a 1 durante la primavera. Estos resultados parecen indicar que el nivel del metal en los organismos resultaría independiente de los que se encuentran en los sedimentos. Por lo tanto, la incorporación de cobre esta-

ría fundamentalmente dominada por factores fisiológicos. Además, los procesos de absorción superarían a los de excreción, por cuanto no se observó un descenso de cobre en los bivalvos cuando disminuyeron los niveles en las muestras de sedimentos. Según el reporte de Chou y Uthe (1991), este metal, al igual que el cadmio, tampoco resulta ser fácilmente eliminado de los tejidos blandos de bivalvos. Los máximos valores de concentración también se registraron en primavera. Por consiguiente, estos resultados demuestran que el cobre presentaría un comportamiento muy similar al del cadmio.

En las muestras de sedimentos, los niveles de cromo presentaron un descenso significativo durante el invierno, mientras que entre verano y primavera no se encontraron diferencias apreciables. Como el contenido del elemento en los organismos no sufrió modificaciones apreciables durante las distintas temporadas, los factores de bioacumulación, en invierno, resultaron ser aproximadamente el doble que los registrados en verano y primavera. Además, dichos factores resultaron ser menores de 1, por consiguiente, sólo una escasa proporción del elemento asociado a las partículas de sedimentos estaría biodisponible, para ser efectivamente incorporado por los organismos. Por lo tanto, los niveles de cromo en los bivalvos no se vieron modificados por las variaciones registradas en las muestras de sedimentos. Además, estos resultados parecen indicar que una vez incorporado en los organismos, el elemento no sería fácilmente excretado, aun cuando descendan los niveles en sedimentos.

Los niveles de hierro en muestras de sedimentos no exhibieron variaciones significativas durante las tres temporadas de estudio. Ya hemos discutido que el contenido de este metal en los moluscos bivalvos resultó altamente variable, sin que mediaran causas evidentes para su interpretación. Los factores de bioacumulación resultaron considerablemente bajos, reflejando una escasa biodisponibilidad de este elemento.

Los niveles de níquel en sedimentos resultaron ligeramente más bajos en invierno, mientras que fueron comparables en las temporadas verano y primavera. Así, el descenso observado en invierno

parecería estar correlacionado con la disminución en el contenido de níquel en las muestras de tejido total libres de tracto gastrointestinal, por cuanto una cierta proporción de ellas arrojó valores no detectables. Sin embargo, esta proporción siguió aumentando durante primavera, cuando los valores en sedimentos alcanzaron nuevamente a los registrados en el verano. Los factores de acumulación, en muchos casos, sólo pudieron ser parcialmente estimados en base al límite de detección, y reflejan también una escasa biodisponibilidad del metal.

En sedimentos, se observó una ligera disminución en los niveles de plomo durante el invierno, mientras que los valores en verano y primavera fueron comparables. Los niveles del metal en el tejido blando total de los bivalvos experimentaron un significativo aumento en primavera. Dicho aumento resultó más notorio en los organismos libres de tracto gastrointestinal, puesto que se pasó de niveles no detectables, en verano e invierno, a valores perfectamente cuantificables. Además, este incremento no puede atribuirse exclusivamente al aumento de plomo en los sedimentos, del invierno a la primavera, ya que estos últimos no fueron significativamente diferentes a los valores registrados en verano. En otros moluscos, también se ha encontrado que la acumulación de plomo resultaba mayor en primavera, en comparación con las temporadas verano e invierno, aunque se desconocen las posibles causas (Díaz et al., 1992).

Por otra parte, en base a los elevados niveles de plomo en las muestras de sedimentos, se confirmaría la hipótesis enunciada anteriormente para explicar las importantes diferencias entre los organismos analizados con y sin tracto gastrointestinal. El mayor contenido del metal que presentaron los primeros, sería consecuencia de las partículas que transitoriamente estarían presentes en el sistema digestivo; pero, a partir de las cuales, sólo una escasa proporción del elemento llega a ser verdaderamente absorbida por los tejidos blandos. Los bajos valores obtenidos en los factores de bioacumulación, demostrarían la escasa biodisponibilidad de este metal.

Los niveles de zinc en sedimentos mostraron una cierta variabilidad, pero no se observaron diferencias significativas durante

las tres temporadas de estudio. En los bivalvos, tampoco se encontraron variaciones significativas. Los factores de acumulación indicarían que aproximadamente entre un tercio y la mitad del zinc asociado a los sedimentos resultaría biodisponible.

Teniendo en cuenta estos resultados, no se han obtenido buenas correlaciones entre el contenido total extractable de elementos metálicos en sedimentos superficiales y los niveles observados en los tejidos blandos de los bivalvos, salvo frente a unos pocos metales y únicamente en forma parcial.

Las correlaciones parciales se encontraron frente a níquel, por los descensos entre verano e invierno, y frente a plomo, en relación a los aumentos entre invierno y primavera. Pero aún en estos casos, las correlaciones se pierden al incorporar simultáneamente el análisis de la tercer temporada de estudio.

Es justo destacar, sin embargo, que frente a algunos elementos, especialmente cadmio, cobalto, y en algunos casos níquel y plomo, no se pueden efectuar correlaciones concluyentes, al no obtener valores detectables en algunas de las dos clases de muestras. Por otra parte, suele ser muy difícil evaluar la fracción de elementos asociada a los sedimentos efectivamente biodisponible para los organismos (Arjonilla et al., 1994).

De este modo, los aumentos en el contenido de cadmio, cobre y plomo, en los tejidos blandos de los bivalvos, observados en primavera, parecen ser debidos fundamentalmente a factores fisiológicos, que conducirían a una mayor incorporación o fijación de dichos metales, en concordancia con los reportes de otros autores. Además, elementos como el cadmio y cobre, una vez incorporados, se eliminarían muy lentamente.

Los niveles de cromo en los moluscos se mantuvieron considerablemente constantes a través del período de estudio, a pesar de las variaciones que se encontraron en las muestras de sedimentos. En cambio, frente al zinc no se observaron modificaciones en los niveles presentes en los organismos, como tampoco en los sedimentos.

En principio, la disminución de níquel en los bivalvos no parece tener una explicación evidente, pero podría ser consecuencia de un descenso en su incorporación, ya sea por menores niveles del metal biodisponible a partir de los sedimentos, o por cues-

tiones de competencia frente a los otros metales.

El estudio de los factores de bioacumulación revela el enorme potencial de los bivalvos N. limosa para concentrar cadmio; mayor incluso, que el observado en el hepatopáncreas del gastrópodo A. insularum (III.3.2.). El orden de acumulación para estos bivalvos resultaría ser el siguiente:

Cd >> Cu > Zn > Cr > Fe, Ni, Pb, Co

Guthrie et al. (1979) encontraron un orden bastante similar (Cd > Zn > Cu > Cr > Fe) en cierta especie de almeja marina, aunque para todos los elementos analizados en dicho reporte, los factores de acumulación resultaron menores de 1.

III.3.3.2. ESTUDIOS COMPLEMENTARIOS

El estudio anterior permitió demostrar que el fenómeno de bioacumulación no depende solamente de los niveles de contaminantes presentes en el ambiente físico, sino también de las características particulares de los procesos de absorción, distribución, metabolismo y eliminación que se verifican para cada sustancia en un dado organismo.

Así, mientras que el cadmio no fue detectado en las muestras de sedimentos, los factores de bioacumulación fueron muy superiores a uno. Como contrapartida, durante las temporadas verano e invierno de 1991 no se detectó plomo en los tejidos blandos de N. limosa libres de tracto gastrointestinal, a pesar de los niveles relativamente altos que se encontraron en los sedimentos.

En los análisis de muestras de aguas, si bien fueron efectuados durante verano e invierno de 1989, tampoco se detectó cadmio. En cambio, los niveles de plomo fueron cuantificables, oscilando entre 2,4 y 58,6 ug.L⁻¹ (Tabla I.5.)

Sadig y Alam (1989) tampoco detectaron plomo en los tejidos blandos totales de ciertas ostras marinas de las costas del Golfo de Arabia. Sin embargo, los niveles que se encontraron en las muestras de sedimentos no superaron 1,28 ug Pb.g⁻¹, mientras que los rangos observados en nuestro trabajo fueron de 27,0 a 132,5 ug.g⁻¹, considerablemente mayores.

Algunos reportes señalan que numerosos elementos metálicos han sido detectados en las valvas de distintas especies de moluscos y en el exoesqueleto de crustáceos. Teniendo en cuenta que el carbonato de calcio es el principal componente de esas estructuras, se ha sugerido que durante la formación y crecimiento de las valvas, los organismos pueden incorporar ciertos cationes divalentes, en reemplazo de Ca²⁺, especialmente en ambientes deficientes de éste. Por ello, diversos estudios se han encarado a fin de evaluar la posibilidad de emplear las valvas como indicadores de contaminación. Se considera, incluso, que los análisis efectuados sobre las líneas de crecimiento permitirían estimar la evolución histórica de muchos metales contaminantes (Carell et al., 1987; Gårdenfors et al., 1988).

Por consiguiente, decidimos determinar los niveles de concentración de cadmio y plomo en muestras de valvas de N. limosa

recolectadas en invierno'91. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla III.9. Se incluyen también los valores de concentración de ambos metales en los tejidos blandos, para facilitar la discusión.

Tabla III.9.: Rangos y valores medios de concentración de cadmio y plomo en distintos tejidos de N. limosa.

	Cadmio ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	Plomo ($\mu\text{g.g}^{-1}$)
tej.blando		
total	0,33-0,41	0,67-1,23
(n=55)	0,36	0,83
tej.blando		
libre TGI	0,22-0,30	<0,5
(n=50)	0,26	
valvas	<0,02	0,52-0,75
(n=15)		0,64

Los análisis en valvas demostraron una situación prácticamente opuesta a la observada en los tejidos blandos. En esas estructuras el cadmio no fue detectado. Su nivel de concentración resultaría ser, por lo menos, 10 veces menor al presente en los tejidos blandos de N. limosa. Contrariamente, otros autores reportaron que las valvas de bivalvos de agua dulce pueden llegar a acumular a este metal en una proporción similar a la de los tejidos blandos (Mc Cracken, 1987).

En cambio, los niveles de concentración de plomo en las valvas resultaron prácticamente del mismo orden que los registrados en el tejido blando total. Otros estudios indican que los niveles de

este metal en estas estructuras calcáreas resultan similares, o incluso ampliamente mayores, a los registrados en los tejidos blandos de moluscos y crustáceos. Además, en ciertos casos, los niveles de plomo presentes en valvas se han podido correlacionar con los presentes en las muestras de sedimentos (WHO, 1989).

Estos hechos adquieren una relevancia tal que, en algunos casos, escapa a la problemática estrictamente ambiental. Se ha demostrado que algunos suplementos terapéuticos de calcio, preparados a partir de las valvas de ostras y almejas, pueden llegar a tener niveles de plomo peligrosos para la salud, principalmente para la población infantil y cuando son empleados en tratamientos prolongados (Bourgoin et al., 1992).

Ya hemos discutido que las diferencias en los niveles de plomo observadas entre los organismos analizados con y sin tracto gastrointestinal, podían atribuirse a la asociación de este metal a las partículas de sedimentos, accidentalmente ingeridas por los bivalvos. Depledge y Rainbow (1990) han sugerido que el tracto gastrointestinal actuaría como un órgano de almacenamiento temporario, a partir del cual, y mediante procesos aún no bien establecidos, el plomo resultaría eliminado de los tejidos blandos, pero una parte considerable sería distribuida en las valvas. Nuestros resultados parecen confirmar ampliamente esta hipótesis.

En cuanto al cadmio, su distribución preferencial en los tejidos blandos estaría fundamentalmente dominada por los distintos sistemas de captación del metal que operan a nivel celular. O sea, mediante su unión a metalotioneínas, compartimentalización en el sistema lisosomal o en gránulos. Estos procesos serían predominantes en los bivalvos de N. limosa, de modo tal que no queda metal disponible para distribuirse en las valvas.

III.3.3.3. COMPARACIÓN CON REPORTES BIBLIOGRÁFICOS

En la Tabla III.10 se presentan rangos o valores medios de concentración de elementos metálicos en organismos bivalvos reportados por otros autores. Conviene resaltar que en todos los casos, los valores allí consignados corresponden a análisis del tejido blando total de bivalvos de ambientes costeros marinos. Comparativamente, hay mayor cantidad de trabajos sobre dichos organismos, en relación a los disponibles en organismos de sistemas de estuarios o de agua dulce.

Los rangos de concentración que figuran sobre el presente trabajo, corresponden a los resultados obtenidos durante las tres temporadas, ya que las comparaciones que puedan efectuarse tendrán únicamente un valor orientativo.

En líneas generales, de la Tabla III.10 se puede observar una cierta y previsible variabilidad en los datos, ya que se trata de especies y ambientes diferentes.

En relación al cadmio, los valores registrados para N. limosa se encuentran, en general, dentro de los rangos documentados por otros autores, siendo menores que el promedio reportado por Chou y Uthe (1991) en mejillones de la costa de Canadá.

Para cobre, en cambio, se han obtenido valores más altos que los reportados en la mayoría de los trabajos citados. Únicamente en ostras de las costas del Reino Unido se observaron niveles similares.

Para cromo y níquel hay pocos datos, pero éstos son similares a los que presentaron los bivalvos del Río de la Plata. Lo mismo sucede con respecto al hierro, pero el rango en éstos últimos es más amplio.

En relación al plomo, los valores registrados en N. limosa figuran entre los más altos, especialmente por el aumento observado durante la última temporada del presente monitoreo. Vale la pena mencionar que el promedio obtenido por Chou y Uthe (1991) corresponde a mejillones costeros recolectados en la vecindad de una fundición de plomo.

En el caso del zinc, los valores obtenidos en los bivalvos del Río de la Plata, resultan intermedios a los reportados en la literatura.

Tabla III.10: Niveles de elementos metálicos en bivalvos de distintos sistemas acuáticos.

	Cadmio ug.g ⁻¹	Cobre ug.g ⁻¹	Cromo ug.g ⁻¹	Hierro ug.g ⁻¹	Níquel ug.g ⁻¹	Plomo ug.g ⁻¹	Zinc ug.g ⁻¹
Reino Unido (a)							
ostras	<0,2 -1,4	10-88	<0,2 -0,4			<0,2 -0,8	100-180
mejillones	<0,2 -0,7	0,8 -2,0	3,0			0,4 -2,0	10-20
almejas	<0,2	2,0	- -			0,2	27
Filipinas (b)							
especies varias	0,045-0,400	2,38-5,00				0,078-0,122	10,4-23,7
Golfo Arabia (c)							
ostras	0,09-5,57	0,34-8,83	no det.	13,8-86,8	<0,03-0,56	no det.	55 -1189
Canadá (d)							
mejillones	2,64+0,64	1,56+1,07		33,3+6,0		2,08+1,84	34,1+18,9
<u>N. limosa</u>	0,13-0,67	7,6-39,4	0,49-1,31	29,7-401,1	<0,10-0,80	<0,5-3,86	16,9-47,4

(a): Murray, 1981. (b): Hungspreugs, 1988. (c): Sadig y Alam, 1989. (d): Chou y Uthe, 1991.

- -: no determinado; no det.: no detectado.

CAPITULO IV

Bioensayos

IV.1. INTRODUCCIÓN

Tal como ya hemos mencionado, se recurre a los bioensayos en procura de resolver diferentes objetivos. Por consiguiente, la selección y la implementación de un cierto tipo de ensayo, dependerá justamente de los objetivos perseguidos, así como también de la disponibilidad de recursos y de los requerimientos del organismo empleado (APHA-AWWA-WPCF, 1980; US EPA, 1991).

En esta etapa, el objetivo general consistió en el estudio de algunas respuestas biológicas de organismos invertebrados, principalmente de una especie de molusco bivalvo, por exposición aguda a distintas soluciones de cadmio o plomo. Por ende, antes de pasar al detalle de las experiencias realizadas, trataremos de describir los distintos tipos de bioensayos y las pautas generales que deben seguirse en su diseño experimental.

TIPOS DE BIOENSAYOS

En estudios agudos, existen tres tipos de condiciones para realizar un bioensayo (APHA-AWWA-WPCF, 1980; FAO, 1982 y 1987; US EPA, 1991; Metcalfe, 1993):

- * **estáticos**, sin renovación, en los cuales los organismos son expuestos a una misma solución durante el tiempo que dura el ensayo.
- * **estáticos con renovación**, cuando la solución se reemplaza por otra análoga cada cierto intervalo.
- * **flujo continuo**, cuando la solución se bombea en forma continua a través del sistema.

Los sistemas estáticos son relativamente fáciles de montar y mantener en un laboratorio medianamente equipado; no requieren grandes espacios, ni son muy costosos. Sus principales desventajas consisten en una posible depleción del O₂ disuelto, como consecuencia de la demanda biológica del sistema, y las posibilidades de pérdidas en las concentraciones nominales de las sustancias tóxicas a ensayar, ya sea por volatilización o por adsorción a las paredes del recipiente. Incluso, pueden presentarse problemas a causa de la degradación del tóxico o por cambios en la

composición química del medio. Por consiguiente, se pueden obtener resultados que subestimen la verdadera toxicidad de la sustancia a ensayar (Schreck & Brouha, 1975; FAO, 1982 y 1987; US EPA, 1991).

Los sistemas estáticos con renovación minimizan en parte estos inconvenientes que acabamos de detallar para los ensayos sin renovación, pero pueden inducir un factor adicional de estrés en los organismos, debido a su mayor manipulación (FAO, 1982 y 1987; US EPA, 1991).

Obviamente, los sistemas de flujo continuo permiten una evaluación más representativa, pero requieren de mayor espacio y de un equipamiento costoso. En base a estas consideraciones, es fácil comprender las razones por las cuales los sistemas estáticos han sido mucho más difundidos, aún en laboratorios de distintas partes del mundo y hasta nuestros días.

SELECCIÓN DE LOS ORGANISMOS

La selección de los organismos a ser empleados en los bioensayos predictivos se basa en una serie de criterios, entre los que se destacan los siguientes (APHA-AWWA-WPCF, 1980; FAO, 1981 y 1987):

- disponibilidad de los mismos
capacidad de adaptación a las condiciones de laboratorio.
- adecuada relación entre el tamaño de los organismos y el equipamiento experimental.

conocimientos básicos acerca de su biología, especialmente en relación a su identificación taxonómica, ciclo de vida, hábitos alimenticios, reproducción, desarrollo y comportamiento.

Diversas especies de organismos acuáticos han sido empleadas.

Los grupos más recomendados incluyen:

- * algunas especies de algas,
- * zooplancton o fitoplancton,
- * anélidos
- * crustáceos
- * moluscos
- * equinodermos
- * peces

* insectos

(Sprague, 1969; Buikema et al., 1980; Fremling y Mauck, 1980; Reish, 1980; FAO, 1981, 1982 y 1987).

A pesar de que diversas especies de invertebrados se han empleado con mayor frecuencia que de peces, en los monitoreos biológicos de campo, su uso en bioensayos de laboratorio fue considerablemente menos frecuente. Sin embargo, razones de índole ecológica, y también económicas en algunos casos, aconsejan el estudio de los invertebrados. Estos organismos constituyen una importante porción de la biomasa acuática. Por ende, los efectos adversos que sufran como consecuencia de la presencia de sustancias químicas contaminantes, pueden alterar significativamente la estructura y la funcionalidad de los ecosistemas; ya sea porque disminuya la población de aquellas especies económicamente valiosas, o porque se afecte la disponibilidad de alimentos para los organismos superiores (Maciorowski y Clarke, 1980).

Como hemos visto, los invertebrados conforman un conjunto de organismos que presentan una muy amplia y variada diversidad ecológica, fisiológica y morfológica. Por lo tanto, pueden exhibir también un rango de respuestas muy amplio frente a los mismos contaminantes. Algunas de estas respuestas, justamente resultan de atributos específicos de estos organismos. Así, se han diseñado bioensayos que evalúan el movimiento ciliar en protozoos, el grado de filtración o la frecuencia de apertura de valvas, en moluscos bivalvos (Maciorowski y Clarke, 1980; Kramer et al., 1989).

Existen, además, algunas ventajas prácticas en el uso de algunos de estos organismos en bioensayos. Los macroinvertebrados resultan muy adecuados por cuanto poseen un tamaño casi ideal, ya que no se requiere de microscopios para visualizarlos, como en el caso de trabajar con fitoplancton, zooplancton u otros microinvertebrados. Por otra parte, requieren de menor espacio y equipamiento que al trabajar con peces; por ende, los ensayos resultan más prácticos y económicos (Maciorowski y Clarke, 1980; FAO, 1987).

La principal desventaja del uso de invertebrados en bioensayos reside en el hecho de que aún no se ha logrado, en muchas especies, la adecuada mantención y, por sobre todo, la reproducción en condiciones de laboratorio. Esto, en parte, es consecuencia de nuestra falta de conocimiento sobre los aspectos básicos de sus

requerimientos fisiológicos o ecológicos. En otros casos, los organismos adoptan un comportamiento agresivo, llegando incluso al canibalismo, por lo que se malogran los cultivos (Maciorowski y Clarke, 1980).

En estos casos, se debe recurrir al empleo de organismos recolectados en la naturaleza. Esto trae aparejado otros inconvenientes. Ya hemos señalado que la sensibilidad de los organismos frente a los tóxicos puede estar influenciada por exposiciones previas, cuando se verifica una adaptación o aclimatación fisiológica. Por consiguiente, se recomienda que los organismos procedan de la misma zona y que se encuentren en idéntico estado de salud (Maciorowski y Clarke, 1980; FAO, 1981 y 1982).

En todos los casos, se trate de organismos recolectados en la naturaleza o criados en laboratorio, los individuos seleccionados para las experiencias deberán ser del mismo sexo, tamaño o edad y estado fisiológico (FAO, 1981 y 1982).

RECOLECCIÓN Y TRANSPORTE DE MOLUSCOS BIVALVOS

En líneas generales, la recolección y el transporte de los organismos debe efectuarse de forma tal de minimizar todo posible daño o trauma fisiológico, de manera de mantenerlos en óptimas condiciones. En zonas costeras, y aprovechando la marea baja, el proceso puede realizarse con relativa facilidad en forma manual; descartando aquellos organismos que tengan rotas sus valvas, o no las cierren rápidamente durante la manipulación. Los animales se colocan en baldes plásticos, con suficiente nivel de agua, obtenida del propio sistema acuático, evitando colocar un número excesivo por balde y todo posible contacto con la atmósfera. También deben evitarse cambios bruscos de temperatura, especialmente durante su transporte (APHA-AWWA-WPCF, 1980; FAO, 1981, 1982 y 1987).

ACLIMATACIÓN DE LOS ORGANISMOS

Una vez en el laboratorio, los bivalvos son suavemente lavados, para remover todo tipo de material que pueda estar adherido a sus valvas, cuidando de no dañarlos. Se descartarán todos los

animales que no se encuentren en condiciones saludables. A continuación son transferidos a recipientes de tamaños adecuados, que tengan una amplia superficie de contacto con la atmósfera, y aireados mediante una bomba impulsora de aire, para asegurar la correcta oxigenación. Se aconseja el empleo de recipientes de aproximadamente 30 x 60 cm., con unos 10 cm. de profundidad de agua, en los que se disponen hasta 20 animales en cada uno de ellos, ya que los bivalvos no tienen hábitos de canibalismo. En estas condiciones pasarán por el período de aclimatación. Si se produjera la mortalidad de entre un 10 al 20 % de los organismos, durante los dos primeros días posteriores a su recolección, el lote, en su conjunto, deberá descartarse. El período de aclimatación recomendado para moluscos varía desde 2 a 7 días, según los autores (APHA-AWWA-WPCF, 1980; FAO, 1981, 1982 y 1987).

La temperatura debería mantenerse lo más constante posible, siendo conveniente que la habitación posea aire acondicionado. No deberían producirse cambios bruscos, las posibles variaciones no deberían sobrepasar los 5°C, en un lapso de 24 horas, en forma gradual (APHA-AWWA-WPCF, 1980; FAO 1981 y 1982).

Usualmente se recomienda un fotoperíodo de 12 horas, y en lo posible luz natural, disponiendo las peceras y recipientes cerca de una ventana (FAO, 1981 y 1987).

No es necesario alimentar a los bivalvos durante el período de aclimatación, siempre y cuando éstos sean usados dentro de los 7 a 10 días posteriores a su recolección (FAO, 1987).

Se considera que los bivalvos se encuentran en condiciones saludables cuando sus valvas se encuentran ligeramente separadas, en ausencia de todo tipo de perturbación. En cambio, frente a cualquier estrés reaccionan rápidamente, cerrando firmemente sus valvas. Los organismos moribundos han perdido esa capacidad de reacción, mientras que los ya muertos presentan sus valvas abiertas (FAO, 1987).

TIPOS DE AGUA A EMPLEAR EN LOS BIOENSAYOS

Durante el período de aclimatación, así como para la preparación de las diluciones de los tóxicos a ensayar, idealmente las propiedades físico-químicas del agua a emplear deberían corresponderse con las del medio acuático natural. Como este propósito

no siempre puede lograrse, al menos se debería conseguir que los animales sobrevivan aceptablemente durante los períodos correspondientes (FAO, 1981 y 1982).

Para el caso de organismos provenientes de sistemas dulceacuíferos, se aconseja entonces el empleo de agua potable de la canilla. Cuando se trata de suministros a través de redes municipales, se hace necesaria su aereación durante un lapso mínimo de 24 horas, para favorecer la eliminación de residuos clorados (FAO, 1987).

Teniendo en cuenta que la calidad de las aguas, especialmente en cuanto a su pH, alcalinidad, conductividad, dureza y contenido de compuestos orgánicos o inorgánicos, así como de potenciales sustancias tóxicas (plaguicidas, entre otras) puede ser muy variable, se recomienda analizar previamente sus valores. No debe olvidarse que todos esos valores van a tener una importante, y a veces hasta decisiva, influencia en la toxicidad de la sustancia a ensayar. En lo posible, conviene también verificar regularmente esos valores (FAO, 1981 y 1987; US EPA, 1991).

Para la eliminación de las potenciales sustancias tóxicas, principalmente aquellas de origen orgánico, como plaguicidas, algunos autores han realizado un proceso de filtración del agua a través de carbón animal (Doherty et al., 1987).

No obstante, otros autores han empleado las aguas obtenidas de los sistemas acuáticos naturales para sus bioensayos (Watton y Haukes, 1984; Mackie, 1989). En estos casos, la toxicidad resultante de un dado contaminante en estudio, estará sujeta a las posibles interacciones con los diversos compuestos, orgánicos o inorgánicos, que estén presentes.

ESTUDIOS REALIZADOS

Ahora que ya han sido señalados los distintos aspectos involucrados en la implementación de los bioensayos, pasaremos a enunciar los estudios específicos realizados para el presente capítulo:

* Bioensayos agudos con algunos invertebrados acuáticos:

- Estudios de letalidad por exposición a soluciones de cadmio o plomo.
- Estudios de bioacumulación por exposición a soluciones de cadmio.

* Bioensayos agudos con moluscos bivalvos:

- Influencia de los ácidos húmicos en la toxicidad del cadmio o plomo.
- Efectos del cadmio o del plomo sobre los niveles de glucógeno.
- Efectos del cadmio o del plomo sobre los niveles de grupos tioles.

IV.2. MATERIALES Y MÉTODOS

IV.2.1. Organismos seleccionados

Se emplearon dos especies de gastrópodos: Biomphalaria glabrata y Ampullaria canaliculata. Los organismos fueron suministrados por el Dr. Daniel E. Nahabedian, del Laboratorio de Invertebrados, Depto. de Ciencias Biológicas, FCEN, UBA; dirigido por el Prof. Dr. Humberto J.A. Moretto. Los mismos habían sido criados y mantenidos en condiciones de laboratorio, estaban alojados en peceras provistas de aireación y eran alimentados con hojas de lechuga "ad libitum", tal como se recomienda en la literatura (Aloisi et al.,1991; Fried et al.,1992). Se emplearon ejemplares adultos de B. glabrata (especie hermafrodita), con un tamaño promedio de 22,8 mm de diámetro y 6,9 mm de altura. Los organismos de A. canaliculata eran juveniles, por consiguiente sexualmente aún no diferenciados, y sus dimensiones promedios fueron de 28,4 mm de diámetro; 20,9 mm de alto y 15,4 mm de ancho de abertura, respectivamente.

Se emplearon también moluscos bivalvos de la especie Neocorbicula limosa, recolectados de la naturaleza, en la zona del Parque Ecológico, Costanera Sur, Buenos Aires, entre los meses de noviembre de 1992 a febrero de 1993. Para su recolección y transporte se siguieron las condiciones generales recomendadas en la literatura y ya reseñadas en la introducción de este capítulo. Se utilizaron ejemplares adultos de N. limosa (especie hermafrodita) cuyo largo de valvas promedio fue de $26,2 \pm 0,8$ mm.

Una vez en el laboratorio, los bivalvos fueron transferidos a recipientes plásticos, adecuadamente prelavados, de aproximadamente 30 cm de ancho, 60 cm de largo y 20 cm de alto, conteniendo un nivel de unos 10 cm de alto de medio acuoso. Las bandejas fueron dispuestas cerca de una ventana, de manera tal que los organismos recibieran luz natural (fotoperíodo de aproximadamente 14/10 hs), provistas de aireación. Durante el período de aclimatación, de 7 a 10 días, los organismos no fueron alimentados.

IV.2.2. Medio acuoso

Tanto sea durante el período de aclimatación, como para la

preparación de las soluciones de los bioensayos, se utilizó agua corriente de red. La misma fue desclorada previamente, por un período de al menos 24 hs, dejándola reposar en bandejas plásticas, similares a las utilizadas para la aclimatación de los organismos. Seguidamente fue filtrada a través de una columna de carbón animal, lana de vidrio y papel de filtro (Doherty et al., 1987).

A continuación se determinaron las siguientes propiedades físico-químicas: pH, alcalinidad, dureza y conductividad, empleando los equipos o las técnicas analíticas adecuadas. Los valores obtenidos se presentan a continuación:

- * pH (mediante pH-metro): $7,0 \pm 0,2$.
- * alcalinidad (método OSN, 1970): $28,8 \pm 1,1 \text{ mg CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$.
- * dureza (método OSN, 1967): $66,8 \pm 0,4 \text{ mg CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$.
- * conductividad (mediante conductímetro): $250 \pm 17 \text{ uS}$.

Según la literatura, se considera que dichas propiedades, especialmente las tres primeras, son las que pueden ejercer mayor influencia en los resultados de los bioensayos de toxicidad (Hamilton et al., 1989).

IV.2.3. Bioensayos

En todos los casos se practicaron bioensayos estáticos, realizados en forma aguda por un lapso de 96 hs. Este tipo de bioensayos resulta apropiado cuando se emplean soluciones de contaminantes metálicos no volátiles, como cadmio o plomo, y ha sido ampliamente utilizado en diversos estudios (Hilmy et al., 1987; Mackie, 1989; Grippo y Dunson, 1991; Wan et al., 1992).

Se emplearon bandejas plásticas de 3 L de capacidad, prelavadas con solución 1 % de HNO_3 , v/v, y enjuagadas con abundante agua destilada y luego agua de dilución. Se colocaron de cuatro a cinco organismos, de similar tamaño, por recipiente, y un volumen de 1,5 L de solución (FAO, 1981).

A pesar que no se considera imprescindible para ensayos de 96 hs de duración (FAO, 1987), las bandejas fueron provistas de aireación. En ningún caso los organismos fueron alimentados (FAO, 1981 y 1987).

Las diluciones de cadmio se prepararon a partir de una solu-

ción conteniendo $1.000 \text{ mg Cd.L}^{-1}$, empleando $\text{CdCl}_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$ (Merck) en agua destilada.

En principio, las diluciones de plomo se prepararon a partir de una solución conteniendo $1.000 \text{ mg Pb.L}^{-1}$, empleando $\text{Pb (NO}_3)_2$ (Mallinckrodt) en agua destilada.

Dado que las soluciones resultantes de plomo presentaron un aspecto turbio, con gran cantidad de sólidos en suspensión y depósitos de sales (por cuestiones de insolubilidad) se decidió ensayar la preparación de las mismas a partir de otras sales y empleando aguas de diferentes propiedades, para su disolución.

Las sales alternativas que se probaron fueron: PbCl_2 (Merck) y $\text{Pb (CH}_3\text{COO)}_2 \cdot 3 \text{ H}_2\text{O}$ (Carlo Erba).

Los medios acuosos consistieron en:

- agua mineral comercial (pH = 7,6; alcalinidad $350 \text{ mg CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$; dureza $100 \text{ mg CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$ y conductividad 1250 uS).
- agua reconstituída según norma europea (pH = 6,6; alcalinidad $12 \text{ mg CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$; dureza $13 \text{ mg CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$ y conductividad 185 uS) (O.E.C.D., 1984).
- agua de napas subterráneas (pH = 7,9; alcalinidad $115 \text{ mg CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$; dureza $170 \text{ mg CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$ y conductividad 580 uS).

En ningún caso se consiguió mejorar apreciablemente la solubilidad del metal, según las lecturas de plomo practicadas por espectrofotometría de absorción atómica. Por consiguiente, en todos los bioensayos realizados se siguió el procedimiento inicialmente detallado.

Se emplearon ácidos húmicos [fórmula comercial para uso en laboratorio (Fluka)]. Las diluciones se prepararon pesando la cantidad apropiada; las mismas fueron filtradas antes de su utilización para eliminar vestigios insolubles.

Todas las sales y reactivos fueron de calidad p.a.

IV.2.4. Estudios de letalidad

Los organismos fueron observados cada 12 hs. Todos aquellos que se encontraban muertos eran retirados de las bandejas.

Para los moluscos gastrópodos, la falta de pulsación cardíaca

se adoptó como criterio de muerte. Para ello, los ejemplares que se mantenían aparentemente inmóviles, se colocaban bajo un microscopio para verificar el ritmo cardíaco. Esta operación fue supervisada por el Dr. Daniel E. Nahabedian.

Para los bivalvos, la falta de reacción para cerrar rápidamente sus valvas ante un ligero estímulo practicado con una varilla de vidrio, fue adoptado como criterio de muerte (FAO, 1981 y 1987).

Estos bioensayos se realizaron por triplicado y se consideraron válidos cuando no se verificó mortandad en los organismos controles, los cuales estaban expuestos únicamente al medio de dilución.

IV.2.5. Estudios de bioacumulación

Al término de los bioensayos de acumulación, los moluscos gastrópodos fueron sacrificados por congelamiento, a $T = 0 \text{ } ^\circ\text{C}$, durante 5-10 minutos (Bullough, 1981).

En el caso de los organismos de B. glabrata se analizó el tejido blando total conjuntamente con la conchilla, debido a la imposibilidad de separarla correctamente del primero, por tratarse de una estructura muy frágil.

Para los ejemplares de A. canaliculata se analizaron separadamente muestras de tejido blando total y del tejido duro.

Los organismos bivalvos fueron sacrificados mediante la apertura manual de sus valvas.

Los tejidos de los diferentes organismos fueron enjuagados con agua destilada, colocados sobre papel de filtro para eliminar el exceso de humedad y, luego, se pesaron.

El tratamiento y análisis de las muestras fueron practicados según se describió en III.2.2. En el caso de los bivalvos, las determinaciones de cadmio y plomo se realizaron únicamente en el tejido blando total.

IV.2.6. Determinaciones de glucógeno

Para los análisis de glucógeno, una vez sacrificados los bivalvos, se separó cuidadosamente el tejido blando total, se escurrió el exceso de humedad sobre papel de filtro y se pesó. Segui-

damente, el tejido fue homogeneizado en presencia de una solución de EDTA 0,02 M, a $T = 0^{\circ}\text{C}$, empleando un homogeneizador tipo Potter-Elvehjem provisto con émbolo de Teflon, llevando el volumen final a 10,0 mL. Para las determinaciones de glucógeno, se tomó una alícuota de 0,5 mL de dicho homogenato, mientras que el resto fue conservado a $T = -14^{\circ}\text{C}$, para los análisis de grupos tioles (IV.2.7).

Básicamente, las determinaciones se realizaron según la técnica descrita por la Dra. C.R. Krisman (1962). Sobre la alícuota se agregaron 2,0 mL de solución de KOH, 33 % p/v, y se calentó en baño de agua a $T = 100^{\circ}\text{C}$, durante 20 minutos. Una vez enfriado, se agregaron 3 volúmenes de $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ absoluto y se dejó en reposo en heladera, a $T = 4^{\circ}\text{C}$, hasta el día siguiente (aproximadamente 12 hs), a fin de asegurar la precipitación del glucógeno. Luego, el sobrenadante fue removido por centrifugación a 3000 rpm, durante 15 minutos, a $T = 4^{\circ}\text{C}$. El glucógeno precipitado fue lavado sucesivamente con $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ absoluto, acetona y finalmente éter etílico. A continuación, se disolvió en agua destilada. Una alícuota de 0,2 mL fue transferida a otro tubo, en el cual se agregaron 0,2 mL de solución saturada de ClNH_4 y 2,6 mL del reactivo de coloración. Dicho reactivo consistía en una solución de 0,5 mL de I_2/I^- en 130 mL de solución saturada de CaCl_2 , que se preparaba en el momento de uso. La solución de I_2/I^- se preparó a partir de 0,26 g de I_2 (sólido) y 2,6 g de IK, disueltos en 10 mL de agua destilada.

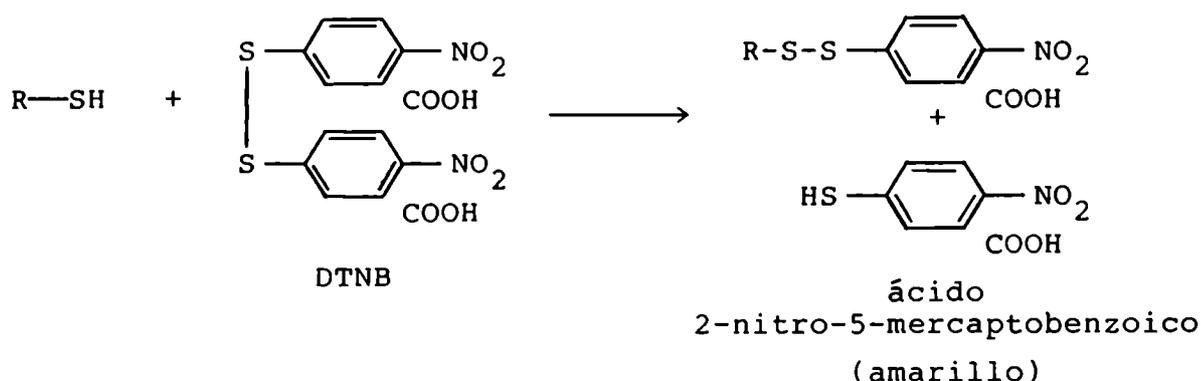
Seguidamente, se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a 460 nm de longitud de onda. La cuantificación del glucógeno fue realizada mediante una curva de calibración, empleando un preparado comercial de dicho polisacárido para fines comerciales, p. a., (Merck).

Para los análisis de glucógeno en pie, el tejido fue cuidadosamente seccionado del cuerpo blando de los bivalvos, empleando un bisturí. A continuación, se dejó escurrir el exceso de humedad y, una vez pesado, se colocó en un tubo de ensayos. Luego, se trató con solución de KOH, 33 % p/v, en relación 0,9 mL por cada 100 mg de tejido, aproximadamente. La mezcla se calentó en baño de agua ($T = 100^{\circ}\text{C}$), durante 20 minutos. Una vez enfriada, se agregaron 3 volúmenes de $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ absoluto, dejando reposar en heladera durante unas 12 hs aproximadamente. Una vez precipitado

el glucógeno, se siguió el mismo procedimiento que se acaba de detallar para su lavado y cuantificación.

IV.2.7. Determinaciones de grupos tioles

La determinación de grupos tioles en tejidos blandos totales de moluscos bivalvos, se basa en la técnica de Ellman, que consiste en la reducción del ácido 5,5'-ditiobis- (2-nitrobenzoico) (DTNB) por medio de los grupos SH-, para dar un compuesto coloreado, cuya absorbancia se puede determinar espectrofotométricamente, según la reacción general:



En este trabajo se empleó específicamente el método de Sedlak y Lindsay (1968), el cual consiste en una modificación de la técnica de Ellman, y permite la determinación de los grupos SH-totales y de los grupos SH-no proteicos.

Para la determinación de los grupos SH-totales se tomó una alícuota de 0,7 mL del homogenato preparado según IV.2.6. y se adicionaron:

- 1,5 mL de buffer Tris 0,2 M, a pH = 8,2, 0,02 M en EDTA.
- 0,1 mL de solución de DTNB, 0,01 M, en etanol absoluto, y
- 8,0 mL de etanol absoluto.

Paralelamente, se hicieron un blanco de reactivos, empleando 0,7 mL de agua destilada, y un blanco de homogenato (sin agregado de DTNB).

Los tubos se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos y, seguidamente, se centrifugaron a 3000 g, T = 4°C, durante otros 15 minutos. Sobre el sobrenadante, se midió la absorbancia a 412 nm de longitud de onda.

La curva de calibración se realizó a partir de una solución patrón conteniendo 1,5 mM de cisteína (pa, Merck). La linealidad fue demostrada para el rango de 0 a 30×10^{-8} moles de cisteína.

Todas las determinaciones se hicieron por duplicado.

Para la determinación de los grupos SH - no proteicos se tomó una alícuota de 5,0 mL de homogenato, preparado según IV.2.6., la cual se colocó en un tubo de ensayos. Se adicionaron 4,0 mL de agua destilada y 1,0 mL de solución acuosa 10 % de TCA, p/v, de manera de asegurar la precipitación de todas las proteínas, incluyendo las metalotioneínas (Veldhuizen-Tsoerkan et al., 1991). Se dejó reposar durante 15 minutos a temperatura ambiente, con agitación ocasional. Luego, la mezcla se centrifugó a 3000 g, durante otros 15 minutos. A continuación, se tomaron 2,0 mL del sobrenadante y se agregaron:

4,0 mL de buffer Tris 0,02 M, conteniendo 5 % de SDS y 0,02 M de EDTA, a pH = 8,2; y

0,1 mL de solución de DTNB, 0,01 M.

Nuevamente, se midieron las absorbancias empleando un espectrofotómetro a 412 nm de longitud de onda.

La cuantificación de los grupos SH - no proteicos se realizó a partir de una curva de calibración, empleando diluciones apropiadas de una solución patrón de cisteína de 1,5 mM. En este caso, se demostró una correcta linealidad para el rango de 0 a 12×10^{-8} moles de cisteína.

Los niveles de grupos SH - proteicos fueron calculados por medio de la diferencia entre los niveles de grupos SH - totales y los de grupos SH - no proteicos.

IV.2.8. Cálculos y Métodos estadísticos

Los factores de bioacumulación (FBA), en todos los casos, fueron calculados en función del valor nominal de concentración de cadmio o plomo en la solución del bioensayo, a partir de la siguiente expresión:

$$\text{FBA} = \frac{|\bar{x}| \text{ en tejidos biológicos}}{|\bar{x}| \text{ nominal en el agua del bioensayo}}$$

donde $|\bar{x}|$ = concentración de cadmio o plomo.

Para establecer si se verificaban o no diferencias significativas entre los niveles de concentración de glucógeno en pie o de grupos tioles (totales, no proteicos y proteicos) en el tejido blando total, se aplicó la prueba de análisis de varianzas (ANOVA), al nivel $p < 0,05$ (Sokal y Rohlf, 1969).

IV.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.3.1. BIOENSAYOS AGUDOS CON ALGUNOS INVERTEBRADOS ACUÁTICOS

IV.3.1.1. ESTUDIOS DE LETALIDAD

En la Tabla IV.1. se detallan los porcentajes de mortalidad obtenidos para las especies de moluscos analizadas, expuestas a diversas concentraciones de cadmio o a una de plomo.

Tabla IV.1.: Porcentajes de mortalidad de moluscos por exposición a Cd o Pb en bioensayos agudos (t = 96 hs).

nivel de Cd (mg.L ⁻¹)	<u>B. glabrata</u> (n=15)	<u>A. canaliculata</u> (n=15)	<u>N. limosa</u> (n=15)
control	0 %	0 %	0 %
0,05	0 %	0 %	- -
0,30	0 %	0 %	- -
0,60	0 %	0 %	- -
2,50	100 %	100 %	0 %
10,0	- -	- -	0 %
25,0			0 %
50,0			0 %

nivel de Pb (mg.L ⁻¹)			
control	0 %	0 %	0 %
30,0	0 %	0 %	0 %

(- -): no determinado

En ningún caso se registró mortalidad en los bioensayos controles. Pero antes de apresurarnos por intentar analizar los resultados de dicha Tabla, resulta necesario señalar algunas consideraciones. En primer lugar, los organismos de A. canaliculata eran juveniles, mientras que en las otras dos especies se utilizaron ejemplares adultos. Está ampliamente documentado en la literatura que el ciclo de vida desempeña un rol importante en la toxicidad de una dada especie. En general se considera que en organismos acuáticos, los adultos suelen ser menos sensible a los efectos de diversos contaminantes, entre ellos el cadmio (Ravera, 1984; WHO, 1992). Otro hecho, que hay que destacar es que ambas especies de gastrópodos habían sido criadas y mantenidas en condiciones de laboratorio; en cambio, los bivalvos provenían de la naturaleza y sólo pasaron un breve período de aclimatación, antes de ser expuestos a estas experiencias. Los bivalvos presentaban ciertos niveles basales de acumulación de cadmio, que reflejaban el grado de exposición al cual habían estado sometidos en su hábitat natural. Por lo tanto, estos organismos pudieron desarrollar una mayor tolerancia al metal, mediante un proceso de aclimatación fisiológica, tal como ya ha sido discutido anteriormente.

Con respecto a los gastrópodos, a los niveles de 0,05 y 0,30 mg Cd.L⁻¹ no se observó mortalidad ni se detectaron visualmente efectos tóxicos. En cambio, al nivel de 0,60 mg Cd.L⁻¹ si bien no se registró mortalidad, los animales demostraron signos de una mayor agresión, por cuanto se observó escaso movimiento de los mismos y una disminución en la defecación. Al nivel de 2,50 mg Cd.L⁻¹ la mortalidad fue del 100 %. De acuerdo a esto, consideramos más apropiado proponer como rango, dentro del cual quedaría acotada la CL₅₀, entre 0,30 y 2,50 mg Cd.L⁻¹, para ambas especies de gastrópodos.

Dentro de dicho rango no se realizaron bioensayos adicionales, por cuanto hubiera sido necesario emplear un número considerable de animales. Por otra parte, las tendencias actuales en ecotoxicología, así como también en otras disciplinas científicas, recomiendan disminuir el número de organismos empleados en bioensayos y limitar la información a rangos de CL₅₀ o de cualquier otro parámetro de efecto en estudio (CE₅₀) (Balls et al., 1990; Balls, 1991; FRAME Toxicity Committee, 1991; Olson et al., 1991). Hay que

tener presente que aún cuando se fije un valor de CL_{50} éste queda condicionado al procedimiento experimental empleado por cada laboratorio y, por ende, tampoco facilita en gran medida las comparaciones.

Para los bivalvos, por su parte, no se encontró un nivel de exposición a cadmio tal que produjera, aunque más no sea, cierto porcentaje de mortalidad. Hay que destacar, además, que a partir del nivel de $10,0 \text{ mg Cd.L}^{-1}$ en adelante, la solución resultante para el bioensayo presentaba cierta inhomogeneidad, visible a simple vista, que se acentuaba al aumentar la concentración. De tal forma que en estas soluciones aparentemente saturadas, no se alcanzaba una mayor proporción de iones Cd^{2+} libres, por lo que desistimos de ensayar con niveles por encima de $50,0 \text{ mg Cd.L}^{-1}$.

Teniendo en cuenta estos estudios podemos concluir, dentro de ciertos límites y en base a que las condiciones experimentales fueron análogas, que las dos especies de gastrópodos demostraron ser considerablemente más sensibles al cadmio en relación a la especie bivalva.

El hecho más natural ahora consiste en intentar comparar los resultados de nuestras experiencias con los múltiples reportes que se presentan en la literatura. Lo haremos. Pero antes, debemos señalar que las comparaciones deben ser realizadas con cautela, tomando en cuenta una serie de factores. Algunos de ellos ya los hemos discutido anteriormente. Los datos de toxicidad aguda dependen, en gran medida, de las condiciones experimentales y, por ello, están sujetos a variaciones por efectos de las propiedades físico-químicas del medio: pH, dureza, alcalinidad, temperatura, salinidad, nivel de oxígeno disuelto, entre otras (Schreck y Brohua, 1975; Frank y Robertson, 1979; FAO, 1981, 1982 y 1987; US EPA, 1991; WHO, 1992).

Otro factor experimental que debería tenerse en cuenta, es el volumen de agua utilizado en el bioensayo, en relación al número de organismos. Este factor determina la cantidad de tóxico que alcanza a cada uno de los individuos, por lo tanto puede tener profunda influencia sobre la respuesta en estudio y, por ende, modificar los valores de CL_{50} (Stratton y Giles, 1990).

Por otra parte, algunos autores realizaron las experiencias en condiciones estáticas, estáticas con renovación o con sistemas de flujo continuo; describiendo el nivel de concentración de las

soluciones en base al valor de tóxico agregado (valor nominal) o, en algunos casos, analizando directamente la solución resultante (valor medido).

Por tanto, en la práctica, los distintos autores han seguido diversas condiciones experimentales, las cuales no siempre han sido completamente descriptas. A esta falta de estandarización en los aspectos metodológicos del bioensayo, se le debe sumar la variabilidad de origen biológico. El sexo, la edad, la procedencia del organismo en estudio, su estado nutricional, el período de aclimatación previo, y hasta la época del año, pueden incidir, en mayor o menor grado, en la respuesta que presentan al agente tóxico (Malins y Ostrander, 1991; Grandjean, 1992). Incluso, en la literatura se han documentado marcadas diferencias en la toxicidad entre diferentes organismos, aun entre especies estrechamente relacionadas, las cuales muchas veces resultan muy difíciles de interpretar (WHO, 1992).

Para la especie B. glabrata se reportó, frente a cadmio, un valor de CL_{50} (96 hs) = $0,30 \text{ mg Cd.L}^{-1}$, el cual coincide con el límite inferior del rango propuesto en este trabajo (Ravera, 1984).

Según la recopilación de Wong (1987), para gastrópodos de agua dulce, empleando bioensayos en condiciones estáticas y en base a concentraciones nominales de cadmio, los valores de CL_{50} (96 hs) para diversas especies oscilaron entre $0,3$ y $8,4 \text{ mg Cd.L}^{-1}$.

En otra recopilación análoga, los valores variaban entre $0,8$ y $1,37 \text{ mg Cd.L}^{-1}$, para organismos de agua dulce, registrándose un valor de $10,5 \text{ mg Cd.L}^{-1}$ para la única especie marina estudiada (WHO, 1992).

Mackie (1989) estudió la variación de toxicidad del cadmio en una especie de gastrópodo de agua dulce en función del pH, en bioensayos estáticos. Los resultados de CL_{50} (96 hs) fueron de $2,71 \text{ mg Cd.L}^{-1}$ a $\text{pH} = 3,5$ (el más bajo utilizado); $3,80 \text{ mg Cd.L}^{-1}$ a $\text{pH} = 4,0$, y $6,35 \text{ mg Cd.L}^{-1}$, a $\text{pH} = 4,5$, observándose una marcada influencia de la acidez en la toxicidad.

En vista de todos esos resultados, podemos concluir que el rango de toxicidad propuesto en este trabajo para los gastrópodos Biomphalaria glabrata y Ampullaria canaliculata, resulta del mismo orden de magnitud que los valores de CL_{50} (96 hs) reportados en la literatura para otras especies de agua dulce, en condi-

ciones de laboratorio más o menos análogas.

Según las experiencias de Mackie (1989), para moluscos bivalvos de agua dulce expuestos en condiciones estáticas, los valores de CL_{50} (96 hs) oscilaron entre 0,36 y 2,08 mg Cd.L⁻¹, dependiendo de la especie y del pH del medio. Sin embargo, en la mayoría de los trabajos consultados no figuran datos para especies de agua dulce. En general, se han reportado valores para bivalvos marinos, los cuales oscilan entre 0,7 y 25 mg Cd.L⁻¹, empleando bioensayos estáticos (Fisler, 1977; Mc Leese et al., 1987; Wong, 1987; WHO, 1992).

Por consiguiente, de acuerdo a los resultados consignados en la Tabla IV.1. los organismos de Neocorbicula limosa parecerían exhibir una singular resistencia a este elemento. Sin embargo, se ha sugerido que en algunos casos el período de 96 hs puede no ser suficiente para reflejar la verdadera toxicidad del cadmio en algunos invertebrados (Wong, 1987). En el caso particular de los bivalvos, éstos pueden ser capaces de evitar, durante un corto período, una dada condición de estrés, refugiándose en sus valvas (Mackie, 1989).

Al nivel de concentración de plomo ensayado, no se observó letalidad en ninguna de las especies de moluscos estudiadas (Tabla IV.1.). En este caso, es necesario destacar que la solución del bioensayo resultante exhibió una cierta inhomogeneidad, debido a la formación de material en suspensión y depósitos de sales, los cuales se incrementaban a través del tiempo. Debido a ello, una gran parte del elemento podía no resultar biodisponible.

En algunos reportes se señala que la frecuente elección de cadmio como contaminante en estudio se puede atribuir, entre otras razones, a su gran solubilidad (FAO, 1987). Algunos autores han destacado que frente a ciertos elementos sólo se puede aspirar a realizar bioensayos con niveles de concentración nominales "pretendidos", a causa de problemas de insolubilidad que se plantean a pH compatibles con el bienestar de los organismos (Somasundaram et al., 1985). Por ello, los resultados de las experiencias de toxicidad con sales inorgánicas de plomo suelen ser muy difíciles de interpretar y, aún menos, de comparar (WHO, 1989). No obstante, otros autores han realizado bioensayos con niveles de concentración de hasta 50 mg Pb.L⁻¹, sin documentar problemas de solubilidad (Mackie, 1989).

En una etapa previa a estas experiencias, se intentó obtener una mejor solubilidad empleando aguas de dilución con diferentes niveles de dureza, sin conseguir resultados satisfactorios. Incluso, probamos preparar las diluciones a partir de otras sales, entre ellas acetato y cloruro, sin lograr ese objetivo. Por ello, nuestros estudios se limitaron a ensayar un único nivel de concentración de plomo.

IV.3.1.2. ESTUDIOS DE BIOACUMULACIÓN

Para tratar de comprender las marcadas diferencias de toxicidad observada entre las distintas especies de moluscos analizadas, frente al cadmio, decidimos realizar un estudio de bioacumulación. Para ello, se efectuaron una serie de bioensayos agudos, en condiciones estáticas, a diversos niveles de exposición. Seguidamente, se analizaron los niveles de concentración del metal alcanzados en los distintos organismos y se calcularon los factores de bioacumulación, en base a los valores de exposición nominales. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla IV.2. (siguiente página).

En primera instancia, el hecho más relevante surge de las enormes diferencias que presentaron los factores de bioacumulación para los distintos organismos, especialmente cuando se consideran el tejido blando o el total.

Las dos especies de gastrópodos demostraron poseer una capacidad mucho más elevada para acumular cadmio, en relación a los organismos bivalvos. Se podría argumentar, sin embargo, que en esta última especie no se estudió el grado de acumulación por exposición al nivel de $0,05 \text{ mg Cd.L}^{-1}$. No obstante, la conclusión anterior seguiría siendo válida, por cuanto aún asumiendo que estos organismos alcanzaran un nivel de acumulación igual al resultante por la exposición a $2,5 \text{ mg Cd.L}^{-1}$, hecho prácticamente improbable, el factor de bioacumulación sería:

$$\text{F.B.A.} = \frac{4,5}{0,05} = 90$$

Tabla IV.2.: Niveles de concentración y factores de bioacumulación en moluscos por exposición a Cd en bioensayos agudos (t = 96 hs).

organismo (n=5)	nivel de Cd (mg.L ⁻¹)	acumulación x + DE* (ug.g ⁻¹)	F.B.A.#
<u>B. glabrata</u>			
Tej. total	0,05	12,5 ± 0,1	250
<u>A. canaliculata</u>			
Tej. duro	0,05	2,9 ± 1,0	58
Tej. blando	0,05	20,0 ± 5,2	400
Tej. total	0,05	13,0 ± 2,2	260
<u>N. limosa</u>			
Tej. blando	2,5	4,5 ± 1,6	1,80
	10,0	14,0 ± 2,7	1,40
	25,0	27,7 ± 3,8	1,11
	50,0	38,0 ± 4,7	0,76

x + DE* : valor medio y desviación estándar (peso húmedo).

F.B.A.# : factor de bioacumulación (nominal).

En el caso de B. glabrata sólo fue posible analizar el contenido de cadmio en el organismo entero, ya que resulta muy difícil separar el tejido duro (concha) del blando, debido a la fragilidad del primero.

En cambio, para A. canaliculata se analizaron separadamente los niveles de cadmio acumulados en ambos tejidos y, en base a esos datos, se obtuvieron los valores correspondientes a los organismos enteros. De acuerdo a esos resultados, se pudo comprobar que en esta especie la mayor acumulación del elemento se registraba en el tejido blando. Por otra parte, en relación al tejido duro, no es factible determinar si el metal allí presente estaba

simplemente adsorbido sobre la superficie o había sido depositado tras un proceso de incorporación previa.

Es importante destacar, además, que cuando se considera el tejido total, los niveles de concentración así como los factores de bioacumulación resultaron análogos para ambas especies de gastrópodos, dentro del error experimental.

Con respecto a los moluscos bivalvos se puede observar (Tabla IV.2.) que a medida que aumenta el nivel de exposición a cadmio, los factores de bioacumulación tienden a disminuir. Este hecho se puede apreciar más fácilmente en la Figura IV.1., donde se muestra el aspecto de la curva resultante al graficar los niveles de concentración del metal bioacumulados en función de los niveles de exposición nominales.

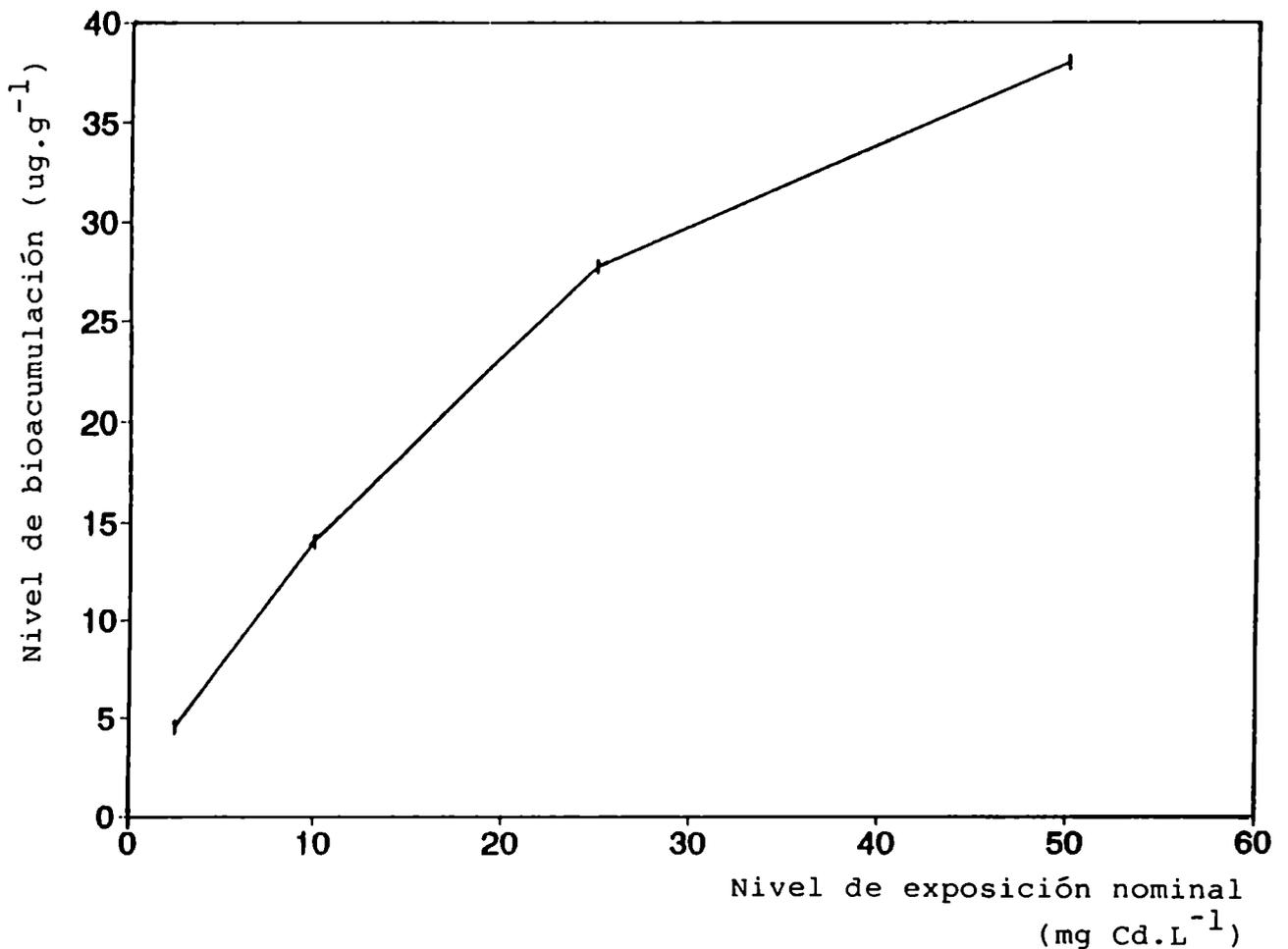


Fig. IV.1.: Niveles de concentración de cadmio bioacumulados en N. limosa expuestos a distintos niveles de exposición del metal mediante bioensayos agudos.

Anteriormente, ya hemos señalado que a partir del nivel nominal de $10,0 \text{ mg Cd.L}^{-1}$, las soluciones resultantes eran inhomogéneas, por lo tanto disminuiría así la biodisponibilidad del elemento. Sin embargo, este factor sería sólo parcialmente responsable del hecho, puesto que los valores de concentración del metal en el tejido blando continúan aumentando, a medida que se incrementa el nivel de exposición. Por consiguiente, esos datos estarían demostrando que en estos organismos se puede efectivamente verificar la incorporación del metal no sólo a partir de iones Cd^{2+} libres en solución, sino también a partir del material particulado.

En base a diversos reportes, los factores de bioacumulación para distintos organismos acuáticos, obtenidos mediante bioensayos de laboratorio, resultan ampliamente variables, con valores que van desde 16 hasta 130.000, aunque no parecen responder a algún tipo de patrón particular (WHO, 1992). En principio, sabemos que estas diferencias pueden ser atribuídas a numerosas causas. Entre ellas, algunos organismos podrían regular en forma más efectiva el ingreso de ciertos contaminantes, como el cadmio. Otros, dispondrían de mecanismos de detoxificación más rápidos o eficaces, ya sea para captar a las sustancias e impedir que desencadenen sus efectos tóxicos, o bien para facilitar su eliminación (Depledge y Rainbow, 1990; Hogstrand y Haux, 1991).

Según nuestras experiencias, los moluscos gastrópodos alcanzaron, más fácilmente que los bivalvos, niveles muy altos de acumulación de cadmio, especialmente en el tejido blando, aún cuando los niveles de exposición al tóxico fueron menores. Este hecho permitiría explicar, al menos en parte, la razón por la cual los organismos B. glabrata y A. canaliculata presentaron una mayor susceptibilidad frente al cadmio, mientras que no se observó mortalidad en la especie bivalva.

Si bien la mayoría de los autores sostienen que los bivalvos son capaces de concentrar altas cantidades de metales en sus tejidos, en un dado período, el proceso de incorporación suele ser lento (Waldichuk, 1974; WHO, 1992). Por ejemplo, el factor de bioacumulación en ciertas ostras expuestas durante 10 días resultó igual a 149, pero aumentó a 2714 al término de 40 semanas (WHO, 1992). Se considera, además, que el ingreso de cadmio en estos moluscos depende de los hábitos alimenticios y del grado de

respiración, los cuales pueden reducirse frente a altos niveles de contaminantes (GESAMP, 1984; Malins y Ostrander, 1991).

Los valores de los factores de bioacumulación obtenidos en este estudio, para los ejemplares de N. limosa, resultaron ser singularmente bajos. De este modo, se confirmaría entonces lo enunciado previamente, en cuanto a que durante una exposición de sólo 96 hs los organismos evitarían en gran parte el ingreso del tóxico, refugiándose en sus valvas y exhibiendo así una mayor resistencia (Wong, 1987; Mackie, 1989).

IV.3.2. BIOENSAYOS AGUDOS CON MOLUSCOS BIVALVOS

IV.3.2.1. INFLUENCIA DE LOS ÁCIDOS HÚMICOS EN LA TOXICIDAD DE CADMIO O PLOMO

En base a los estudios de letalidad pudimos comprobar que frente a niveles de $2,5 \text{ mg Cd.L}^{-1}$ o de $30,0 \text{ mg Pb.L}^{-1}$, no se verificaba mortalidad en la especie N. limosa, al término de 96 horas. Por consiguiente, esos fueron los niveles de exposición seleccionados para el estudio de las otras respuestas biológicas, que seguidamente analizaremos, en los bioensayos con organismos bivalvos.

Merece destacarse que es muy poco probable que niveles de esa magnitud puedan registrarse en la naturaleza. Sin embargo, otros autores, anteriormente, han elegido elevadas concentraciones de contaminantes en bioensayos agudos, a fin de impactar rápidamente a los organismos y poner en evidencia sus respuestas biológicas (Sarasquete et al., 1992).

En este trabajo, además, consideramos conveniente analizar dichas respuestas en presencia o en ausencia de un cierto nivel de ácidos húmicos. Recordemos que al reseñar los procesos de distribución en sistemas acuáticos (Introducción, punto III.3.1.), hemos resaltado la importancia que pueden exhibir esos compuestos en la especiación de los elementos metálicos. A su vez, la especiación desempeña un rol muy significativo en la toxicidad de estos contaminantes.

A pesar de esos hechos, todavía no se han investigado ampliamente las posibles interacciones resultantes entre el material húmico y los distintos metales. Los bioensayos que incluyan el estudio de estas interacciones podrían brindar una mejor información acerca de los efectos que pueden sufrir los organismos en la naturaleza.

Para realizar nuestras experiencias, seleccionamos un nivel de concentración de ácidos húmicos de 5 mg.L^{-1} . Se considera que dicho valor representa un nivel promedio, registrado en numerosos sistemas acuáticos naturales (Neubecker et al., 1983; Benson y Long, 1991).

En esta etapa, nuestro primer objetivo fue analizar la influencia de ese nivel de ácidos húmicos en la toxicidad del

cadmio o del plomo en organismos bivalvos, específicamente en relación a la letalidad. Los resultados de estos bioensayos se muestran en la Tabla IV.3.

Tabla IV.3.: Influencia de los ácidos húmicos en la letalidad del Cd o del Pb en moluscos bivalvos.

nivel de exposición	% mortalidad
control	0 %
5 mg.L ⁻¹ Ac.H.	0 %
2,5 mg Cd.L ⁻¹	0 %
2,5 mg Cd.L ⁻¹ + 5,0 mg.L ⁻¹ Ac.H.	0 %
30,0 mg Pb.L ⁻¹	0 %
30,0 mg Pb.L ⁻¹ + 5,0 mg.L ⁻¹ Ac.H.	0 %

Ac.H.: ácidos húmicos.

(n = 15)

De este modo, se puede apreciar que al nivel de ácidos húmicos estudiado no se observan modificaciones en los porcentajes de letalidad, tanto sea para los organismos controles, como para aquellos expuestos a las soluciones de cadmio o de plomo.

El segundo paso, consistió en estudiar los niveles de acumulación en el tejido blando total, tras la exposición de los organismos a 2,5 mg Cd.L⁻¹ o a 30,0 mg Pb.L⁻¹, en presencia y en ausencia de 5 mg.L⁻¹ de ácidos húmicos. En la Tabla IV.4.(A) se expresan los valores medios de acumulación frente al cadmio, así

como los factores de bioacumulación nominales. Adicionalmente, en la Tabla IV.4.(B). se muestran los niveles medios de cadmio medidos en la solución de los bioensayos, tanto en la fracción soluble como en la recuperable.

Tabla IV.4.(A).: Niveles de acumulación y factores de bioacumulación de Cd en N. limosa.

nivel de exposición	acumulación* ug.g ⁻¹	F.B.A.#
control	0,50 ± 0,16	
5 mg.L ⁻¹ Ac.H.	0,50 ± 0,18	
2,5 mg Cd.L ⁻¹	4,46 ± 2,55	1,78
2,5 mg Cd.L ⁻¹ 5 mg.L ⁻¹ Ac.H.	3,00 ± 1,92	1,20

acumulación* : valor medio y desviación estándar, en función de peso húmedo.

F.B.A.# : factor de bioacumulación (nominal).

(n = 10).

En la Tabla IV.4.(A). se puede observar que las concentraciones promedio de cadmio en los organismos controles y en los expuestos a 5 mg.L⁻¹ de ácidos húmicos resultaron estadísticamente iguales. Esos valores reflejan en parte el nivel de contaminación que presentaban los organismos recolectados de la naturaleza. Ya hemos mencionado en el capítulo anterior, en base a la bibliografía, que este elemento es eliminado en forma muy lenta. Los organismos expuestos únicamente a un nivel de 2,5 mg Cd.L⁻¹ presentaron los niveles más altos de acumulación, a la vez que una mayor variabilidad. Pese a ello, la diferencia con los expuestos al

mismo nivel de cadmio pero en presencia de ácidos húmicos, resulta estadísticamente significativa.

Tabla IV.4.(B).: Niveles de Cd en las soluciones de los bioensayos.

	fracción t = 0	soluble t = 96 hs mg.l. ⁻¹	f.recuperable t = 96 hs mg.l. ⁻¹
control	<0,2 ug.L ⁻¹		
5 mg.L ⁻¹ Ac.H.	<0,2 ug.L ⁻¹		
2,5 mg Cd.L ⁻¹	2,5 mg.L ⁻¹	2,3	2,3
2,5 mg Cd.L ⁻¹ 5 mg.L ⁻¹ Ac.H.	2,5 mg.L ⁻¹	1,9	1,9

Según la Tabla IV.4.(B). las soluciones de los bioensayos con cadmio resultaron bastante estables, durante el tratamiento. No obstante, los valores medios de concentración del metal fueron ligeramente inferiores en presencia de ácidos húmicos, tanto en la fracción soluble como en la recuperable, al término de las 96 horas, a pesar que los niveles de partida fueron iguales. Este ligero descenso en los niveles de cadmio puede atribuirse a una disminución de iones Cd²⁺ libres en solución, debida al efecto complejante de esos ligandos.

En ningún caso se encontraron diferencias significativas en las concentraciones del metal determinadas, a las 96 horas, en la fracción soluble o en la recuperable. Este hecho puede responder a la homogeneidad que presentaron estas soluciones.

A su vez, estos resultados se correlacionan positivamente con el descenso observado en los niveles de concentración y en el factor de bioacumulación que presentaron los organismos expuestos simultáneamente a cadmio y ácidos húmicos.

En la Tabla IV.5.(A). se pueden observar los niveles de acumulación en los organismos controles y en aquellos tratados con solución de plomo, en presencia o ausencia de ácidos húmicos.

Tabla IV.5.(A).: Niveles de acumulación y factores de bioacumulación de Pb en N. limosa.

nivel de exposición	acumulación* ug.g ⁻¹	F.B.A.#
control	1,6 ± 0,6	
5 mg.L ⁻¹ Ac.H.	1,4 ± 0,3	
30 mg Pb.L ⁻¹	36,4 ± 22,8	1,2
30 mg Pb.L ⁻¹ 5 mg.L ⁻¹ Ac.H.	46,1 ± 20,6	1,5

acumulación*: valor medio y desviación estándar, en función de peso húmedo.

F.B.A.#: factor de bioacumulación (nominal).

(n = 10).

Según esa Tabla, se encontraron ciertos niveles de plomo en los organismos controles y en los expuestos a las sustancias húmicas, los cuales entre sí no difieren significativamente, como consecuencia de la contaminación presente en el entorno natural de los bivalvos. Los organismos expuestos al metal mostraron un aumento muy significativo de acumulación (más de 20 veces) respecto a los controles. Por consiguiente, a pesar de la inhomogeneidad que exhibió la solución del bioensayo, con material en suspensión y precipitado, los organismos pudieron incorporar una importante proporción del tóxico en sus tejidos blandos, al menos transitoriamente.

Sin embargo, a diferencia de lo observado frente al cadmio, los organismos expuestos a plomo en presencia de ácidos húmicos presentaron, en promedio, mayores niveles de acumulación, aunque los valores mostraron una alta variabilidad. No obstante, aplicando un método estadístico no paramétrico (prueba de Kruskal-Wallis) se confirma que las distribuciones de esos datos son significativamente diferentes.

Los valores de concentración de plomo en las soluciones de los bioensayos se muestran en la Tabla IV.5.(B).

Tabla IV.5.(B).: Niveles de Pb en las soluciones de los bioensayos.

	fracción t = 0	soluble t = 96 hs mg.L ⁻¹	f.recuperable t = 96 hs mg.L ⁻¹
control	<2 ug.L ⁻¹		
5 mg.L ⁻¹ Ac.H.	<2 ug.L ⁻¹		
30 mg Pb.L ⁻¹	16 mg.L ⁻¹	<0,2	1,8
30 mg Pb.L ⁻¹ 5 mg.L ⁻¹ Ac.H.	14 mg.L ⁻¹	0,9	9,0

A pesar que el valor nominal de concentración de plomo fue de efectivamente 30 ± 1 mg.L⁻¹, los niveles medidos inmediatamente después de preparadas las soluciones decayeron a la mitad del valor inicial. En ese primer momento no se observaron diferencias apreciables en la fracción soluble.

Ya hemos señalado que la turbidez de las diluciones de plomo se acentuaba a través del tiempo. De hecho, los niveles medidos al término de los bioensayos, muestran un marcado descenso, especialmente cuando se analiza la fracción soluble.

Las concentraciones medidas en la fracción recuperable resultaron considerablemente más altas. De todas maneras, y en relación a ambas fracciones, los niveles de plomo "cuantificables" en las soluciones conteniendo al metal en presencia de ácidos húmicos fueron significativamente más altas que en las soluciones que contenían únicamente al elemento. Este hecho se correlaciona positivamente con la mayor acumulación de tóxico que presentaron los organismos en aquel primer tratamiento. Por consiguiente, se observó una mayor disponibilidad de plomo debida a la interacción con el material húmico. Esto podría atribuirse a la formación de complejos solubles, los cuales darían cuenta del aumento de metal que puede ser determinado analíticamente. A la vez, estos complejos podrían facilitar la incorporación del plomo en los organismos.

IV.3.2.2. EFECTOS DEL CADMIO O DEL PLOMO SOBRE LOS NIVELES DE GLUCÓGENO

Teniendo en cuenta que en la mayoría de los moluscos el metabolismo energético está basado en la utilización de hidratos de carbono, fundamentalmente glucógeno en organismos adultos, grandes reservas de polisacáridos se localizan en sus diversos tejidos (Hunt, 1970; Hemminga et al., 1985; Geraerts, 1992).

Hemos visto que frente a las múltiples perturbaciones que se suceden en el ambiente, incluyendo aquellas derivadas de la contaminación, los organismos tienden, en primera instancia, a hacer frente a la agresión mediante la elaboración de respuestas compensatorias. Este proceso normalmente implica un costo energético para el animal. Por consiguiente, muchos autores han investigado las modificaciones que pueden producirse en los niveles de glucógeno en organismos expuestos a diversos contaminantes (Calamari et al., 1982; Sastry et al., 1982; Cossarini-Dunier et al., 1988; Hemelraad et al., 1990c; Bolognani-Fantin et al., 1992). La naturaleza de estas alteraciones no puede, obviamente, catalogarse como una respuesta específica, pero sí puede constituir un parámetro relativamente precoz de contaminación (Haux y Förlin, 1988).

Por estas razones, decidimos estudiar los niveles de glucógeno en organismos de la especie N. limosa, expuestos en forma aguda a las concentraciones subletales anteriormente seleccionadas de cadmio o plomo. En estas experiencias se incluyó también el análisis de las posibles interacciones entre dichos elementos y un dado nivel de ácidos húmicos (5 mg.L^{-1}).

Los niveles medios de glucógeno, en el tejido blando total, obtenidos según los distintos tratamientos se presentan en la Figura IV.2.

En primer lugar, merece destacarse que la concentración media de glucógeno total en los organismos expuestos a ácidos húmicos resultó, aproximadamente, un 20 % mayor en relación a los organismos controles. Podría asumirse, así, que aquel medio que mejor representa al ambiente natural resulta más favorable para el desarrollo de estos bivalvos.

Por efecto del tratamiento con cadmio se encontró el valor promedio más bajo de concentración de glucógeno, pero los datos individuales presentaron una alta variabilidad. Además, no se

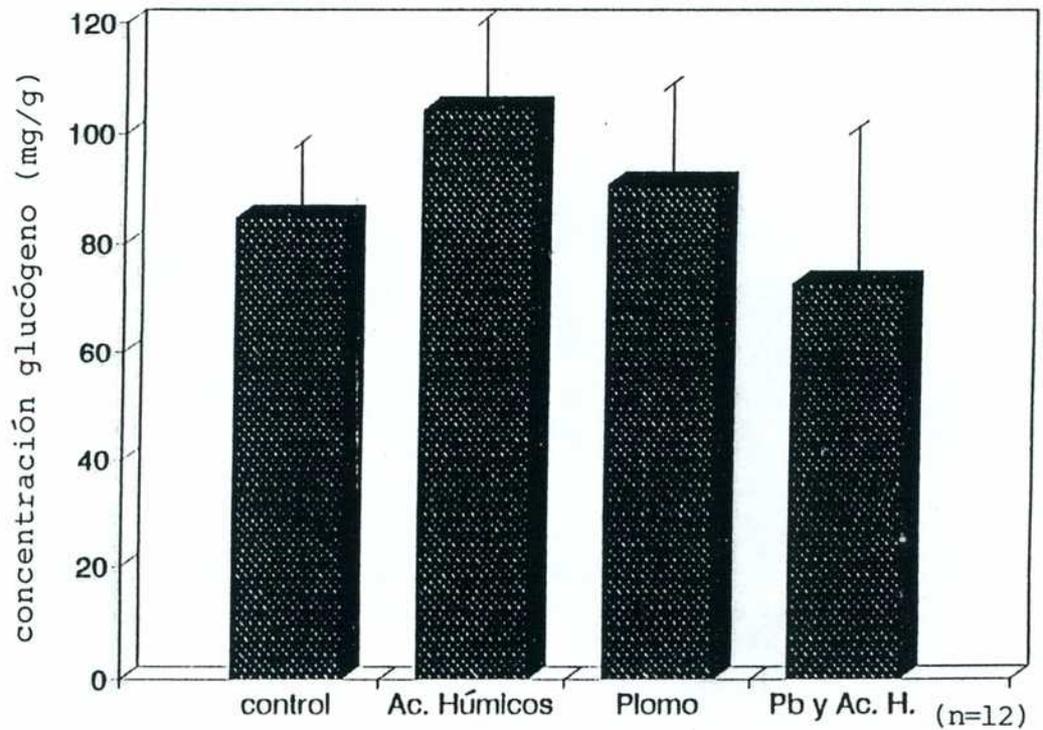
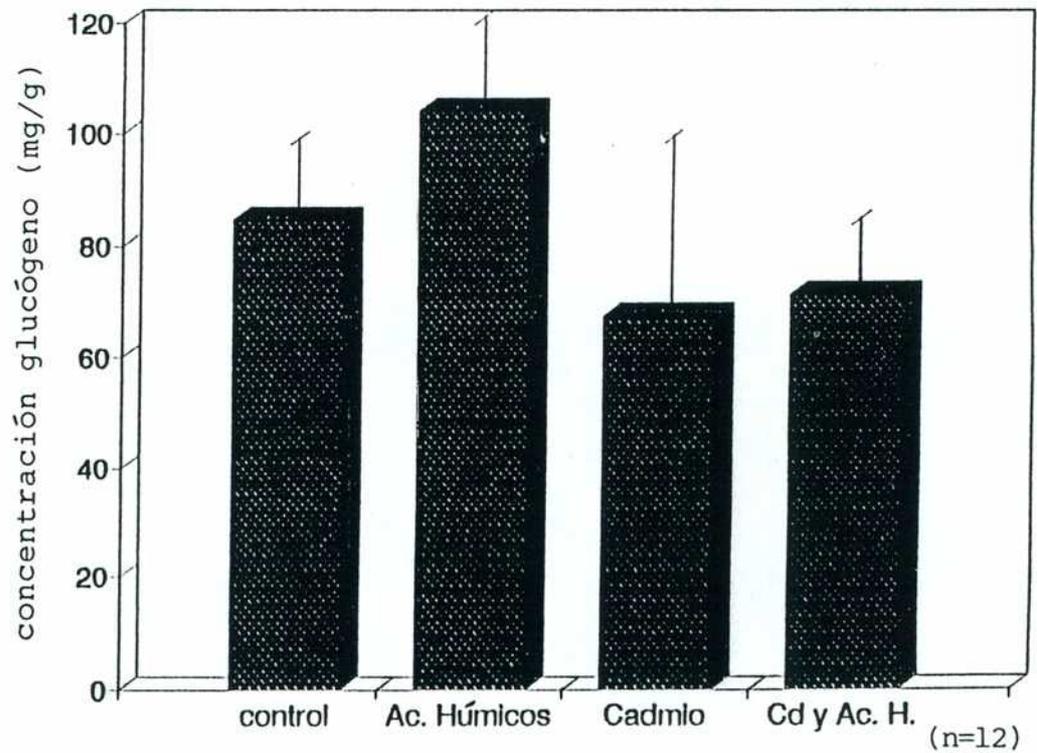


Fig.IV.2.: Niveles medios de concentración de glucógeno en el tejido blando total de bivalvos N. limosa expuestos a distintos tratamientos.

encontraron diferencias significativas entre ese tratamiento y los organismos expuestos al metal en presencia de ácidos húmicos.

En el tratamiento con plomo, las diferencias no resultaron estadísticamente significativas con el control. Pero en presencia de plomo y ácidos húmicos, el nivel medio de glucógeno tendió a disminuir, especialmente si lo comparamos con los niveles que presentaron los organismos expuestos únicamente a dichos ligandos.

Sin embargo, todas esas tendencias no se pueden considerar concluyentes, debido a la dispersión que presentaron los datos. Por ello, decidimos analizar los niveles de glucógeno presentes en el tejido del pie de los bivalvos.

Diversas razones motivaron la elección del pie como tejido en estudio. Los bivalvos cavadores, como N. limosa, se hunden en los sedimentos o emergen a la superficie merced a los movimientos de su pie (Roux, 1986a). Desde el punto de vista anatómico, el tejido del pie es fácilmente reconocido y puede separarse del resto de los tejidos blandos sin mayores dificultades. Por otra parte, Balogh (1988) encontró que elementos como cadmio o plomo, se acumulan en gran proporción en dicha estructura, al analizar una especie bivalva de agua dulce proveniente de zonas contaminadas.

En la Tabla IV.6. se presentan los niveles de concentración de ambos metales en el pie y en el resto del tejido blando total de organismos de la especie N. limosa, recolectados en la naturaleza.

A diferencia del reporte de Balogh (1988), la concentración de cadmio en el pie de los bivalvos del Río de la Plata resultó ser prácticamente la mitad de la que se registró en el resto de los tejidos blandos. Para plomo, en cambio, los niveles de acumulación en el pie fueron superiores.

A continuación, en la Figura IV.3. se muestran los niveles medios de glucógeno en el pie de los organismos expuestos a soluciones de $2,5 \text{ mg Cd.L}^{-1}$ o de 30 mg Pb.L^{-1} , en presencia o ausencia de 5 mg.L^{-1} de ácidos húmicos.

En estos análisis, no se observaron diferencias significativas entre el contenido presente en el pie de los organismos controles y los tratados con ácidos húmicos.

En los bivalvos tratados con la solución de cadmio se registraron los niveles mínimos de glucógeno en el pie. En cambio,

Tabla IV.6.: Niveles de concentración de Cd y Pb en tejidos de N. limosa.

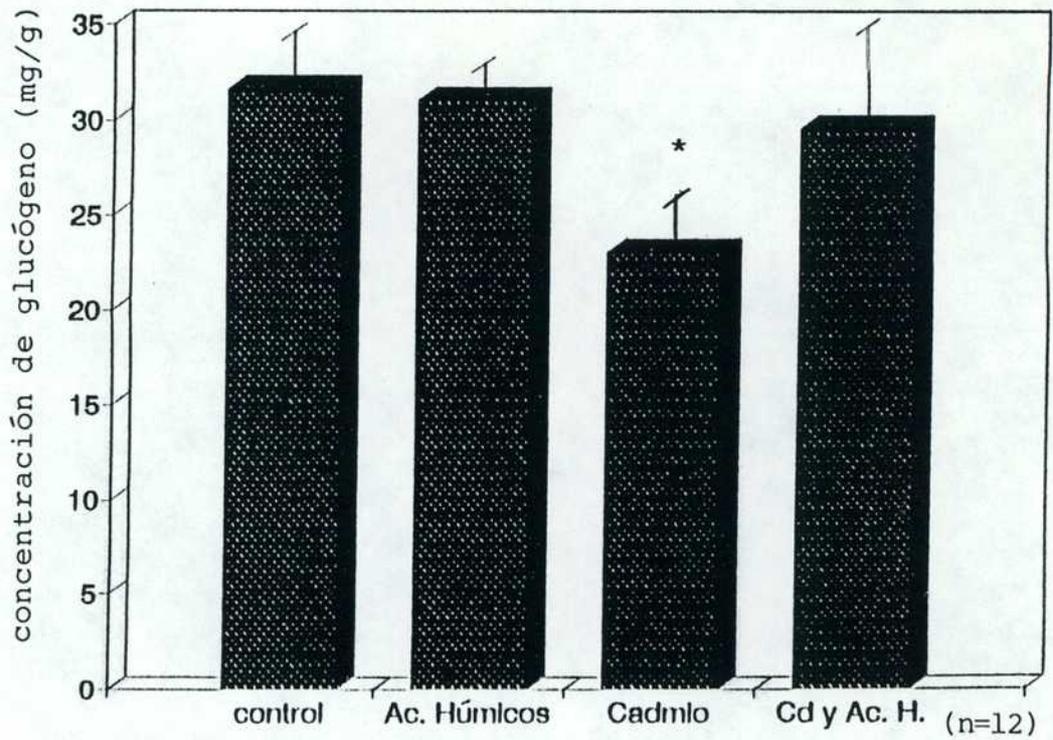
	pie [*] ug.g ⁻¹	resto tejidos [*] blandos ug.g ⁻¹
cadmio (n=7)	0,32 ± 0,14	0,58 ± 0,09
plomo (n=6)	3,29 ± 0,25	2,05 ± 0,71

(*) valor medio y desviación estandar, en función peso húmedo.

aquellos expuestos al metal en presencia de material húmico, dieron valores similares a los controles.

En el pie de los organismos expuestos a plomo, los niveles descendieron ligeramente con respecto a los controles, pero las diferencias no fueron significativas. El descenso resultó mayor en presencia de plomo y ácidos húmicos, siendo en este caso estadísticamente significativo.

En todos estos análisis, se observó una menor variabilidad en los valores, permitiendo una mejor interpretación de los resultados.



*: diferencias significativas con los controles.

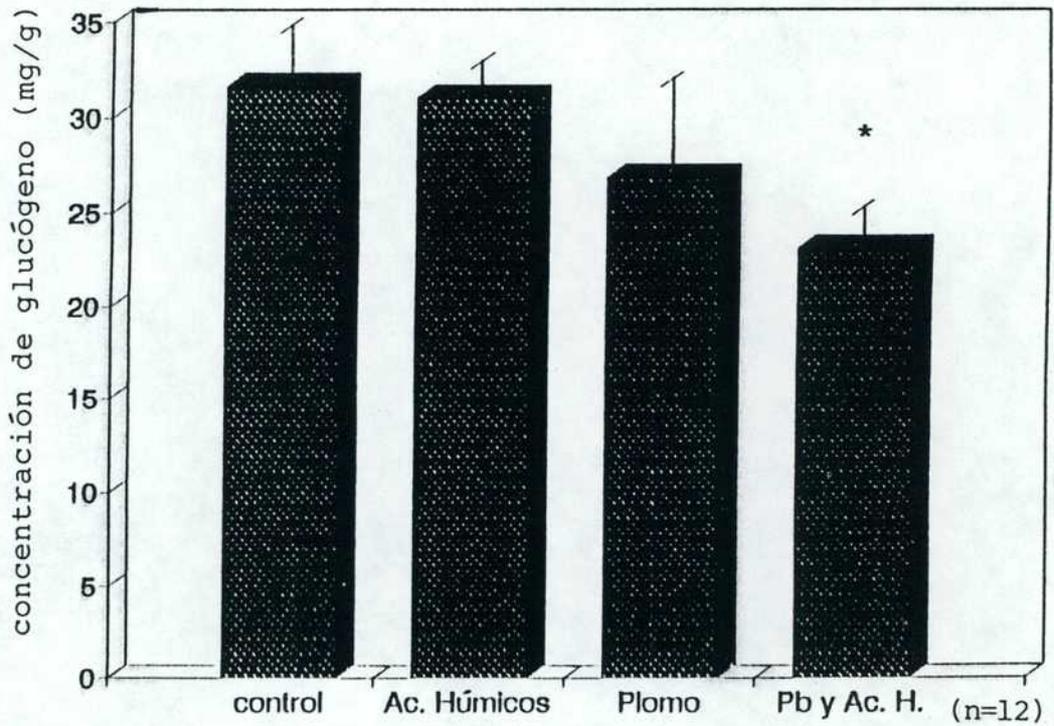


Fig.IV.3.: Niveles medios de concentración de glucógeno en el tejido del pie de bivalvos N. limosa expuestos a distintos tratamientos.

IV.3.2.3. EFECTOS DEL CADMIO O DEL PLOMO SOBRE LOS NIVELES DE GRUPOS TIOLES

Anteriormente ya se ha mencionado (Introducción, Sección V) que las interacciones que pueden verificarse entre los elementos metálicos y los grupos tioles desempeñan un rol muy importante, a través del cual se pueden interpretar algunos de los efectos tóxicos que sufren los organismos expuestos a dichos contaminantes, como así también el posible desarrollo del fenómeno de tolerancia o aclimatación fisiológica.

Por consiguiente, se efectuaron determinaciones de los niveles de grupos tioles totales y no proteicos, presentes en el tejido blando total de bivalvos, N. limosa, expuestos a 2,5 mg Cd.L⁻¹ o a 30 mg Pb.L⁻¹, en presencia o ausencia de 5 mg.L⁻¹ de ácidos húmicos. Los resultados obtenidos se presentan en las Figuras IV.4. y IV.5, respectivamente. Por diferencia, fue posible calcular los niveles de grupos tioles proteicos. Estos resultados se presentan en la Figura IV.6.

De acuerdo con la Figura IV.4. no se encontraron diferencias significativas en la concentración de grupos tioles totales entre los organismos controles y los expuestos a ácidos húmicos. En cambio, por tratamiento con cadmio se observó un ligero aumento, estadísticamente significativo. En los organismos tratados con el metal en presencia de ácidos húmicos, se verificó también un ligero incremento, que en este caso no resultó estadísticamente significativo.

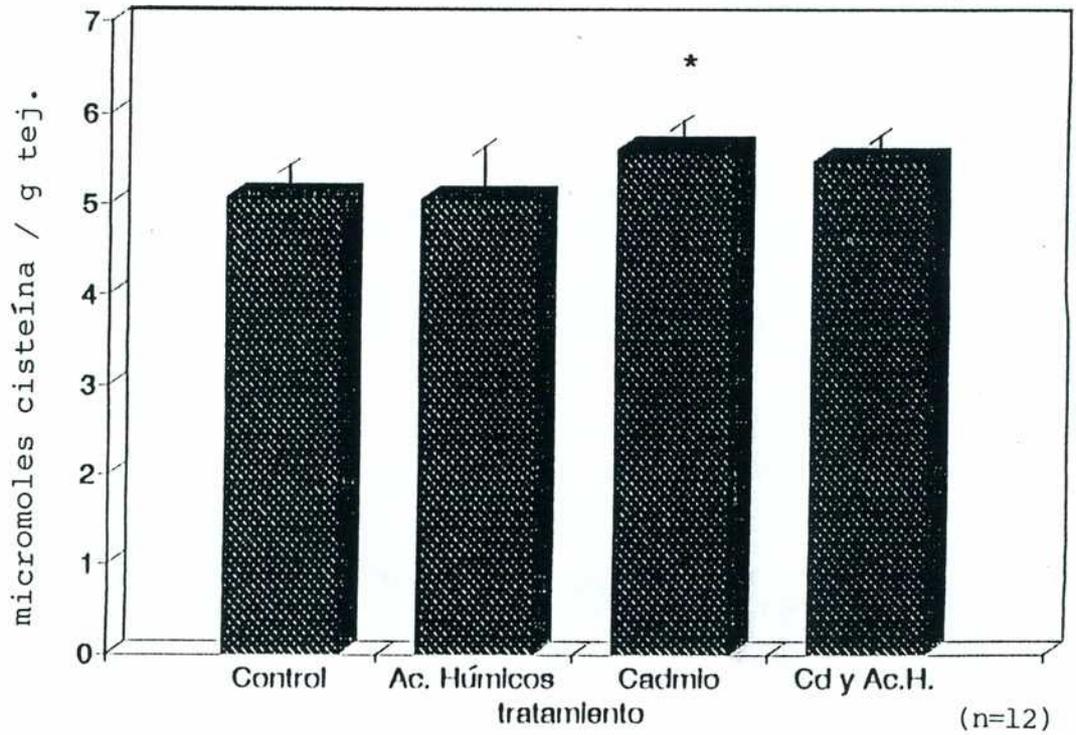
En los organismos tratados con plomo, ya sea en presencia o ausencia del material húmico, no se encontraron diferencias apreciables (Figura IV.4.).

Cuando se analizaron los niveles de grupos tioles no proteicos (Figura IV.5.) no se observaron diferencias significativas, excepto frente al tratamiento con cadmio en presencia de ácidos húmicos, en el cual se encontraron niveles significativamente menores. En los tratamientos con plomo, no se registraron diferencias apreciables.

Al calcular los valores de grupos tioles proteicos (Figura IV. 6.) no se observaron diferencias entre los organismos controles y los expuestos a la solución del material húmico. Los organismos tratados únicamente con cadmio presentaron niveles signi-

ficativamente superiores a los controles. Por lo tanto, para estos organismos, el ligero aumento observado en los grupos tioles totales puede atribuirse exclusivamente al aumento de grupos tioles en la fracción proteica. Frente al tratamiento con este metal en presencia de ácidos húmicos, también fue observado un incremento significativo en los niveles de concentración de grupos tioles proteicos, respecto a los controles.

En los tratamientos con plomo, en presencia o ausencia de ácidos húmicos, no se encontraron modificaciones apreciables en los niveles de grupos tioles proteicos.



*: diferencias significativas con los controles.

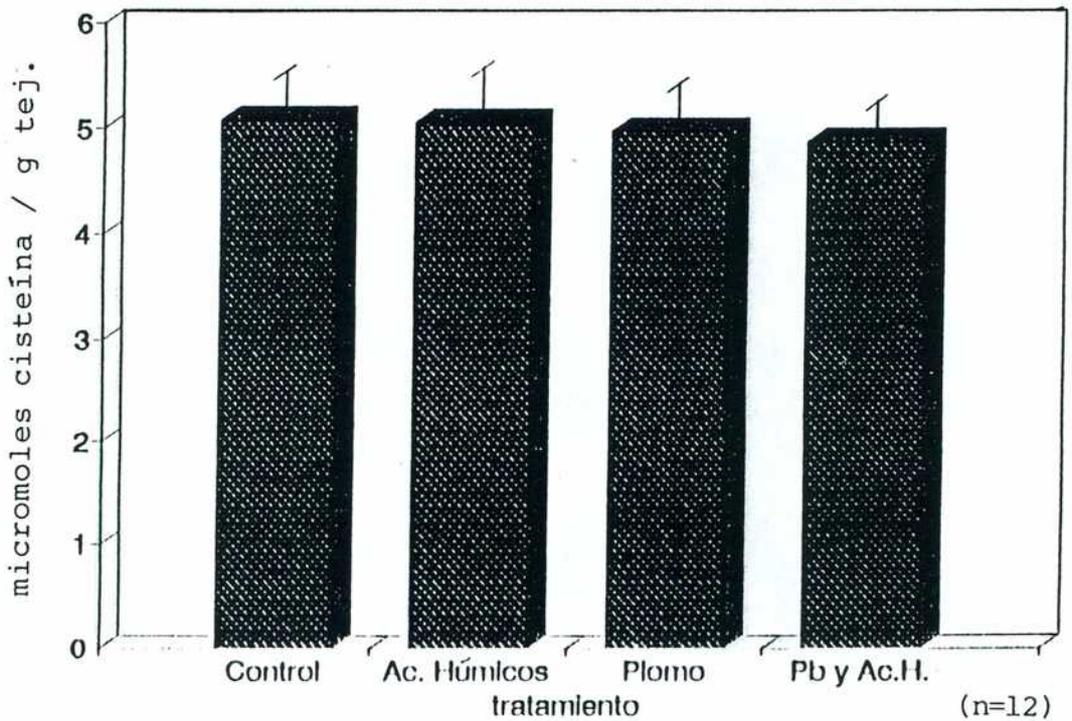
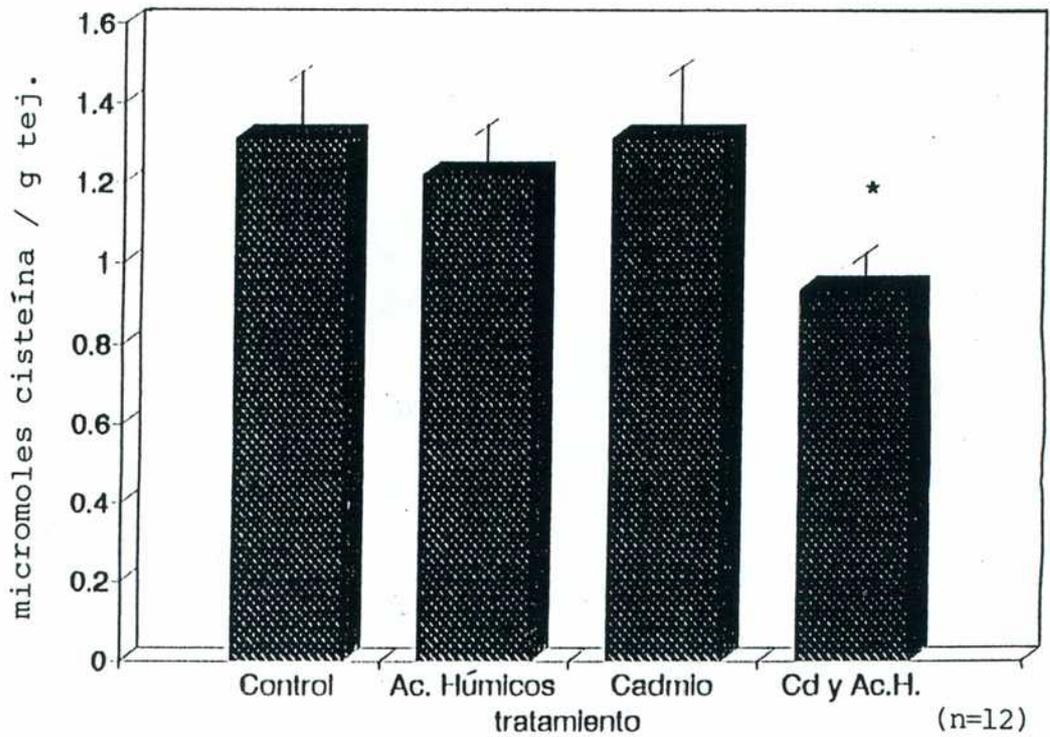


Fig.IV.4.: Niveles medios de concentración de grupos tioles totales en el tejido blando de bivalvos N. limosa expuestos a distintos tratamientos.



*: diferencias significativas con los controles.

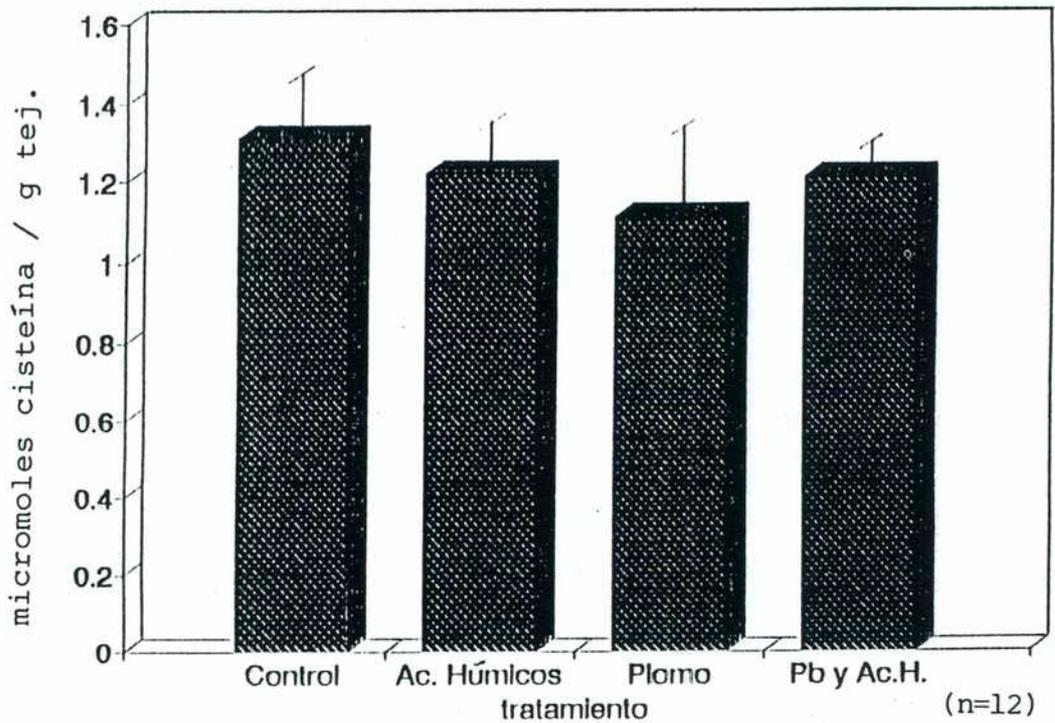
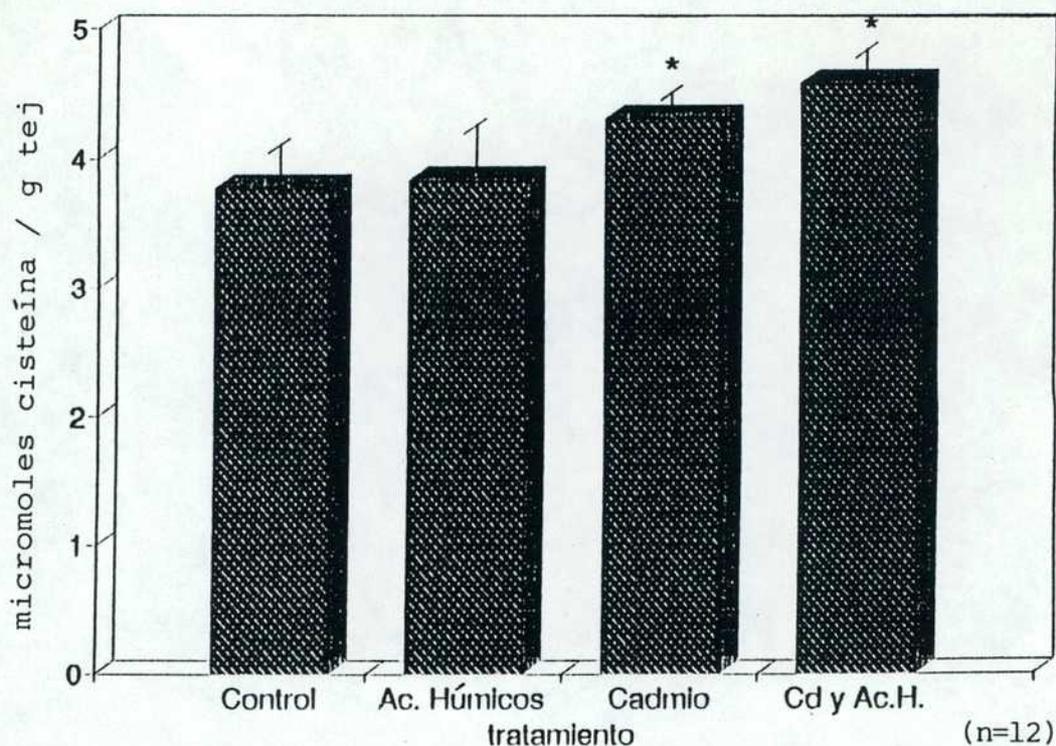


Fig.IV.5.: Niveles medios de concentración de grupos tioles no proteicos en el tejido blando de bivalvos N. limosa expuestos a distintos tratamientos.



*: diferencias significativas con los controles.

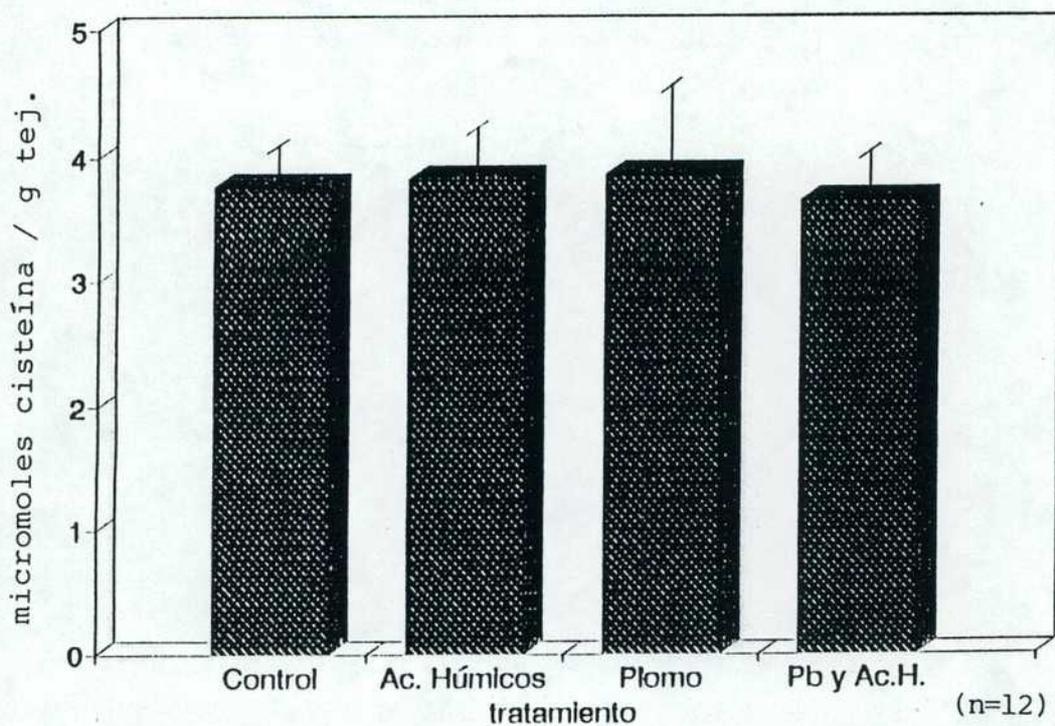


Fig.IV.6.: Niveles medios de concentración de grupos tioles proteicos en el tejido blando de bivalvos N. limosa expuestos a distintos tratamientos.

IV.3.2.4. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

A continuación trataremos de resumir e interpretar los principales resultados obtenidos mediante la realización de los bioensayos con moluscos bivalvos.

Si bien no se observaron cambios en la letalidad de los bivalvos expuestos a las soluciones de los metales cadmio o plomo, en presencia de un dado nivel de concentración de ácidos húmicos (5 mg.L^{-1}), sí se encontraron diferencias en los niveles de bioacumulación resultantes.

Los organismos expuestos a un nivel de $2,5 \text{ mg Cd.L}^{-1}$ en presencia de ácidos húmicos presentaron menor concentración de cadmio en sus tejidos blandos, en relación a los expuestos únicamente al metal. Este descenso en los niveles de acumulación se correlaciona con la menor proporción de cadmio presente en la solución (fracción soluble y recuperable) conteniendo al metal y a los ácidos húmicos.

Por el contrario, los organismos expuestos a un nivel de 30 mg Pb.L^{-1} junto con el material húmico, presentaron mayor concentración de plomo en sus tejidos blandos. En este caso, el aumento en los niveles de bioacumulación se correlaciona con la mayor proporción de plomo, en las fracciones soluble y recuperable, de la solución conteniendo al metal en presencia de ácidos húmicos.

Las variaciones observadas en los distintos parámetros biológicos analizados en el presente trabajo, según los diferentes tratamientos, en relación a los organismos controles, se presentan en forma cualitativa y resumida en la Tabla IV.7.

Según la literatura, los efectos tóxicos de las sustancias químicas contaminantes pueden aumentar, disminuir o no resultar afectados en presencia de ácidos húmicos (Josephson, 1982; Benson y Long, 1991).

La naturaleza y las propiedades físico-químicas de los complejos que pueden formarse entre esos ligandos y los distintos elementos metálicos aún no están muy bien clarificadas. Por lo tanto, no es posible predecir las características de las interacciones resultantes, aunque se sabe que básicamente dependen de la concentración y composición del material húmico, así como también de cada elemento en particular. Sin embargo, no quedan dudas de

Tabla IV.7.: Variaciones cualitativas de los parámetros biológicos en estudio con respecto a los controles.

	Glucógeno		Grupos tioles		
	tej.total	pie	totales	no proteicos	proteicos
2,5 mg Cd.L ⁻¹	(↓)	↓	↑		↑
2,5 mg Cd.L ⁻¹ 5 mg AcH.L ⁻¹	(↓)		(↑)	↓	↑↑
30 mg Pb.L ⁻¹					
30 mg Pb.L ⁻¹ 5 mg AcH.L ⁻¹	(↓)	↓			

- -: no presentan cambios con los controles.

↓ o ↑: descenso o aumento significativo.

(↓) o (↑): tendencia al descenso o al aumento.

que desempeñan un rol fundamental en la especiación y, por ende, en la biodisponibilidad de estos contaminantes (Josephson, 1982; Stackhouse y Benson, 1988; Lövgren y Sjöberg, 1989).

En base a estas experiencias, en las cuales se empleó una única concentración de material húmico comercial, se puede apreciar que las interacciones resultantes dependen en gran medida del metal en cuestión.

Así, con respecto al cadmio se encontró que los niveles de bioacumulación resultaron menores, mientras que frente al plomo fueron mayores, cuando las soluciones de esos elementos estaban en presencia de ácidos húmicos.

En la literatura se pueden encontrar diversos estudios previos relativos a algunas de las interacciones resultantes entre los

ácidos húmicos y elementos como el cadmio; aunque no fue posible disponer de información con respecto al plomo.

En relación a la letalidad, los reportes son contradictorios. Los porcentajes de letalidad de los organismos expuestos a cadmio en presencia de ácidos húmicos, pueden resultar disminuídos, aumentados o no exhibir modificaciones apreciables (Giesy et al., 1977; Winner, 1984; Stackhouse y Benson, 1988).

Según nuestros resultados, no se produjeron cambios en la letalidad de los organismos. Sin embargo, hay que tener presente que estos bioensayos se practicaron empleando un único valor de concentración de cada metal y de ácidos húmicos.

Por otra parte, Stackhouse y Benson (1988) encontraron que frente a un nivel de 5 mg.L^{-1} de ácidos húmicos, el 93 % del cadmio se encontraba como iones libres en la solución de los bioensayos, a las 96 hs. del tratamiento. En nuestro caso, ese porcentaje resultó ser de aproximadamente un 76 %, algo menor, tanto en las lecturas practicadas en la fracción soluble como en la recuperable.

Por su parte, Winner (1984) no encontró diferencias en los niveles de acumulación de cadmio en crustáceos expuestos a distintas concentraciones de ácidos húmicos, mientras que en nuestras experiencias se encontraron valores menores.

En principio, el contenido de glucógeno en el tejido blando total de los organismos controles, expresado en función del peso húmedo de los bivalvos, constituye aproximadamente un 8,5 %. Este valor resulta ligeramente mayor, aunque del mismo orden, al observado por Geraerts (1992) en otra especie de molusco (entre 2 y 6 %).

Los niveles de concentración de glucógeno en el tejido blando total tendieron a disminuir en los organismos expuestos a cadmio, ya sea en presencia o ausencia de ácidos húmicos, con respecto a los controles. Los niveles de glucógeno en pie disminuyeron en forma significativa únicamente frente al tratamiento con cadmio (Tabla IV.7.).

Según esos resultados, podríamos asumir que debido a la disminución en los niveles de bioacumulación en los organismos expuestos al metal en presencia de ácidos húmicos, no se alcanzaría el nivel umbral de concentración de cadmio en el tejido del pie,

como para alterar los niveles de glucógeno en dicho tejido.

Otros autores también han encontrado que por tratamiento con cadmio disminuyen los niveles de glucógeno en el tejido hepático de ratas (Merali et al.,1974) y de peces (Arillo et al.,1982), así como también en el tejido blando total de almejas (Hemelraad et al.,1990c).

En relación a los tratamientos con plomo, los niveles de concentración de glucógeno en el tejido blando total tendieron a disminuir únicamente en los organismos expuestos al metal en presencia de ácidos húmicos. A pesar de la variabilidad observada, las diferencias entre los organismos expuestos solamente a plomo y los controles, no resultaron significativas. Estas tendencias se confirman y acentúan al analizar los niveles del polisacárido en pie (Tabla IV.7.).

Estos resultados demostrarían que los niveles de plomo necesarios para provocar modificaciones en las concentraciones de glucógeno, se alcanzarían recién en los organismos expuestos al metal en presencia de ácidos húmicos, los cuales presentaron una mayor acumulación del elemento. Los análisis practicados en el pie se correlacionan mejor con los niveles bioacumulados. Recordemos que este tejido llega a concentrar mayores niveles de plomo que el resto de los tejidos blandos (Tabla IV.6.).

En hígado de peces, también fue demostrado que este elemento es capaz de disminuir los niveles de glucógeno (Frauchini et al., 1991; Bolognani-Fantin et al.,1992).

La disminución de las reservas de glucógeno usualmente han sido atribuidas al incremento de la demanda energética, asociada con un agente estresante de naturaleza química o física. Por consiguiente, las determinaciones de dicho polisacárido, ya sea en homogenatos del tejido total o de alguno en particular, reflejan el estado energético de un organismo, constituyendo un buen parámetro indicador de exposición (Mayer et al.,1992).

Se considera además que, a nivel subcelular, los elementos cadmio y plomo, cuando se presentan en concentraciones elevadas, pueden ejercer efectos adversos sobre las mitocondrias, afectando las enzimas involucradas en el proceso de glucogenolisis. También pueden alterarse algunos de los factores hormonales (glucagon, insulina, adrenalina, por ejemplo) que intervienen en su regulación. De este modo, se verificaría la activación de la glucogeno-

lisis y, por ende, descenderían las reservas de glucógeno en los organismos expuestos (Hemelraad et al.,1990c; Franchini et al., 1991; Bolognani-Fantin et al.,1992).

Los niveles de grupos tioles totales en los organismos expuestos únicamente a cadmio mostraron un significativo aumento, respecto a los controles, el cual fue debido a un incremento en los niveles de grupos tioles proteicos, ya que no se modificaron los niveles de grupos tioles no proteicos (Tabla IV.7.).

Dicho incremento podría ser consecuencia de una inducción de proteínas ligantes de cadmio, con alto porcentaje de grupos sulfhidrilos, iguales o similares a las metalotioneínas. Estas proteínas han sido efectivamente caracterizadas en diversos organismos bivalvos, tanto marinos como de agua dulce (Nöel-Lambot, 1976; Doherty et al.,1987; Bebianno y Langston, 1992).

En base a la técnica de determinación empleada en este trabajo, se podría argumentar que mediante la reacción de los grupos tioles con DTNB, no estarían reaccionando proteínas del tipo de las metalotioneínas.

Sin embargo, los estudios de Li et al. (1981) demostraron que a pesar de la gran afinidad entre dichas proteínas y los metales, los complejos efectivamente se disocian, dando lugar a que la reacción entre la tioneína y el DTNB se verifique hasta completarse.

De hecho, diversos autores consideran que dicha técnica puede constituir una primera aproximación, rápida y sencilla, para evaluar el nivel de metalotioneínas tipo I (Li et al.,1981), tipo II (Olafson et al.,1979; Weber et al.,1987) y de tipo III, como las fitoquelatinas (Scheller et al.,1987; Rauser, 1990).

Por último, los niveles de metalotioneínas medidos en el tejido blando total de moluscos bivalvos, con capaces de reflejar la inducción que se verifica en los distintos órganos de mayor acumulación de cadmio (branquias, glándulas digestivas, riñón y manto) tras una exposición aguda (Bebianno y Langston, 1992).

Por ello, en base a todos esos trabajos, podemos asumir que por reacción con DTNB se estarían evaluando los grupos tioles derivados de metalotioneínas o de otras proteínas similares. Sin embargo, es necesario tener presente que esta técnica es inespecífica y a menudo sobreestima los niveles de metalotioneínas ya

que simultáneamente estarían reaccionando también grupos tioles de proteínas muy diversas, que no tengan ninguna relación con las primeras (Dieter et al., 1986). De todos modos, ya hemos señalado (Introducción, sección V) que la caracterización completa de las metalotioneínas requiere de técnicas y metodologías muy complejas y costosas, las cuales no son fácilmente accesibles en un laboratorio medianamente equipado.

Cuando se analizaron los niveles de grupos tioles totales en los organismos expuestos a cadmio en presencia de ácidos húmicos, se encontró un ligero aumento, estadísticamente no significativo, con respecto a los controles. Sin embargo, en este tratamiento, los niveles de grupos tioles proteicos aumentaron aún más que en los organismos expuestos únicamente a cadmio. Simultáneamente, los niveles de grupos tioles no proteicos descendieron significativamente, con respecto a los organismos controles y a aquellos expuestos al metal (Tabla IV.7.).

Ya hemos mencionado que el glutatión constituye el compuesto tiólico no proteico mayoritario, en un gran número de especies animales e incluso vegetales.

En relación a la determinación de grupos tioles no proteicos con el reactivo DTNB, se considera que representa una primera aproximación para estimar los niveles de glutatión, una vez que han sido precipitadas las proteínas (Meister y Anderson, 1983). De hecho, Shimizu y Morita (1990) encontraron que la relación entre los niveles de glutatión medidos por el método enzimático y de grupos tioles no proteicos, por reacción con DTNB, resultaba ser aproximadamente 0,9; en el tejido hepático de ratas. Dicha relación indica, entonces, que cerca del 90 % de los grupos tioles no proteicos provienen del glutatión.

Numerosos experimentos se han realizado con el fin de analizar el efecto del cadmio sobre los niveles de glutatión en diferentes tejidos y en diversas especies. Los resultados, lejos de demostrar una tendencia general, indican que las concentraciones del péptido pueden disminuir (Shimizu y Morita, 1990), aumentar (Dudley y Klaassen, 1984) o permanecer sin cambios (Eaton et al., 1980), aun cuando se analiza una misma especie (rata) y un mismo órgano (hígado).

Estas diferencias, que pueden resultar confusas, podrían explicarse en base a diferencias en el diseño experimental, do-

sis y sales metálicas empleadas, vías de administración, estado nutricional, sexo y edad de los organismos, entre los factores más relevantes (Eaton et al.,1980; Iguchi et al.,1991; Cartañá et al.,1992).

Pese a ello, parece existir un mayor consenso en cuanto al posible rol protector que exhibiría al péptido frente al cadmio y, eventualmente, a otros metales. Diversas experiencias en las que se disminuyeron los niveles de glutatión, los organismos presentaron una mayor sensibilidad a los efectos tóxicos del cadmio (Dudley y Klaassen, 1984; Singhal et al.,1987; Kang y Enger,1988; Chan y Cherian, 1992). Por el contrario, cuando se favorecía su aumento, se encontraba una mayor resistencia (Dudley y Klaassen, 1984; Singhal et al.,1987).

El mecanismo por el cual el glutatión ejercería este rol protector no ha sido aún totalmente esclarecido. Sin embargo, se considera que el péptido no estaría involucrado en la inducción de metalotioneínas (Singhal et al.,1987; Chan y Cherian, 1992; Chubatsu et al.,1992). Es posible, en cambio, que la unión del cadmio al glutatión disminuya los niveles intracelulares de Cd^{2+} libres, impidiendo su unión a sitios críticos de macromoléculas, enzimas u organelas (Dudley y Klaassen, 1984; Singhal et al., 1987).

No resulta evidente ni sencillo explicar, por un lado, el descenso en los niveles de grupos tioles no proteicos, como tampoco el mayor incremento en los niveles de grupos tioles proteicos que se verifica entre los organismos expuestos a cadmio en presencia o ausencia de ácidos húmicos.

En principio, estos resultados no parecen correlacionarse con el descenso observado en los niveles de bioacumulación del metal, por exposición a cadmio y ácidos húmicos. En base ello, se podría esperar una respuesta similar o más atenuada de dicho tratamiento, en relación a los organismos tratados únicamente con el metal. Sin embargo, debe considerarse que las interacciones resultantes entre el cadmio y los ácidos húmicos pueden alterar la toxicidad del elemento en aspectos muy diversos, que no dependan exclusivamente de los niveles de exposición o de bioacumulación. De hecho, los complejos formados pueden alterar la distribución del metal, a nivel tisular o intracelular, o bien modificar los procesos metabólicos, promoviendo la elaboración de diferentes

respuestas. Por otra parte, no estamos en condiciones de evaluar, en base a nuestras experiencias, si las respuestas obtenidas reflejan un mayor o menor impacto tóxico para los organismos.

Por efecto de los tratamientos con plomo, ya sea en presencia o ausencia de ácidos húmicos, no se observaron modificaciones en los niveles de grupos tioles totales, proteicos o no proteicos (Tabla IV.7.).

Según un trabajo de Eaton et al. (1980), se observó que a bajas dosis de plomo, en ratas, los niveles de glutatión hepático disminuían, mientras que a dosis más altas, no se encontraban diferencias con respecto a los controles.

En nuestras experiencias se emplearon altos niveles de exposición de plomo, los cuales difícilmente se verifiquen en condiciones naturales. Además, según los estudios de bioacumulación complementarios, que detallamos en III.3.3.2., gran parte del elemento presente en el tejido blando total estaría transitoriamente ligado al tracto gastrointestinal, pero no verdaderamente unido a los tejidos blandos, distribuyéndose preferentemente en las valvas.

Por consiguiente, al no haber encontrado diferencias en las distintas fracciones de grupos tioles analizadas, entre los distintos tratamientos ni en relación a los organismos controles, podemos concluir que dichas determinaciones no constituirían buenos parámetros biológicos, o biomarcadores, del nivel de exposición de moluscos bivalvos de la especie Neocorbicula limosa frente al plomo.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

Cada uno de nosotros ha sido testigo de los diversos efectos adversos que se verifican como consecuencia de la liberación indiscriminada de numerosas sustancias químicas contaminantes en el sistema del Río de la Plata.

El impacto ambiental resultante, puede verse reflejado a través de las advertencias "Prohibido bañarse: aguas contaminadas", los episodios de mortandad masiva de peces, o la gran cantidad de residuos diversos que se acumulan en sus costas, por citar sólo algunos ejemplos.

Si bien es cierto que desde diversos sectores públicos y privados, se ha manifestado una lógica preocupación, así como también la intención de revertir esos procesos, aún no se han encarado suficientes estudios para evaluar el grado de contaminación y los efectos tóxicos a que pueden estar sometidos los distintos organismos del ecosistema.

Una vez que los contaminantes se liberan en los sistemas acuáticos pueden sufrir una serie de procesos de distribución, transformación y/o transporte, los cuales determinan su destino en el ambiente. Como consecuencia de tales procesos, los contaminantes, o algún producto derivado, pueden distribuirse en la fase acuosa soluble, los sedimentos del lecho, el material en suspensión y los distintos organismos biológicos presentes.

Por ello, en una primera etapa, se ha intentado ofrecer una contribución mediante la realización de un monitoreo ambiental en zonas costeras del Río de la Plata, a fin de determinar los niveles de concentración de algunos elementos metálicos en muestras de aguas y sedimentos.

Inicialmente, los metales seleccionados fueron cadmio y plomo, los cuales no presentan ningún rol fisiológico reconocido. El primero, debido a que por su toxicidad y tendencia a acumularse en los distintos organismos del ecosistema, ha sido, casi sin dudas, uno de los metales que mayor atención a recibido en la literatura (Beijer y Jernelöv, 1986; WHO, 1992). El segundo, captó nuestra atención dado que para la época en que comenzó este trabajo, en nuestro país, se expendían exclusivamente naftas conteniendo alquilos de plomo como antidetonantes. A la fecha, si bien ya están disponibles las llamadas "naftas ecológicas", libres o

con muy bajo contenido del elemento, su empleo aún no se ha generalizado. Como contrapartida, el parque automotor y, consecuentemente, el tránsito vehicular en la ciudad de Buenos Aires y sus alrededores, continúan aumentando.

Para la realización de estos monitoreos se seleccionaron las siguientes zonas de muestreo:

- Puerto de Olivos
- Costanera Norte, altura Ciudad Universitaria (FCEN)
- Puerto de Buenos Aires
- Parque Ecológico, Costanera Sur
- Balneario de Quilmes

Las muestras fueron recolectadas durante verano e invierno de 1989.

En base a la literatura, ya hemos detallado que los análisis de elementos metálicos en muestras de aguas, plantean serias dificultades metodológicas. Por ello, el primer paso consistió en optimizar las condiciones y en analizar algunas de las posibles fuentes capaces de interferir con los resultados. El método finalmente seleccionado permite, en forma simultánea, el análisis de cinco elementos (cadmio, cobalto, hierro, níquel y plomo) en la llamada fracción recuperable. Según los estudios, resulta confiable y reproducible para su aplicación rutinaria, obteniéndose una muy buena linealidad dentro de un cierto rango de concentraciones, y disponiéndose de un lapso de al menos quince días para la realización de los análisis.

Se considera, además, que dicho método puede constituir una buena aproximación para la determinación del contenido total de elementos metálicos, presentes tanto en la fase acuosa como en el material en suspensión, potencialmente biodisponibles para los distintos organismos.

Los resultados obtenidos en los análisis de las muestras de aguas presentaron, en general, una gran variabilidad entre las distintas estaciones de muestreo, las cuales están sujetas a la influencia de descargas muy diversas.

Según la literatura, se considera que los niveles de concentración de elementos metálicos en muestras de aguas naturales, pueden presentar una amplia variabilidad, aún dentro de una misma zona, como consecuencia de las constantes fluctuaciones en las

condiciones ambientales (Lietz y Galling, 1989; Finerty et al., 1990).

Debido a dicha variabilidad y al hecho de que únicamente se han analizado dos temporadas, no es posible establecer tendencias temporales.

En forma complementaria, se analizaron muestras de sedimentos recolectadas en las mismas zonas ya descritas, exceptuando Puerto de Buenos Aires, donde no se tuvo acceso para su recolección. Los análisis incluyeron la determinación de ocho elementos: cadmio, cobalto, cobre, cromo, hierro, níquel, plomo y zinc.

A través de los resultados obtenidos se pudo comprobar que las variaciones en los niveles de concentración de los metales entre las distintas zonas resultaron más marcadas que las variaciones por cambio de temporada.

En Puerto de Olivos se encontraron los niveles más bajos de concentración de los distintos elementos analizados. Los valores más altos de cobre y plomo se verificaron en las dos zonas de Capital Federal (FCEN y Parque Ecológico). En Balneario de Quilmes se registraron los niveles más elevados de cobalto, cromo, hierro y zinc, así como también valores detectables de cadmio.

Los estudios realizados en distintas temporadas demostraron que en la zona de Puerto de Olivos se encontraron variaciones apreciables para todos los elementos estudiados. En cambio, en la zona del Balneario de Quilmes, únicamente los elementos cadmio y cromo presentaron variaciones temporales apreciables.

Por consiguiente, los análisis de muestras de sedimentos permitieron obtener mayor información, en relación a los practicados sobre las muestras de aguas.

Anteriormente ya se ha discutido que los sedimentos constituyen el subcompartimiento de mayor acumulación de sustancias químicas contaminantes, especialmente de elementos metálicos. Los contaminantes que allí se distribuyen presentan un carácter más "conservativo", por cuanto no están tan sujetos a las variantes condiciones ambientales.

Además, desde el punto de vista metodológico, las determinaciones resultan más simples, económicas y rápidas, siendo menos susceptibles de alteraciones por problemas de contaminación accidental de las muestras.

Por ello, en coincidencia con diversos autores, consideramos

que los análisis de elementos metálicos en muestras de sedimentos reflejan en mejor medida el grado de contaminación del sistema acuático y su evolución temporal (Marcus y Scott, 1990; Cofino et al., 1992).

Los datos reportados constituyen valores de referencia útiles no sólo para documentar los niveles de concentración de ciertos metales en distintas zonas costeras del Río de la Plata, sino también para establecer comparaciones con futuros monitoreos. Además, en base a dichos datos se pudo comprobar que efectivamente el plomo sería el principal elemento tóxico contaminante, entre los metales estudiados, en las zonas ubicadas en la ciudad de Buenos Aires, justificando ampliamente nuestra elección inicial.

El monitoreo biológico se concretó mediante la realización de estudios de bioacumulación. Para ello se analizaron muestras de tejido hepático de dos especies de peces: Odontesthes bonariensis (pejerrey) y Pimelodus clarias (bagre); de hepatopáncreas de gastrópodos: Ampullaria insularum, y de tejido blando total de moluscos bivalvos: Neocorbicula limosa. Estas últimas, fueron analizadas con y sin tracto gastrointestinal. De este modo es posible evaluar no sólo la cantidad de contaminantes que transitoriamente pueden estar presentes en el tracto gastrointestinal, asociados al material particulado accidentalmente incorporado por los organismos, sino también la proporción verdaderamente ligada a los tejidos blandos.

Los moluscos bivalvos han sido una de las especies más recomendadas y ampliamente usadas como posibles indicadores de contaminación en diversos programas de monitoreo a nivel mundial. Por ello, se realizó un estudio a fin de establecer las probables relaciones entre el contenido de metales en organismos de Neocorbicula limosa en función de su tamaño y en distintas épocas del año (verano, invierno y primavera de 1991).

Todos los organismos fueron recolectados en clubes de pescalinderos al Puerto de Buenos Aires, y en la zona del Parque Ecológico, Costanera Sur. En todos los casos posibles, se efectuaron determinaciones de ocho metales: cadmio, cobalto, cobre, cromo, hierro, níquel, plomo y zinc.

Tal como está ampliamente registrado en la literatura, los resultados presentaron una gran variabilidad, consecuencia de las

diferencias biológicas y fisiológicas de las distintas especies seleccionadas.

Los estudios de bioacumulación realizados con moluscos, incluyeron también el análisis de muestras de sedimentos. De este modo, se pudieron calcular los factores de bioacumulación resultantes. Estos valores pusieron en evidencia que a pesar de los bajos niveles ambientales de cadmio, los tejidos de ambos moluscos exhibieron una muy alta capacidad para acumular a dicho metal, en concordancia con múltiples reportes bibliográficos.

Teniendo en cuenta, además, que el cadmio presenta una elevada toxicidad, se justifican las constantes recomendaciones para incluirlo en los programas de biomonitoreo, por parte de las principales agencias de protección ambiental, y la gran atención que ha recibido en la literatura (APHA-AWWA-WPCF, 1980; GESAMP, 1984, 1987 y 1991; Swedish EPA, 1991; WHO, 1992).

En relación al plomo, se encontró una situación inversa. Mientras que resultó ser el elemento tóxico mayoritario en muestras de aguas y sedimentos, su capacidad para acumularse en los moluscos demostró ser muy pobre. Incluso, en dos temporadas (verano e invierno de 1991) no fue detectado en el tejido blando libre de tracto gastrointestinal de los bivalvos. Estudios complementarios demostraron que una gran proporción del elemento se distribuye preferentemente en las valvas, antes que en los tejidos blandos. En cuanto al cadmio, no se detectó en dichas estructuras.

El hepatopáncreas de Ampullaria insularum presentó también una gran capacidad para acumular zinc, con niveles superiores a los ambientales. Los niveles de níquel fueron prácticamente iguales a los registrados en sedimentos.

En cambio, los moluscos bivalvos, después de cadmio, presentaron una gran capacidad para acumular cobre, la cual también llegó a ser superior a los niveles presentes en las muestras de sedimentos.

Los análisis de cadmio y plomo realizados en el tejido blando total de los bivalvos con y sin tracto gastrointestinal presentaron diferencias significativas. De esta manera, resulta evidente la conveniencia de eliminar el tracto gastrointestinal y su contenido para evaluar correctamente los niveles acumulados. Para los otros elementos, en cambio, no se encontraron diferencias significativas.

Las determinaciones realizadas durante tres temporadas demostraron que los niveles de cadmio, cobre y plomo, presentes en las muestras libres de tracto gastrointestinal, experimentaban un incremento significativo en primavera, no encontrándose diferencias apreciables entre verano e invierno. Los niveles de cromo y zinc no exhibieron diferencias significativas durante las tres temporadas de estudio, mientras que los de níquel presentaron una tendencia decreciente. El cobalto no fue detectado en ninguna de las muestras analizadas y los niveles de hierro presentaron una variabilidad tal, que impide obtener conclusiones sobre su comportamiento.

Por otra parte, en líneas generales, no fue posible establecer buenas correlaciones entre los niveles de elementos metálicos presentes en las muestras de sedimentos y los niveles observados en los tejidos blandos de los bivalvos.

En base a estos resultados, se puede apreciar que los estudios de bioacumulación constituyen una herramienta de singular importancia en el campo de la ecotoxicología.

Los monitoreos ambientales que se basan en la realización de análisis químicos permiten identificar la clase y los niveles de ocurrencia de los diversos contaminantes en el sistema acuático. De este modo pueden contribuir a establecer niveles de referencia, a detectar las principales fuentes de emisión, el destino y la persistencia de las sustancias en el ambiente.

En otro orden, pueden resultar útiles para establecer normas de regulación y control de las descargas.

Sin embargo, estos análisis no revelan, por sí mismos, la magnitud y el alcance al que están sometidos los distintos organismos como consecuencia de la absorción de tales sustancias.

Nuestros resultados han puesto en clara evidencia que los procesos de bioacumulación de elementos metálicos no dependen exclusivamente de los niveles ambientales. De hecho, los niveles de bioacumulación están influenciados por diversos factores fisiológicos, los cuales a su vez suelen estar sujetos a variaciones estacionales, y que condicionan los procesos de absorción, distribución, metabolismo y excreción de las sustancias químicas contaminantes (Hilmy et al., 1987; Khan et al., 1989; Bjerregaard, 1991).

Por consiguiente, es muy difícil satisfacer plenamente los distintos requisitos que teóricamente debe cumplir un organismo

para ser considerado como "bioindicador" de contaminación. Los moluscos bivalvos han sido ampliamente recomendados en tal sentido. Sin embargo, según nuestros resultados ese concepto debería emplearse con prudencia, reconociendo sus limitaciones.

De todas maneras, queda demostrado que una evaluación integral del sistema acuático, que contemple simultáneamente análisis en muestras ambientales y en tejidos u organismos biológicos, posibilita obtener una información más completa del impacto derivado de la liberación de sustancias químicas contaminantes y de la calidad de sus aguas.

En relación a la segunda etapa del presente trabajo, el primer objetivo consistió en tratar de establecer los niveles de concentración letales en dos especies de moluscos gastrópodos (Biomphalaria glabrata y Ampullaria canaliculata) y una de bivalvos (Neocorbicula limosa) expuestos a diferentes soluciones de cadmio o plomo, mediante la realización de bioensayos agudos (t = 96 hs), en condiciones controladas de laboratorio.

En relación al cadmio, los resultados obtenidos pusieron de manifiesto una importante diferencia en la toxicidad del metal en las diferentes especies. Así, mientras que para los gastrópodos el rango de letalidad osciló entre 0,3 y 2,5 mg Cd.L⁻¹, no pudo encontrarse un valor tal que produjera un cierto porcentaje de mortalidad en los organismos bivalvos. Según la literatura, el rango de letalidad obtenido para los gastrópodos, se encuentra dentro de los valores que han sido registrados tanto en especies marinas como de agua dulce (Ravera, 1984; Wong, 1987; WHO, 1992). Por su parte, los bivalvos de N. limosa fueron sometidos a niveles de exposición de hasta 50 mg Cd.L⁻¹, superando los niveles de letalidad reportados por otros autores, sin que se verificara mortalidad (Eisler, 1977; Mc Leese et al., 1987; Wong, 1987; WHO, 1992).

Al estudiar los niveles de acumulación de cadmio en los tejidos de los diversos organismos expuestos, se puede llegar a interpretar esas diferencias. Así, mientras los factores de bioacumulación nominales obtenidos en el tejido total (blando + duro) de los organismos gastrópodos alcanzaron valores de 250 y 260, para B. glabrata y A. canaliculata, respectivamente, y de 400 en el tejido blando de esa última especie; no llegaron a 2 en los

bivalvos de N. limosa.

En base a estos resultados, los organismos bivalvos han demostrado una muy escasa absorción del metal, en relación a los gastrópodos.

Resulta interesante señalar, además, que ambas especies de gastrópodos son pulmonados, por lo que deben salir a la superficie para respirar. En cambio, los bivalvos, al poseer branquias, están obligados a obtener el oxígeno del medio acuoso.

Por ello, es posible que estos organismos hayan hecho frente al estrés, disminuyendo su actividad y procesos fisiológicos a niveles basales, refugiándose en sus valvas, para evitar el ingreso del tóxico (Wong, 1987; Mackie, 1989). Según la literatura, se ha observado que aún entre especies estrechamente relacionadas se encuentran marcadas diferencias en la toxicidad del cadmio, debidas a variaciones en la incorporación del elemento (Stuhlbacher et al., 1992).

Recordemos también que durante nuestros estudios de monitoreo de bioacumulación observamos que la especie A. insularum no pudo encontrarse después del primer muestreo. Oportunamente, hemos discutido que múltiples factores, de naturaleza química o física, pudieron influir en la desaparición de esa especie.

Sin embargo, en base a nuestros estudios pudimos comprobar que los gastrópodos resultaron más sensibles a los efectos tóxicos del cadmio. Si bien en los bioensayos de letalidad y acumulación se trabajó con una especie diferente (A. canaliculata), ésta pertenece a la misma familia (de Castellanos y Fernández, 1976). Por consiguiente, puede asumirse que los altos niveles de cadmio, registrados en el hepatopáncreas de A. insularum hayan incidido en forma significativa en su desaparición.

Al pretender implementar los bioensayos con distintos niveles de plomo, se presentaron serios inconvenientes, debido a problemas de insolubilidad de las soluciones, a valores de pH compatibles con el bienestar de los organismos.

Ahora bien, en los sistemas acuáticos naturales se verifican una serie de interacciones, tanto de índole química como biológica. Por ello, para lograr una mejor aproximación a las condiciones naturales, se implementaron una serie de bioensayos, empleando moluscos bivalvos expuestos a una cierta concentración subletal de cadmio o plomo, en presencia o ausencia de ácidos húmicos.

Estas sustancias orgánicas, ampliamente distribuídas en todos los sistemas acuáticos, constituyen uno de los principales ligandos que pueden influir en la especiación y biodisponibilidad de los elementos metálicos y, por ende, en su toxicidad.

Mediante estos bioensayos se evaluaron las siguientes respuestas de los organismos: letalidad, acumulación, niveles de glucógeno y de grupos tioles (totales, proteicos y no proteicos)

Si bien en ningún caso se modificó la letalidad, en presencia de ácidos húmicos los niveles de bioacumulación de cadmio disminuyeron, mientras que los de plomo aumentaron, en relación a los organismos expuestos únicamente a las soluciones de los respectivos metales.

En general, los niveles de glucógeno en el tejido blando total presentaron una gran variabilidad, impidiendo obtener conclusiones válidas. Por ello, se analizaron los niveles en el tejido del pie, los cuales se correlacionaron positivamente con los niveles de bioacumulación resultantes según los tratamientos.

Los organismos tratados con cadmio exhibieron un incremento significativo en los niveles de grupos tioles totales, debido a un aumento en los niveles de grupos tioles proteicos, con respecto a los controles. Dicho incremento podría ser consecuencia de la inducción de metalotioneínas o proteínas similares. Cuando los organismos se expusieron a cadmio en presencia de ácidos húmicos, se elevaron aún más los niveles de grupos tioles proteicos, a la vez que disminuyeron los niveles de grupos tioles no proteicos. Es posible que dicho descenso, sea debido a una disminución en los niveles de glutatión.

En los organismos expuestos a plomo, ya sea en presencia o ausencia de ácidos húmicos, no se observaron modificaciones en los niveles de grupos tioles totales, proteicos o no proteicos.

Estos resultados demostraron que efectivamente como consecuencia de las interacciones resultantes entre los ácidos húmicos y los distintos metales, se modifican apreciablemente las diversas respuestas biológicas de los organismos en estudio, con excepción de la letalidad.

Las experiencias realizadas a lo largo del presente Trabajo de Tesis, nos han permitido apreciar los alcances y las limitaciones de algunas de las estrategias disponibles en la Ecotoxicología, para encarar la compleja problemática derivada de la contaminación ambiental. Indudablemente, desde el punto de vista científico se avanza con cierta lentitud. Sin embargo, tenemos la convicción de que a través de una evaluación cabal y profunda del estado de nuestro medio ambiente y los ecosistemas, es posible encarar las medidas más adecuadas para protegernos de las consecuencias negativas de la contaminación. De este modo, se ha intentado brindar un aporte acerca de los niveles de algunos contaminantes metálicos presentes en zonas costeras del Río de la Plata, así como también se han implementado bioensayos tendientes a evaluar algunas de las respuestas biológicas de los organismos en estudio.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'W. A. ...', with a long horizontal line extending to the right.A handwritten signature in black ink, appearing to be 'B. W. ...', with a long horizontal line extending to the right.

BIBLIOGRAFÍA

- 1) Abaychi, J.K. y Dou-Abul, A.A.Z. (1985). *Water Res.* 19: 457-462.
- 2) Abaychi, J.K. y Al-Saad, H.T. (1988). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 40: 226-232.
- 3) Abbt-Braun, G.; Frimmel, F.H. y Schulten, H.R. (1989). *Water Res.* 23: 1579-1591.
- 4) Alexander, M. (1981). *Science* 211: 132-138.
- 5) Alikhan, M.A. (1993). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 50: 922-928.
- 6) Aloisi, J.; Fried, B. y Sherma, J. (1991). *J. Liq. Chromatogr.* 14: 3259-3267.
- 7) Anderson, B.G. (1980). in "Aquatic Invertebrate Bioassays", ASTM STP 715, A.L. Buikema Jr, y J. Cairns Jr., Eds., American Society for Testing and Materials, pp. 3-35.
- 8) Anderson, M.E. (1985). *Meth. Enzymol.* 113: 548-553.
- 9) Andersson, I. y Gustafsson, L. (1989). *Ambio* 18: 244-246.
- 10) APHA-AWWA-WPCF. (1980). American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation. "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater", 15 th. Edition.
- 11) Arillo, A.; Margiocco, C.; Melodia, F. y Mensi, P. (1982). *Chemosphere* 11: 47-57.
- 12) Arjonilla, M.; Forja, J.M. y Gómez-Parra, A. (1994). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 52: 810-817.
- 13) Ashton, A. y Chan, R. (1987). *Analyst* 112: 841-844.
- 14) Ayala, H.L. (1987). *Environ. Manage.* 11: 141-147.
- 15) Baker, E.T.; Cannon, G.A. y Curl, H.C.Jr. (1983). *J. Geophys. Res.* 88: 9661-9669.
- 16) Balls, M.; Blaauboer, B.; Brusick, D.; Frazier, J.; Lamb, D.; Pemberton, M.; Reinhardt, C; Roberfroid, M.; Rosenkranz, H.; Schmid, B.; Spielman, H.; Stamatii, A.L. y Walum, E. (1990). *ATLA* 18: 313-337.
- 17) Balls, M. (1991). *Laboratory Animals* 25: 198-206.
- 18) Balogh, K.V. (1988). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 41: 910-914.
- 19) Barnes, R.D. (1987). "Zoología de los invertebrados", Nueva Editorial Interamericana, 4ª edición.
- 20) Batley, G.E. y Gardner, D. (1977). *Water Res.* 11: 745-756.
- 21) Baudo, R. y Muntau, H. (1990). en "Sediments: Chemistry and Toxicity of in-Place Pollutants"; R. Baudo, J.P. Giesy y H. Muntau, editores. Lewis Publishers, Inc. pp. 1-14.
- 22) Bazán, J.M. y Arraga, E. (1993). en "Conferencias de Limnología"; A. Boltovskoy y H.L. López, editores. Instituto de Limnología "Dr. R. A. Ringuet". La Plata, pp. 71-82.
- 23) Bebianno, M.J. y Langston, W.J. (1993). *BioMetals* 6: 239-244.
- 24) Beeby, A. (1991). en "Metal Ecotoxicology: Concepts & Applications"; M.C. Newman y A.W. McIntosh, editores. Lewis Publishers, Inc. pp. 65-90.
- 25) Beijer, K. y Jernelöv, A. (1986). en "Handbook on the Toxicology of

- Metals"; L. Friberg, G.F. Nordberg y V.B. Vouk, editores. Elsevier, Amsterdam. Vol. 1, Cap. 11.
- 26) Beliles, R.P. (1975). en: "Toxicology: The Basic Science of Poisons"; L. Casarett y J. Doull, editores. Macmillan Publishing Co., New York; pp. 454-502.
 - 27) Benes, P.; Gjessing, E.T. y Steinnes, E. (1976). *Water Res.* 10: 711-716.
 - 28) Bengtsson, B. (1988). *Ambio* 17: 356.
 - 29) Benson, A.A.; Chapelle, S.; Nevenzal, J.C.; Hakanson, J.L.; Bolis, L. y Gibbs, A.G. (1987). En: "Physiological Responses of Marine Organisms to Environmental Stresses"; J.V. Dorigan y F.L. Harrison, editores. Department of Energy, United States of America; DOE/ER-0317, pp. 29-38.
 - 30) Benson, W.H. y Long, S.F. (1991). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 21: 301-307.
 - 31) Bewers, J.M.; Barry, P.J. y MacGregor, D.J. (1987). En: "Cadmium in the Aquatic Environment"; J.O. Nriagu y J.B. Sprague, editores. John Wiley & Sons, Inc., pp. 1-18.
 - 32) Bitton, G. y Dutka, B.J. (1986). (editores). En: "Toxicity Testing Using Microorganisms", CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida. Vol. 1, 151 p.
 - 33) Bitton, G. y Koopman, B. (1992). *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 125: 1-22.
 - 34) Bjerregaard, P. (1991). *Comp. Biochem. Physiol.* 99 A: 75-83.
 - 35) Blazka, M.E. y Shaikh, Z.A. (1992). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 113: 118-125.
 - 36) Blazka, M.E.; Yoshida, M. y Shaikh, Z.A. (1992). *Comp. Biochem. Physiol.* 101 C: 631-639.
 - 37) Block, W.M.; Brennan, L.A. y Gutiérrez, R.J. (1987). *Environ. Manage.* 11: 265-269.
 - 38) Bojórquez-Tapia, L.A. (1989). *Environ. Manage.* 13: 545-551.
 - 39) Bolognani Fantin, A.M.; Franchini, A.; Trevisan, P. y Pederzoli, A. (1992). *Acta Histochem.* 92: 228-235.
 - 40) Booij, K. (1993). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 50: 205-211.
 - 41) Bordalo Costa, M.M. y Peneda, M.C. (1989). *Environ. Technol. Lett.* 10: 697-705.
 - 42) Borseth, J.F.; Aunaas, T.; Einarson, S.; Nordtug, T.; Olsen, A.J. y Zachariassen, K.E. (1992). *J. Exp. Biol.* 169: 1-18.
 - 43) Bourgoin, B.P.; Boomer, D.; Powell, M.J.; Willie, S.; Edgar, D. y Evans, D. (1992). *Analyst* 117: 19-22.
 - 44) Bourque, C.L. y Guy, R.D. (1989). En: "Aquatic Toxicology and Water Quality Management"; J.O. Nriagu y J.S.S. Lakshminarayana, editores. John Wiley & Sons, Inc. pp. 73-88.
 - 45) Boyden, C.R. (1974). *Nature* 251: 311-314.
 - 46) Boyden, C.R. y Phillips, D.J.H. (1981). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 5: 29-40.
 - 47) Bradford, W.L. y Horowitz, A.J. (1988). (editores). En: "The Role of Sediments in the Chemistry of Aquatic Systems"; US Geological Survey, Circular 969, 75 p.
 - 48) Brady, F.O. (1982). *Trends Biochem. Sci.* 7: 143-145.
 - 49) Breder, R. (1982). *Fresenius Z. Anal. Chem.* 313-395.

- 50) Brezonik, P.L.; King, S.O. y Mach, C.E. (1991). En: "Metal Ecotoxicology: Concepts & Applications"; M.C. Newman y A.W. McIntosh, editores. Lewis Publishers, Inc. pp. 1-32.
- 51) Briscoe, J. (1993). *Environment* 35: 7-37.
- 52) Brix, H. y Schierup, H.H. (1989). *Ambio* 18: 100-107.
- 53) Bro, K.M.; Sonzogni, W.C. y Hanson, M.E. (1987). *Environ. Manage.* 11: 495-505.
- 54) Broderius, S.J. (1991). En: "Aquatic Toxicology and Risk Assessment: Fourteenth Volume", ASTM STP 1124; M.A. Mayes y M.G. Barron, editores; American Society for Testing and Materials, Philadelphia, pp. 107-127.
- 55) Brouwer, A.; Murk, A.J. y Koeman, J.H. (1990). *Functional Ecology* 4: 275-281.
- 56) Brown, B.E. (1982). *Biol. Rev.* 57: 621-667.
- 57) Brown, L. (1980). *Water Res.* 14: 941-947.
- 58) Brown, V.M.; Shaw, T.L. y Shurben, D.G. (1974). *Water Res.* 8: 797-803.
- 59) Bruland, K.W.; Franks, R.P.; Knauer, G.A. y Martin, J.H. (1979). *Anal. Chim. Acta* 105: 233-245.
- 60) Bryan, G.W. y Gibbs, P.F. (1991). En: "Metal Ecotoxicology: Concepts & Applications"; M.C. Newman y A.W. McIntosh, editores. Lewis Publishers, Inc., pp. 323-362.
- 61) Bucke, D. (1993). *Parasitology* 106: S25-S37.
- 62) Buikema, A.L.Jr.; Geiger, J.G. y Lee, D.R. (1980). En: "Aquatic Invertebrate Bioassays" ASTM STP 715; A.L. Buikema Jr. y J. Cairns Jr., Eds., American Society for Testing and Materials, Philadelphia, pp. 48-69.
- 63) Bullough, W.S. (1981). "Practical Invertebrate Anatomy"; The Macmillan Press, Ltd.; 2ª Ed.; Ch. 20.
- 64) Burridge, L.E. y Haya, K. (1989). En: "Aquatic Toxicology and Water Quality Management"; J.O. Nriagu y J.S.S. Lakshminarayana, editores; John Wiley & Sons, Inc.; pp. 193-204.
- 65) Cabrera, F.; Toca, C.G.; Díaz, E. y de Arrambarri, P. (1984). *Water Res.* 12: 1469-1482.
- 66) Calamari, D.; Gaggino, G.F. y Pacchetti, G. (1982). *Chemosphere* 11: 59-70.
- 67) Calow, P. (1989). *Hydrobiologia* 188/189: 61-64.
- 68) Calow, P. y Sibly, R.M. (1990). *Functional Ecology* 4: 283-288.
- 69) Calow, P. (1992). *J. Aquat. Ecosyst. Health* 1: 1-5.
- 70) Carell, B.; Forberg, S.; Grundelius, E.; Henrikson, L.; Johnels, A.; Lindh U.; Mutvei, H.; Olsson, M.; Svärdström, K. y Westermark, T. (1987). *Ambio* 16: 2-10.
- 71) Carmichael, N.G.; Squibb, K.S.; Engel, D.W. y Fowler, B.A. (1980). *Comp. Biochem. Physiol.* 65A: 203-206.
- 72) Carmichael, N.G. y Bondy, S.C. (1981). *Experientia* 37: 752-753.
- 73) CARP-SIHN-SOHMA. (1990). Comisión Administradora del Río de la Plata-Servicio de Hidrografía Naval Argentina - Servicio de Oceanografía, Hidrografía y Meteorología de la Armada, Uruguay. "Estudio para la Evaluación de la Contaminación en el Río de la Plata". Buenos Aires, 422 p.

- 74) Carpena, E. y George, S.G. (1981). *Molec. Physiol.* 1: 23-34.
- 75) Cartañá, J.; Romeu, A. y Arola, Ll. (1992). *Comp. Biochem. Physiol.* 101C: 209-213.
- 76) Cattoggio, J. (1990). *Revista Ciencia Hoy*, vol. 90.
- 77) Chan, H.M. y Cherian, M.G. (1992). *Toxicology* 72: 281-290.
- 78) Chan, K.M.; Davidson, W.S. y Fletcher, G.L. (1989). En: "Aquatic Toxicology and Water Quality Management"; J.O. Nriagu y J.S.S. Lakshminarayana, editores. John Wiley & Sons, Inc., pp. 89-110.
- 79) Chapman, P.M. (1992). *J. Aquat. Ecosyst. Health* 1: 69-79.
- 80) Cheh, A.M.; Skochdopole, J.; Koski, P. y Cole, L. (1980). *Science* 207: 90-92.
- 81) Cherian, M.G. y Nordberg, M. (1983). *Toxicology* 28: 1-15.
- 82) Chou, C.L. y Uthe, J.F. (1991). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 46: 473-478.
- 83) Christiansen, D.C. y Klungsoyr, L. (1987). *Comp. Biochem. Physiol.* 88 B: 701-711.
- 84) Christie, N.T. y Costa, M. (1984). *Biol. Trace Elem. Res.* 6: 139-158.
- 85) Chubatsu, L.S.; Gennari, M. y Meneghini, R. (1992). *Chem. Biol. Interactions* 82: 99-110.
- 86) Chubatsu, L.S. y Meneghini, R. (1993). *Biochem. J.* 291: 193-198.
- 87) Clements, W.H. (1991). En: "Metal Ecotoxicology: Concepts & Applications" M.C. Newman y A.W. McIntosh, editores. Lewis Publishers, Inc., pp. 363-391.
- 88) Cochran, W.G. y Cox, G.M. (1964). "Experimental Design", 2nd Ed.; John Wiley & Sons, Inc., New York, 617 p.
- 89) Cofino, W.P.; Smedes, F.; de Jong, S.A.; Abarnou, A.; Boon, J.P.; Oostingh, I.; Davies, I.M.; Klungsoyr, J.; Wilhelmsen, S.; Whinnett, J.A. Law, S.; Schmidt, D. y Wilson, S. (1992). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 91: 47-56.
- 90) Coimbra, J. y Carraca, S. (1990). *Comp. Biochem. Physiol.* 95 C: 265-270.
- 91) Connell, D.W. (1987). *Ambio* 16: 47-50.
- 92) Cook, A.M.; Grossenbacher, H. y Hütter, R. (1983). *Experientia* 39: 1191-1198.
- 93) Cossarini-Dunier, M.; Demaël, A.; Riviere, J.L. y Lepot, D. (1988). *Ambio* 17: 401-405.
- 94) Coulson, R.A. (1987). *Comp. Biochem. Physiol.* 87 B: 207-216.
- 95) Courtemanch, D.L.; Davies, S.P. y Laverty, E.B. (1989). *Environ. Manage.* 13: 35-41.
- 96) Cripe, C.R. y Pritchard, P.H. (1990). En: "Aquatic Toxicology and Risk Assessment: Thirteenth Volume", ASTM STP 1096; W.G. Landis y W.H. van der Schalie, editores. American Society for Testing and Materials, Philadelphia. pp. 29-47.
- 97) Crossland, N.O.; Mitchell, G.C.; Bennett, D. y Maxted, J. (1991). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 22: 175-183.
- 98) Dagnino Pastore, L. (1973). "Mi Galaxia" (vol. 2), Ed. Nobis. Argentina.

- 99) Dallinger, R. (1994a). En: "Biología Celular en Toxicología Ambiental", Universidad del País Vasco; Euskadiko Kutxa Ed., vol. II, pp. 1-16.
- 100) Dallinger, R. (1994b). En: "Biología Celular en Toxicología Ambiental", Universidad del País Vasco; Euskadiko Kutxa Ed., vol. II, pp. 17-30.
- 101) de Castellanos, Z.J.A. y Fernández, D. (1976). "Fauna de agua dulce de la República Argentina"; Fundación para la Educación, la Ciencia y la Cultura (FECIC), Buenos Aires, Argentina; vol. XV, 33 p.
- 102) DeLaune, R.D.; Gambrell, R.P. y Knox, R.S. (1989). Environ. Technol. Lett. 10: 753-762.
- 103) Dellien, I. y Persson, L. (1979). Talanta 26: 1101-1104.
- 104) Depledge, M. (1989). Ambio 18: 301-302.
- 105) Depledge, M. y Rainbow, P.S. (1990). Comp. Biochem. Physiol. 97 C: 1-7.
- 106) de Robertis, E.D.P. y de Robertis, E.M.F. (1986). En: "Biología Celular y Molecular"; Ed. Librería "El Ateneo", Buenos Aires, 11ª Ed., pp. 232-252.
- 107) Díaz, C.; Galindo, L.; García-Montelongo, F.; Larrechi, M.S. y Rius, X. (1992). Bull. Environ. Contam. Toxicol. 48: 55-62.
- 108) Dickson, R.R. (1987). "Irish Sea Status Report of the Marine Pollution Monitoring Management Group"; Aquat. Environ. Monit. Rep; Ministry of Agriculture, Fisheries and Food Directorate of Fisheries Research, Lowestoft, (17), 83 p.
- 109) Dieter, H.H.; Müller, L.; Abel, J. y Summer, K.H. (1986). Toxicol. Appl. Pharmacol. 85: 380-388.
- 110) Dixon, P.M. y Newman, M.C. (1991). En: "Metal Ecotoxicology: Concepts & Applications"; M.C. Newman y A.W. McIntosh, editores. Lewis Publishers, Inc., pp. 207-242.
- 111) Doherty, F.G.; Failla, M.L. y Cherry, D.S. (1987). Comp. Biochem. Physiol. 87 C: 113-120.
- 112) Dorigan, J.V. y Harrison, F.L. (1987). "Physiological Responses of Marine Organisms to Environmental Stresses"; Department of Energy, United States of America; DOE/ER-0317, 501 p.
- 113) Dorigan, J.V.; Harrison, F.L.; Costlow, J.D.; Crecelius, E.A.; Jenkins, K.D.; Roughgarden, J.D. y Templeton, W.L. (1987). En: "Physiological Responses of Marine Organisms to Environmental Stresses"; Department of Energy, United States of America; DOE/ER-0317, pp. 7-26.
- 114) Doyle, L.J.; Blake, N.J.; Woo, C.C. y Yevich, P. (1978). Science 199: 1431-1433.
- 115) Duce, R.A.; Stumm, W. y Prospero, J.M. (1972). J. Geophys. Res. 77: 5059-5061.
- 116) Dudley, R.E. y Klaassen, C.D. (1984). Toxicol. Appl. Pharmacol. 72: 530-538.
- 117) Dutka, B.J. (1988). (editor) "Methods for Microbiological and Toxicological Analysis of Waters, Wastewaters and Sediments"; National Water Research Institute (NWRI); Canada Centre for Inland Waters (CCIW), Burlington, Ontario, Canadá.
- 118) Dutka, B.J. (1991). "Stability and Replicability of Bioassays Used in the Battery of Tests Approach for Aquatic Ecosystem Screening"; National Water Research Institute (NWRI), Canada Centre for Inland Waters (CCIW); Burlington, Ontario, Canadá; Contribution Nº 91-72.

- 119) Eaton, D.L.; Stacey, N.H.; Wong, K.L. y Klaassen, C.D. (1980). *Toxicol. Appli. Pharmacol.* 55: 393-402.
- 120) Eckert, R. (1990). "Fisiología Animal: Mecanismos y Adaptaciones"; McGraw Hill-Interamericana de España; Madrid. 3º Ed. 652 p.
- 121) Eidt, D.C.; Hollebone, J.E.; Lockhart, W.L.; Kingsbury, P.D.; Gadsby, M. C. y Ernst, W.R. (1989). En: "Aquatic Toxicology and Water Quality Management"; J.O. Nriagu y J.S.S. Lakshminarayana, editores. John Wiley & Sons, Inc.; pp. 245-283.
- 122) Eisler, R. (1977). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 17: 137-145.
- 123) Elbaz-Poulichet, F.; Hollinger, P.; Huang, W.W, y Martin, J.M. (1984). *Nature* 308: 409-414.
- 124) El-Hinnawi, E. y Haque Hashmi, M.U. (1982). "Global Environmental Issues" United Nations Environment Programme; Tycooly International Publishing Ltd., Dublin. Vol. 7, pp.69-99.
- 125) Evans, D.H. (1987). *Environ. Health Perspect.* 71: 47-58.
- 126) FAO (1977): Food and Agriculture Organization of the United Nations. "Manual of Methods in Aquatic Environment Research", Part 4 - Bases for selecting biological tests to evaluate marine pollution. Rome, FAO Fish. Tech. Pap. (164), 31 p.
- 127) FAO (1981): Food and Agriculture Organization of the United Nations. "Manual of Methods in Aquatic Environment Research", Part 7 - Selected Bioassays for the Mediterranean. Rome, FAO Fish. Tech. Pap. (208), 32p.
- 128) FAO (1982): Food and Agriculture Organization of the United Nations. "Manual of Methods in Aquatic Environment Research", Part 6 - Toxicity Tests Rome, FAO Fish. Tech. Pap. (185), 23 p.
- 129) FAO (1987): Food and Agriculture Organization of the United Nations. "Manual of Methods in Aquatic Environment Research", Part 10 - Short term static bioassays. Rome, FAO Fish. Tech. Pap. (247), 62 p.
- 130) Farrington, J.W. (1989). En: "Ecotoxicology: Problems and Approaches"; S. A. Levin, M.A. Harwell, J.R. Kelly y K.D. Kimball, editores. Springer-Verlag New York Inc.; pp. 279-350.
- 131) Ferris, F.G.; Schultze, S.; Witten, T.C.; Fyfe, W.S. y Beveridge, T.J. (1989). *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 1249-1257.
- 132) Finerty, M.W.; Madden, J.D.; Feagley, S.E. y Grodner, R.M. (1990). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 19: 94-100.
- 133) Finn, R.K. (1983). *Experientia* 39: 1231-1236.
- 134) Flegal A.R. y Coale, K.H. (1989). *Water Resources Bull.* 25: 1275.
- 135) Florence, T.M.; Morrison, G.M. y Stauber, J.L. (1992). *Sci. Total Environ* 125: 1-13.
- 136) Ford, J. (1989). En: "Ecotoxicology: Problems and Approaches"; S.A.Levin, M.A. Harwell, J.R. Kelly y K.D. Kimball, editores. Springer-Verlag, New York Inc.; pp. 99-144.
- 137) Förstner, U. (1990). En: "Sediments: Chemistry and Toxicity of in Place Pollutants"; R. Baudo, J.P. Giesy y H. Muntau, editores. Lewis Publishers Inc.; pp. 61-105.
- 138) Foulkes, E.C. (1988). *Toxicology* 52: 263-272.
- 139) Foulkes, E.C. (1991). *Toxicology* 69: 177-185.

- 140) Foulkes, E.C. y Bergman, D. (1993). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 120: 89-95.
- 141) Fowler, B.A. (1987). *Environ. Health Perspec.* 71: 121-128.
- 142) Fowler, B.A.; Hildebrand, C.E.; Kojima, Y. y Webb, M. (1987). *Experientia Suppl.* 52: 19-22.
- 143) FRAME (1991): Fund for the Replacement of Animals in Medical Experiments. *ATLA* 19: 116-138.
- 144) Franchini, A.; Barbanti, E. y Bolognani-Fantin, A.M. (1991). *Tissue and Cell* 23: 893-901.
- 145) Frank, P.M. y Robertson, P.B. (1979). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 21: 74-78.
- 146) Fremling, C.R. y Mauck, W.L. (1980). En: "Aquatic Invertebrate Bioassays" ASTM STP 715; A.L. Buikema, Jr. y J. Cairns Jr., editores. American Society for Testing and Material, Philadelphia; pp. 81-97.
- 147) French, D.P. (1991). En: "Aquatic Toxicology and Risk Assessment: Fourteenth Volume", ASTM STP 1124; M.A. Mayes y M.G. Barron, editores. American Society for Testing and Materials, Philadelphia; pp. 35-47.
- 148) Frenet, M. (1981). *Water Res.* 15: 1343-1350.
- 149) Friant, S.L. (1979). *Water, Air, and Soil Pollution* 11: 455-465.
- 150) Fried, B.; Rao, K.S. y Sherma, J. (1992). *Comp. Biochem. Physiol.* 101 A: 351-352.
- 151) Gärdenfors, U.; Westermark, T.; Emanuelsson, U.; Mutvei, H. y Waldén, H. (1988). *Ambio* 17: 347-349.
- 152) Gardiner, M.S. (1978). "Biología de los Invertebrados", Ediciones Omega, S.A., Barcelona, España; 920 p.
- 153) Gearing, J.N. (1989). En: "Ecotoxicology: Problems and Approaches"; S.A. Levin, M.A. Harwell, J.R. Kelly y K.D. Kimball, editores. Springer Verlag New York Inc.; pp. 411-470.
- 154) George, S.G. y Pirie, B.J. (1979). *Biochim. Biophys. Acta* 580: 234-244.
- 155) George, S.G.; Coombs, T.L. y Pirie, B.J. (1982). *Biochim. Biophys. Acta* 716: 61-71.
- 156) George, S.G. y Olsson, P.E. (1994). En: "Biomonitoring of Coastal Waters and Estuaries"; K.J.M. Kramer, editor. CRC Press, Inc., Boca Raton; pp. 151-178.
- 157) Geraerts, W.P.M. (1992). *Gen. Comp. Endocrinol.* 86: 433-444.
- 158) Gerson, R.J. y Shaikh, Z.A. (1984). *Biochem. Pharmacol.* 33: 199-203.
- 159) GESAMP (1984): Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Pollution. "Review of Potentially Harmful Substances: Cadmium, Lead, and Tin." World Health Organization. Reports and Studies (22), 114 p.
- 160) GESAMP (1987). Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Pollution. "Land/Sea Boundary Flux of Contaminants: Contributions from Rivers". World Health Organization. Reports and Studies (32), 171 p.
- 161) GESAMP (1991). Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Pollution. "Statement of the Intergovernmental Meeting of Experts on Land Based Sources of Marine Pollution. World Health Organization.
- 162) Ghisalba, O. (1983). *Experientia* 39: 1247-1257.
- 163) Ghisalba, O. y Küenzi, M. (1983a). *Experientia* 39: 1257-1263.

- 164) Ghisalpa, O. y Küenzi, M. (1983b). *Experientia* 39: 1263-1271.
- 165) Gibbs, R.J. (1973). *Science* 180: 71-73.
- 166) Giesy, J.P.Jr.; Laversee, G.J. y Williams, D.R. (1977). *Water Res.* 11: 1013-1020.
- 167) Giesy, J.P.Jr.; Duke, C.S.; Bingham, R.D. y Dickson, G.W. (1983). *Toxicol Environ. Chem.* 6: 259-295.
- 168) Giesy, J.P.Jr. y Hoke, R.A. (1990). En: "Sediments: Chemistry and Toxicity of in-Place Pollutants"; R. Baudo, J.P. Giesy y H. Muntau, editores; Lewis Publishers, Inc.; pp. 265-348.
- 169) Glasby, G.P. (1988). *Ambio* 17: 330-335.
- 170) Gluth, G.; Freitag, D.; Hanke, W. y Korte, F. (1985). *Comp. Biochem. Physiol.* 81 C: 273-277.
- 171) Goering, P.L. y Klaassen, C.D. (1983). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 70: 195-203.
- 172) Goering, P.L. y Klaassen, C.D. (1984). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 74: 299-307.
- 173) Goldberg, E.D.; Koide, M.; Hodge, V.; Flegal, A.R. y Martin, J. (1983). *Estuarine Coastal Shelf. Sci.* 16: 69-94.
- 174) Goldstein, A.; Aronow, L. y Kalman, S.M. (1974). "Principles of Drug Action: The basis of pharmacology". 2º Ed., John Wiley & Sons, 854 p.
- 175) Gómez, E.D. (1988). *Ambio* 17: 166-169.
- 176) Goreau, T.J. y de Mello, W.Z. (1988). *Ambio* 17: 275-280.
- 177) Goyer, R.A. (1991). En: "Casarett and Doull's Toxicology: The basic science of Poisons"; M.O. Amdur, J. Doull y C.D. Klaassen, editores; 4 th Edition. Pergamon Press, New York. pp. 623-680.
- 178) Graedel, T.E. y Crutzen, P.J. (1989). *Investigación y Ciencia* 158: 22-31.
- 179) Grandjean, P. (1992). *Toxicol. Lett.* 64/65: 43-51.
- 180) Greaves, G.N.; Simkiss, K.; Taylor, M. y Binsted, N. (1984). *Biochem. J.* 221: 855-868.
- 181) Grill, E.; Winnacker, F.L. y Zenk, M.H. (1985). *Science* 230: 674-676.
- 182) Grippo, R.S. y Dunson, W.A. (1991). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 21: 289-296.
- 183) Guarino, A.M. (1987). *Environ. Health Perspect.* 71: 17-24.
- 184) Guthrie, R.K.; Davis, E.M.; Cherry, D.S. y Murray, H.E. (1979). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 21: 53-61.
- 185) Hamer, D.H. (1986). *Ann. Rev. Biochem.* 55: 913-951.
- 186) Hamilton, S.J.; Faerber, N.L. y Buhl, K.J. (1989). *Water Res.* 23: 159-165.
- 187) Handy, R.D. y Eddy, F.B. (1990). *Functional Ecology* 4: 385-392.
- 188) Harper, D.J.; Fileman, C.F.; May, P.V. y Portmann, J.E. (1989). "Methods of Analysis for Trace Metals in Marine and other Samples"; *Aquat. Environ. Prot.: Analyt. Meth.*; Ministry of Agriculture, Fisheries and Food Directorate of Fisheries Research, Lowestoft, (3), 38 p.
- 189) Haux, C. y Förlin, L. (1988). *Ambio* 17: 376-380.

- 190) Hayton, W.L. y Schultz, I.R. (1991). En: "Aquatic Toxicology and Risk Assessment: Fourteenth Volume", ASTM STP 1124, M.A. Mayes y M.G. Barron, editores. American Society for Testing and Materials, Philadelphia; pp. 149-165.
- 191) Hemelraad, J.; Holwerda, D.A.; Wijnne, H.J.A. y Zandee, D.I. (1990a). Arch. Environ. Contam. Toxicol. 19: 686-690.
- 192) Hemelraad, J.; Herwig, H.J.; van Donselaar, E.G.; Holwerda, D.A. y Zandee D.I. (1990b). Arch. Environ. Contam. Toxicol. 19: 691-698.
- 193) Hemelraad, J.; Holwerda, D.A.; Herwig, H.J. y Zandee, D.I. (1990c). Arch. Environ. Contam. Toxicol. 19: 699-703.
- 194) Hemminga, M.A.; Maaskant, J.J.; Jager, J.C. y Joosse, J. (1985). Comp. Biochem. Physiol. 82 A: 239-246.
- 195) Herricks, E.E.; Schaeffer, D.J. y Perry, J.A. (1989). En: "Ecotoxicology: Problems and Approaches"; S.A. Levin, M.A. Harwell, J.R. Kelly y K.D. Kimball, editores. Springer-Verlag, New York, Inc.; pp. 351-410.
- 196) Heusner, A.A. (1987). Ann. Rev. Physiol. 49: 121-133.
- 197) Hileman, B. (1992). Chemical & Engineering News 70: 7-14.
- 198) Hilmy, A.M.; Shabana, M.B. y Daabees, A.Y. (1987). Comp. Biochem. Physiol. 81 C: 139-143.
- 199) Hogstrand, C. y Haux, C. (1991). Comp. Biochem. Physiol. 100 C: 137-141.
- 200) Holwerda, D.A.; Veenhof, P.R. y de Zwaan, A. (1984). Mar. Biol. Lett. 5: 185-190.
- 201) Horowitz, A.J. (1988). En: "The Role of Sediments in the Chemistry of Aquatic Systems"; US Geological Survey, Circular 969, pp. 7-22.
- 202) Hovinga, M.E.; Sowers, M. y Humphrey, H.E.B. (1993). Arch. Environ. Health 48: 98-104.
- 203) Howard, B. y Simkiss, K. (1981). Comp. Biochem. Physiol. 70 A: 559-561.
- 204) Hungspreugs, M. (1988). Ambio 17: 178-184.
- 205) Hunt, S. (1970). "Polysaccharide-Protein Complexes in Invertebrates", Academic Press, Inc.; pp. 163-175.
- 206) I.A.E.A. (1985).: International Atomic Energy Agency; Technical Reports Series nº 247.
- 207) Iguchi, H.; Ikeda, M. y Kojo, S. (1991). J. Appl. Toxicol. 11: 211-217.
- 208) Jackim, E. (1974). En: "Pollution and Physiology of Marine Organisms"; F.J. Vernberg y W.B. Vernberg, editores; Academic Press, Inc., New York; pp. 59-65.
- 209) Jenkins, K.D. y Sanders, B.M. (1986). Environ. Health Perspect. 65: 205-210.
- 210) Jing, Z. y Wei-Wen, H. (1988). Ambio 17: 36-39.
- 211) Johnson, L.M. y Talbot, H.W. (1983). Experientia 39: 1236-1246.
- 212) Jordao, C.P. y Nickless, G. (1989). Environ. Technol. Lett. 10: 743-752.
- 213) Josephson, J. (1982). Environ. Sci. Technol. 16: 20-24.
- 214) Kabala, S.J. (1988). Ambio 17: 323-329.
- 215) Kägi, J.H.R. y Vallee, B.L. (1960). J. Biol. Chem. 235: 3460-3465.

- 216) Kägi, J.H.R. y Kojima, Y. (1987). *Experientia Suppl.* 52: 25-61.
- 217) Kägi, J.H.R. y Schäffer, A. (1988). *Biochemistry* 27: 8509-8515.
- 218) Kaiser, M.; Irmer, U. y Weiler, K. (1989). *Environ. Technol. Lett.* 10: 845-854.
- 219) Kang, Y.J. y Enger, M.D. (1988). *Toxicology* 48: 93-101.
- 220) Karin, M. (1985). *Cell* 41: 9-10.
- 221) Karin, R.W.; Buono, J.A. y Fasching, J.L. (1975). *Anal. Chem.* 47: 2296-2299.
- 222) Karr, J.R. (1987). *Environ. Manage.* 11: 249-256.
- 223) Kelly, J.R.; Duke, T.W.; Harwell, M.A. y Harwell, C.C. (1987). *Environ. Manage.* 11: 537-562.
- 224) Kelly, J.R. (1989). En: "Ecotoxicology: Problems and Approaches"; S.A. Levin, M.A. Harwell, J.R. Kelly y K.D. Kimball, editores. Springer Verlag New York, Inc.; pp. 473-496.
- 225) Kelly, J.R. y Harwell, M.A. (1989). En: "Ecotoxicology: Problems and Approaches"; S.A. Levin, M.A. Harwell, J.R. Kelly y K.D. Kimball, editores. Springer-Verlag, New York, Inc.; pp. 9-39.
- 226) Kesten, E.M. (1990). *Acta Bioquim. Clin. Latinoam.* 24: 53-60.
- 227) Ketchum, B.H. (1983). "Ecosystems of the World 26: Estuaries and Enclosed Seas", Elsevier Scientific Publishing Co., 481 p.
- 228) Khan, A.T.; Weis, J.S. y D'Andrea, L. (1989). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 42: 339-343.
- 229) Khan, S.U. y Schnitzer, M. (1972). *Geochim. Cosmochim. Acta* 36: 745-754.
- 230) Kinne-Saffran, E.; Hülseweh, M.; Pfaff, CH. y Kinne, R.K.H. (1993). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 121: 22-29.
- 231) Kinrade, J.D. y Van Loon, J.C. (1974). *Anal. Chem.* 46: 1894-1898.
- 232) Klaassen, C.D. y Rozman T. (1991). En: "Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons", M.O. Amdur, J. Doull y C.D. Klaassen, editores. Pergamon Press, 4 th. Ed., pp. 50-87.
- 233) Klerks, P.L. y Levinton, J.S. (1989). En: "Ecotoxicology: Problems and Approaches"; S.A. Levin, M.A. Harwell, J.R. Kelly y K.D. Kimball, editores. Springer-Verlag, New York, Inc.; pp. 41-68.
- 234) Koeman, J.H. (1991). *Comp. Biochem. Physiol.* 100 C: 7-10.
- 235) Kolasa, J. y Pickett, S.T.A. (1992). *J. Aquat. Ecosyst. Health* 1: 7-13.
- 236) Koli, A.K.; Sandhu, S.S.; Canty, W.T.; Felix, K.L.; Reed, R.J. y Whitmore R. (1978). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 20: 328-331.
- 237) Korte, F. (1978). En: "Principles of Ecotoxicology"; John Wiley & Sons, London. pp. 11-35.
- 238) Kramer, K.J.M.; Jenner, H.A. y de Zwart, D. (1989). *Hydrobiologia* 188/189: 433-444.
- 239) Kosower, F.M. (1989). En: "Glutathione: Chemical, Biochemical, and Medical Aspects"; D. Dolphin, R. Poulson y O. Avramovic, editores. John Wiley & Sons, Inc.; pp. 103-143.
- 240) Krasne, S.; Eisenman G. y Szabo, G. (1971). *Science* 174: 412-415.
- 241) Krisman, C.R. (1962). *Anal. Biochem.* 4: 17-23.

- 242) Lai, T.M. (1988). En: "The Role of Sediments in the Chemistry of Aquatic Systems"; US Geological Survey, Circular 969, pp. 56-64.
- 243) Lake, D.L.; Kirk, P.W.W. y Lester, J.N. (1989). *Water Res.* 23: 285-291.
- 244) Landner, L. (1988). *Ambio*, 17: 360-366.
- 245) Landrum, P.F. y Robbins, J.A. (1990). En: "Sediments: Chemistry and Toxicity of in-Place Pollutants"; R. Baudo, J.P. Giesy y H. Muntau, editores. Lewis Publishing, Inc.; pp. 237-263.
- 246) La Point, T.W. y Perry, J.A. (1989). *Environ. Manage.* 13: 539-544.
- 247) Laskowski, R. y Maryanski, M. (1993). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 50: 232-240.
- 248) Latouche, Y.D. y Mix, M.C. (1982). *Mar. Pollut. Bull.* 13: 27-29.
- 249) Laurén, D.J. (1991). En: "Aquatic Toxicology and Risk Assessment: Volume Fourteenth", ASTM STP 1124; M.A. Mayes y M.G. Barron, editores; American Society for Testing and Materials, Philadelphia. pp. 223-244.
- 250) Laxen, D.P.H. y Harrison, R.M. (1981). *Anal. Chem.* 53: 345-350.
- 251) Lee, S.K.; Freitag, D.; Steinberg, C.; Kettrup, A. y Kim, Y.H. (1993). *Water Res.* 27: 199-204.
- 252) Lehninger, A.L. (1972). "Bioquímica: Las bases moleculares de la estructura y función celular", Ediciones Omega, S.A., Barcelona, 5ª Ed., 887 p.
- 253) Leisinger, T. (1983). *Experientia* 39: 1183-1191.
- 254) Lerman, A.; Mackenzie, F.T. y Geiger, R.J. (1989). En: "Ecotoxicology: Problems and Approaches"; S.A. Levin, M.A. Harwell, J.R. Kelly y K.D. Kimball, editores. Springer-Verlag, New York, Inc.; pp. 315-350.
- 255) Levin, S.A.; M.A. Harwell; Kelly, J.R. y Kimball, K.D. (1989). *Ibid.* pp. 1-9.
- 256) Li, T.Y.; Minkel, D.T.; Shaw III, C.F. y Petering, D.H. (1981). *Biochem. J.* 193: 441-446.
- 257) Lietz, W. y Galling, G. (1989). *Water Res.* 23: 247-252.
- 258) Lin, S.; Llukkonen, R.J.; Thom. R.E.; Bastian, J.G.; Lukasewycz, M.T. y Carison, R.M. (1984). *Environ. Sci. Technol.* 18: 932-935.
- 259) Lobel, P.B. (1987). *Comp. Biochem. Physiol.* 87 C: 47-50.
- 260) Lövgren, L. y Sjöberg, S. (1989). *Water Res.* 23: 327-332.
- 261) Lu, W. y Stillman, M.J. (1993). *J. Am. Chem. Soc.* 115: 3291-3299.
- 262) Lugo, A.E. y Morris, G.L. (1982). "Los Sistemas Ecológicos y la Humanidad", Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos, Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico, monografía nº 23, 82 p.
- 263) Luoma, S.N. (1988). En: "The Role of Sediments in the Chemistry of Aquatic Systems"; US Geological Survey, Circular 969; pp. 32-56.
- 264) Luoma, S.N. y Carter, J.L. (1991). En: "Metal Ecotoxicology: Concepts and Applications"; M.C. Newman y A.W. McIntosh, editores; Lewis Publishers, Inc.; pp. 261-300.
- 265) Maciorowski, H.D. y Clarke, R. McV. (1980). En: "Aquatic Invertebrate Bioassays", ASTM STP 715; A.L. Buikema y J.P. Cairns, editores. American Society for Testing and Materials, Philadelphia; pp. 36-47.

- 266) Mackay, D.; Joy, M. y Paterson, S. (1983). *Chemosphere* 12: 981-997.
- 267) Mackie, G.L. (1989). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 18: 215-223.
- 268) Magos, L. (1975). *Br. Med. Bull.* 31: 241-245.
- 269) Mahaffey, K.R.; Capar, S.G.; Gladen, B.C. y Fowler, B.A. (1981). *J. Lab. Clin. Med.* 98: 463-481.
- 270) Mahan, C.A. y Holcombe, J.A. (1992). *Anal. Chem.* 64: 1933-1939.
- 271) Mäkelä, T.P.; Petänen, T.; Kukkonen, J. y Oikari, A.O.J. (1991). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 22: 153-163.
- 272) Malins, D.C. y Ostrander, G.K. (1991). *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 31: 371-399.
- 273) Malm, O.; Pfeiffer, W.C.; Fiszman, M. y Azcue, J.M.P. (1989). *Environ. Technol. Lett.* 10: 675-680.
- 274) Malm, O.; Pfeiffer, W.C.; Souza, C.M.M. y Reuther, R. (1990). *Ambio* 19: 11-15.
- 275) Maltby, L. y Calow, P. (1989). *Hydrobiologia* 188/189: 65-76.
- 276) Maltby, L. y Naylor, C. (1990). *Functional Ecology* 4: 393-397.
- 277) Mangla, B. (1988). *Ambio* 17: 350-351.
- 278) Mannervik, B.; Carlberg, I. y Larson, K. (1989). En: "Glutathione: Chemical, Biochemical and Medical Aspects"; D. Dolphin, O. Avramovic y R. Poulson, editores; John Wiley & Sons, Inc.; pp. 475-516.
- 279) Marcus, J.M.; Swearingen, G.R.; Williams, A.D. y Heizer, D.D. (1988). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 17: 103-113.
- 280) Marcus, J.M. y Scott, G.I. (1990). En: "Aquatic Toxicology and Risk Assessment: Thirteenth Volume", ASTM STP 1096; W.G. Landis y W.H. van der Schalie, editores. American Society for Testing and Materials, Philadelphia; pp. 110-122.
- 281) Marcus, W.A. (1989). *Environ. Manage.* 13: 703-713.
- 282) Margalef, R. (1977). "Ecología", Ediciones Omega, S.A., Barcelona.
- 283) Margoshes, M. y Vallee, B.L. (1957). *J. Am. Chem. Soc.* 79: 4813-4814.
- 284) Marigómez, J.A.; Vega, M.M.; Cajaraville, M.P. y Angulo, E. (1989). *Cell. Mol. Biol.* 35: 555-562.
- 285) Mart, L. (1979a). *Fresenius Z. Anal. Chem.* 299: 97-102.
- 286) Mart, L. (1979b). *Fresenius Z. Anal. Chem.* 296: 350-357.
- 287) Mason, A.Z. y Simkiss, K. (1982). *Exp. Cell Res.* 139: 383-391.
- 288) Massabuau, J.C.; Burtin, B. y Wheatly, M. (1991). *Resp. Physiol.* 83: 103-114.
- 289) Masee, R.; Maessen, F.J.M.J. y de Goeij, J.J.M. (1981). *Anal. Chim. Acta* 127: 181-193.
- 290) Matsui, M.; Kakuta, M. y Misaki, A. (1993). *Biosci. Biotech. Biochem.* 57: 623-627.
- 291) May, W.E.; Wasik, S.P. y Freeman, D.H. (1978). *Anal. Chem.* 50: 997-1000.
- 292) Mayer, F.L.; Versteeg, D.J.; McKee, M.J.; Folmar, L.C.; Graney, R.L.; McCune, D.C. y Rattner, B.A. (1992). En: "Biomarkers: Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress"; R.J. Hugget, R.A. Kimerie, P.M. Mehrie, H.L. Bergman, Eds.; Lewis Publishers; pp. 5-85.

- 293) McCahon, C.P. y Pascoe, D. (1990). *Functional Ecology*, 4: 375-383.
- 294) McConchie, D.M. y Lawrance, L.M. (1991). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 21: 303-310.
- 295) McCracken, I.R. (1987). En: "Cadmium in the Aquatic Environment"; J.O. Nriagu y J.B. Sprague, editores. John Wiley & Sons, Inc.; pp. 89-116.
- 296) McIntosh, A.W. (1991). En: "Metal Ecotoxicology: Concepts & Applications." M.C. Newman y A.W. McIntosh, editores. Lewis Publishers, Inc.; pp. 243-260.
- 297) McLeese, D.W.; Sprague, J.B. y Ray, S. (1987). En: "Cadmium in the Aquatic Environment"; J.O.Nriagu y J.B.Sprague, editores. John Wiley & Sons, Inc., pp. 171-198.
- 298) Means, J.C. y Wijayarathne, R. (1982). *Science* 215: 968-970.
- 299) Mehra, M.C. y Arseneau, A. (1989). En: "Aquatic Toxicology and Water Quality Management"; J.O.Nriagu y J.S.S. Lakshminarayana, editores. John Wiley & Sons, Inc.; pp. 65-72.
- 300) Meier, J.R.; Ringhand, H.P.; Coleman, W.E.; Schenck, K.M.; Munch, J.W.; Streicher, R.P.; Kaylor, W.H. y Kopfler, F.C. (1986). *Environ. Health Perspect.* 69: 101-107.
- 301) Meister, A. y Anderson, M.F. (1983). *Ann. Rev. Biochem.* 52: 711-760.
- 302) Menzer, R.E. (1991). En: "Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons"; M.O. Amdur, J. Doull y C.D. Klaassen, editores. Pergamon Press, 4 th Ed.; pp. 872-902.
- 303) Merali, Z.; Kacew, S. y Singhal, R.L. (1974). *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 53: 174-184.
- 304) Meredith, P.A.; Moore, M.R. y Goldberg, A. (1977). *Biochem. J.* 166: 531-537.
- 305) Metcalfe, C.D. (1993). Apuntes curso "Contaminación Marina: 2º Parte, Contaminantes Orgánicos"; Universidad Nacional de Mar del Plata.
- 306) Meyer, W.; Kretschmer, M.; Hoffmann, A. y Harisch, G. (1991). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 21: 137-156.
- 307) Mistry, P. (1986). *Biochem. Pharmacol.* 35: 711-713.
- 308) Mizuike, A. (1987). *Pure & Appl. Chem.* 59: 555-564.
- 309) Mohnen, V.A. (1988). *Scientific American* 259: 30-38.
- 310) Möller, W. von (1978). *Arch. Hydrobiol.* 83: 405-418.
- 311) Moody, J.R. y Lindstrom, R.M. (1977). *Anal. Chem.* 49: 2264-2267.
- 312) Morata, P.; Faus, M.J.; Pérez-Palomo, M. y Sánchez-Medina, F. (1982). *Comp. Biochem. Physiol.* 72B: 421-425.
- 313) Moretto, H.J.A.; Nahabedian, D.F. y Pettovello, A.D. (1993). "Contaminación Acuática: Bioindicadores (Ecotoxicidad en invertebrados acuáticos de Buenos Aires)", Talleres gráficos SERVI-SER S.H., Morón, Bs. As.
- 314) Morgan, G.B. y Bretthauer, E.W. (1977). *Anal. Chem.* 49: 1210-1214.
- 315) Motosugi, K. y Soda, K. (1983). *Experientia* 39: 1214-1220.
- 316) Mulvey, M. y Diamond, S.A. (1991). En: "Metal Ecotoxicology: Concepts and Applications"; M.C. Newman y A.W. McIntosh, editores; Lewis Publishers, Inc., pp. 301-321.
- 317) Mullen, M.D.; Wolf, D.C.; Ferris, F.G.; Beveridge, T.J.; Flemming, C.A. y

- Bailey, G.W. (1989). *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 3143-3149.
- 318) Mumme, S.P. (1991). *Environment* 33: 7-29.
- 319) Munkittrick, K.R. y Dixon, D.G. (1989). *Hydrobiologia* 183/189: 123-135.
- 320) Murray, A.J. (1981). "Metal, organochlorine pesticides and PCB residue levels in fish and shellfish landed in England and Wales during 1975". *Aquat. Environ. Monit. Rep.*; Ministry of Agriculture, Fisheries and Food Directorate of Fisheries Research, Lowestoft, (5), 40 p.
- 321) Münzinger, A. (1987). *Environ. Technol. Lett.* 8: 141-148.
- 322) Neubecker, T.A. y Allen, H.E. (1983). *Water Res.* 17: 1-14.
- 323) Newman, M.C. y Heagler, M.G. (1991). En: "Metal Ecotoxicology: Concepts & Applications"; M.C. Newman y A.W. McIntosh, editores; Lewis Publishers, Inc.; pp. 91-130.
- 324) Noël-Lambot, F. (1976). *Experientia* 32: 324-326.
- 325) Nott, J.A. (1991). *Scanning Microscopy* 5: 191-205.
- 326) Nriagu, J.O. y Pacyna, J.M. (1988). *Nature* 333: 134-140.
- 327) Nriagu, J.O. (1990). *Environment* 32: 7-32.
- 328) Nriagu, J.O. (1992). *Sci. Total Environ.* 121: 1-37.
- 329) Nriagu, J.O. (1993). Apuntes del curso "Contaminación Marina, 1ª Parte, Contaminantes Metálicos"; Universidad Nacional de Mar del Plata.
- 330) Nriagu, J.O.; Lawson, G.; Wong, H.K.T. y Azcue, J.M. (1993). *J. Great Lakes Res.* 19: 175-182.
- 331) Nriagu, J.O. (en prensa). *Sci. Total Environ.*
- 332) Nyholm, N. y Kristensen, P. (1992). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 23: 161-172.
- 333) Nyholm, N.; Damborg, A. y Lingaard-Jorgensen, P. (1992). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 23: 173-190.
- 334) Odum E.D. (1969). *Science* 164: 262-270.
- 335) O.E.C.D. (1984).: Organization for Economic Cooperation and Development; Document nº 252/146.
- 336) Officer, C.B. (1983). En: "Ecosystems of the World 26: Estuaries and Enclosed Seas"; B.H. Ketchum, ed.; Elsevier Scientific Publishing Co., Amsterdam. pp. 15-41.
- 337) Ogner, G. y Schnitzer, M. (1970). *Science* 170: 317-318.
- 338) Okkerman, P.C.; Plassche, E.J.v.d.; Slooff, W.; Van Leeuwen, C.J. y Canton, J.H. (1991). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 21: 182-193.
- 339) Okun, D.A. (1991). *Environment* 33: 16-43.
- 340) Olafson, R.W.; Sim, R.G. y Boto, K.G. (1979). *Comp. Biochem. Physiol.* 62 B: 407-416.
- 341) Oliver, B.G.; Thurman, E.M. y Malcolm, R.L. (1983). *Geochim. Cosmochim. Acta* 47: 2031-2035.
- 342) Olsen, S.; Pessenda, L.C.R.; Ruzieka, J. y Hansen, E.H. (1983). *Analyst* 108: 905-917.
- 343) Olson, K.R.; Crawford, R.L.; Gingerich, W.H.; Meyerhoff, R.D. y Miller, J.G. (1991). En: "Aquatic Toxicology and Risk Assessment: Fourteenth

- Volume", ASTM STP 1124; M.A. Mayes y M.G. Barron, editores. American Society for Testing and Materials, Philadelphia; pp. 5-11.
- 344) Olsson P.E. (1994). En: "Fish Diseases, Volume III - Non-infectious disorders"; J.F. Leatherland y P.T.K. Woo, editores. Sweden. pp. 1-13.
 - 345) OPS-OMS (1982).: Organización Panamericana de la Salud - Organización Mundial de la Salud; Publicación Científica 425, 211p.
 - 346) Orrenius, S. y Moldéus, P. (1984). Trends Pharmacol. Sci. 5: 432-435.
 - 347) OSN (1967).: Obras Sanitarias de la Nación, método A - XIII.
 - 348) OSN (1970).: Ibid., método AV - XV.
 - 349) Overnell, J.; McIntosh, R. y Fletcher, T.C. (1987). Experientia 43: 178-181.
 - 350) Oxender, D.L. (1972). Ann. Rev. Biochem. 41: 777-809.
 - 351) Pakalns, P. y Farrar, Y.J. (1977). Water Res. 11: 145-151.
 - 352) Pardo, R.; Barrado, E.; Pérez, L. y Vega, M. (1990). Water Res. 24: 373-379.
 - 353) Parodiz, J.J. y Hennings, L. (1965). Ann. Carnegie Mus. 38: 69-96.
 - 354) Pilkis, S.J. y Claus, T.H. (1991). Annu. Rev. Nutr. 11: 465-515.
 - 355) Piotrowicz, S.R.; Ray, B.J.; Hoffman, G.L. y Duce, R.A. (1972). J. Geophys. Res. 77: 5243-5254.
 - 356) Poff, N.L.R. y Matthews, R.A. (1986). Arch. Hydrobiol. 106: 119-137.
 - 357) Portmann, J.; Harper, D.; Balls, P.; Pattinson, P.; Head, J.; Parker, J. y Ramsay, R.J. (1987). Aquat. Environ. Monit. Rep.; MAFF Direct. Fish. Res., Lowestoft (17), United Kingdom, 83 p.
 - 358) Postuma, L.; Hogervorst, R.F. y Van Straalen, N.M. (1992). Arch. Environ. Contam. Toxicol. 22: 146-156.
 - 359) Power, E.A.; Munkittrick, K.R. y Chapman, P.M. (1991). En: "Aquatic Toxicology and Risk Assessment: Fourteenth Volume", ASTM STP 1124; M.A. Mayes y M.G. Barron, editores. American Society for Testing and Materials Philadelphia, pp. 48-64.
 - 360) Pratt, J.R. (1990). En: "Aquatic Toxicology and Risk Assessment: Thirteenth Volume", ASTM STP 1096; W.G. Landis y W.H. van der Schalie, Eds., American Society for Testing and Materials, Philadelphia, pp. 16-26.
 - 361) Pucci, A.A.; Harriman, D.A.; Ervin, E.M.; Bratton, L. y Gordon, A. (1989) Water Resources Bull. 25: 1267-1272.
 - 362) Quiroga, J.M.; Sales, D. y Gómez-Parra, A. (1989). Water Res. 23: 801-807.
 - 363) Rabenstein, D.L. (1989). En: "Glutathione: Chemical, Biochemical, and Medical Aspects", Part A; D. Dolphin. O. Avramovic y R. Poulson, eds.; John Wiley & Sons; pp. 147-186.
 - 364) Rainbow, P.S.; Malik, I. y O'Brien, P. (1993). Aquat. Toxicol. 25: 15-30.
 - 365) Randall, D. (1990). En: "Fisiología Animal: Mecanismos y Adaptaciones", McGraw-Hill - Interamericana de España, 3ª Ed., Madrid. pp. 435-520.
 - 366) Rapport, D.J. (1992). J. Aquat, Ecosyst. Health 1: 15-24.
 - 367) Rauser, W.E. (1990). Annu. Rev. Biochem. 59: 61-86.

- 368) Ravera, O. (1984). *Experientia* 40: 2-14.
- 369) Ray S. y McLeese D.W. (1987) En: "Cadmium in the Aquatic Environment"; J.O.Nriagu y J.B.Sprague, editores. John y Wiley & Sons, Inc., pp. 199-230.
- 370) Regier H.A. (1989). En: "Aquatic Toxicology and Water Quality Management"; J.O.Nriagu y J.S.S. Lakshminarayana, editores. John Wiley, & Sons, inc.; pp. 1-6.
- 371) Regoli, F.; Nigro M. y Orlando E. (1992). *Comp. Biochem. Physiol.* 102 C: 189-192.
- 372) Reineskog, M. y Petersson, L.R. (1990). *Comp. Biochem. Physiol.* 95C: 201-206.
- 373) Reish, D.J. (1980). En: "Aquatic Invertebrate Bioassays", ASTM STP 715; A.L. Buikema y J. Cairns, Eds., American Society for Testing & Materials, Philadelphia; pp. 140-154.
- 374) Ritter, C.J.; Bergman, S.C.; Cothorn, C.R. y Zamierowski, E.E. (1978). *At. Absorpt. Newsl.* 17: 70-72.
- 375) Robertson, D.E. (1968). *Anal. Chem.* 40: 1067-1072.
- 376) Rockwell, R.C. y Moss, R.H. (1992). *Environment* 34: 12-39.
- 377) Roesijadi, G. y Unger, M.E. (1993). *Aquat. Toxicol.* 24: 195-206.
- 378) Rosencranz, A. (1988). *Ambio* 17: 336-341.
- 379) Rosopulo, A. von; Stärk, H.; Hahn, M. y Müller, H. (1980). *Landwirtsch. Forschung* 33: 121-135.
- 380) Ross, H.B. (1986). *Ambio* 15: 188-189.
- 381) Roux, A. (1986a). "Fauna Argentina: Moluscos I", Centro Editor de América Latina, S.A., Buenos Aires; Vol. 104, 33 p.
- 382) Roux, A. (1986b). "Fauna Argentina: Moluscos II", Centro Editor de América Latina, S.A., Buenos Aires; Vol. 105, 65 p.
- 383) Sadig, M. y Alam, I. (1989). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 42: 111-118.
- 384) Sagripanti, J.L.; Goering, P.L. y Lamanna, A. (1991). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 110: 477-485.
- 385) Sakai, H.; Kojima, Y. y Saito, K. (1986). *Water Res.* 20: 559-567.
- 386) Salanki, J.; Balogh, C.V. y Berta, E. (1982). *Water Res.* 16: 1147-1152.
- 387) Saleh, M.A.; Saleh, M.A.; Fouda, M.M.; Saleh, M.A.; Abdel Lattif, M.S. y Wilson, B.L. (1988). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 17: 391-403.
- 388) Sanders, B.M.; Jenkins, K.D.; Sunda, W. y Costlow, J.D. (1983). *Science* 222: 53-55.
- 389) Sangfors, O. (1988). *Ambio* 17: 296.
- 390) Sarasquete, M.C.; Gonzales de Canales, M.L. y Gimeno, S. (1992). *Eur. J. Histochem.* 36: 223-232.
- 391) Sarokin, D. y Schulkin, J. (1992a). *Environ. Sci. Technol.* 26: 1694-1701.
- 392) Sarokin, D. y Schulkin, J. (1992b). *Environ. Sci. Technol.* 26: 1476-1484.
- 393) Sastry, K.V.; Siddiqui, A.A. y Singh, S.K. (1982). *Chemosphere* 11: 1211-1216.

- 394) Schaeffer, D.J. (1991). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 22: 225-239.
- 395) Scheller, H.V.; Huang, B.; Hatch, E. y Goldsbrough, P.B. (1987). *Plant Physiol.* 85: 1031-1035.
- 396) Schmitt, C.J. y Brumbaugh, W.G. (1990). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 19: 731-747.
- 397) Schreck, C.B. y Brouha, P. (1975). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 14: 149-152.
- 398) Schulten, H.R. y Plage, B. (1991). *Naturwissenschaften* 78: 311-312.
- 399) Schulten, H.R. y Schnitzer, M. (1992). *Sci. Total Environ.* 117/118: 27-39.
- 400) Sedlak, J. y Lindsay, R.H. (1968). *Anal. Biochem.* 25: 192-205.
- 401) Sedman, R.M. (1989). *Environ. Health Perspect.* 79: 291-313.
- 402) Shaw, J.S. y Stroup, R.L. (1990a). *Internat. Health Develop.* winter'90: 17-19.
- 403) Shaw, J.S. y Stroup, R.L. (1990b). *Ibid.* pp. 20-24.
- 404) Sheehan, P.J. y Winner, R.W. (1984). En: "Effects of pollutants at the Ecosystem Level"; P.J. Sheehan, D.R. Miller, G.C. Butler y P. Bourdeau, Eds.; SCOPE, John Wiley & Sons, Ltd.; pp. 255-271.
- 405) Shimizu, M. y Morita, S. (1990). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 103: 28-39.
- 406) Simkiss, K. (1979). *Endeavour New Series* 3: 2-6.
- 407) Simkiss, K. (1990). *Functional Ecology* 4: 303-308.
- 408) Singhal, R.K.; Anderson, M.E. y Meister, A. (1987). *FASEB J.* 1: 220-223.
- 409) Sipes, M y Gandolfi, R. (1991). En: "Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons"; M.O. Amdur, J. Doull y C.D. Klaassen, eds.; Pergamon Press, 4 th Ed.; pp. 88-126.
- 410) Smith, R.A.; Alexander, R.B. y Wolman, M.G. (1987). *Science* 235: 1607-1615.
- 411) Smith, R.A. y Alexander, R.B. (1989). *Water Resources Bull.* 25: 1279-1281.
- 412) Sokal, R.R. y Rohlf, F.J. (1969). "Biometry: The Principles and Practice of Statistics in Biological Research"; W.H. Freeman and Co., San Francisco.
- 413) Somasundaram, B.; King, P.E. y Shackley, S.E. (1985). *Comp. Biochem. Physiol.* 81 C: 29-37.
- 414) Sprague, J.B. (1969). *Water Res.* 3: 793-821.
- 415) Sprague, J.B. (1987). En: "Cadmium in the Aquatic Environment"; J.O. Nriagu y J.B. Sprague, Eds.; John Wiley & Sons; pp. 139-169.
- 416) Stacey, N.L. y Klaassen, C.D. (1981). *Biochim. Biophys. Acta* 640: 693-697.
- 417) Stackhouse, R.A. y Benson, W.H. (1988). *Aquat. Toxicol.* 13: 99-108.
- 418) Stallard, R.F. y Edmond, J.M. (1983). *J. Geophys. Res.* 88: 9671-9688.
- 419) Steinberg, C.E.W.; Sturm, A.; Kelbel, J.; Kyu Lee, S.; Hertkorn, N.; Freitag, D. y Kettrup, A.A. (1992). *Acta Hydrochim Hydrobiol.* 20: 326-332.
- 420) Stone, H. y Overnell, J. (1985). *Comp. Biochem. Physiol.* 80 C: 9-14.

- 421) Storey, K.B. (1985). FEBS Lett. 181: 245-248.
- 422) Strachan, W.M.J. (1988). Ambio 17: 394-397.
- 423) Stratton, G.W. y Giles, J. (1990). Bull. Environ. Contam. Toxicol. 44: 420-427.
- 424) Streit, B. (1992). Experientia 48: 955-970.
- 425) Sketris, I.S. (1982). Clin. Toxicol. Consultant 4: 89-105.
- 426) Stryer, S. (1988). "Bioquímica", 3ª Ed., Editorial Reverté, Barcelona, España.
- 427) Stuhlbacher, A.; Bradley, M.C.; Naylor, C. y Calow, P. (1992). Comp. Biochem. Physiol. 101 C: 571-577.
- 428) Sturgeon, R.E.; Berman, S.S.; Desaulniers, A. y Russell, D.S. (1980). Talanta 27: 85-94.
- 429) Subramanian, K.S.; Chakrabarti, C.L.; Sueiras, J.E. y Maines, I.S. (1978) Anal. Chem. 50: 444-448.
- 430) Subramanian, K.S. y Méranger, J.C. (1979). Inter. J. Environ. Anal. Chem. 7: 25-40.
- 431) Sunda, W.G. y Lewis, J.M. (1978). Limnol. Oceanogr. 23: 870-876.
- 432) Sunda, W.G. y Gillispie, P.A. (1979). J. Mar. Res. 37: 761-777.
- 433) Sunda, W.G.; Cross, F.A.; Engel, D.W. y Hanson, P.J. (1987). En: Physiological Responses of Marine Organisms to Environmental Stresses"; J.V. Dorigan y F.L. Harrison, Eds.; Department of Energy, United States of America; DOE/ER-0317, pp. 451-478.
- 434) Süß, A. von (1978). Landwirtsch. Forschung 35: 419-429.
- 435) Swedish EPA (1990).: Swedish Environmental Protection Agency, "Biological Chemical Characterisation of Industrial Waste Water", 101 p.
- 436) Tarazona, J.V.; Muñoz, M.J.; Carbonell, G.; Carballo, M.; Ortiz, J.A. y Castaño, A. (1991). Arch. Environ. Contam. Toxicol. 20: 480-487.
- 437) Thomas, D.G.; Solbe, J.F. del G.; Ray, J. y Cryer, A. (1983). Biochem. Biophys. Res. Commun. 110: 584-592.
- 438) Thomas, D.G.; Brown, M.W.; Shurben, D.; Solbe, J.F. del G.; Cryer, A. y Kay, J. (1985). Comp. Biochem. Physiol. 82 C: 55-62.
- 439) Towle, D.W. (1981). Mar. Biol. Lett. 2: 107-122.
- 440) Trefry, J.H.; Metz, S. y Trocine, R.P. (1985). Science 230: 439-441.
- 441) Truhaut, R. (1977). Ecotoxicol. Environ. Saf. 1: 151-173.
- 442) Turner, M.D.; Marsh, D.O.; Smith, J.C.; Inglis, J.B. y Clarkson, T.W. (1980). Arch. Environ. Health 35: 367-378.
- 443) Tukey, J.W. (1977). "Exploratory Data Analysis", Addison-Wesley Publishing, Co.
- 444) Umweltbundesamt (1991). Daten zue Umwelt 1990/1991, Bundesrepublik Deutschland.
- 445) UNFSCO (1988) "River Inputs to Ocean Systems: Status and Recommendations for Research", UNFSCO Tech. Pap. Mar. Sci. (55), 25 p.
- 446) Uschida, Y.K.; Takio, K.; Ihara, Y. y Tomonaga, M. (1992). Neuron. 7: 337-347.

- 447) US EPA (1971).: United States Environmental Protection Agency. "Methods of Chemical Analysis of Waters and Wastes", Cincinnati, Ohio.
- 448) US EPA (1991).: United States Environmental Protection Agency. "Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organismos", Cincinnati, Ohio.
- 449) US Geological Survey (1987). "A Review of Surface-Water Sediment Fractions and their Interactions with Persistent Manmade Organic Compounds", Circular nº 993, 39 p.
- 450) Valsaraj M. y Thibodeaux, C. (1989). Water Res. 23: 183-189.
- 451) Van Erkom Schurink, C. y Griffiths, C.L. (1992). Comp. Biochem. Physiol. 101 A: 779-789.
- 452) Veldhuizen-Tsoerkan, M.B.; Holwerda, D.A.; van der Mast, C.A. y Zandee, D.I. (1991). Comp. Biochem. Physiol. 100 C: 699-706.
- 453) Verboost, P.M.; Flik, G.; Lock, R.A.C. y Wendelaar Bonga, S. E. (1988). J. Membrane Biol. 102: 97-104.
- 454) Viarengo, A. (1989). C.R.C. Aquat. Sci. 1: 295-317.
- 455) Viarengo, A. y Canesi, L. (1991). Aquaculture 94: 225-243.
- 456) Viessman, W. (1990). Environment 32: 11-35.
- 457) Villee, C.A. (1977). "Biología", Ed. EUDEBA, 18ª edición, pp. 651-679.
- 458) Waldichuk, M. (1974) En: "Pollution and Physiology of Marine Organisms", F.J. Vernberg y W.M. Vernberg, editores; Academic Press, Inc., New York; pp. 1-57.
- 459) Waldichuk, M. (1989). En: "Aquatic Toxicology and Water Quality Management", J.O. Nriagu y J.S.S. Lakshminarayana, editores; John Wiley & Sons, Inc.; pp. 7-22.
- 460) Walker, C.H. (1990). Functional Ecology 4: 295-301.
- 461) Walker, C.C.; Lott, H.M. y Barker, S.A. (1993). J. Chromatogr. 642: 225-242.
- 462) Wan, M.T.; Watts, R.G. y Moul, D.J. (1992). Bull. Environ. Contam. Toxicol. 49: 914-921.
- 463) Watton, A.J. y Hawkes, H.A. (1984). Environmental Pollution (Series A) 36: 17-29.
- 464) Weber, D.N.; Shaw III, C.F. y Petering, D.H. (1987). J. Biol. Chem. 262: 6962-6964.
- 465) Weinstein, D.A. y Birk, E.M. (1989). En: "Ecotoxicology: Problems and Approaches", S.A. Levin, M.A. Harwell, J.R. Kelly y K.D. Kimball, eds.; Springer-Verlag, New York, Inc.; pp. 181-212.
- 466) Weisz, P.B. (1987). "La ciencia de la biología", Ed. Omega, 6ª edición.
- 467) Whelan, T. (1988). Ambio 17: 72-75.
- 468) Whelan, T. (1989). Ambio 18: 302-304.
- 469) WHO. (1984). "Guidelines for Drinking-Water Quality", World Health Organization, Geneva, Vol. 2., 335 p.
- 470) WHO. (1989). "Environmental Health Criteria for Lead", World Health Organization, Geneva, 106 p.
- 471) WHO. (1992). "Environmental Health Criteria for Cadmium", World Health

- Organization, Geneva, 156 p.
- 472) Widdows, J. y Donkin, P. (1991). *Comp. Biochem. Physiol.* 100 C: 69-75.
- 473) Wiesel, I.; Wübker, S.M. y Rehm, H.J. (1993). *Appl. Microbiol. Biotechnol* 39: 110-116.
- 474) Winger, P.V.; Schultz, D.P. y Johnson, W.W. (1990). *Arch. Environ. Contam Toxicol.* 19: 101-117.
- 475) Winner, R.W. (1984). *Aquat. Toxicol.* 5: 267-274.
- 476) Witkowski, P.J.; Smith, J.A.; Fusillo, T.V. y Chiou, C.T. (1987). United States Geological Survey, Circular 993, 39 p.
- 477) Wong, P.T.S. (1987). En: "Cadmium in the Aquatic Environment"; J.O.Nriagu y J.B. Sprague, eds., John Wiley & Sons, Inc.; pp. 117-138.
- 478) Woolwell, G.M. (1970). *Science* 168: 429-433.
- 479) Yoshida, K.; Sigeoka, T. y Yamachi, F. (1988). *Chemosphere* 17: 2063-2072.
- 480) Zaba, B.N. y Davies, J.I. (1980). *Mar. Biol. Lett.* 1: 235-243.
- 481) Zaba, B.N. (1981). *Mar. Biol. Lett.* 2: 67-74.
- 482) Zwaan, A. de y Van Marrewijk, W.J.A. (1973). *Comp. Biochem. Physiol.* 44B: 429-439.
- 483) Zwaan, A. de y Wijsman, T.C.M. (1976). *Comp. Biochem. Physiol.* 54B: 313-324.