

Influencia de la especiación de los metales pesados en medio acuático como determinante de su toxicidad

Castañé PM¹, Topalián ML¹, Cordero RR^{1,2} y Salibián A^{1,3}

¹Programa de Ecofisiología Aplicada, Departamento de Ciencias Básicas. Universidad Nacional de Luján, Casilla de Correo 221, B6700ZBA, Luján, Argentina

²Instituto de Geología y Geocronología Isotópica, CONICET, Bs. As

³Comisión de Investigaciones Científicas, Provincia de Buenos Aires, B1900 La Plata, Argentina. e-mail: prodea@mail.unlu.edu.ar

Recibido 15 de Marzo de 2002 / Aceptado 6 de Junio de 2002

Resumen: La captación y toxicidad de los metales pesados para los organismos acuáticos están influidos no sólo por su concentración; también son relevantes el tiempo de exposición y los factores bióticos y abióticos del ambiente. Para considerar las relaciones de los metales con la biota acuática se deben tener en cuenta tres niveles de interés: a) la especiación en el ambiente, b) las interacciones con la membrana plasmática en la interfase organismo-ambiente, así como otros factores secundarios que pueden afectar los mecanismos funcionales básicos del individuo y c) la partición del elemento en los compartimentos del organismo y los efectos biológicos resultantes de su interacción con los receptores en los sitios de acción. En esta revisión se presentan ejemplos que ilustran la necesidad de determinar no sólo la concentración total de un metal en solución acuosa sino también el perfil de su entorno fisicoquímico y su biodisponibilidad; esta última puede ser correlacionada directamente con la especiación química a través del modelo de actividad del ion libre (en inglés, FIAM, free ion activity model). Se discute además la posibilidad de usar organismos como sensores de la biodisponibilidad de los metales en relación con su especiación química. Dentro de ellos, las algas representan un grupo muy importante ya que muestran una sensibilidad a los contaminantes mucho mayor que otros organismos acuáticos.

Se presentan resultados propios obtenidos mediante bioensayos de laboratorio, usando cultivos algales monoespecíficos de *Selenastrum capricornutum* Printz (= *Raphidocelis subcapitata*); se ha estudiado el efecto del Cd sobre la inhibición de la fotosíntesis en presencia del quelante EDTA-Na₂. Los resultados muestran que la concentración total del Cd no es un buen predictor de su toxicidad para las algas y que su especiación puede afectar la disponibilidad del mismo para los organismos en medio acuático y, consecuentemente, determinar la magnitud de su toxicidad.

Palabras clave: metales pesados, especiación química, toxicidad, medio acuático, bioensayos algales.

Abstract: Influence of the heavy metals speciation in the aquatic environment as determinant of their toxicity. The uptake and toxicity of heavy metals for aquatic organisms are not only under the influence of their concentration; the exposure time and the biotic and abiotic characteristics of the particular environment are also relevant. The relationship of the metals with the aquatic biota requires taking into account a) their speciation in the environment, b) the interactions with the cellular membrane in the organism-water interface as well as other secondary factors that may affect functional basic mechanisms of the organism and, c) the partition of the metal in the different compartments of the organism and the biological effects as a result of their interaction with the receptors at their sites of action. Several examples showing the importance of the determination of the total concentration and bioavailability of the metals and of the environmental profile are presented; in this respect, the free ion activity model (FIAM) is a useful tool that allows to determinate the correlation between the bioavailability and chemical speciation of the particular element. In addition, the possibility that organisms may be sensors of the bioavailability of heavy metals in the context of their speciation is discussed. Algae constitute a very important group of organisms that show a high sensitivity in the assessment of the impacts of toxic chemicals on aquatic species. The results obtained through laboratory bioassays run using *Selenastrum capricornutum* Printz (= *Raphidocelis subcapitata*) as test organism and cadmium chloride as a reference toxic are shown. The used end point was the inhibition of the photosynthesis rate when grown in media containing EDTA-sodium salt. It was shown that the total concentration of Cd was not a good indicator to predict the toxicity of the metal and that the speciation significantly affects its bioavailability and, consequently, the intensity of the toxic response.

Key words: Heavy metals, chemical speciation, toxicity, aquatic environment, algal bioassays.

INTERACCIONES ENTRE METALES Y ORGANISMOS ACUÁTICOS

Para la mayoría de los organismos la exposición a metales pesados, por encima de una concentración umbral, puede ser extremadamente tóxica. Los de mayor importancia toxicológica y ecotoxicológica en los ambientes acuáticos son: Hg, As, Cr, Pb,

Correspondencia: Dr. Alfredo Salibián. Depto de Ciencias Básicas, Universidad Nacional de Luján, Casilla de Correo 221, B6700ZBA-Luján, Argentina. Fax: 54-323-425795. e-mail: prodea@mail.unlu.edu.ar

Cd, Ni y Zn. Los iones de estos elementos suelen penetrar en la célula a través de los mismos sistemas de transporte que utilizan otros cationes metálicos fisiológicamente importantes (Ca, Mg, Cu, Zn). Dentro de la red trófica, los organismos fotosintetizadores o productores son las principales vías de acceso de los metales pesados hacia los consumidores, incluido el ser humano [1].

La actividad industrial y minera ha incrementado dramáticamente la contaminación de los ambientes naturales periurbanos por metales pesados. Por ejemplo, luego de un prolongado monitoreo regular del Río Reconquista (Buenos Aires, Argentina) se encontraron metales disueltos en el agua superficial cuyas concentraciones superaban ampliamente los límites máximos permitidos para la protección de la vida dulceacuática en la legislación vigente: As 4 veces, Cd 40.000, Cr 150, Cu 65 y Zn 23 veces [2-3].

La captación y toxicidad de los metales pesados para los organismos acuáticos están influidos no sólo por su concentración; también son relevantes el tiempo de exposición y los factores bióticos y abióticos del ambiente [4-6]. Para considerar las relaciones de los metales con la biota acuática se deben tener en cuenta tres niveles de interés: a) la especiación en el ambiente, b) las interacciones con la membrana plasmática en la interfase organismo-ambiente, así como otros factores secundarios que pueden afectar los mecanismos funcionales básicos del individuo y c) la partición del elemento en los compartimentos del organismo y los efectos biológicos resultantes de su interacción con los receptores en los sitios de acción.

Especiación del metal en el ambiente

En la descripción de la concentración de compuestos inorgánicos, considerados "sustancias traza" en los ambientes naturales, es frecuente encontrar la misma expresada en términos de elementos químicos. Sin embargo éstos son parte de moléculas y forman diversas especies moleculares presentes simultáneamente y en relaciones diversas en el ambiente. Por otro lado el comportamiento de un elemento depende de las especies particulares en la que está presente y la mayor reactividad de una especie no necesariamente coincidirá con la mayor concentración del metal en esa forma química. De allí que el comportamiento de un elemento en el ambiente (biodisponibilidad, toxicidad, distribución, etc.) no pueda predecirse basándose en su concentración total [7].

Para tomar en cuenta la complejidad del ambiente natural en el cual se encuentran los elementos traza y su importancia en el comportamiento de los mismos aparece en el contexto químico, el término "especiación".

Especiación química se define como la distribución de un elemento químico particular entre las diferentes formas en las cuales puede existir (especies), en un medio determinado. Incluye tanto los elementos libres (en forma neutra o ionizada) como los variados complejos que pueden formarse con diferentes ligandos [8]. La especiación química en aguas superficiales refleja la complejidad química de ese medio.

Los modelos de especiación de elementos traza consideran la formación de complejos con ligandos inorgánicos y orgánicos de bajo peso molecular, complejos con materia orgánica disuel-

ta, adsorción sobre la superficie del material particulado, reacciones redox, etc.

En aguas naturales la concentración de ligandos inorgánicos [HCO_3^- , CO_3^{2-} , Cl^- , SO_4^{2-} , F^- , $\text{HS}^-/\text{S}^{2-}$ (en condiciones anóxicas)] puede ser conocida con precisión; por el contrario los orgánicos (aminoácidos, ácidos orgánicos, material particulado) sólo se conocen como parámetros colectivos. A ellos deben añadirse los que se incorporan a través de vertidos antropogénicos, como por ejemplo, NTA (ácido nitrilotriacético) y EDTA (ácido etilendiamintetraacético) que pueden encontrarse en una concentración de 10^{-7} – 10^{-8} M [9].

La dificultad analítica para determinar las concentraciones de una sola especie o de un grupo de especies ha tenido por consecuencia que en general se cuantifique la concentración total de elementos trazas en el ambiente. Sin embargo, el análisis de las distintas especies químicas es una herramienta importante para predecir su comportamiento en el ecosistema y desarrollar medidas de remediación en caso de contaminación [6].

Desastres ecológicos como el incidente del metilmercurio en Minamata, sirven como trágico recordatorio de la importancia de la especiación de los elementos tóxicos en su movilización y bioacumulación. Muchas especies químicas de As, Hg y Se son transformados en el ambiente durante procesos de alteración abiótica, captación y eliminación por la biota, fijación y removilización en los sedimentos, etc. [7].

El óxido de cadmio y algunas sales de este metal, como el sulfuro y el carbonato, son prácticamente insolubles en agua pero pueden convertirse en sales hidrosolubles en el medio natural, mientras que el sulfato, el nitrato y los haluros son hidrosolubles [10]. De allí que la especiación del cadmio en el ambiente tiene importancia para evaluar su riesgo tóxico y ecotoxicológico. Los factores ambientales influyen en la captación y, por ende, en los efectos tóxicos del cadmio en los organismos acuáticos. Al aumentar la temperatura aumentan la captación y los efectos tóxicos, mientras que el aumento de la salinidad o de la dureza del agua los hace disminuir [11-12]. Los efectos producidos en presencia de materia orgánica disuelta son variables. Se observó que fracciones de masa molecular relativa intermedia, entre 500 a 300.000, reducen la captación y los efectos tóxicos fijando el cadmio y reduciendo su disponibilidad para los seres vivos; mientras que fracciones mayores de 300.000 aumentaron la toxicidad de este metal [13].

Estos ejemplos ilustran la necesidad de determinar no sólo la concentración total de un metal sino también el perfil del entorno fisicoquímico y su biodisponibilidad. Esta puede ser correlacionada directamente con la especiación química a través de la actividad del ion libre [14].

Modelo de actividad del ion libre (en inglés, FIAM, free ion activity model):

Para que un metal se acumule y/o provoque una respuesta biológica en un organismo blanco, debe interactuar o atravesar una membrana celular.

Esta interacción del metal con la superficie celular, involucra como especies reactivas tanto al ion libre (M^{z+}) como al complejo metal-ligando, de fórmula general, (ML), y puede ser

representada en términos de la formación de complejos de superficie M-X-célula, donde X-célula corresponde a un ligando celular presente en la superficie.

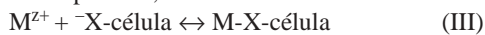
En el caso más simple - cuando el ión libre es la especie que reacciona con componentes de la superficie celular- se pueden considerar las siguientes reacciones:

A. equilibrio en la solución



$$K_1 = [ML] / ([M^{Z+}] [L]) \quad (II)$$

B. reacción, en la superficie, de M^{Z+}



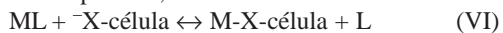
$$K_2 = \{\text{M-X-célula}\} / \{\text{X-célula}\} [M^{Z+}] \quad (IV)$$

reordenando $\{\text{M-X-célula}\} = K_2 \{\text{X-célula}\} [M^{Z+}] \quad (V)$

donde K_1 y K_2 son las constantes de equilibrio, L es un ligando en solución, y las cargas en los complejos se omiten por simplicidad.

Se supone que la respuesta biológica es proporcional a la concentración del complejo de superficie, $\{\text{M-X-célula}\}$. Si la concentración de los sitios X-célula libres permanece aproximadamente constante, la ecuación (V) indica que la respuesta biológica varía directamente como función de $[M^{Z+}]$.

C. reacción, en la superficie, de ML



$$\{\text{M-X-célula}\} = K_3 \{\text{X-célula}\} [ML] / [L] \quad (VII)$$

Reordenando la ecuación (II) y sustituyendo en (VII) se obtiene $\{\text{M-X-célula}\} = K_1 K_3 \{\text{X-célula}\} [M^{Z+}]$

que muestra la misma dependencia de $[M^{Z+}]$ que en la ecuación (V).

Diferentes autores han sugerido posibles mecanismos de unión entre la formación del complejo de superficie, M-X-célula, y el inicio del efecto biológico [15]. Si X-célula representa un sitio fisiológicamente activo en la superficie celular, la unión del metal M puede inducir una respuesta biológica directa (por ej., en las branquias de los peces). Por otro lado, si ese ligando celular corresponde a un sitio de transporte que permite al metal M atravesar la membrana celular y penetrar en el citosol, la unión al sitio de superficie precederá al transporte al interior de la célula; en otras palabras, la reacción efectiva de M con el sitio blanco ocurrirá intracelularmente, luego de atravesar la membrana. En una variación de este escenario, M podría competir por un sitio, X-célula, de transporte normalmente utilizado por un micronutriente esencial. Entonces, la unión del metal M al sitio de superficie inhibirá la provisión de ese elemento e inducirá una deficiencia de ese nutriente. Tal es el caso, por ejemplo, de la competencia Cu/Mn y Cd/Fe en el fitoplancton [16] o la de Ca/Cd en la piel de larvas de anfibios [12].

Las suposiciones que tiene en cuenta el FIAM son: (a) la membrana celular es el primer sitio de interacción del metal con los organismos vivos; (b) esta interacción con la membrana plasmática puede describirse como una reacción de complejación en la superficie, formándose el complejo M-X-célula; (c) el transporte del metal en solución, hacia la membrana, y la subsecuente reacción de complejación en la superficie ocurre rápidamente (respecto a la toma del metal y a la expresión de la respuesta bio-

lógica) de modo tal que se establece un pseudoequilibrio entre las especies del metal en el seno de la solución y aquellos en la superficie biológica; (d) la respuesta biológica depende estrictamente de la concentración del complejo de superficie M-X-célula; (e) dentro del rango de concentraciones de metales de interés toxicológico, la concentración de los sitios libres, $\{\text{X-célula}\}$, permanece virtualmente constante y las variaciones en la $\{\text{M-X-célula}\}$ siguen aquellas de $[M^{Z+}]$ en solución; y (f) durante la exposición al metal, la estructura de la superficie biológica permanece inalterada (por ej., el metal no induce ningún cambio en la estructura de la membrana plasmática).

Algunas aparentes excepciones al FIAM:

- A. Ligandos orgánicos que formen complejos lipofílicos con el metal: los ligandos de estructura $R_2 C(S)S^-$ (por ejemplo los xantatos) forman complejos lipofílicos con el metal que, por esa condición, atraviesan, fácilmente, la membrana celular. Otros ejemplos del aumento de la captación/ toxicidad del metal complejado se registraron para la 8 hidroxiquinolina (oxina) y ligandos relacionados. La introducción de un grupo sulfónico a la molécula de oxina en posición 5, que convierte al complejo en hidrofílico, hace desaparecer el aumento de toxicidad [17].
- B. Ligandos inorgánicos: en experiencias realizadas con iones fluoruro como complejante del Al se observaron aparentes excepciones al modelo. En estos casos, se propuso que, L-M-X-célula (F-Al-X-branquia) contribuyó junto a Al-X-branquia a la toxicidad observada. La contribución a la respuesta biológica del metal complejado se postuló en estos casos, debida a su capacidad para ocupar sitios activos en la membrana celular [15].
- C. Ligandos orgánicos de bajo peso molecular que formen complejos hidrofílicos con el metal: en experimentos con el alga unicelular *Selenastrum capricornutum*, se informó el aumento de biodisponibilidad de Cd^{2+} y Zn^{2+} en presencia de citrato ($100 \mu\text{mol.l}^{-1}$). En estos ensayos se encontró que: (i) al comparar los efectos producidos con el agregado de NTA, en presencia de citrato la concentración de Cd^{2+} que inhibe el 50% del crecimiento algal (IC_{50}) disminuía de 0.6 a $0.085 \mu\text{mol.l}^{-1}$, y con Zn^{2+} de 0.7 a $0.17 \mu\text{mol.l}^{-1}$, lo que indica el aumento de toxicidad de estos metales en presencia de dicho anión; (ii) la captación de Cd por la célula era dos veces mayor con citrato que con NTA, lo que indica que la entrada del metal a la célula aumenta en presencia del mismo. Por lo tanto se concluye que la toma de citrato por parte de la célula es suficiente para explicar el aumento de biodisponibilidad del metal debido posiblemente al transporte inespecífico del complejo metal-ligando a través de sistemas de transporte de la membrana biológica [18].
- D. Materia orgánica disuelta (en inglés, DOM, dissolved organic matter): la materia orgánica disuelta en las aguas naturales tiene influencia en la especiación y biodisponibilidad de los metales. La mayoría de los autores expresan la hipótesis de que la DOM natural actúa como un ligando, reduciendo la toxicidad por complejación del metal de una forma similar a ligandos sintéticos tales como EDTA. El FIAM asume implícitamente que los complejos hidrofílicos metal-DOM no contribuyen directamente a la toxicidad del metal por su

incapacidad de atravesar las barreras biológicas [19]. Sin embargo, la presencia de ácido fúlvico como parte de la DOM muestra que en esos casos, la participación en reacciones de complejación con Al no está limitada a su actuación como ligando; además hay claras evidencias de la interacción del ácido fúlvico con la membrana celular y su participación como proveedor de fósforo para las algas, apareciendo como una aparente excepción al FIAM. Esto refleja la dificultad de aplicar este modelo a medios con DOM, dada su naturaleza indefinida y la inherente dificultad analítica para determinar concentraciones de ion libre en su presencia [20].

Interacciones metal-organismo

Al aproximarse a la superficie de un organismo vivo, un metal, generalmente, encuentra primero una capa protectora de polisacáridos o glicoproteínas (por ej. la pared celular de los microorganismos o plantas superiores; el mucus de las células animales). Las macromoléculas que forman esta capa externa contienen una variedad de grupos funcionales simples, generalmente no quelantes, dominados por dadores de oxígeno. A valores de pH neutro algunos de esos grupos pueden ionizarse, conformando una matriz de sitios cargados negativamente a través del cual el metal debe migrar.

Al moverse hacia el interior celular, el metal encuentra la membrana plasmática, con un gran número de receptores o sitios de unión que pueden ser de dos tipos: sitios fisiológicamente inertes, en los cuales el metal puede ser secuestrado sin perturbar el funcionamiento celular normal, o sitios fisiológicamente activos. En el último caso la unión del metal puede afectar al metabolismo directamente (por ej. si el sitio de unión corresponde a una enzima de membrana) o indirectamente (si el metal unido es transportado a través de la membrana al interior de la célula) y una vez dentro de la célula, puede interactuar con una amplia variedad de sitios, con las consiguientes alteraciones del metabolismo.

Considerando este modelo general, la interacción de un metal con un organismo acuático puede plantearse como un proceso que involucra los siguientes pasos: (a) difusión desde el seno de la solución a la superficie biológica; (b) difusión a través de las barreras externas; (c) sorción/complejación, en la superficie, del metal a sitios de unión pasivos en la capa protectora, o a sitios en la superficie externa de la membrana plasmática; (d) internalización del metal mediante mecanismos de transporte a través de la membrana plasmática.

Por último, cabe mencionar el modelo del ligando biótico (en inglés, BLM, biotic ligand model) desarrollado recientemente. Este modelo se basa en la hipótesis de que la toxicidad no está solamente relacionada con la concentración acuosa del metal libre, sino que es necesario considerar tanto la complejación metal-ligando biótico como la interacción del metal con los cationes que compiten en el sitio de acción de toxicidad [21]. Se ha estudiado la aplicación del BLM para predecir los efectos de una variedad de parámetros químicos del agua natural sobre la toxicidad del cobre en las branquias de peces y en dafnias, encontrándose buena concordancia con las CL_{50} medidas experimentalmente [22].

Partición del metal en el organismo y los efectos biológicos resultantes

A pesar de la complejidad de los procesos toxicológicos, pueden hacerse algunas generalizaciones acerca del modo de unión de metales que conduce a efectos adversos. Las respuestas tóxicas pueden ser debidas a alguno de los siguientes daños causados por el metal [23]:

- A. bloqueo de grupos funcionales, biológicamente esenciales, de biomoléculas: por ejemplo, el complejo piruvato dehidrogenasa es inhibido por el As^{3+} debido a su reacción con dos grupos sulfhidrilos del ácido dihidrolipoico (cofactor esencial), por formación de una estructura cíclica estable.
- B. desplazamiento de iones metálicos esenciales en biomoléculas: uno de los ejemplos mejor documentados es la inhibición por Pb de ácido δ -aminolevulínico dehidratasa (ALAD) en vertebrados [24], donde el Zn es desplazado por dicho metal así como la alteración en la composición y conformación de los eritrocitos en *Bufo arenarum* expuesto a iones plomo [25].
- C. modificación de la conformación activa de las biomoléculas: por ejemplo, el Hg reacciona con las uniones disulfuro, afectando la estructura terciaria y cuaternaria de las proteínas; la inserción del Hg extiende la longitud normal de la unión disulfuro en aprox. 0.3 nm lo cual en algunos casos es suficiente para reducir la actividad biológica de la proteína blanco.

También hay evidencias que ciertos metales son capaces de sufrir procesos redox dentro de la célula que pueden inducir toxicidad por producción de radicales libres oxígeno, reactivos [26].

En el caso particular del cadmio, su toxicidad aguda para los organismos acuáticos es variable, incluso entre especies estrechamente emparentadas [27], y guarda relación con la concentración de iones libres del metal. El cadmio interacciona con el metabolismo del calcio en los animales; en los peces provoca hipocalcemia, probablemente al inhibir la captación de calcio a partir del agua. No obstante, las concentraciones elevadas de calcio en el agua los protegen de la ingestión de cadmio por competencia en los lugares de captación. En el anfibio *Bufo arenarum*, alteraciones epidérmicas ocurridas en soluciones conteniendo cadmio, fueron mitigadas en presencia de NaCl o agua dulce artificial, lo que fue interpretado ligándolo a la competición entre Cd y Ca [12]. El zinc aumenta la toxicidad del cadmio para los invertebrados acuáticos. Se han notificado efectos subletales en el crecimiento y la reproducción de invertebrados acuáticos, así como modificaciones estructurales en las branquias. Hay pruebas de la selección de estirpes resistentes de invertebrados acuáticos tras la exposición al cadmio sobre el terreno. La toxicidad del Cd es variable en los peces; los salmónidos son especialmente susceptibles. Se han notificado efectos subletales en los peces, en particular malformaciones de la espina dorsal. Las fases biológicas más susceptibles son el embrión y la larva joven; los huevos son los menos vulnerables. No se ha observado una interacción homogénea entre el cadmio y el zinc en los peces [13].

UN CASO PARTICULAR: LAS ALGAS

La toma de iones metálicos por las algas del fitoplancton aparece en la mayoría de los casos como un proceso en dos etapas que comprende: (a) unión del metal sobre la superficie externa de la célula con ligandos biológicos liberados o con ligandos superficiales con grupos funcionales, (b) transporte del complejo superficial, a través de la membrana, al interior de la célula, en general por moléculas portadoras o *carriers* [9].

Del lado exterior de la membrana, existe un equilibrio entre los varios complejos formados entre solutos y los ligandos de superficie con el ion metálico libre. Si el transporte hacia el interior de la célula es lento en comparación con el proceso de pre-equilibración en el seno de la solución, la toma del ion metálico por la célula, depende de la concentración del ion libre. La producción y eliminación de los *carriers* están relacionadas con la velocidad de crecimiento algal.

La selectividad del transporte de ciertos iones metálicos está dada por la selectividad de estos ligandos. Las moléculas portadoras son, con frecuencia, proteínas y la estabilidad de sus complejos con diferentes metales corresponde a la secuencia establecida por el ordenamiento de Irving-Williams: $Mn^{2+} < Fe^{2+} < Co^{2+} < Ni^{2+} < Cu^{2+} > Zn^{2+}$; factores estéricos también están involucrados en la selectividad. La concentración dentro de la célula depende de la disponibilidad de los ligandos portadores, de la velocidad del transporte a través de la membrana y posiblemente de la velocidad de transporte fuera de la célula.

La importancia central de la actividad del ion acuoso libre en el efecto biológico no necesariamente reside en que el mismo sea la especie tomada, en ese momento, por el organismo acuático, pero refleja que la reactividad química del metal es medida por la actividad del ion libre y que sus efectos fisiológicos están mediados por interacciones químicas entre el metal y varios ligandos celulares.

Una vez en el interior de la célula algal, el ion metálico puede intervenir en procesos bioquímicos o ser atrapado en formas inactivas (por ej. complejo por metalotioneínas), como una forma de detoxificación. Los efectos tóxicos sobre las algas han sido observados cuando la concentración intracelular del ion metálico alcanza nivel crítico, próximo a la concentración mínima de un metal traza esencial. El sistema aparece "sobreinundado" con iones metálicos que reaccionan e inactivan enzimas críticas [9].

Los metales tóxicos son generalmente incorporados al interior de la célula algal por sistemas de transporte de metales nutrientes. Los sitios de unión metabólicos nunca son completamente específicos para los metales nutrientes o que actúan como cofactores, por lo tanto los mismos pueden ser desplazados competitivamente por los metales inhibitorios o tóxicos, que pueden acceder así a sitios metabólicos fundamentales.

Uso de bioensayos algales para predecir la toxicidad de los metales en relación con su especiación química

Es posible usar organismos como sensores de la biodisponibilidad de los metales en relación con su especiación química. Dentro de ellos, las algas representan una parte muy importante de los productores primarios acuáticos, siendo responsables de más del 70% de la producción de oxígeno total en la biosfera y muestran una sensibilidad a los contaminantes mucho mayor

que otros organismos acuáticos [28]. Los bioensayos de laboratorio, usando cultivos algales mono-específicos de *Selenastrum capricornutum* Printz (= *Raphidocelis subcapitata*) han mostrado ser una herramienta útil para asistir en el manejo de la mayoría de los problemas relacionados con la calidad de las aguas naturales [28-29].

Se ha determinado que en soluciones acuosas el Cd^{2+} disuelto inhibe el crecimiento, la fotosíntesis, la respiración, reduce la concentración de clorofila y en algunas especies produce hinchamiento y alteración de las membranas [30].

El uso de métodos de inhibición de la fotosíntesis en cultivos algales, utilizando técnicas de medición de ^{14}C , está siendo propuesto en varios países para su estandarización, como una alternativa a los ensayos de inhibición de crecimiento para la determinación de riesgo de sustancias tóxicas [31]. La evaluación de este importante proceso fisiológico, crítico para la sobrevivencia de los productores primarios, puede realizarse en bioensayos estáticos de laboratorio con las siguientes ventajas: son de muy corta duración, constituyen un sistema cerrado que permite ensayar compuestos degradables o volátiles, y posibilitan usar como centinelas especies individuales o comunidades naturales.

En nuestro laboratorio, hemos estudiado el efecto del Cd^{2+} sobre la inhibición de la fotosíntesis en presencia del quelante EDTA- Na_2 [32]. Se ensayaron siete concentraciones nominales de Cd^{2+} entre 0.06 y 0.68 ppm ($0.5-6.1 \times 10^{-6}$ M). Se corrieron 3 series para cada concentración: i) medio de cultivo EPA [29] sin EDTA, ii) con EDTA 2.10^{-6} M, y iii) con EDTA 2.10^{-4} M. Los ensayos se realizaron con cultivos axénicos de *Selenastrum capricornutum*, provista por la UTEX (Universidad de Texas, Austin) a $24^\circ C$ e iluminación permanente ($100 \mu e.m^{-2}.s^{-1}$). Las muestras se preincubaron 4 hs; se agregó $NaH^{14}CO_3$ y se incubaron 2 hs más; los ensayos finalizaron llevando a pH 2. Se eliminó el $NaH^{14}CO_3$ remanente y se midió la radioactividad fijada. Se calculó el porcentaje de inhibición de cada muestra respecto del control (medio sin EDTA). A la mayor concentración de EDTA utilizada, 2.10^{-4} M, se estimuló la fotosíntesis para todas las concentraciones del metal. La concentración de Cd^{2+} inhibitoria de la fotosíntesis en 50% (IC_{50}) se estimó por interpolación lineal para toxicidad subletal [33]. Con los valores de $[Cd^{2+}]_{nominal}$, los resultados obtenidos (medias y límite de confianza al 95%) fueron:

- a) sin complejante, $1.11 (0.96-1.44) \times 10^{-6}$ M
- b) con EDTA 2.10^{-6} M, $2.25 (2.01-2.86) \times 10^{-6}$ M

Cuando la IC_{50} fue estimada con la $[Cd^{2+}]_{libre}$, calculada con el programa MINEQL [34], utilizando los componentes del medio respectivo, no se encontraron diferencias significativas entre ambos tratamientos:

- a) sin EDTA, $1.06 (0.92-1.38) \times 10^{-6}$ M
- b) con EDTA 2.10^{-6} M, $1.13 (0.95-1.59) \times 10^{-6}$ M

Estos resultados muestran que la concentración total (nominal) del Cd no es un buen predictor de su toxicidad para las algas y que su especiación puede afectar la disponibilidad del mismo para los organismos en medio acuático y por consiguiente determinar su efecto biológico adverso.

Agradecimientos: Los resultados originales presentados en este artículo corresponden al Proyecto "Especiación química: su

influencia en la toxicidad de metales pesados en medio acuoso”, acreditado por el Programa de Incentivos y por el DCB-UNLu (Res. 243-98), el mismo contó con apoyo económico de la Universidad Nacional de Luján.

Bibliografía

- Moreno Sanchez R, Devars S (1999) Abundancia de los metales pesados en la biosfera. En: Cervantes C, Moreno-Sanchez R (eds) Contaminación Ambiental por Metales Pesados. AGT Editor. Mexico. 1-10.
- Castañé PM, Loez CR, Olguín HF, Puig A, Rovedatti MG, Topalián ML, Salibián A (1998) Caracterización y variación espacial de parámetros físicos, químicos y del plancton en el río Reconquista (Buenos Aires, Argentina). Rev Int Contam Amb 14: 69-77.
- Topalián ML, Castañé PM, Rovedatti MG, Salibián A (1999) Principal component analysis of dissolved heavy metals in water of the Reconquista river (Buenos Aires, Argentina). Bull Environ Contam Toxicol 63: 484-490.
- Markert B (1998) Distribution and biogeochemistry of inorganic chemicals in the environment. En: Schüürmann G and Markert B. Ecotoxic. John Wiley & Sons. Nueva York. 165-222.
- Dawson DC, Ballatori N (1995) Membrane transporters as sites of action and routes of entry for toxic metals. En: Goyer RA and Cherian G (Eds.) Toxicology of Metals. Springer-Verlag. Berlin. 53-76.
- Wilken RD (1998) Speciation of chemical elements in the environment. En: Schüürmann G, Markert B. Ecotoxicology. Wiley. New York. 223-235
- Bernhard M, Brinckman FE, Irgolic KJ (1986) Why “Speciation”. En: Bernhard, M.; Brinckman, F.E. and Sadler, P.J. (Eds.) The Importance of Chemical Speciation in Environmental Processes. Springer-Verlag. Berlin. 7-14.
- Lyman W J (1995) Transport and transformation processes. En: Rand G M (ed) Fundamentals of Aquatic Toxicology. Taylor & Francis. Washington. 449-492.
- Stumm W, Morgan JJ (1995) Aquatic Chemistry. John Wiley & Sons. Nueva York. pp. 1022.
- Jonnalagadda SB, Prasada Rao PVV (1993) Toxicity, bioavailability and metal speciation. Comp Biochem Physiol 106 C: 585-595.
- Muñoz CV, Ferrari L, Salibián A (1990) Protective actions of ions against the Cadmium toxicity to young *Bufo arenarum* tadpoles. Bull Environ Contam Toxicol 45: 313-319.
- Ferrari L, Salibián A (1999) Effect of cadmium on the epidermic structure of *Bufo arenarum* tadpoles: influence of the chemical composition of the incubation media. Arch Physiol Biochem 107: 91-96.
- WHO (World Health Organization) (1992) Cadmium-Environmental Aspects (Environmental Health Criteria 135). Geneva. pp. 156.
- Turner DR (1995) Problems in Trace metal speciation modeling. En: Tessier A, Turner DR. Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems. John Wiley & Sons. Chichester. 149-203.
- Campbell PGC (1995) Interaction between trace metals and aquatic organisms: a critique of the free-ion activity model. En: Tessier A, Turner DR (Eds) Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems. John Wiley & Sons. Chichester. 45-102 .
- Wright DA, Welbourn PM (1994) Cadmium in the aquatic environment: a review of ecological, physiological and toxicological effects on biota. Environ Rev 2: 187-214.
- Phinney JT, Bruland KW (1994) Uptake of lipophilic organic Cu, Cd and Pb complexes in the coastal diatom *Thalassiosira weissflogii*. Environ Sci Technol 28: 1781-4.
- Errecalde O, Seidl M, Campbell PGC (1998) Influence of a low molecular weight metabolite (citrate) on the toxicity of cadmium and zinc to the unicellular green alga *Selenastrum capricornutum*: an exception to the free-ion model. Wat Res 32: 419-429.
- Roy RL, Campbell PGC (1997) Decreased toxicity of Al to juvenile atlantic salmon (*Salmo salar*) in acid soft water containing natural organic matter: a test of the free-ion model. Environ Toxicol Chem 16: 1713-1720.
- Parent L, Twiss MR, Campbell PGC (1996) Influences of natural dissolved organic matter on the interaction of aluminium with the microalga *Chlorella*: A Test of the free-Ion model of trace metal toxicity. Environ Sc Technol 30: 1962-1969.
- Di Toro DM, Allen HE, Bergman HL, Meyer JS, Paquin PR, Santore RC (2001) Biotic Ligand Model of the acute toxicity of metals. 1. Technical basis. Environ. Toxicol. Chem. 20, 10: 2383-2396.
- Santore RC, Di Toro DM, Paquin PR, Allen HE, Meyer JS (2001) Biotic Ligand Model of the acute toxicity of metals. 2. Application to acute copper toxicity in freshwater fish and *Daphnia*. Environ. Toxicol. Chem. 20, 10: 2397-2402.
- Mason AZ, Jenkins KD (1995) Metal detoxification in aquatic organisms. En: Tessier A, Turner D R. Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems. John Wiley & Sons. Chichester. 479-608.
- Arrieta MA, Peri SI, Apartin C, Rosenberg CE, Fink NE, Salibián A (2000) Blood lead concentration and delta-aminolevulinic acid dehydratase activity in adult *Bufo arenarum*. Arch Physiol Biochem 108: 275-280.
- Rosenberg CE, Peri SI, Arrieta MA, Fink NE, Salibián A (1998) Red blood cell osmotic fragility in *Bufo arenarum* exposed to lead. Arch Physiol Biochem 106: 19-24.
- Kawanishi S (1995) Role of active oxygen species in metal-Induced DNA damage. En: Goyer RA, Cherian G (Eds.). Toxicology of Metals. Springer-Verlag. Berlin. 349-371.
- US Environmental Protection Agency (2001) Update of Ambient Water Quality criteria for Cadmium, EPA-8222- R-01-001. Washington DC. pp. 268.
- Greene JC, Bartels CL, Warren-Hicks WJ, Parkhurst BR, Linder GL, Peterson SA, Miller WE (1988) Protocols for Short Term Toxicity Screening of Hazardous Waste Sites, EPA 600/3-88/029, US Environmental Protection Agency, Washington DC.
- Lewis MA (1995) Algae and vascular plant Tests. En: Rand G M (ed). Fundamentals of Aquatic Toxicology. Taylor & Francis. Washington. 135-169.
- Moreno Sanchez R, Diaz Barriga F, Devars S (1999) Mecanismos de toxicidad y de tolerancia a los metales pesados. En: Cervantes C, Moreno-Sanchez R (eds) Contaminación Ambiental por Metales Pesados. AGT Editor. México. 11-40
- Kusk KO, Nyholm N (1991) Evaluation of a phytoplankton toxicity test for water pollution assessment and control. Arch Environ Contam Toxicol 20: 375-379.
- Topalián ML, Castañé PM, Cordero Otero RR, Salibián A (2000) El EDTA como protector de la inhibición de fotosíntesis de *Selenastrum capricornutum* por acción del Cadmio. Rev Brasil Toxicol 13 (Supl. 1): 51.
- Norbert-King TJ (1993) A linear interpolation method for sublethal toxicity: the inhibition concentration (ICp) Approach. National Effluent Toxicity Assessment Center, Environmental Protection Agency, Environmental Research Laboratory. Duluth, Minnesota. Technical Report: 03-93
- Schecher WD, McAvoy DC (1991) MINEQL+: A Chemical Equilibrium Program for personal Computer. Environmental Research Software.