



Perfil toxicológico de los sedimentos del Río Magdalena usando como modelo biológico *Caenorhabditis elegans*

Lesly Patricia Tejada Benítez
Jesús Tadeo Olivero Verbel

un
i Universidad
Internacional
de Andalucía
A

Pr
E de Estudios
Iberoamericanos
Grupo La Rábida
mio 9



www.unia.es



PERFIL TOXICOLÓGICO DE LOS
SEDIMENTOS DEL RÍO MAGDALENA
USANDO COMO MODELO
BIOLÓGICO *CAENORHABDITIS*
ELEGANS

LESLY PATRICIA TEJEDA BENÍTEZ
JESÚS TADEO OLIVERO VERBEL

EDITA:
UNIVERSIDAD INTERNACIONAL DE ANDALUCÍA.
SERVICIO DE PUBLICACIONES
Monasterio de Santa María de las Cuevas.
Calle Américo Vespucio, 2.
Isla de la Cartuja. 41092 Sevilla
www.unia.es



COPYRIGHT DE LA PRESENTE EDICIÓN:
Universidad Internacional de Andalucía

COPYRIGHT: Los autores

FECHA: 2016

ISBN: 978-84-7993-290-9

MAQUETACIÓN, DISEÑO E IMPRESIÓN: Artes Gráficas Servigraf

FOTOGRAFÍA CUBIERTAS: Lesly Patricia Tejeda Benítez - Jesús Tadeo Olivero Verbel

Índice

Resumen	9
Introducción	13
1. El río Magdalena	17
2. Calidad ambiental y toxicológica de sedimentos fluviales	25
3. <i>Caenorhabditis elegans</i> como modelo toxicológico	31
4. Área de estudio	45
5. Metodología	79
6. Resultados	89
7. Conclusiones	131
8. Recomendaciones	135
Referencias	139



Resumen

El Río Magdalena, el principal de Colombia, atraviesa el país desde el macizo colombiano hasta desembocar en el Mar Caribe, siendo sumidero de aguas residuales domésticas e industriales de diversas actividades económicas a lo largo de su recorrido. Estos vertimientos de variadas características, contienen contaminantes que por sus propiedades fisicoquímicas permanecen en los sedimentos, desde son incorporados al plancton, entrando a la cadena alimenticia en procesos de bioacumulación y biomagnificación, ocasionando considerables problemas de toxicidad en todos los niveles tróficos, incluso en el hombre. La presencia de contaminantes en los sedimentos del Río es desconocida y hasta ahora no se habían realizado estudios que mostraran el grado de toxicidad de los mismos. En esta investigación fue empleado el nemátodo *Caenorhabditis elegans* como modelo biológico para la evaluación toxicológica de los sedimentos de este cuerpo de agua. Veinte muestras de sedimentos fueron colectadas en igual número de sitios a lo largo del Río. Los sedimentos fueron liofilizados, cuantificando la presencia de metales de interés ambiental e hidrocarburos aromáticos. Para la evaluación de toxicidad, nemátodos silvestres y transgénicos fueron expuestos a extractos acuosos y metanólicos de los sedimentos, evaluando diferentes parámetros biológicos y alteraciones en las vías de transducción de señales, empleando para ello genes reporteros acoplados al gen de la proteína verde fluorescente. Las respuestas biológicas y moleculares fueron correlacionadas con las concentraciones de contaminantes presentes en los sedimentos, y de esta manera identificados los patrones de toxicidad en el Río. Los extractos de sedimentos muestreados en zonas de elevada actividad industrial como Barrancabermeja, Girardot, Barranquilla, y la zona de minería de oro, presentaron los niveles más altos de metales pesados. Las concentraciones más elevadas de hidrocarburos aromáticos polinucleares se hallaron en los sedimentos colectados en Neiva, Magangué y Barranquilla. En los sedimentos obtenidos de Gamarra, Calamar, Campo de la Cruz y Barranquilla, las concentraciones de metales como cromo, cadmio, cobre y níquel estuvieron por encima de los valores límites para evitar efectos biológicos adversos en organismos. El valor del Índice de Carga de Contaminación para los sedimentos de Gamarra, Campo de la Cruz y Barranquilla, sugiere que en estos sitios el nivel de contaminación es muy alto. En las estaciones localizadas en áreas de actividad industrial y de minería extensiva, tales como Barrancabermeja, San Pablo, Simití, Gamarra, El Banco, Mompo y Barranquilla, los Índices de Riesgo Ecológico Potencial aparecen elevados, indicando contaminación muy alta por metales pesados.

El cadmio fue el metal que más aportó a este indicador. Los mayores efectos tóxicos sobre la biología del nemátodo y la expresión de genes de respuesta al estrés se registraron en Barranquilla, Girardot y Barrancabermeja. Las respuestas biológicas y bioquímicas correlacionaron mayoritariamente con la concentración de metales como cobalto, cobre, níquel, zinc y plomo. En síntesis, este estudio muestra el grave estado de contaminación del Río Magdalena, y constituye una herramienta para que las autoridades colombianas desarrollen programas de protección ambiental en el mismo, estableciendo políticas de salud pública que conduzcan a mejorar la calidad de vida de los colombianos.

un
i
A

Introducción

La actividad agrícola, minera e industrial desarrollada en la cuenca del Río Magdalena realiza aportes de diversos contaminantes a esta arteria fluvial, tales como metales pesados (MPs) e hidrocarburos aromáticos polinucleares (HAPs), los cuales debido a sus características tóxicas, mutagénicas y cancerígenas, son considerados peligrosos para la fauna silvestre, y por supuesto, para la salud pública. Una vez en el agua, estos químicos son fuertemente adsorbidos sobre la superficie de las partículas asociadas con el contenido orgánico de la fase sólida siendo depositados a los sedimentos. Los HAPs por lo general tienen baja solubilidad en agua, pero alta liposolubilidad, razón por la cual se encuentran en los depósitos grasos tanto de animales como de vegetales. En las cadenas tróficas estos tóxicos son biomagnificados, iniciando por organismos unicelulares que los absorben del agua, son consumidos por otros organismos que a su vez los pueden tomar del sedimento y de esta forma pasan a los niveles mayores de la cadena trófica, convirtiéndose en tóxicos para los organismos de los últimos niveles, incluso el hombre (Rippey, 2008).

Debido a la importancia cultural, económica y ambiental que tiene el Río Magdalena para el país, es necesario tener conocimiento sobre los patrones de toxicidad de sus sedimentos, dado que los mismos determinan en cierta forma la calidad del agua de más de la mitad de los municipios del país, quienes emplean sus aguas para abastecer los acueductos, en algunos casos sin tratamiento previo, y también como destino final de sus aguas servidas.

De acuerdo con lo expuesto, el objetivo principal de este trabajo fue generar el perfil toxicológico de los sedimentos del Río Magdalena usando el nemátodo *C. elegans* como modelo biológico, para lo cual se evaluaron la presencia de metales e HAPs en 20 muestras de sedimentos recolectadas en el Río, identificando los efectos de los extractos acuosos y metanólicos de los sedimentos sobre la mortalidad, crecimiento y locomoción de *C. elegans*, así como los cambios sobre la expresión de genes asociados con choque térmico, estrés oxidativo, exposición a metales y respuesta a xenobióticos, empleando cepas del nematodo con genes reporteros. Por último, la información química colectada fue asociada estadísticamente con los datos de toxicidad obtenidos con el nemátodo, estableciendo un patrón de toxicidad a lo largo del Río Magdalena, de utilidad no sólo como línea base para estudios temporales comparativos, sino como soporte científico para que

los tomadores de decisiones puedan establecer estrategias que contribuyan con la conservación del Río, como herramienta para garantizar la sostenibilidad del país y el presente y futuro de sus ciudadanos.



1. El río Magdalena

Colombia es reconocida por su gran riqueza hídrica, siendo el décimo en el mundo en cuerpos de agua dulce renovable. Esta riqueza, junto a su privilegiada ubicación geográfica, se refleja en su gran cantidad de productos naturales que lo ubican en el segundo país en biodiversidad a nivel mundial. Sin embargo, estos recursos se encuentran en peligro debido al vertimiento indiscriminado de residuos líquidos domésticos e industriales a los ríos, sobrepasando su capacidad natural de autopurificación. Esta situación se evidencia en el Río Magdalena, la principal arteria fluvial del país.

El Río Magdalena con una longitud de 1.612 km y una cuenca de 257.438 km² es considerado un río de clase mundial y el sistema fluvial andino más importante de Suramérica. El sistema del Magdalena es la principal fuente de agua dulce y sedimentos al Mar Caribe, descargando 560 t/km² cada año, la cual es una de las mayores tasas de transporte de sedimentos en el mundo, y la más alta en el Suramérica (Restrepo et al., 2014). El Magdalena nace en el macizo colombiano, en la Cordillera de los Andes a una altura de 3300 m. Su cuenca está formada por 151 subcuencas, y sus principales afluentes son el Cauca, segundo río más grande de Colombia, el Sogamoso, el San Jorge y el Cesar (Restrepo, 2006).

Las principales ciudades de Colombia, incluyendo Bogotá, Medellín, Cali, Bucaramanga y Barranquilla, se ubican en la cuenca del Magdalena, con cerca del 49% de la población del país viviendo sobre la misma, con una densidad promedio aproximada de 120 hab/km² (Restrepo et al., 2006; Restrepo, 2008). En los municipios ribereños habitan más de 5.6 millones de personas, concentradas en los departamentos de Atlántico, Bolívar y Huila. Este cuerpo de agua es a su vez el medio de transporte y su principal proveedor de alimentos, cuyo sustento primario es la pesca (PGN, 2013).

Muchos municipios a lo largo del Río obtienen el agua directamente de su cauce y lo utilizan sin ningún tratamiento ante la carencia de plantas de potabilización, aumentando con ello los riesgos epidemiológicos de enfermedades transmitidas a través del líquido. Es frecuente que muchos usuarios masivos del agua, en especial los dedicados a minería, no presentan estudios o solicitudes para el otorgamiento de concesiones y permisos, los cuales podrían garantizar el correcto, o al menos legal, uso del recurso hídrico, lo cual lleva a la sobreexplotación y degradación de su calidad. Adicionalmente, en la mayoría de los centros urbanos existen plantas de sacrificio de ganado sin las adecuadas condiciones de salubridad, aumen-

tando los riesgos sanitarios. De 393 municipios ribereños y no ribereños del Río Magdalena, 180 no tienen planta de tratamiento de aguas residuales (PTAR) y 27 las poseen sin funcionar. Una gran parte de los municipios (44 %) no cuenta con sistema de disposición final de residuos sólidos, y en buen número de casos, el sitio de disposición son vertederos a cielo abierto sin especificaciones técnicas para el control de lixiviados (PGN, 2013), los cuales inexorablemente alcanzan el río.

La alta contaminación del Río Magdalena es producto del desarrollo de múltiples actividades antropogénicas a lo largo y ancho de toda su cuenca, entre las cuales sobresalen la minería aurífera, refinación y transporte de petróleo, malas prácticas de uso del suelo, deforestación, aumento de las tasas de urbanización, agricultura y ganadería, entre otras, las cuales han interrumpido los hidrogramas naturales en la cuenca, aumentando la tasa de sedimentación y ocasionando el deterioro de hábitats críticos, comprometiendo la biodiversidad, así como también, la desaparición de los arrecifes de coral y algas marinas en el Caribe (Moreno et al., 2015).

Uno de los aportes de contaminantes más sobresalientes a lo largo del río lo constituye la liberación de metales tóxicos en los procesos mineros. La explotación minera se centra en la extracción de arena, grava, hidrocarburos y oro de aluvión. Esta última es desarrollada a diferentes escalas productivas y en muchas áreas de la cuenca del Magdalena, pero en especial sobre la zona nororiental del departamento de Antioquia y Sur de Bolívar. En la mayoría de los casos, la extracción del oro en los distritos mineros es llevada a cabo empleando técnicas artesanales, las cuales generan sedimentos que arrastran consigo mercurio (Hg), y metales presentes en las rocas, hacia los ríos y ciénagas que finalmente vierten al Magdalena. La afectación por minería aurífera es notoria en las cuencas de los ríos Cauca, Caribona, Boque, Bagre, Guavas y Guadalajara, entre otros. La minería del oro también ha impactado la región de La Mojana, un ecosistema estratégico en materia de seguridad alimentaria para el norte de Colombia, y para el cual existe un proceso de contaminación por Hg derivado especialmente de la entrada de aguas contaminadas del Río Cauca, aunque también puede estar ocurriendo deposición atmosférica del metal liberado en el Sur de Bolívar (Olivero-Verbel et al., 2004). La situación de contaminación por Hg en la cuenca del Magdalena ha sido revisada en diversas matrices ambientales, incluyendo sedimentos, macrófitas, especies de peces de diferentes niveles tróficos y cabello humano (Olivero-Verbel y Solano, 1998;

Olivero-Verbel et al., 2015; Mancera y Álvarez, 2006). De acuerdo con la información disponible, la presencia de Hg en el Magdalena ha permeado los diferentes niveles tróficos; y, en consecuencia, los pescadores, quienes basan su dieta en el consumo de pescado, ostentan los niveles más elevados del metal tóxico, por encima de los reportados en los mineros.

La calidad de los sedimentos del Río Magdalena en materia de metales nocivos al ambiente ha sido documentada para varias localidades y áreas específicas en diversas cuencas, no necesariamente asociadas con minería aurífera; por ejemplo, en Marmato, Caldas (Cormagdalena, 2007), Puerto Berrío y Barrancabermeja (Ideam, 2006; Ideam, 2007), Sur de Bolívar (Olivero-Verbel y Solano, 1998), La Mojana (Mancera y Álvarez, 2006), Calamar (Cormagdalena, 2007), y el departamento del Magdalena (Espinosa y Wallner-Kersanach, 1996), entre otros. En la zona de Calamar (Bolívar), en la parte baja del río, Cormagdalena ha evaluado la calidad de los sedimentos encontrando que algunos metales peligrosos tales como el As, Cd, Fe, Cu, Pb y Hg, aunque están presentes en concentraciones cuantificables, aparecen a niveles por debajo de los estándares de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA) (Cormagdalena, 2007). Por su parte, en un estudio del Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales (Ideam), se reportó la presencia de Hg, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb y Zn en los sedimentos del Río Magdalena en cantidades por encima de los valores normales para rocas sedimentarias de las que comúnmente se encuentran en su cuenca (Ideam, 2006; Ideam, 2007). En este caso las zonas estudiadas fueron Puerto Berrío y Barrancabermeja en el departamento de Santander.

Otra actividad que impacta negativamente sobre toda la Cuenca del Río Magdalena es la explotación, transporte y refinación de petróleo. Según reportes de Ecopetrol, se pueden destacar La Zona Alta, comprendida entre el municipio de Yaguará y el municipio de Aipe (Huila), donde se encuentran campos de producción y oleoductos, siendo común el vertido de aguas industriales de las estaciones de separación petróleo-agua, con aportes de fenoles, metales e hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), entre otros contaminantes (Mancera y Álvarez, 2005). Un riesgo adicional es el derrame ocasional de petróleo en la zona, que inevitablemente llega directamente al Río o a través de sus afluentes. La zona del Magdalena Medio, comprendida entre Puerto Boyacá y Puerto Wilches, comprende varios campos de producción y estaciones de recepción donde los principales contaminantes

generados son fenoles, HAPs, Cu, Na, B, Cr, Ba, Sr, As, Ag, Ti, Zr, cloruros y sulfatos. En esta región se encuentra el Complejo de la Refinería de Barrancabermeja, en donde los riesgos ambientales han sido relacionados con Ba, Cu, Cr, Pb, Hg, Co, Zn, Fe, Ni, V, Mo, Sr, Na, cloruros, sulfatos, cianuros, fenoles, HAPs, olefinas, ácidos orgánicos e inorgánicos, benceno, tolueno y xileno. Por último, en la Zona del Bajo Magdalena, comprendida entre Yariri y el Complejo Cenagoso de Zapatosa, la explotación petrolera se caracteriza por su antigüedad y por el hecho de que el mantenimiento y operación de la producción son deficientes, generando vertimientos continuos de petróleo directamente a las ciénagas, con características de criticidad en Cantagallo y la Depresión Momposina, especialmente en Talaigua, Zenón y El Limón en la Isla de Mompós (Avellaneda, 1990).

Un tercer renglón de la economía que afecta la calidad ambiental del Río es el desarrollo de la agroindustria, actividad caracterizada por el uso extensivo y crónico de herbicidas, insecticidas, fungicidas y fertilizantes, los cuales por escorrentía llegan al Río. La fumigación aérea de los cultivos de arroz, algodón y sorgo, con altas dosis de plaguicidas y herbicidas, constituye hoy en día una de las principales fuentes de contaminación del agua, así como del aire, del suelo y de los alimentos (Mancera y Álvarez, 2005). En la Región Caribe, la agroindustria colombiana está orientada al mercado nacional e internacional del banano, sorgo, algodón, arroz y palma africana. Entre estos, el principal producto agrícola es el banano, el cual se cultiva en la Zona Bananera del Río Magdalena, seguido del arroz que se produce en algunas zonas del departamento de Bolívar. Estos dos cultivos requieren gran cantidad de agroquímicos. La mayoría de los pesticidas, dadas sus propiedades fisicoquímicas tienen tendencia a acumularse en los sedimentos, pero su presencia en el Río ha sido muy poco evaluada (Mancera y Álvarez, 2006). En estudios de los sedimentos de la Ciénaga Grande de Santa Marta, impactada por los cultivos de banano en su cuenca, y que recibe aguas del Río Magdalena, se encontró lindano, heptacloro, aldrin, p,p' -DDE, p,p' -DDD y p,p' -DDT (Espinosa et al., 1995). Pesticidas y contaminantes como los bifenilos policlorados (PCBs), también han sido reportados en tejido muscular de peces, con las concentraciones más altas observadas en la parte media y baja del Magdalena (Mancera y Álvarez, 2005). Un estudio reciente describió la presencia de retardantes de llama y filtros UV en 13 sitios del Río Magdalena, lo que confirma la presencia de contaminantes emergentes en los sedimentos de esta arteria fluvial (Barón et al., 2013).

Por último, merece especial atención destacar que, a la altura de la ciudad de Girardot, el Río Magdalena recibe las aguas del Río Bogotá, receptor no solo de las aguas residuales domésticas de una ciudad que alberga más de nueve millones de personas, sino de multitud de afluentes de un parque industrial diversificado, el cual incluye fábricas de equipos eléctricos, curtiembres, metalúrgicas, manufactureras, petroquímicas, entre otras, cuyo impacto global sobre el Río es alarmante y contundente, en especial al considerar que las concentraciones de varios metales pesados están por encima de los niveles máximos sugeridos en las legislaciones locales e internacionales (Mancera y Álvarez, 2006).

Con este panorama superficial, apenas la punta del iceberg de su verdadero estado de contaminación, el Río Magdalena necesita recibir especial atención gubernamental y de la sociedad civil, de tal forma que pueda conocerse su verdadero estado de calidad y salud ambiental, para así establecer programas bien estructurados y sostenibles, necesarios para el goce de sus innumerables servicios ambientales, a lo largo de la historia que apenas empieza a contarse.



2. Calidad ambiental y toxicológica de sedimentos fluviales

En ríos de poco impacto antropogénico, los sedimentos poseen una gran diversidad de componentes, incluyendo arcillas, coloides inorgánicos como los hidróxidos de hierro y aluminio y materia orgánica del suelo, en especial sustancias húmicas y biomasa en descomposición, entre otros, permitiendo la interacción con diversos contaminantes ambientales. Desde el punto de vista granulométrico, los sedimentos están formados por arena y grava (2.00 - 0.20 mm), arena fina (0.20 - 0.02 mm), limo (0.02-0.002 mm) y arcilla con tamaños de grano menores de 0.002 mm. Los sedimentos más finos, que generalmente contienen concentraciones más altas de metales, suelen acumularse en aguas tranquilas. Los procesos de sedimentación y los mecanismos de asociación de diferentes contaminantes, dependen de las condiciones de pH, temperatura y oxígeno disuelto (Barceló et al., 2002; Fuentes et al., 2010). Por su parte, los óxidos e hidróxidos de hierro y aluminio adsorben mucho más los metales traza que los óxidos e hidróxidos de silicio; que funcionan como soporte de materia orgánica.

Existe abundante evidencia sobre la acumulación de contaminantes en el sedimento de ríos, lagos y bahías. Debido a su alta capacidad de acumular contaminantes orgánicos persistentes y metales, los sedimentos son considerados una fuente de contaminación a largo plazo para los organismos acuáticos, por lo que su estudio es un paso importante en el mapeo de posibles vías de exposición, debido a que los contaminantes que contienen pueden estar biodisponibles para los organismos presentes. (Peng et al., 2004; Covaci et al., 2005; Aguirre et al., 2009; Menzel et al., 2009; Barjhoux et al., 2012; Thuong et al., 2013).

A continuación se describe la presencia de metales e HAPs en sedimentos fluviales.

2.1. Metales pesados

Los sedimentos son por lo general los sumideros de los metales en el medio acuático y constituyen un depósito enriquecido de los mismos, potencialmente disponible para su bioacumulación por los animales bentónicos. Los metales en sedimentos oxigenados se distribuyen principalmente en diferentes fases geoquímicas como carbonatos, carbono orgánico total (COT) y óxidos de hierro y manganeso, los cuales poseen diversas capacidades de unión a metales, afectando su biodisponibilidad. Para sedimentos anóxicos, el sulfuro se considera como un factor importante que afecta la biodisponibilidad de la mayoría de los metales divalentes que tienen una alta afinidad

por el ion sulfuro (Peng et al., 2004). La especiación de metales en los sedimentos es un factor crítico en la evaluación de los posibles impactos ambientales.

2.2. Hidrocarburos aromáticos

Los sedimentos son por excelencia acumuladores de compuestos orgánicos de baja polaridad, representando una ruta potencial de exposición a los COPs para las especies acuáticas (Van Ael et al., 2005). Los contaminantes orgánicos de origen antropogénico más comúnmente encontrados en los sedimentos de ríos son de tipo hidrofóbico, como los HAPs, pesticidas organoclorados (POC) y bifenilos policlorados (PCB), entre muchos otros. Los HAPs son carcinógenos ambientales que se producen como resultado de la combustión incompleta de combustibles fósiles, la quema de residuos sólidos (Rippey, 2008) y pueden aparecer como contaminantes en vertidos industriales y urbanos, relacionados o no con la industria del petróleo. Debido a su baja solubilidad y alta lipofilidad, los HAPs tienden a acumularse en los sedimentos, quienes actúan como depósito de los mismos a largo plazo (Liu et al., 2012b).

2.3. Toxicidad de los sedimentos

Los sedimentos y sus componentes interactúan con la biota presente en los ecosistemas, y de acuerdo con la exposición presente pueden aparecer efectos nocivos en los organismos, originando toxicidad. La toxicidad de los sedimentos ha sido ampliamente estudiada para muchos ríos, en diferentes escalas y a través de diversos modelos biológicos y puntos finales. A continuación se muestran algunos trabajos de años recientes.

En un estudio con *Danio rerio* la toxicidad de extractos de sedimentos fue evaluada utilizando microarreglos de ADN. La alteración en la expresión génica fue comparada con los resultados de los bioensayos y con la composición química de los extractos y fue identificado un peligro potencial en la regulación de diversos genes relacionados con el perfil de toxicidad de las sustancias encontradas en los sedimentos (Kosmehl et al., 2012). Asimismo, en Brasil los efectos embriotóxicos y teratogénicos de los sedimentos de algunas ubicaciones seleccionadas en la cuenca del Río Tietê se han estudiado usando embriones de *Danio rerio*. Este río y su afluente, el Río Pinheiros, reciben una carga compleja de contaminantes orgánicos e inorgánicos de aguas residuales sanitarias e industriales, y de actividades agrícolas y

agroindustriales. Se reportó alta toxicidad cerca de la ciudad de Sao Paulo y aguas abajo (Rocha et al., 2011).

La toxicidad de sedimentos contaminados de varias cuencas fluviales de Europa fue estudiada utilizando modelos biológicos de tres niveles tróficos diferentes. Los ensayos de toxicidad fueron realizados usando *Lumbricus variegatus oligochaete*, *C. elegans*, *Potamopyrgus antipodarum*, *Chironomus riparius*, *Danio rerio* y *Vibrio fischeri*. Los resultados mostraron mayor riesgo tóxico para los sedimentos contaminados en comparación con los sedimentos de referencia correspondientes, sin embargo hubo diferencias en la sensibilidad de las especies (Tuikka et al., 2011).

En zonas de minería de Pb y Zn al sureste de Missouri, la toxicidad de los sedimentos de tres ríos fue estudiada empleando el anfípodo *Hyalella azteca*. Los sedimentos redujeron la supervivencia de los anfípodos. Los efectos tóxicos se correlacionaron significativamente con las concentraciones de metales como Ni, Zn, Cd y Pb, siendo consistentes con las predicciones de la toxicidad debida a metales (Besser et al., 2009). En otro estudio, el erizo *Arbacia spatuligera* fue usado en ensayos de fecundación para evaluar la toxicidad de sedimentos de cuatro puertos chilenos. La presencia de HAPs y MPs mostró ser sinérgica y estar correlacionada con la ausencia de fecundación encontrada (Aguirre et al., 2009).

El alga *Pseudokirchneriella subcapitata* fue empleada como modelo biológico para evaluar la toxicidad de los sedimentos del Río Sava (Europa Oriental), el cual recibe aportes de sustancias orgánicas e inorgánicas de una variedad de actividades domésticas e industriales que afectan la salud de los seres humanos y la vida silvestre. Los resultados identificaron algunos puntos críticos en los cuales hubo marcada inhibición del crecimiento de las algas (Källqvist et al., 2008). Por otro lado, la toxicidad de los sedimentos del Río Ebro fue estudiada mediante el uso de las bacterias foto-luminiscentes *Vibrio fischeri*. Las respuestas tóxicas encontradas demostraron una fuerte relación con los niveles de contaminantes en la zona (Ocampo et al., 2008).

En un trabajo *in vitro* con hepatocitos de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) se evaluó la toxicidad de sedimentos de los Ríos Sava y Krupa (Eslovenia) con múltiples puntos finales, tales como citotoxicidad, inhibición metabólica, daño en el ADN, estrogenicidad y actividad 7-O-etoxiresorufina deetilasa (EROD). Los bioensayos permitieron discriminar entre sedimentos contaminados y menos contaminados para citotoxicidad, inhibi-

ción metabólica y la inducción de la actividad de la EROD, aunque no se observó aumento en el daño del ADN (Tollefsen et al., 2006).

En un estudio piloto, *C. elegans* fue usado para evaluar los efectos de los sedimentos de tres ríos alemanes con diferentes niveles de MPs y contaminantes orgánicos, Rin, Danubio y Elba, en la reproducción y patrón de expresión génica de *C. elegans*. Hubo inhibición del 50% de reproducción en los nemátodos expuestos a los sedimentos del Rin y el Elba. El patrón de expresión génica de los gusanos expuestos a sedimentos del Elba coincidieron con los expuestos a PCB52 en otro estudio (Menzel et al., 2009). En otro ensayo con los sedimentos del Elba, se evaluaron como puntos finales la longitud del cuerpo, el número de huevos dentro de los gusanos, el porcentaje de gusanos grávidas, y el número de crías por gusano (Traunspurger et al., 2009). Asimismo, *C. elegans* fue expuesto a 26 diferentes sedimentos de cuerpos de agua dulce no contaminados para evaluar el efecto del tamaño de partícula en el desarrollo. Los puntos finales evaluados fueron la longitud del cuerpo, número de huevos por gusano, y el porcentaje de gusanos grávidos. Se encontró una correlación débil de la longitud del cuerpo con la distribución del tamaño de las partículas, lo que indicó que los nemátodos se desarrollan mejor en los sedimentos más gruesos. El número de huevos por gusano y el porcentaje de grávidos mostró variación relativamente alta entre los tratamientos (Höss et al., 2009b).

A nivel de Latinoamérica no se han desarrollado muchos estudios relacionados con la toxicidad de sedimentos de ríos. Algunos trabajos que se pueden mencionar son el estudio efectuado a los sedimentos del Río Ceará (Brasil), en el que se encontró fuerte contaminación con Al, Cu, Cr y Zn y alta toxicidad a través de ensayos con plancton marino mostraron (Nilin et al., 2007). En el estudio de los sedimentos del Río Bío Bío (Chile) usando *Oncorhynchus mykiss*, en las estaciones de muestreo impactadas por vertidos de la industria petroquímica, se encontraron altas concentraciones de HAPs, actividad del gen CYP1A1 (relacionada con la presencia de HAP) y daño genotóxico (Inzunza et al., 2006). Por otro lado, en el Río Paraná (Argentina) se utilizó la *Hyalella curvispina* como bioindicador de la toxicidad de los sedimentos, hallándose que las principales perturbaciones detectadas se presentaron en el sector medio de la cuenca, donde prevalecen aportes de materia orgánica de las diversas actividades combinadas, donde los sedimentos inducen alta letalidad, y una fuerte reducción consecuyente de la comunidad bentónica población y la diversidad (Peluso et al., 2013).



3. *Caenorhabditis elegans* como modelo toxicológico

Caenorhabditis elegans es un nemátodo no parásito que por sus excelentes características ha sido un importante modelo de estudio para la biología. Fue el primer animal cuyo genoma fue secuenciado completamente. Este nemátodo de vida libre ha estado ligado a los descubrimientos biológicos de las últimas dos décadas, siendo inicialmente propuesto como un organismo modelo por Sydney Brenner en 1965 (García-Sancho 2012). Desde entonces, se ha usado en biología celular, neurobiología y genética, empleándose como sistema de excelencia para el estudio de eucariotas superiores. Entre los años 1970 y 1980, la línea celular completa del gusano, desde el huevo fecundado hasta el adulto, fue caracterizada por microscopía. La microscopía electrónica y el seccionamiento serial permitió la reconstrucción del sistema nervioso completo, lo cual en conjunto con los datos genéticos y genómicos generados en los años 1990, han convertido a este organismo en una poderosa herramienta para el descubrimiento y caracterización funcional de genes eucariotas (Dimitriadi y Hart, 2010).

3.1. Características de *c. Elegans*

El cuerpo de un espécimen adulto de *C. elegans* mide aproximadamente 1 mm de longitud (Figura 1). Su transparencia permite la visualización de todos los tipos de células en sus distintas etapas de desarrollo. Posee un sistema nervioso sencillo de 302 neuronas en el adulto, donde cada neurona tiene una posición única (Dimitriadi y Hart, 2010; Giles y Rankin, 2009).



Figura 1. Fotografía de un espécimen adulto de *C. elegans*.

La mayoría de los individuos son hermafroditas, con dos ovarios, oviductos, una cavidad para almacenar el esperma, llamada espermateca y un útero (L'Hernault, 2009). Los hermafroditas producen ovocitos y espermatozoides, se reproducen por autofecundación y no pueden fertilizar a otros hermafroditas. Los machos, que aparecen de manera espontánea con una frecuencia inferior al 0.3%, pueden fertilizar hermafroditas. El tiempo promedio de este proceso es de 2 a 3 días, y la vida del adulto en el laboratorio, a temperatura constante de 20 °C, oscila entre 2 a 3 semanas. El ciclo reproductivo de *C. elegans* es de 2.5 a 4 días a temperatura ambiente y su esperanza de vida varía entre 12 y 20 días (Giles y Rankin 2009).

El desarrollo embrionario culmina generando una larva tipo L1 de 550 células, luego de la muerte de 113 por apoptosis. Después de 4 fases larvarias, el gusano se transforma en un organismo adulto de 959 células, 302 de las cuales son neuronas y 18 más habrán muerto por apoptosis. El adulto maduro es fértil durante 4 días, tiempo después del cual puede vivir entre 10 y 15 días. Cada adulto hermafrodita coloca entre 200 y 300 huevos y el intervalo entre puestas consecutivas es de 20 minutos. La nueva generación pasará por 4 estados larvarios (L1 - L4) antes de llegar a la etapa adulta. A partir del cuarto estado larvario, los hermafroditas son capaces de producir espermatozoos y una vez adultos generar huevos, aunque el ciclo de vida es dependiente de la temperatura de incubación (García-Sancho, 2012). Un esquema con el ciclo de la cepa silvestre Bristol N2 a 20 °C es mostrado en la Figura 2.

Cuando las condiciones ambientales son adversas, por ejemplo, durante escasez de alimentos, altas temperaturas o grandes densidades de población, es poco probable una reproducción exitosa. En este caso, *C. elegans* puede detener el desarrollo en una etapa L2 alterna llamada fase *dauer*, caracterizada por la ausencia del proceso de alimentación, y un aumento de la resistencia de la cutícula. Los animales pueden volver a entrar al ciclo de vida reproductiva una vez las condiciones sean más favorables (Wang et al., 2010b).

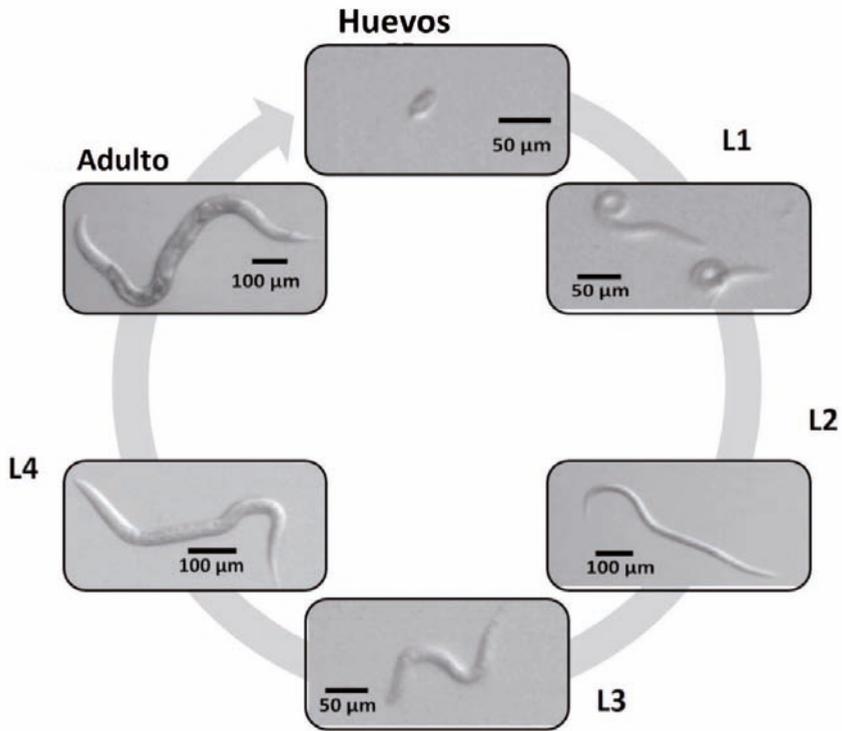


Figura 2. Ciclo de vida de *C. elegans*. Las imágenes fueron tomadas en un microscopio de disección con objetivo 4X.

3.2. Ventajas como modelo biológico

C. elegans ha sido usado para estudios toxicológicos desde el nivel del animal completo hasta el nivel de células individuales (Zhuang et al., 2014) y sus características bioquímicas y biológicas lo hacen adecuado como modelo para diversidad de estudios. Tiene un corto tiempo de generación (3 días), siendo capaz de autofecundarse, haciendo económico su mantenimiento en el laboratorio (Zhuang et al., 2014). Produce una gran progenie, entre 200 y 300 crías (Megalou y Tavernarakis, 2009). La genética de este animal está muy bien establecida, debido a que su genoma fue secuenciado completamente y existe un buen conocimiento del linaje celular completo

de sus 959 células somáticas (García-Sancho, 2012). *C. elegans* es ideal para el estudio de mecanismos moleculares debido a la facilidad con la que su manipulación genética puede ser realizada. Su excelente desempeño como modelo en esta área ha conducido al desarrollo de muchas herramientas y recursos, incluyendo miles de mutantes caracterizados y bibliotecas de ARN de interferencia (ARNi), útiles para silenciar la expresión de genes específicos e inferir su efecto (Adam, 2009; Megalou y Tavernarakis, 2009). Así mismo, su transparencia hace que las proteínas transgénicas que han sido fusionadas a marcadores fluorescentes sean visibles en experimentos *in vivo* (Giles y Rankin, 2009; Tejeda-Benítez y Olivero-Verbel, 2016).

C. elegans es cultivada en el laboratorio en un medio de crecimiento de nemátodos (NGM), el cual contiene NaCl, agar, peptona, colesterol, K_3PO_4 , KH_2PO_4 , K_2HPO_4 y $MgSO_4$. Otro medio de cultivo utilizado es el agar K, el cual contiene adicionalmente KCl (Meyer et al., 2010). Por su parte, el medio líquido K es el utilizado para transferir los gusanos a platos frescos y para la realización de ensayos en medio líquido. Las cepas son mantenidas en incubadora a 20° C y alimentadas con la bacteria *Escherichia coli* OP50 como fuente de alimento (Williams y Dusenbery, 1990).

3.3. Puntos finales de evaluación de toxicidad

Existen muchos puntos finales que pueden ser evaluados en los experimentos de toxicidad empleando *C. elegans*. El procedimiento general de exposición aguda consiste en la incubación de adultos jóvenes dentro del medio líquido K con el tóxico a diferentes concentraciones, sin alimento. Para ensayos de exposición prolongada son empleadas larvas en edad L1, las cuales se dejan crecer hasta convertirse en adultos, en presencia de un extracto de *E. coli* OP50 como alimento. En aquellos casos en donde la cría pueda afectar el resultado del experimento, algunos autores interrumpen la reproducción empleando 5-fluorodesoxiuridina, un inhibidor de la síntesis del ADN (Wu et al., 2012a). A continuación se describen algunos de los puntos finales frecuentemente usados en investigaciones relacionadas con evaluación de la toxicidad, por lo general realizados generando curvas de concentración-respuesta.

Los puntos finales pueden agruparse teniendo en cuenta los efectos en la biología del organismo, incluyendo letalidad, crecimiento, locomoción y reproducción, entre otros. Así mismo, es común la utilización de marca-

dores moleculares para determinar estrés oxidativo, cambio en la expresión de mRNA o proteínas, daño al ADN, e inducción de fluorescencia en cepas transgénicas, por mencionar algunos ejemplos. La Figura 3 muestra algunos puntos finales usualmente empleados en la investigación de toxicidad usando *C. elegans*.



Figura 3. Puntos finales de toxicidad

3.3.1. Letalidad

En esta prueba, 10 ± 1 adultos jóvenes son transferidos a microplacas que contienen diferentes concentraciones del tóxico a evaluar y un control. Los gusanos son expuestos durante 24 h a 20 °C, registrando posteriormente el número de organismos vivos y muertos mediante inspección con un microscopio de disección (Zhuang et al., 2014; Williams y Dusenbery, 1990). La muerte es asumida cuando no hay movimiento durante un período de 30 s (Rui et al., 2013; Wu et al., 2013).

3.3.2. Crecimiento

Este punto final es evaluado midiendo la longitud del cuerpo de los nematodos antes y después de la incubación con el tóxico. El proceso se realiza bajo microscopio de luz y con un analizador de imágenes (Nyström et al., 2002). En este caso, los nematodos fueron calentados a 50 °C para que permanecieran rectos, facilitando de este modo la medición.

3.3.3. Locomoción

Los defectos en la locomoción de los nemátodos han sido relacionados con un deterioro de la red neuronal, efecto evaluado a partir de varios criterios: el ladeo de la cabeza, el curvamiento del cuerpo y movimientos básicos (Yu et al., 2013a). Un ladeo de la cabeza es definido como un cambio en la dirección de flexión en el cuerpo. El curvamiento del cuerpo es observado como un cambio en la dirección de la vulva superior de la faringe a lo largo del eje Y, suponiendo que los nemátodos se desplazan a lo largo del eje X. Los movimientos básicos son los movimientos sinusoidales hacia adelante en un tiempo fijo (Matsuura et al., 2013, Rui et al., 2013, Wu et al., 2013, Yu et al., 2013a, b, Zhuang et al., 2014).

3.3.4. Expresión de fluorescencia como marcador

Diferentes nemátodos transgénicos que portan el gen *gfp* han sido desarrollados para el estudio de diferentes vías bioquímicas. La proteína verde fluorescente (GFP) es utilizada en diversos estudios biotecnológicos debido a sus múltiples posibilidades de aplicación. Esta macromolécula fue aislada inicialmente de la medusa *Aequorea victoria* y su principal característica es la emisión de luz verde fluorescente, la cual puede medirse directamente sin desintegración celular. El cromóforo de GFP está formado por ciclación y deshidrogenación intramolecular y sin la adición de cofactores. En *A. victoria* la luz se produce cuando la energía se transfiere de la fotoproteína aequorina activada por Ca^{+2} a GFP. Este proceso se produce en células fotogénicas especializadas ubicadas en la base de la sombrilla de la medusa, proporcionando una función de comunicación o un mecanismo de defensa para el organismo. La clonación del gen de la GFP de tipo salvaje y su posterior expresión en sistemas heterólogos ha permitido el uso de GFP como un gen reportero potente para el análisis de la expresión génica en una amplia variedad de sistemas experimentales (Kain, 1999).

La GFP es bastante pequeña, altamente soluble y estable en un amplio rango de pH (Beck et al., 2005). En los análisis *in vivo* este reportero inerte es excitado por la luz UV (395 nm), emitiendo luz verde (509 nm), la cual es fácilmente visualizada mediante microscopía de epifluorescencia empleando filtros comúnmente disponibles. GFP tiene la ventaja adicional de que no requiere un sustrato, eliminando los problemas de solubilidad, toxicidad o de permeabilidad asociados (Argueta et al., 2004).

El uso de cepas de *C. elegans* transgénicas con GFP ha permitido el análisis de la inducción de varios genes de respuesta al estrés por sustancias tóxicas, ensayos que suelen ser más económicos, fáciles y rápidos que la técnica de microarreglos de ADN. Variados nemátodos transgénicos que llevan el gen de la GFP se han desarrollado para el estudio de varias vías bioquímicas. Utilizando esta técnica se ha evaluado la toxicidad debida a la exposición a nanopartículas de Zn por medio de transgénicos *pcs-1::gfp* (Polak et al., 2014). Algunas cepas transgénicas emiten fluorescencia sólo a nivel neuronal. Es el caso de la cepa F25B3.3::GFP usada en la evaluación toxicológica de MPs (Du y Wang, 2009), metilmercurio (Helmcke y Aschner, 2009) y pesticidas (Negga et al., 2011). Extractos orgánicos de suelos contaminados de España fueron evaluados utilizando cepas transgénicas de *C. elegans* que portan el gen *gfp* reportero y otros cinco genes, *hsp-16.2*, *gpx-6*, *hsp-6*, *gst-1* y *cyp-34A9*, permitiendo la identificación de diferentes mecanismos de toxicidad (Anbalagan et al., 2012). Estos extractos acuosos también fueron evaluados usando 24 cepas transgénicas que portan el gen *gfp*, permitiendo la correlación entre los datos de expresión visualizados con el reportero y las concentraciones de metales presentes en el suelo (Anbalagan et al., 2013).

La observación de la fluorescencia comúnmente puede lograrse empleando un microscopio de luz, capturando imágenes que luego son estudiadas por un software de análisis de imagen (Li et al., 2009; Shen et al., 2009; Wang et al., 2010a; Polak et al., 2014). Imágenes del microscopio óptico utilizando filtros de fluorescencia son presentadas en la Figura 4.

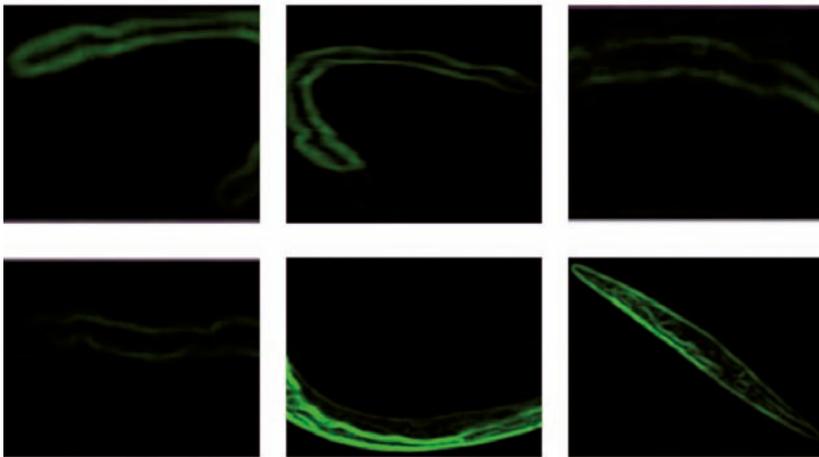


Figura 4. Expresión de fluorescencia en *C. elegans*. Cepa *hsp4::gfp*.

Otros puntos finales que han sido descritos en la literatura sobre modelos de toxicidad con *C. elegans* incluyen la evaluación de reproducción (Höss et al., 2013; Leelaja y Rajini, 2013; Rui et al., 2013); fertilidad (Höss et al., 2009a; b; Roh y Choi, 2011; Wang et al., 2009a); esperanza de vida (Cha et al., 2012; Li et al., 2012b; Zhuang et al., 2014); autofluorescencia intestinal (Rui et al., 2013; Wu et al., 2012a; c; Wu et al., 2013; Zhuang et al., 2014); bombeo de la faringe (Jadhav y Rajini, 2009); longitud media del ciclo de la defecación (Liu et al., 2013; Wu et al., 2012a; Zhao et al., 2014); desarrollo (Helmcke y Aschner, 2009), cambio a estado *dauer* (Wang et al., 2010b), búsqueda de alimento (Monteiro et al., 2014); estrés oxidativo (Eom et al., 2013; Leelaja y Rajini, 2013; Zhuang et al., 2014; Rui et al., 2013); daño oxidativo (Eom et al., 2013; Rudgalvyte et al., 2013; Liu et al., 2012a; Wu et al., 2012a); cambios en la expresión génica (Eom et al., 2013; Rudgalvyte et al., 2013; Zhuang et al., 2014; Wang et al., 2014); cambios en la expresión de proteínas (Wang y Ezemaduka, 2014); daño al ADN (Li et al., 2012b; Hunter et al., 2012; Wang et al., 2014); apoptosis (Wang et al., 2009b; Wang et al., 2014); detención del ciclo celular (Cheng et al., 2014; Kumar et al., 2010; Wang et al., 2014), y más recientemente, han tomado especial relevancia los efectos transgeneracionales (Yu et al., 2011; Yu et al., 2013b).

3.4. Evaluaciones de toxicidad de muestras ambientales usando *C. elegans*

C. elegans ha sido empleado como modelo para la evaluación de toxicidad de muestras ambientales como suelos, lodos y sedimentos. Los sedimentos del Danubio, el Rin y el Elba en Alemania fueron estudiados analizando los cambios en el perfil de expresión génica en este nemátodo usando microarreglos de ADN del genoma entero para identificar categorías de genes y procesos celulares sobreexpresados. Paralelamente, se evaluó la reproducción y el daño al ADN usando la técnica de ensayo cometa (Menzel et al., 2009). Así mismo, suelos contaminados han sido caracterizados toxicológicamente utilizando fertilidad, crecimiento y reproducción como puntos finales en la cepa silvestre Bristol N2 de *C. elegans* (Höss et al., 2009b). Extractos orgánicos de suelos contaminados de dos sitios del Sureste de España fueron evaluados utilizando cepas de *C. elegans* transgénicas portadoras del gen reportero *gfp* y de cinco genes funcionales, *hsp-16.2*, *gpx-6*, *hsp-6*, *gst-1* y *cyp-34A9* para analizar diferentes mecanismos de toxicidad inducidos por los contaminantes presentes en los extractos (Anbalagan et al., 2012). Un resumen de estas investigaciones se muestra en la Tabla 1.

Por encima de las matrices ambientales, los xenobióticos han sido extensivamente investigados en modelos con *C. elegans*. La lista incluye pesticidas (Anbalagan et al., 2013; Leelaja y Rajini, 2013; Lewis et al., 2013; Wang et al., 2014; Cheng et al., 2014; Höss et al., 2013); MPs y sus derivados (Rudel et al., 2013; Wang y Ezemaduka, 2014; Monteiro et al., 2014), nanopartículas (Zhao et al., 2014; Rui et al., 2013; Wu et al., 2013; Chen et al., 2013), fármacos (Matsuura et al., 2013; Smith et al., 2013; Liu et al., 2013), toxinas (Li et al., 2009; Leung et al., 2010) y otras sustancias químicas (Li et al., 2012b; Nam y An, 2010; Leung et al., 2010; Boyd et al., 2010).

Muestra ambiental	Punto final y resultado	Referencia
Sedimentos de tres ríos de Alemania: Danubio, Rin y Elba.	Los cambios en la expresión génica fueron evaluados usando microarreglos del genoma completo para identificar alteraciones en vías bioquímicas. Se encontraron alteradas las rutas metabólicas de disacáridos y glucógeno, mientras que otras vías funcionales adicionales, como la fosforilación oxidativa, la biogénesis de ribosomas, el metabolismo de xenobióticos, el envejecimiento y varios procesos de desarrollo estuvieron reguladas diferencialmente, pero sólo en respuesta a los sedimentos más contaminados.	Menzel et al., 2009
Agua y sedimentos de ríos afectados por la minería del carbón (Estados Unidos)	Muestras de agua y sedimentos de arroyos impactados por las minas de la cuenca alta del Río Mud en Virginia inhibieron el crecimiento de los nemátodos. Mediante el uso de herramientas genómicas y organismos transgénicos se comprobó que la toxicidad del agua estaba relacionada con estrés osmótico, mientras que la toxicidad de sedimentos se correlacionó con la presencia de metales.	Turner et al., 2013
Suelos contaminados de Alemania	Los suelos contaminados mostraron efectos tóxicos sobre los nemátodos en términos de fertilidad, crecimiento y reproducción.	Höss et al., 2009a
Extractos orgánicos de suelos contaminados del Sureste de España	Extractos acuosos de suelos contaminados con pesticidas indujeron la expresión de los genes <i>hsp-6</i> , <i>hsp-16.2</i> , <i>gst-1</i> , <i>gpx-6</i> y <i>cyp-34A9</i> . Los extractos orgánicos fueron más eficientes que los acuosos como inductores de este proceso.	Anbalagan et al., 2013
Extractos acuosos de suelos	Extractos acuosos de suelos contaminados con metales indujeron la expresión de <i>mtl-1</i> , <i>mtl-2</i> y <i>elt-2</i> . Hubo correlación entre la presencia de metales y la magnitud de la expresión.	Anbalagan et al., 2012

<p>Efluente de planta de papel reciclado</p>	<p>La exposición a mezclas de Ca, Al y Fe causó disminución de la esperanza de vida en una proporción mayor que la generada por los metales individuales, confirmando que la mezcla es la causante de la toxicidad del efluente de la planta de papel reciclado.</p>	<p>Wang et al., 2010b</p>
<p>Efluente de planta de papel reciclado</p>	<p>La toxicidad de los efluentes de la planta de papel reciclado medida en términos de la esperanza de vida, está relacionada con los metales Ca, Fe y Al, y no con la celulosa ni EDTA. La autofluorescencia intestinal confirmó este resultado.</p>	<p>Wang et al., 2008</p>
<p>Material Particulado</p>	<p>La exposición aguda a altas concentraciones de PM2.5, en el rango de mg/L, causó efectos adversos sobre el desarrollo, esperanza de vida, reproducción y locomoción. La exposición crónica a bajas concentraciones de PM2.5, en el rango de mg/L, generó efectos adversos sobre el desarrollo, la vida útil, la reproducción, el comportamiento de locomoción y el desarrollo intestinal de los nemátodos. La exposición prolongada a PM2.5 incluso podría causar efectos adversos sobre la esperanza de vida, reproducción, comportamiento locomoción, y el desarrollo intestinal en la proge de los nemátodos expuestos.</p>	<p>Zhao et al., 2014</p>
<p>Material Particulado</p>	<p>La exposición a PM2.5 indujo deficiencias en el desarrollo, reproducción, locomoción y esperanza de vida. Hubo inducción de autofluorescencia intestinal y producción de especies reactivas del oxígeno. La exposición prolongada causó toxicidad más severa que la exposición aguda. La exposición a PM2.5 alteró la expresión de genes necesarios para el control del estrés oxidativo. Hubo reducción de la duración media del ciclo de la defecación por un déficit en el desarrollo de neuronas involucradas.</p>	<p>Sun et al., 2015</p>
<p>Material particulado de diesel (DPE).</p>	<p>La co-exposición a dosis bajas de DPE (20 mg/mL) más UV-A (0.2, 0.5, y 1.0 J/cm²) no afectó el desarrollo pero provocó la inducción de apoptosis de las células germinales. Hubo proliferación de células germinales, lo que indica daño al ADN. La producción de especies reactivas de oxígeno aumentó de una manera dependiente del tiempo.</p>	<p>Guo et al., 2014</p>

<p>Aguas superficiales que contienen compuestos orgánicos bromados.</p>	<p>La exposición a muestras concentradas de agua superficial que contenía compuestos orgánicos bromados aumentó tres de los cuatro rasgos de locomoción y la actividad de la defecación. El comportamiento termotáctico se caracterizó por una preferencia temporal para el ambiente más frío, lo que indica una neurotoxicidad leve temporal. En general se reveló un perfil neurotóxico o neuroestimulante en las aguas estudiadas.</p>	<p>Ju et al., 2014</p>
<p>Mezcla de petróleo crudo y dispersantes</p>	<p>El aceite crudo y su dispersante inhibieron significativamente la reproducción. Inhibiciones dependientes de la dosis fueron observadas en la producción de larvas eclosionadas. El dispersante químico potenció los efectos del crudo; la mezcla de dispersante y petróleo indujo efectos más significativos que las exposiciones individuales. El dispersante y la mezcla dispersante más petróleo indujeron la expresión de 12 genes asociados con una variedad de procesos biológicos, incluyendo puesta de huevos, estrés oxidativo, contracción muscular y funciones neurológicas.</p>	<p>Zhang et al., 2013</p>
<p>Crudo dispersado</p>	<p>El aceite crudo dispersado aumentó el número de células germinales apoptóticas activando genes implicados en esta vía.</p>	<p>Polli et al., 2014</p>
<p>Coloides de óxido de hierro derivados de suelos</p>	<p>Los coloides de ferrihidrita que contienen citrato fueron tomadas por <i>C. elegans</i> con el alimento y acumulados dentro de su cuerpo. La toxicidad de ferrihidrita, goethita, y akaganeita fue dependiente del tamaño y el área de superficie específica. La composición de materia orgánica determinó la toxicidad de manera que óxidos de Fe asociados a ácidos húmicos o citrato fueron menos tóxicos que los óxidos de Fe libre de materia orgánica.</p>	<p>Höss et al., 2015</p>

Tabla 1. Evaluación de muestras ambientales usando *C. elegans* como modelo



4. Área de estudio

Los 20 sitios de muestreo fueron seleccionados teniendo en cuenta diversos aspectos tales como la actividad antropogénica existente en la zona, la facilidad de acceso y la distancia entre estaciones. El muestreo fue realizado entre el 1 y el 10 de Noviembre de 2013. La primera estación estuvo ubicada en el Departamento del Huila, cerca al nacimiento del Río y la última en la ciudad de Barranquilla, en su desembocadura. Los sitios de muestreo, con su respectiva ubicación son mostrados en la Tabla 2 y la Figura 5.

Muestra	Municipio	Departamento	Latitud	Longitud
1	Garzón	Huila	2°11'57"	75°38'59"
2	Neiva	Huila	2°59'55"	75°18'16"
3	Natagaima	Tolima	3°37'23"	75°05'37"
4	Girardot	Cundinamarca	4°18'0"	74°48'0"
5	Honda	Tolima	5°11'0"	74°44'0"
6	La Dorada	Caldas	5°27'0"	74°40'0"
7	Puerto Boyacá	Boyacá	5°58'0"	74°35'0"
8	Puerto Berrío	Antioquia	6°29'0"	74°24'0"
9	Barrancabermeja	Santander	7°4'0"	73°52'0"
10	San Pablo	Bolívar	7°29'0"	73°56'0"
11	Simití	Bolívar	7°58'0"	73°57'0"
12	Gamarra	Cesar	8°20'0"	73°45'0"
13	Barranco de Loba	Bolívar	8°57'0"	74°7'0"
14	El Banco	Magdalena	9°0'0"	73°58'0"
15	Mompox	Bolívar	9°14'22"	74°25'30"
16	Magangué	Bolívar	9°14'0"	74°44'0"
17	Plato	Magdalena	9°47'0"	74°47'0"
18	Calamar	Bolívar	10° 15'0"	74°55'0"
19	Campo de la Cruz	Atlántico	10° 23'0"	74°53'0"
20	Barranquilla	Atlántico	10° 59'16"	74°47'20"

Tabla 2. Ubicación de los sitios de muestreo

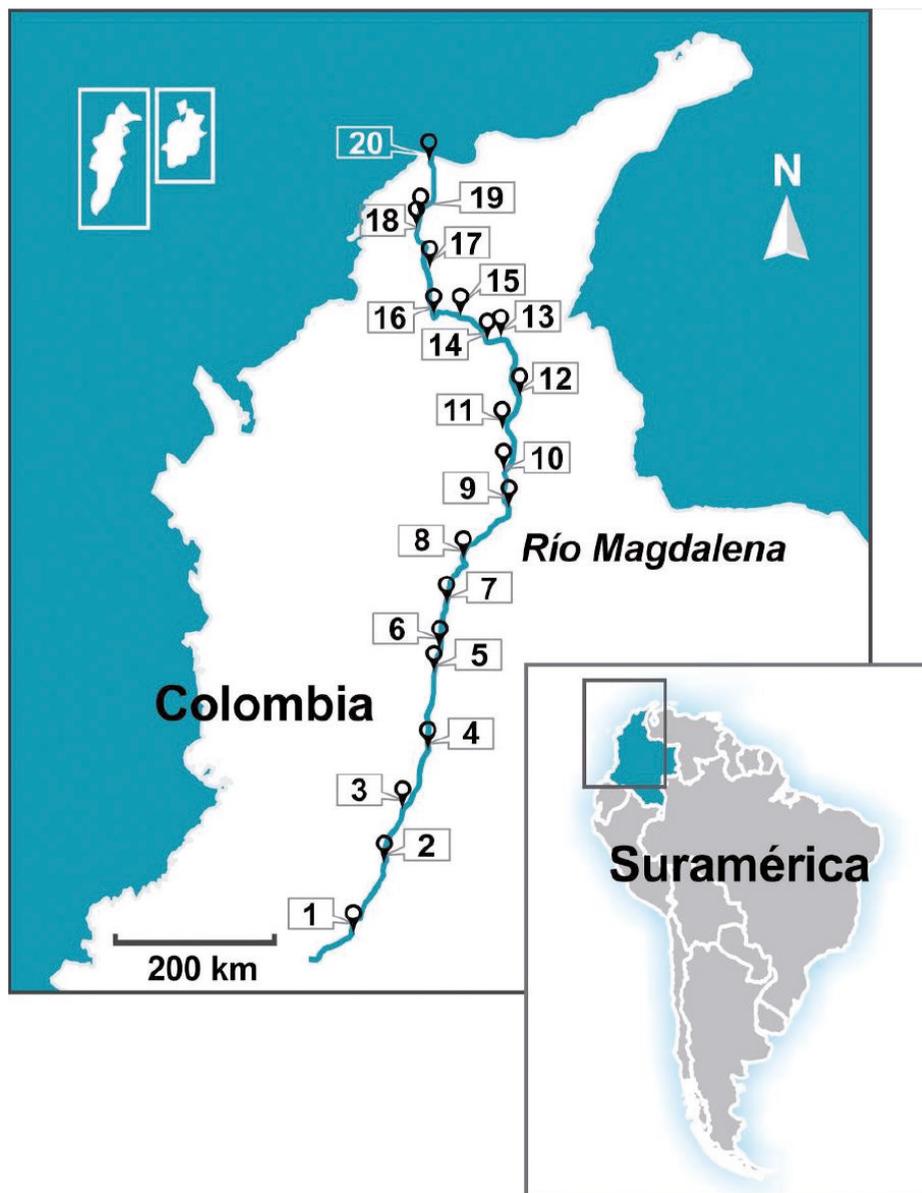


Figura 5. Ubicación de los sitios de muestreo en el río Magdalena.

4.1. Garzón (Huila)

El municipio de Garzón se encuentra localizado a 113 km de Neiva, tiene una población de 86.249 habitantes en un área de 580 km² que equivale al 29% de la superficie total del Departamento del Huila. Está ubicado a 2°11'57" de latitud Norte y 75°38'59" de longitud Oeste. La altura de la cabecera municipal es de 828 msnm y su temperatura media es de 24 °C.

La agricultura es la principal actividad económica del municipio, siendo el café el producto más importante, que genera empleo al 78% de las personas laboralmente activas. Le siguen el plátano, arroz, maracuyá, yuca y cacao. La producción agrícola abarca 12.488 ha, equivalentes al 21.5% del total de la superficie municipal. El sector pecuario genera un promedio de 175 empleos permanentes en los sectores bovino y porcino, y la avicultura de doble fin. La piscicultura se centra en especies de mojarra plateada, carpa espejo y cachama. En esta región, el Río Magdalena recibe las aguas del Río Suaza y de las quebradas que nacen en la parte alta de la Cordillera Oriental. Debido a su poco caudal, el Río presenta baja navegabilidad en esta zona.

La ubicación del municipio, fotografías del Río Magdalena en esta región, de la catedral y del balneario del Balseadero, sitio de muestreo son presentados en el Cuadro 1.

4.2. Neiva (Huila)

Neiva es una ciudad de 340.046 habitantes, capital del Departamento del Huila. Está ubicada entre la Cordillera Central y Oriental, en una planicie sobre la margen oriental del Río Magdalena a 2°59'55" N de latitud y 75°18'16" O de longitud. Tiene una superficie de 1.553 km², una altitud de 442 msnm y una temperatura promedio de 28 °C.

Las principales actividades económicas en Neiva son la agricultura y la ganadería. La agricultura se ha desarrollado y tecnificado en los últimos años, sus principales cultivos son café, algodón, arroz, frijol, maíz mejorado, maíz tradicional, sorgo, cacao, caña panelera, plátano, yuca, iraca y tabaco. La ganadería ha alcanzado un desarrollo notable, sobre todo en el ganado vacuno. En la actividad minera se destaca la minería de oro, plata, caliza, mármol y cobre.

En el sector industrial es de importancia la explotación de petróleo y gas natural, las reservas petroleras representan el 1.2% del total nacional. Toda la infraestructura de servicios en Neiva se ha visto fortalecida por explotación petrolera que comenzó en el año 1959. La producción artesanal se especializa en la elaboración de cerámica y sombreros. La industria fabril es incipiente, pero se encuentran fábricas de productos alimenticios, bebidas, jabones, cigarros y licores. La actividad industrial se desarrolla en la agroindustria, en manufacturas de producción artesanal, en la producción de alimentos y bebidas, y en la fabricación de carrocerías y metalmecánica. El comercio es muy activo debido a que Neiva es el eje de la economía de los departamentos del Huila, Caquetá y Putumayo.

El Río Magdalena es la principal cuenca hídrica de la ciudad, que lo atraviesa de sur a norte. De las Cordilleras Central y Oriental descienden al Magdalena numerosos afluentes que tributan aguas al Magdalena, como Quebradas, El venado, Burisaco, El caimán, Arenoso, El aceite, Dindal y Guacirco. En esta región, el caudal del Río es bajo y la navegabilidad es prácticamente nula, se limita a canoas de pescadores. Es importante destacar que, la ciudad de Neiva carece de sistema de tratamiento de aguas residuales, por lo que el Río Magdalena es el receptor de sus aguas negras, sin recibir ningún tipo de tratamiento. La ubicación de Neiva, fotografías de la ciudad, del Río Magdalena y del sitio de muestreo son presentados en el Cuadro 2.

4.3. Natagaima (Tolima)

Natagaima es un municipio situado al sur del Departamento del Tolima a orillas del Río Magdalena a 3°37'23" de latitud y 75°05'37" de longitud. Tiene una población de 22.637 habitantes en una extensión de 862 km², altitud de 326 msnm y temperatura media de 29 °C. La principal actividad económica es la agricultura con cultivos de arroz, sorgo y algodón a gran escala, así como yuca, plátano y maíz en pequeña proporción. La producción bovina, dedicada a la cría de ejemplares de la raza cebú y mestizos, está orientada hacia la producción de carne y leche. La industria de la tala-bartería es de mucha fama, especialmente las sillas de montar, los aperos de cabezas y los justes. La ubicación de Natagaima, fotografías del municipio y del sitio de muestreo son presentados en el Cuadro 3.

4.4. Girardot (Cundinamarca)

Girardot es un municipio del Departamento de Cundinamarca ubicado a $4^{\circ}18'0''$ de latitud norte y $74^{\circ}48'0''$ de longitud oeste. Está localizado a una altitud de 289 msnm y su temperatura promedio anual es de 33.3°C . Su población es de 104.476 habitantes en una extensión de 129 km². Girardot fue en tiempos pasados uno de los puertos más importantes del Río Magdalena debido a su ubicación estratégica con respecto a Bogotá. Sin embargo, con el tiempo se convirtió en una ciudad con una economía enfocada principalmente al turismo, con una gran infraestructura para esta actividad, con más de 3.000 camas en hoteles, centros vacacionales y numerosos centros de convenciones.

Tanto Girardot, como Flandes en la margen opuesta del Río Magdalena, vierten sus aguas residuales al Río sin ningún tratamiento previo. La única planta de tratamiento existente en Girardot es la del matadero municipal. Por otro lado, en Girardot, el Río Magdalena recibe las aguas del Río Bogotá, el cual recoge las aguas residuales de la capital, vertimientos de curtiembres y de muchas industrias que arrojan sus desechos sin tratar al Río. Las anteriores son dos importantes fuentes de contaminación del cauce en esta zona. La ubicación de Girardot, fotografías del municipio y del sitio de muestreo son presentados en el Cuadro 4.

4.5. Honda (Tolima)

El municipio de Honda se encuentra ubicado en el norte del Departamento del Tolima, a orillas del Río Magdalena, a $5^{\circ}11'0''$ de latitud norte y $74^{\circ}44'0''$ de longitud oeste. Tiene una población de 25.032 habitantes en una extensión de 309 km², temperatura promedio de 27°C y una altitud de 225 msnm.

La actividad económica en Honda se fundamenta en la industria, turismo, pesca y ganadería. El turismo ha cobrado importancia recientemente por ser un centro histórico colonial hoy declarado Monumento Nacional. En Honda, se encuentra el Museo del Río, en homenaje al afluente más importante de Colombia y por donde ingresó el desarrollo al país. Honda es conocida como “La Ciudad de los Puentes”, por contar con más de cuarenta puentes sobre los ríos Magdalena, Gualí, Guarinó y la Quebrada Seca.

En Honda, desembocan en el Río Magdalena, los ríos Gualí y Guarinó. La navegación del Río Magdalena desde el norte del país se interrumpe en

Honda, donde se presenta un desnivel que crea rápidos que impide que los barcos encallen. La ubicación de Honda, fotografías del municipio, del río y del sitio de muestreo son presentados en el Cuadro 5.

4.6. La Dorada (Caldas)

La Dorada es un municipio al oriente del Departamento de Caldas, en la región conocida como Magdalena Medio. Tiene una población de 76.574 habitantes en una superficie de 574 km². Se localiza a 5°27" de latitud norte y 74°40" de longitud oeste, sobre la margen izquierda del Río Magdalena. Está a 178 msnm con una temperatura promedio de 35 °C.

Su principal actividad económica se basa especialmente en la ganadería, la cual se desarrolla a gran escala, tanto en la ceba como en la cría de ganado bovino, siendo este municipio la segunda ciudad ganadera de Colombia, después de Montería. Otras actividades son la piscicultura, agricultura, minería del oro, comercio y la pequeña industria. Recientemente, se ha explotado el turismo de tipo ecológico en los ríos Magdalena, La Miel, Guarinocito y Doña Juana. Estos ríos también son explotados en la navegación, pesca, abastecimiento de agua de consumo humano y generación de energía. Al no contar con plantas de tratamiento de aguas residuales, los residuos líquidos de La Dorada y Puerto Salgar, en la margen opuesta, son vertidos al Río Magdalena sin tratar. La ubicación de La Dorada, fotografías del municipio y del sitio de muestreo son presentados en el Cuadro 6.

4.7. Puerto Boyacá (Boyacá)

Puerto Boyacá es una ciudad y puerto del Departamento de Boyacá en la margen derecha del Río Magdalena, localizada a 5°58'0" de latitud norte y 74°35'0" de longitud oeste. Es uno de los principales puertos de la región del Magdalena Medio y el principal puerto fluvial del Departamento de Boyacá. Tiene una población de 54.838 habitantes en un área de 1.472 km². Tiene una altitud de 145 msnm y temperatura media de 28 °C.

La actividad más importante en Puerto Boyacá es la ganadería, constituyendo la base de la economía del municipio, con un doble propósito, producción de carne y leche. Sobresale el ganado bovino, seguido del equino, porcino, bubalino, ovino y caprino. La pesca es una actividad artesanal que se realiza durante todo el año como parte de la economía de subsistencia para los pescadores de los ríos Magdalena, Negro, Guaguaquí y Ermitaño,

así como de la Ciénaga de Palagua. Se siembra y cosechan especies como la cachama blanca, la mojarra roja y el bocachico. En la agricultura sobresalen los cultivos de plátano, cacao, yuca, maíz, cítricos y papaya. Sin embargo, la actividad más representativa, en materia de regalías y a su vez la de mayor impacto ambiental, es la explotación de petróleo en la Ciénaga de Palagua. La ubicación de Puerto Boyacá, fotografías del municipio y del sitio de muestreo son presentados en el Cuadro 7.

4.8. Puerto Berrío (Antioquia)

Puerto Berrío es un municipio localizado en la subregión del Magdalena Medio, en el Departamento de Antioquia, a $6^{\circ}29'26''$ de latitud norte y $74^{\circ}24'17''$ de longitud oeste. Tiene una población de 44.437 habitantes en una extensión de 1.184 km². Su altitud es de 125 msnm y su temperatura media anual es de 29 °C. El principal sector de la economía municipal es la ganadería con grandes predios dedicados al ganado de levante, principalmente. La agricultura ocupa un renglón de menor importancia en la economía municipal, con la producción de yuca, caña de azúcar, frutales, maíz y limón. La pesca se desarrolla de manera artesanal sin estructura de comercialización. En Puerto Berrío se encuentra una estación de bombeo de Ecopetrol, por lo tanto, es un lugar de tránsito y de movimientos migratorios.

El Río Magdalena es usado para el abastecimiento de agua, la pesca y la navegación recreativa, además, es el receptor de las aguas domésticas. La navegación con fines de transporte a otros municipios no se encuentra completamente desarrollada en esta zona. La ubicación de Puerto Berrío, fotografías del municipio y del sitio de muestreo son presentados en el Cuadro 8.

4.9. Barrancabermeja (Santander)

Barrancabermeja es un municipio ubicado en el Departamento de Santander en la margen derecha del Río Magdalena a $7^{\circ}04'03''$ de latitud norte y $73^{\circ}50'50''$ de longitud oeste. Cuenta con una población de 229.710 habitantes en una superficie de 1.154 km² entre 75 y 146 msnm. Su clima es cálido con una temperatura promedio anual de 28 °C. En Barrancabermeja se encuentra el Complejo Industrial de Ecopetrol S.A., el cual refina aproximadamente 252.000 barriles diarios. Estas instalaciones ocupan 206 hectáreas

y cuenta con más de 50 plantas de procesamiento, por lo cual es reconocido entre los más grandes y antiguos de Latinoamérica.

En la actualidad, el Río Magdalena es el medio de transporte de los hidrocarburos que salen de Barrancabermeja en forma de combustóleo, con destino a la planta de refinación en Cartagena o a los puertos marítimos. Actualmente, se desarrollan trabajos para aumentar la navegabilidad del Río, realizando dragados en zonas de alta sedimentación. La carga menor y los pasajeros se transportan en unidades autopropulsadas, lanchas de madera o de fibra de vidrio con motor fuera de borda, botemotores y motocanoas (Mintransporte, 2006). La ubicación de Barrancabermeja, fotografías del municipio y del sitio de muestreo son presentados en el Cuadro 9.

4.10. San Pablo (Bolívar)

San Pablo se encuentra ubicado en el sur del Departamento de Bolívar sobre la margen izquierda del Río Magdalena en su recorrido medio. Ocupa hacia el occidente un alto porcentaje de la Serranía de San Lucas. Su posición geográfica es 7°09'00" de latitud norte y 75°56'00" de longitud con una altitud de 75 msnm y una temperatura media de 29 °C. Tiene una población de 30.100 habitantes en una superficie de 1.967 km².

Los habitantes de esta región se dedican principalmente a la agricultura, ganadería y minería. En San Pablo, el Río Magdalena recibe aguas del Río Cimitarra, que a su vez recibe del Río Tamar. El transporte fluvial, facilita el intercambio diario de pasajeros y carga, con los municipios de Cantagallo, Puerto Wilches y Barrancabermeja a través de la navegación por el Río Magdalena. La ubicación de San Pablo, fotografías del municipio y del sitio de muestreo son presentados en el Cuadro 10.

4.11. Simití (Bolívar)

El municipio de Simití se localiza al sur del Departamento de Bolívar a 7°57'23" de latitud norte y 73°56'46" de longitud oeste, a una altitud de 53 msnm. Tiene una población de 44.300 habitantes en una superficie de 1.345 km². Su temperatura media es de 30 °C. La economía del municipio de Simití se basa en la producción agrícola, ganadería y pesca. La minería ilegal del oro ha aumentado en los últimos años.

El Río Magdalena, en Simití, recibe aguas del Río Simití, como también los efluentes del municipio contaminados por la actividad agrícola y minera.

La ubicación de Simití, fotografías del municipio y del sitio de muestreo son presentados en el Cuadro 11.

4.12. Gamarra (Cesar)

Gamarra es un municipio localizado en el sudoeste de Departamento de Cesar sobre la margen derecha del Río Magdalena a 50 msnm y $8^{\circ}19'15''$ de latitud norte y $73^{\circ}44'36''$ de longitud oeste. Tiene una población de 14.472 habitantes en una extensión de 320 km² y temperatura media de 31 °C. Las actividades económicas de importancia que se desarrollan en el municipio están relacionadas con el agro, la pesca, la ganadería y el comercio. El transporte de carga y pasajeros a través del Río Magdalena es de importancia en esta región.

Los afluentes principales del Río Magdalena en Gamarra son las quebradas Dorada, San Antonio, Buturama, el Caimán, Noréan y el Burro. La ubicación de Gamarra, fotografías del municipio y del sitio de muestreo son presentados en el Cuadro 12.

4.13. Barranco de Loba (Bolívar)

El Municipio de Barranco de Loba se encuentra localizado en el sur del Departamento de Bolívar. Por la parte lateral norte lo baña el Río Magdalena, que en esta parte toma el nombre de "Brazo de Loba". Se ubica a $8^{\circ}56'44''$ de latitud norte y $74^{\circ}06'21''$ de longitud oeste. Presenta una temperatura de 37 °C y una altitud de 23 msnm. Tiene una población de 15.148 habitantes en un área de 416 km². La economía de Barranco de Loba se basa en la pesca artesanal, agricultura y ganadería. La minería del oro de forma artesanal es una actividad importante en algunos corregimientos del municipio.

El Brazo de Loba conforma la red fluvial del municipio que comunica a Barranco de Loba con todas las poblaciones ribereñas de la cuenca del Río Magdalena. La ubicación de Barranco de Loba, fotografías del municipio y del sitio de muestreo son presentados en el Cuadro 13.

4.14. El Banco (Magdalena)

El Banco es un municipio ubicado en el extremo más meridional del Departamento de Magdalena, en la confluencia de los ríos Magdalena y Cesar. Su posición geográfica es $8^{\circ}59'56''$ de latitud norte y $73^{\circ}58'16''$ de longitud

oeste a 25 msnm. Forma parte de la Depresión Momposina. Cuenta con 55.012 habitantes en una extensión de 820 km². Su temperatura media es 29 °C. La economía se basa en la pesca, y en menor grado la agricultura y ganadería.

El transporte de pasajeros por el Río Magdalena es intenso porque el Banco comunica pasajeros entre Barrancabermeja, Magangué y otros municipio del sur de Bolívar, Cesar y Magdalena. La ubicación de El Banco, fotografías del municipio y del sitio de muestreo son presentados en el Cuadro 14.

4.15. Mompox (Bolívar)

El municipio Santa Cruz de Mompox, ubicado en el Departamento de Bolívar es Monumento Nacional y Patrimonio de la Humanidad. Se ubica a los 9°14'22" de latitud norte y 74°25'30" de longitud oeste en la margen izquierda de uno de los brazos del Río Magdalena, este con su otro brazo lo rodea para formar la Isla de Mompox. Su altitud es 16 msnm y su temperatura media 31 °C. Tiene una población de 43.805 habitantes en un área de 645 km².

La economía municipal gira en torno a la pesca, agricultura, orfebrería, ebanistería y el turismo. La ubicación de Mompox, fotografías del municipio y del sitio de muestreo son presentados en el Cuadro 15.

4.16. Magangué (Bolívar)

Magangué es un municipio localizado a orillas del Río Magdalena, en el Departamento de Bolívar. En esta localidad convergen los ríos Cauca, San Jorge y Magdalena. Está ubicado a 9°14'48" de latitud norte y 74°45'34" de longitud oeste a 25 msnm. Tiene una población de 123.618 habitantes en una superficie de 1.568 km². Su temperatura media anual es de 30 °C.

Magangué mantiene una estrecha relación económica con los municipios que conforman la Depresión Momposina y La Mojana, por ser su centro de acopio de los productos agrícolas, ganaderos y pesqueros. La economía de Magangué basa su desarrollo en la actividad comercial, seguida de la actividad agropecuaria, principalmente la ganadería y la pesca. La actividad industrial es incipiente y está centrada en la producción de lácteos, molinos arroceros, panaderías, hielерías, mueblerías, tipografías, metalmecánica y confección. La ubicación de Magangué, fotografías del municipio y del sitio de muestreo son presentados en el Cuadro 16.

4.17. Plato (Magdalena)

El municipio de Plato está localizado en la zona centro del Departamento del Magdalena y sobre la margen derecha del Río Magdalena, a $9^{\circ}47'0''$ de latitud norte y $74^{\circ}47'0''$ de longitud occidental. Tiene una temperatura media de 28°C y altitud de 20 msnm. Su población es de 56.894 habitantes en una superficie de 1.496 km^2 . El principal renglón económico del municipio es la ganadería seguida de la agricultura y pesca. La ubicación de Plato, fotografías del municipio y del sitio de muestreo son presentados en el Cuadro 17.

4.18. Calamar (Bolívar)

El municipio de Calamar se encuentra ubicado al noreste del Departamento de Bolívar, en la región del Canal del Dique a $10^{\circ}15'00''$ de latitud norte y $74^{\circ}54'57''$ de longitud oeste a 9 msnm. Tiene una población de 30.008 habitantes en un área de 246 km^2 . Su temperatura media es 28°C . La economía de Calamar se caracteriza por ser mixta entre el comercio, ganadería y agricultura. La ubicación de Calamar, fotografías del municipio y del sitio de muestreo son presentados en el Cuadro 18.

4.19. Campo de la Cruz (Atlántico)

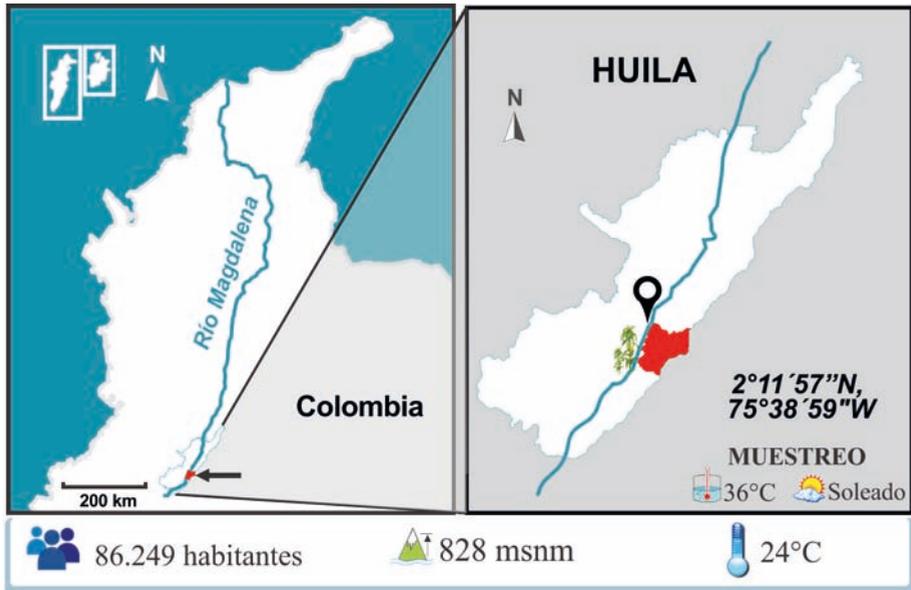
Campo de la Cruz está situado al sur-oriente del Departamento del Atlántico, sobre el vértice del triángulo que forma el Río Magdalena con el Canal del Dique. Su posición geográfica es $10^{\circ}22'40''$ de latitud norte y $74^{\circ}52'53''$ de longitud oeste. Su población es de 16.325 habitantes en una extensión de 105 km^2 . Su altitud es 7 msnm y su temperatura media 28°C . La economía del municipio de Campo de la Cruz se basa en la explotación ganadera y agrícola. La producción pesquera es muy escasa y sólo se realiza para abastecer el consumo interno o de subsistencia. La ubicación de Campo de la Cruz, fotografías del municipio y del sitio de muestreo son presentados en el Cuadro 19.

4.20. Barranquilla (Atlántico)

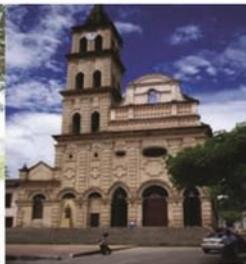
Barranquilla está ubicada sobre la margen occidental del Río Magdalena a 7.5 km de su desembocadura en el Mar Caribe. Tiene 1.212.943 habitantes en sus 154 km^2 de extensión. Su posición geográfica es $10^{\circ}57'50''$ de latitud

norte y 74°47'47" de longitud oeste. Su altitud oscila entre cero hasta una altitud máxima de 142 msnm y su temperatura media es 27 °C.

El Río Magdalena recibe en Barranquilla aguas de los muchos caños como Arriba, Los Tramposos, La Ahuyama, del Mercado y La Tablaza; así como de muchos arroyos de la ciudad, incluyendo los de los barrios el Country, Rebolo, Santo Domingo, Las Américas y el Bosque; además las quebradas El Lindero, El Platanal, El Salado, El Salado 2, Don Juan, Hospital, La Paz, Bolívar, Felicidad, Coltabaco y Siape, entre muchos otros. Todas las aguas superficiales del sistema hídrico de Barranquilla, el Río Magdalena, la Ciénaga de Mallorquín, los caños orientales y los arroyos son objeto de contaminación hídrica como vertederos de aguas residuales sin procesar y de residuos sólidos. La ubicación de Barranquilla, fotografías de la ciudad y del sitio de muestreo son presentados en el Cuadro 20.



Sitio de muestreo
"El Balseadero"



Iglesia Catedral
San Miguel Arcángel



Vista del Río
Magdalena

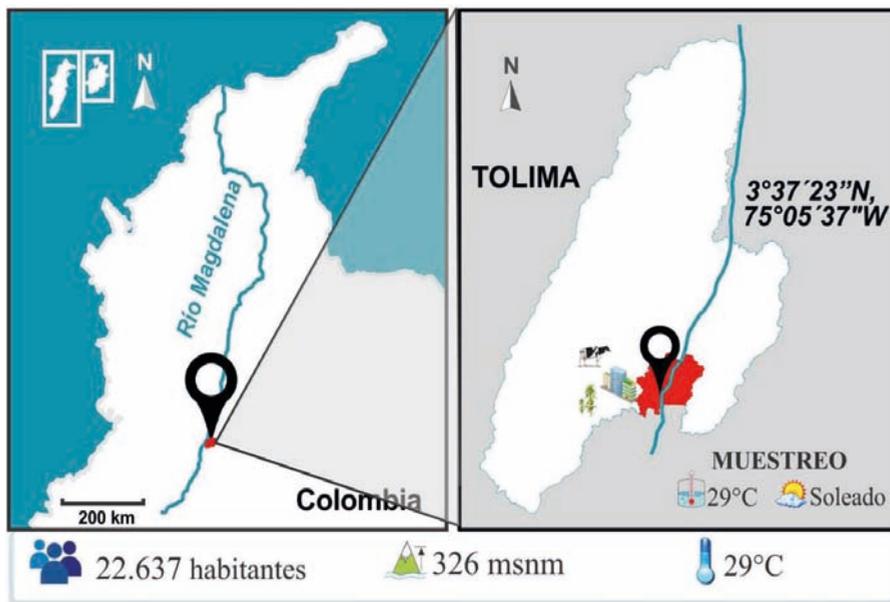
Convenciones

Población	IMPACTOS		
Altura	Agricultura y Ganadería	Actividad Portuaria	Vertimientos Industriales
Temperatura	Minería	Residuos líquidos urbanos	Refinería

Cuadro 1. Reseña del Municipio de Garzón (Huila)



Cuadro 2. Reseña de la ciudad de Neiva (Huila)



Iglesia La Natividad de
Nuestra Señora

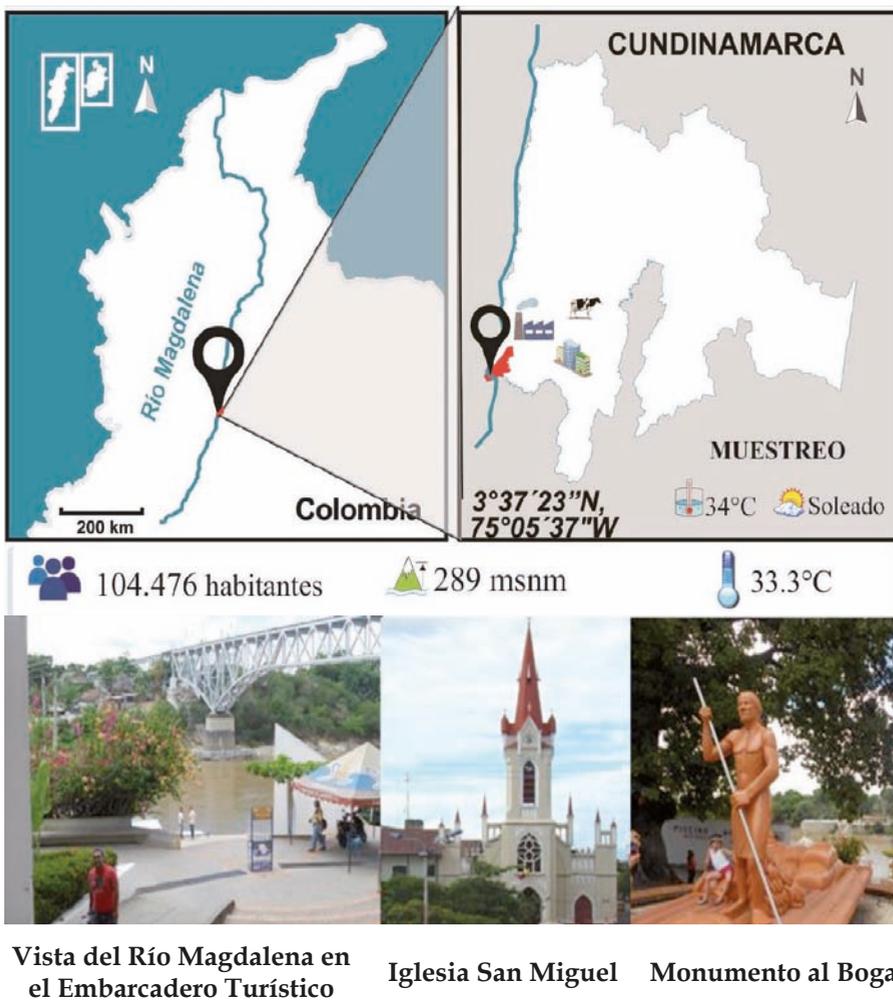


Calle del municipio

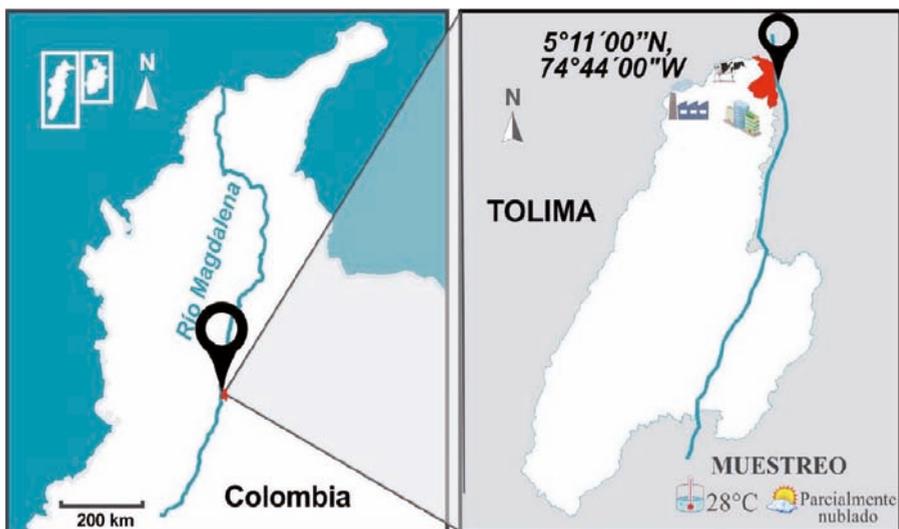


Vista del Río
Magdalena

Cuadro 3. Reseña del municipio de Natagaima (Tolima)



Cuadro 4. Reseña del municipio de Girardot (Cundinamarca)



25.032 habitantes

225 msnm

27°C



Iglesia Catedral
Nuestra Señora del
Rosario

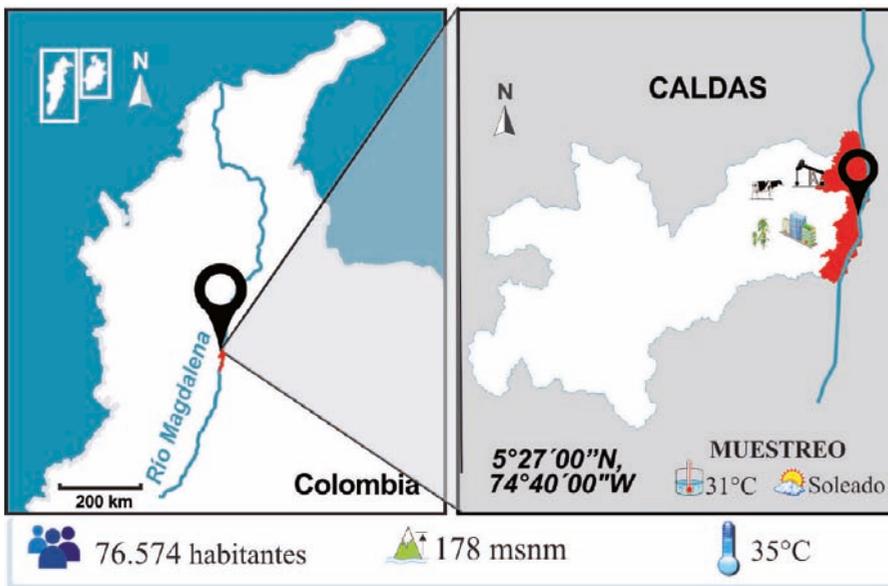


Puente Luis Ignacio
Andrade sobre el Río
Magdalena



Sitio de Muestreo

Cuadro 5. Reseña del municipio de Honda (Tolima)



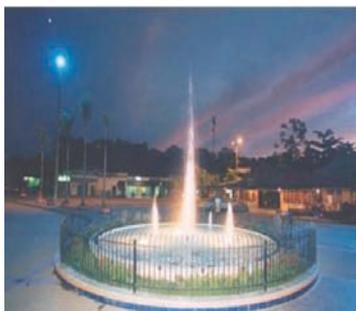
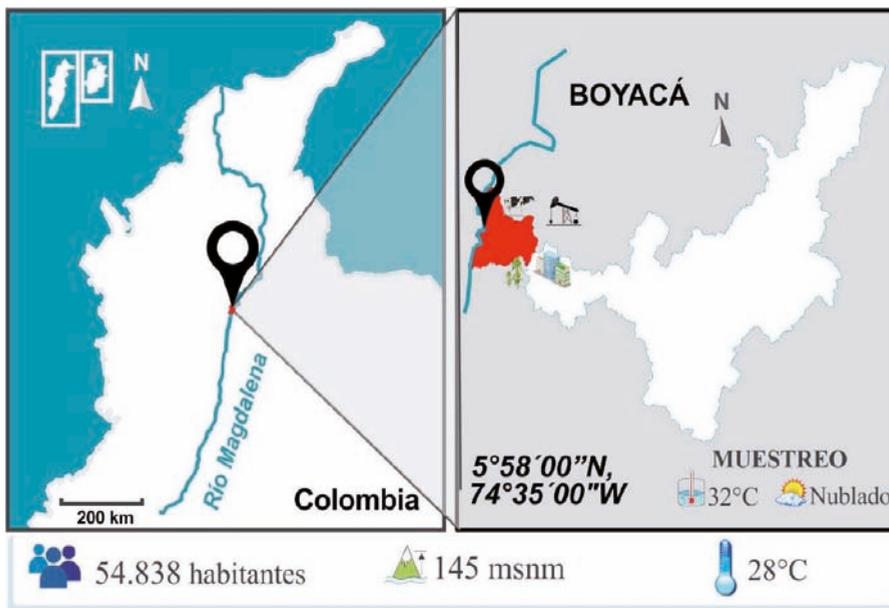
Vista de la Plaza Principal y la Iglesia Catedral Nuestra Señora del Carmen



Vista del Río Magdalena en el Muelle Turístico

Sitio de Muestreo

Cuadro 6. Reseña del municipio de La Dorada (Caldas)



Muelle Laguna de Palagua
Fuente Luminosa



Vista del Río
Magdalena

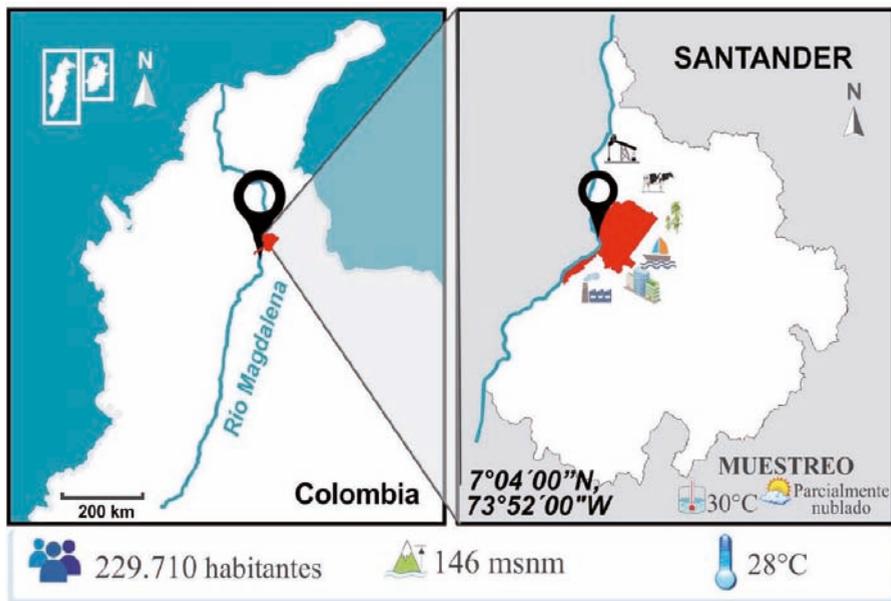


Muelle sobre el Río
Magdalena

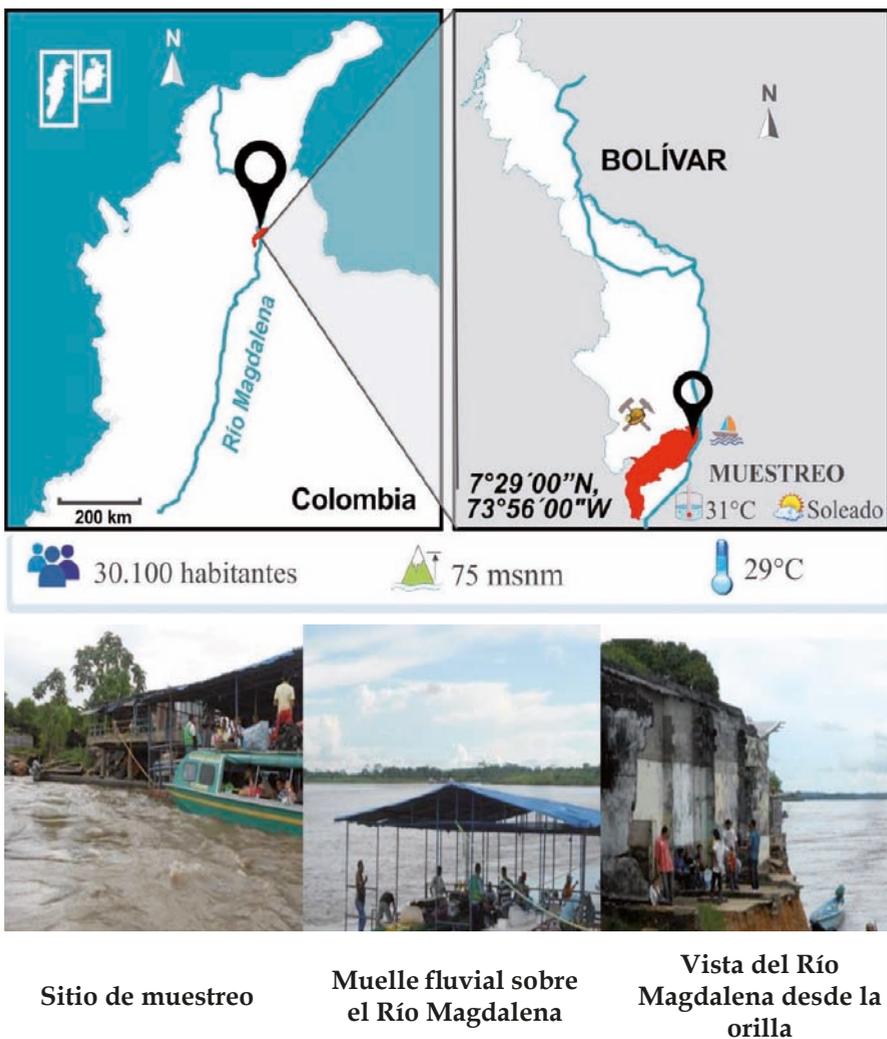
Cuadro 7. Reseña del municipio de Puerto Boyacá (Boyacá)



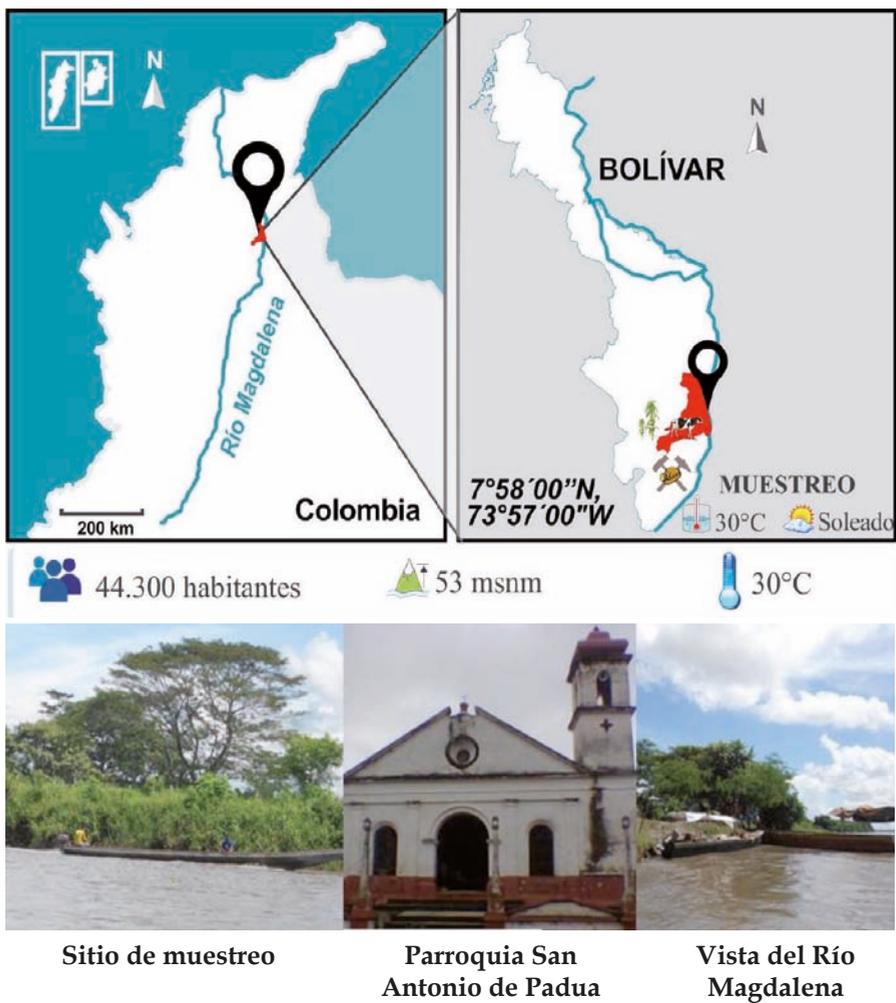
Cuadro 8. Reseña del municipio de Puerto Berrío (Antioquia)



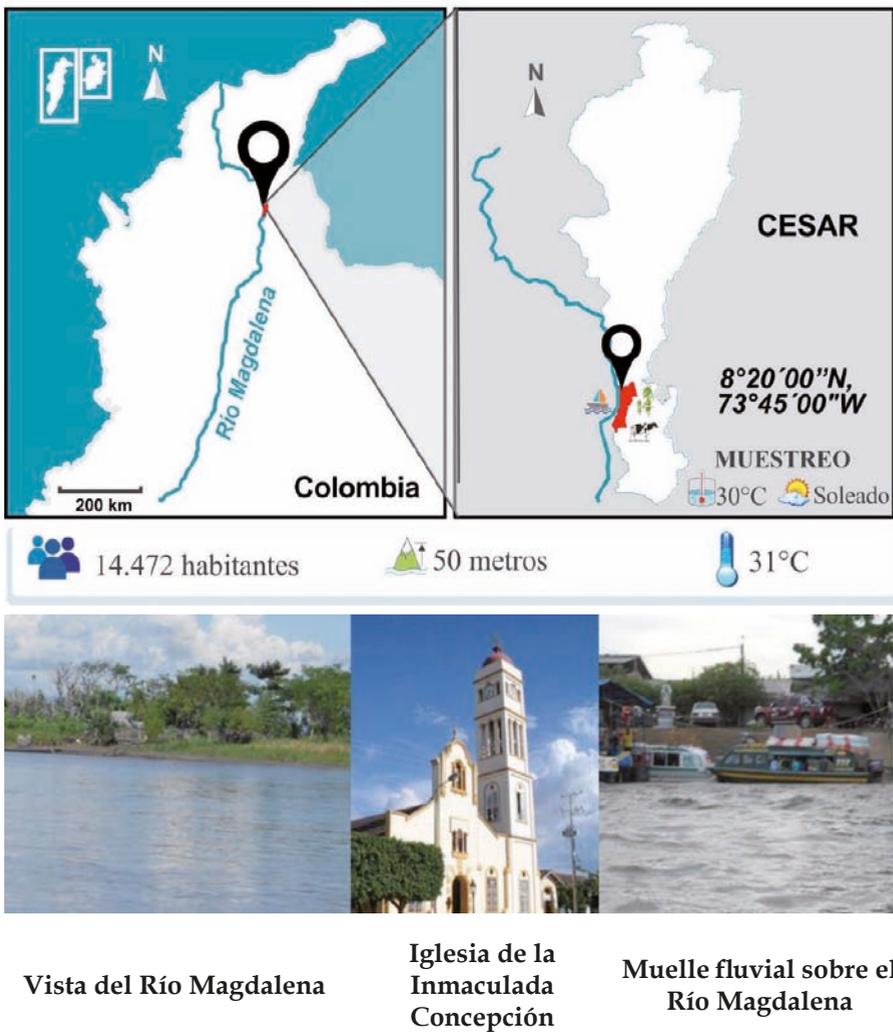
Cuadro 9. Reseña del municipio de Barrancabermeja (Santander)



Cuadro 10. Reseña del municipio de San Pablo (Bolívar)



Cuadro 11. Reseña del municipio de Simití (Bolívar)



Cuadro 12. Reseña del municipio de Gamarra (Cesar)



Cuadro 13. Reseña del municipio de Barranco de Loba (Bolívar)



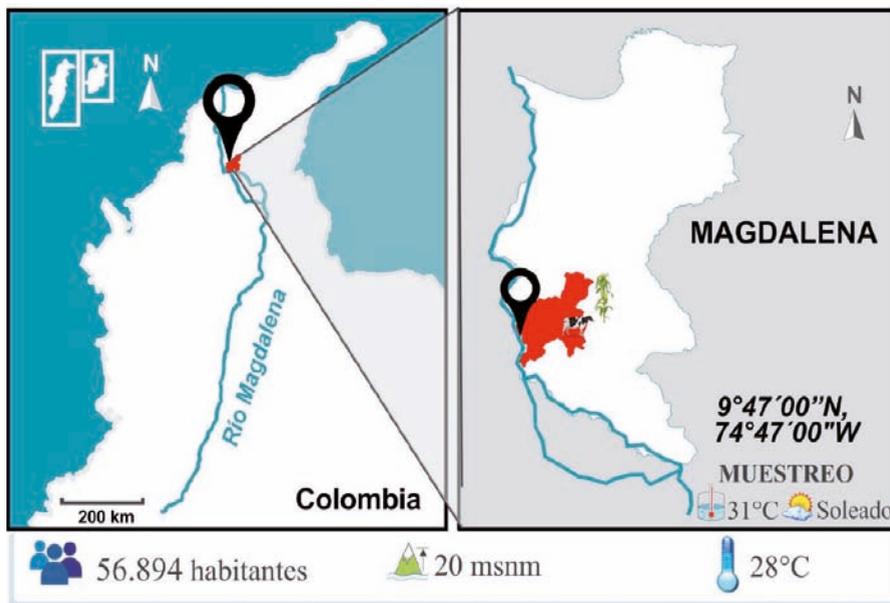
Cuadro 14. Reseña del municipio de El Banco (Magdalena)



Cuadro 15. Reseña del municipio de Mompox (Bolívar)



Cuadro 16. Reseña del municipio de Magangué (Bolívar)



Iglesia la
Inmaculada
Concepción

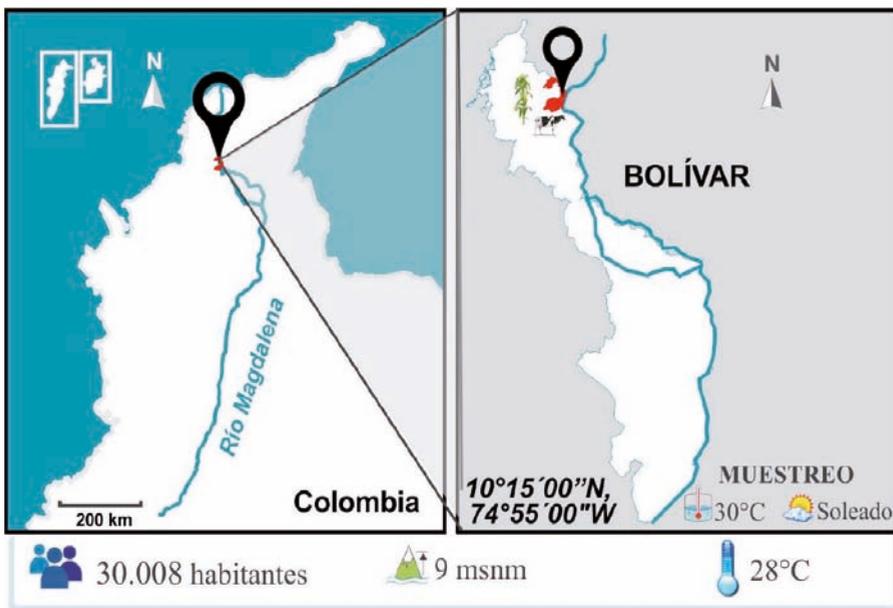


Vista del Río
Magdalena



Vista del Puente

Cuadro 17. Reseña del municipio de Plato (Magdalena)

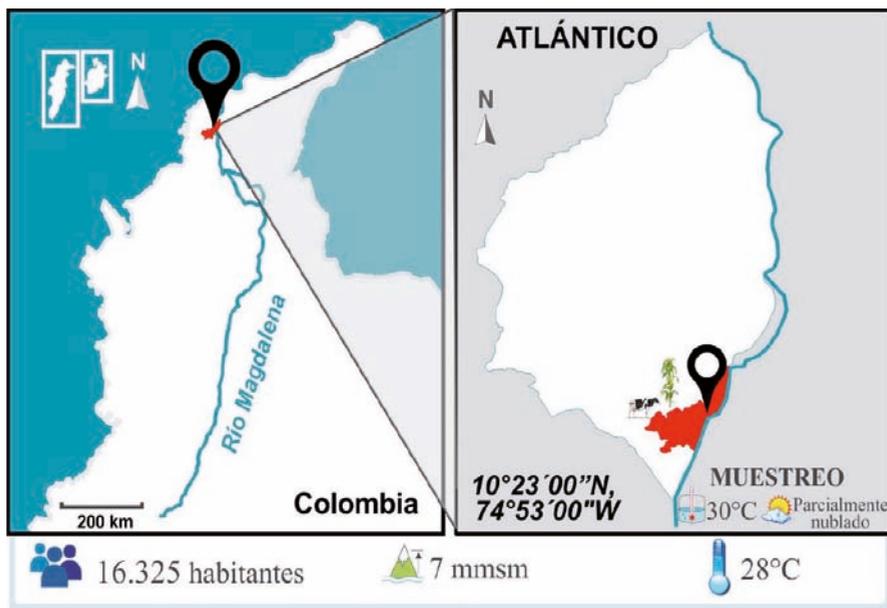


Transporte fluvial

Muelle fluvial

Vista del Río Magdalena

Cuadro 18. Reseña del municipio de Calamar (Bolívar)

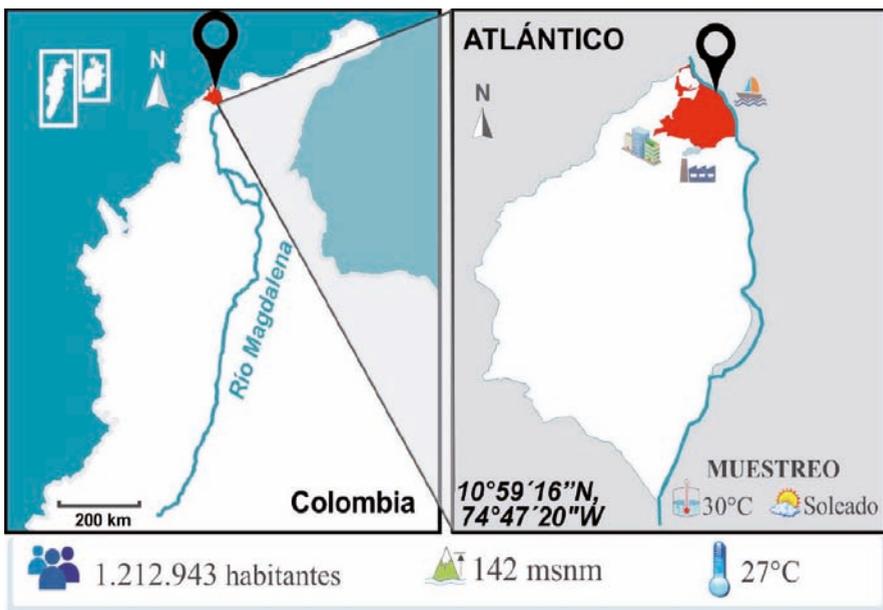


Sitio de muestreo

Parroquia San José

Vista del Río Magdalena

Cuadro 19. Reseña del municipio de Campo de la Cruz (Atlántico)



Puentes de Barranquilla

Sitio de muestreo

Vista del Puerto de Barranquilla desde el Río Magdalena

Cuadro 20. Reseña de Barraquilla (Atlántico)



5. Metodología

La metodología empleada en este trabajo describe las fases principales que fueron cubiertas para generar el perfil toxicológico del Río Magdalena.

5.1. Sedimentos

5.1.1. Preparación

Las muestras de sedimentos fueron tomadas en 20 puntos a lo largo del Río aproximadamente a 50 m de la orilla utilizando una draga Ekman. Cuatro submuestras se obtuvieron de cada sitio para obtener 1.0 kg de muestra compuesta. Todas las muestras fueron colocadas en bolsas de polietileno y ubicadas en una nevera a 4 °C, luego transportadas al laboratorio y almacenadas a -20 °C. La humedad fue eliminada mediante liofilización a -50 °C y -0.019 mbar. Los sedimentos secos fueron triturados y tamizados a < 63 µm y almacenados a -20 °C. El proceso de preparación de sedimentos es presentado en la Figura 6.



Figura 6. Preparación de sedimentos. A. Extracción. B. Liofilización. C. Sedimento liofilizado. D. Homogenización. E. Tamizaje. F. Sedimento tamizado.

5.1.2. Obtención de extractos

Para obtener el extracto líquido, 15 g de sedimento seco fueron mezclados fuertemente con 15 mL de solvente (agua ultrafiltrada para el extracto acuoso y metanol grado cromatográfico para el extracto orgánico) hasta

que el sedimento estuvo completamente mojado. Cada mezcla fue mantenida a 4 °C por 24 h (Anbalagan et al., 2012). El sedimento húmedo fue colocado en dos cilindros de jeringa de 20 mL cada uno, rellenos con lana de vidrio (Power y De Pomerai, 1999). Los cilindros fueron colocados en tubos de plástico de 50 mL y centrifugados a 4500xg durante 10 min. Entre 5 y 8 mL de extracto líquido fueron recuperados de cada muestra de sedimento después de 2 a 4 centrifugaciones. Los extractos de sedimentos de cada muestra fueron reunidos y vueltos a centrifugar a 10.000xg para eliminar cualquier sedimento restante. El extracto orgánico fue sometido a evaporación para remover el metanol, y el material resultante fue disuelto en dimetilsulfóxido y conservado en alícuotas de 1000 µL. Los extractos fueron almacenados a -80 °C. Las imágenes del proceso de obtención del extracto son mostradas en la Figura 7.



Figura 7. Obtención de extractos acuoso y metanólico. A. Cilindros de jeringa de 20 mL rellenos con fibra de vidrio. B. Mezcla del solvente (agua) y sedimentos. C. Líquido obtenido de la extracción. D. Extractos listos para su conservación.

5.1.3. Análisis de sedimentos

pH. En los sedimentos el pH es un reflejo de su composición química, la actividad bioquímica que ocurre en ellos, los contaminantes que contienen y la calidad del agua. El pH de los sedimentos liofilizados fue determinado de acuerdo con la metodología descrita en la norma ISO 10390 (1994). Brevemente, una suspensión del sedimento fue preparada con cinco veces su volumen de agua (con una conductividad específica no superior a 0.2 mS/cm y pH 7). El pH de la suspensión fue medido con un pH-metro previamente calibrado con soluciones tampón de pH = 4, 7 y 10.

Metales. El análisis de metales traza (Cr, Co, Ni, Cu, Zn, As, Sr, Ag, Cd, Ce, Gd, Pt, Pb, Th y U) fue llevado a cabo por espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (HR ICP-MS), sobre soluciones preparadas mediante digestión en ácido de muestras de sedimentos liofilizados, empleando procedimientos previamente establecidos por Soto-Jiménez et al. (2006) y Odigie y Flegal (2014). La concentración de Hg total fue determinada usando un analizador directo de Hg DMA-80 TriCell Milestone®, de acuerdo con lo reportado previamente (Olivero-Verbel et al., 2014).

Hidrocarburos aromáticos polinucleares (HAPs). Los sedimentos liofilizados fueron sometidos a extracción Soxhlet y posteriormente tratados con Na_2SO_4 anhidro y subsecuentemente extraídos con una mezcla hexano/diclorometano. El extracto fue concentrado hasta sequedad bajo presión reducida usando un rotaevaporador, y el concentrado purificado usando una columna cromatográfica empacada con multicapas de sílica gel y sílica gel acidificada. Finalmente, los HAPs fueron detectados utilizando un cromatógrafo de gases (Agilent technologies 7890A GC Systems) acoplado a un espectrómetro de masas (Agilent technologies 5975) (GC-MS), equipado con una columna HP-5MS 5% fenilmetil polisiloxano (30 m x 250 μm x 0.25 μm). Helio fue empleado como gas de arrastre a una velocidad lineal de 1 mL min^{-1} (Pointet y Milliet, 2000, Chen et al., 2012; Li et al., 2012a). Los compuestos fueron identificados y cuantificados frente a una curva de calibración de estándares para 16 HAPs prioritarios de acuerdo con la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos, USEPA (naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fenantreno, antraceno, fluoreno, fluoranteno, pireno, benzo(a)pirero, benzo(a)antraceno, criseno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo[ghi]perileno, Indeno[1,2,3-cd]pireno). Diversos parámetros de validación fueron determinados para asegurar la

calidad y confiabilidad de los resultados, tales como exactitud, precisión, linealidad, rango, límite de detección, límite de cuantificación, entre otros. Igualmente, se analizaron muestras certificadas estándares de concentración conocida para sedimento (MESS-3 y HISS-1 de la National Research Council of Canadá y SRM-1944 de NIST) (Stashenko et al., 2007).

5.2. Bioensayos

5.2.1. Nemátodos

Las cepas de *C. elegans* Bristol N2 y de *E. coli* OP50 usadas en este ensayo fueron generosos donativos del doctor Joel N. Meyer del Meyer Lab (Universidad de Duke, Estados Unidos). Las cepas transgénicas BC20342, BC20309, BC20350, BC20333, BC17553, BC20316, BC20306, BC20303, CL2070 y BC20349 fueron donadas por el doctor David De Pomerai (Universidad de Nottingham, Reino Unido). La descripción de estas cepas es presentada en la Tabla 3.

Cepa	Transgen	Característica
BC20309	<i>mtl-1::GFP</i>	Codifica para proteínas de unión a metal, metalotioneína 1.
BC20342	<i>mtl-2::GFP</i>	Codifica para proteínas de unión a metal, metalotioneína 2.
BC20350	<i>sod-1::GFP</i>	Codifica para proteínas de respuesta a estrés oxidativo, superóxido dismutasa 4.
BC20333	<i>sod-4::GFP</i>	Codifica para proteínas de respuesta a estrés oxidativo, superóxido dismutasa 1.
BC17553	<i>gpx-6::GFP</i>	Codifica para proteínas de respuesta a estrés oxidativo, glutatión peroxidasa 6.
BC20316	<i>gst-1::GFP</i>	Codifica para proteínas de respuesta a estrés por xenobióticos, glutatión-S-transferasa.
BC20306	<i>cyp-34A9::GFP</i>	Codifica para proteínas de respuesta a estrés por xenobióticos, citocromo P 34A9.
BC20303	<i>hsp-6::GFP</i>	Codifica para proteínas de respuesta a estrés por choque térmico.
CL2070	<i>hsp-16.2::GFP</i>	Codifica para proteínas de respuesta a estrés por choque térmico.
BC20349	<i>hsp-70::GFP</i>	Codifica para proteínas de respuesta a estrés por choque térmico.

Tabla 3. Cepas transgénicas usadas en los bioensayos de expresión de fluorescencia.

5.2.2. Mantenimiento y sincronización

Las cepas de *C. elegans* fueron mantenidas en platos Petri en agar K, el cual es preparado con KCl, NaCl, agar, peptona, colesterol, nistatina, CaCl₂ y MgSO₄. Los medios fueron inoculados con *E. coli* OP50 como alimento y mantenidos a 20 °C (Figura 8). Para la sincronización, los nemátodos fueron tratados por diez minutos con solución blanqueadora con NaClO y NaOH, la cual oxida cualquier organismo presente, quedando solamente los huevos, los cuales gracias a su envoltura, resisten estas condiciones de oxidación. Aproximadamente 14 h después los huevos eclosionaron, de manera que todas las larvas se encontraban en estado L1 (Williams y Dusenbery, 1990).

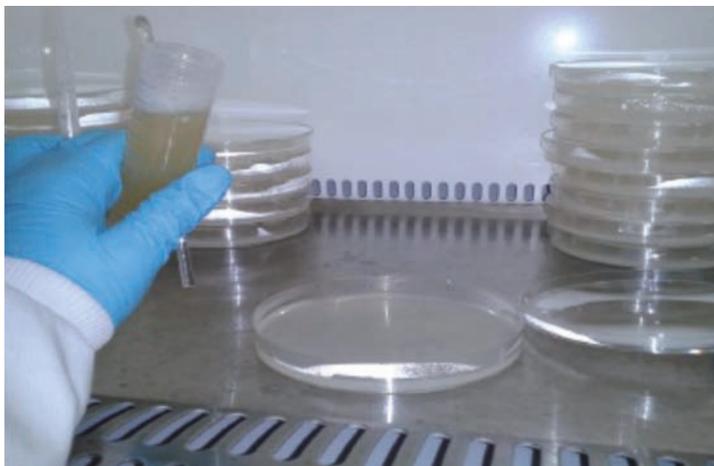


Figura 8. Preparación de nemátodos.

5.2.3. Mortalidad

Los nemátodos fueron cultivados en placas de agar K y lavados usando medio K. 10±1 gusanos N2 sincronizados en edad larval L4 fueron colocados en microplacas de 96 pozos junto al extracto total y una dilución al 50% en agua ultrafiltrada. Cuatro réplicas fueron realizadas para cada tratamiento. Agua ultrafiltrada fue utilizada como control. Las placas se incubaron a 20 °C, y el número de organismos muertos y vivos fue contado a las 24 h bajo observación en un microscopio de disección. Cada ensayo fue realizado por triplicado (Williams y Dusenbery, 1990).

5.2.4. Locomoción

Aproximadamente 30 gusanos fueron usados por tratamiento. A las 24 h de la exposición al extracto total y a la dilución al 50%, se contó el número de curvamientos del cuerpo de cada nemátodo en un período de 20 segundos. Este curvamiento es observado como un cambio en la dirección de la vulva superior de la faringe a lo largo del eje Y, suponiendo que los nemátodos se desplazan a lo largo del eje X (Li et al., 2012a; Matsuura et al., 2013; Rui et al., 2013; Wu et al., 2012a; Wu et al., 2013; Yu et al., 2013a; b; Zhuang et al., 2014).

5.2.5. Crecimiento

Aproximadamente 500 larvas de la cepa silvestre Bristol N2 en edad larval L1 fueron expuestas al extracto total y a la dilución al 50%. En placas de cultivo celular de 96 platos fueron inoculados los gusanos realizando cuatro réplicas por tratamiento. Como fuente de alimento fue adicionada *E. coli* OP50. La longitud de los nemátodos 48 h después de la exposición fue medida usando el microscopio de disección Nikon smz 745T con un aumento de 100X y el software ImageJ. Tres repeticiones del experimento fueron realizadas (Hu et al., 2008; Arnold et al., 2013).

5.2.6. Ensayos con reporteros empleando la proteína verde fluorescente (GFP)

Los nemátodos se cultivaron en placas de agar NGM y luego fueron lavados usando medio K enfriado con hielo (53 mM NaCl, 32 mM KCl; Anbalagan et al., 2013). Alícuotas iguales (10 μ L) de gusanos en todas las etapas de cada cepa reportera fueron colocadas en microplacas negras de 96 pozos, no fluorescentes de fondo en U junto con las muestras de extractos y agua ultrafiltrada como control y cuatro réplicas para cada tratamiento. Para mantener igual concentración de gusanos fue empleado un agitador magnético para mantener una mezcla homogénea de nemátodos. Las placas se incubaron a 20 °C, y las lecturas se realizaron a las 4 y 24 h. Después de reposar en hielo durante 15 minutos, la fluorescencia fue cuantificada mediante el uso de un lector de placas Perkin-Elmer Victor 1420, usando filtros de paso de banda a 485 y 525 nm para la excitación y emisión, respectivamente (Anbalagan et al., 2013).

5.3. Análisis estadístico

Los datos se presentan como media \pm error estándar. La normalidad y la homogeneidad de varianza fueron verificadas mediante el test de Kolmogorov-Smirnov y la prueba de Bartlett, respectivamente. Las diferencias significativas se determinaron con ANOVA, usando la prueba de Dunnett como post-test, para comparar cada muestra con el control. Las correlaciones de Spearman se utilizaron para evaluar las asociaciones entre las variables químicas y biológicas. Para analizar las relaciones entre las variables y estaciones de muestreo se usaron métodos multivariados. Inicialmente, el Análisis de Componentes Principales (ACP) fue utilizado para detectar posibles patrones significativos de distribución de los metales. Seguido del análisis individual de conglomerados (cluster), que se realizó utilizando el método Ward's para identificar las interrelaciones entre los sitios investigados en función del contenido de metales y HAPs en los sedimentos, siendo la distancia de unión reportada como $D_{\text{link}}/D_{\text{max}}$, una relación entre la distancia de articulación para un caso específico (D_{link}) dividido por la distancia máxima (D_{max}) multiplicado por 100. En este caso, el último de ellos fue utilizado para la interpretación. Para todos los efectos estadísticos, el criterio de significación se fijó en $P < 0.05$.

En el Río Magdalena, la toxicidad en *C. elegans* fue estudiada a través de la caracterización de metales e HAPs y del estudio de parámetros relacionados con la fisiología del nemátodo, incluyendo variables tales como mortalidad, locomoción y crecimiento. De igual forma, fueron evaluadas las alteraciones en la expresión de genes de respuesta al estrés en cepas transgénicas del nemátodo, usando dos tipos de extractos, uno acuoso y el segundo metanólico, con el fin de extraer compuestos solubles e insolubles en agua.



6. Resultados

6.1. Caracterización de sedimentos

6.1.1. pH

Los datos de pH determinados a cada muestra de sedimentos liofilizados de acuerdo con la metodología descrita en la norma ISO 10390 (1994) se encuentran en la Tabla 4. Se pudo comprobar que el pH de las muestras es prevalentemente básico, siendo más alto en Natagaima, Girardot, La Dorada, Puerto Berrío, El Banco y Magangué. Estas son áreas de desarrollo agrícola, y el valor alcalino del pH se puede atribuir al uso de fertilizantes nitrogenados que en su proceso de degradación forman compuestos de nitrógeno amoniacal.

Muestra	pH	Muestra	pH
Garzón	8.29	Simití	8.09
Neiva	7.66	Gamarra	8.03
Natagaima	8.66	Barranco de Loba	8.46
Girardot	8.52	El Banco	8.57
Honda	8.43	Mompox	8.40
La Dorada	8.64	Magangué	8.69
Puerto Boyacá	8.55	Plato	7.51
Puerto Berrío	8.90	Calamar	7.83
Barrancabermeja	8.06	Campo de la Cruz	7.80
San Pablo	7.55	Barranquilla	7.90

Tabla 4. pH de muestras de sedimentos

6.1.2. Metales

El resultado del contenido de metales en las muestras se presenta en la Tabla 5. La media de las concentraciones de MPs fueron en mg kg⁻¹: Zn (81.31) > Sr (44.45) > Cr (39.46) > Cu (35.64) > Ce (27.84) > Ni (16.97) > Pb (12.05) > Th (10.91) > Co (6.83) > U (5.34) > As (5.30) > Gd (2.72) > Cd (1.35) > Ag (0.32) > Hg (0.04) > Pt (0.02). Los estudios realizados en el Río Magdalena han informado de niveles similares de Zn (7.06 a 220.64 mg kg⁻¹), menor contenido de Cu (0.43 a 50.69 mg kg⁻¹), similar en Ni (6.94 a 32.5 mg

kg⁻¹), mayores rangos de niveles de Pb (0 - 46.9 mg kg⁻¹), comparables en Cd (2.44 - 4.47 mg kg⁻¹) y los valores semejantes en Hg (0.05 - 0.07 mg kg⁻¹) (Ideam, 2008; Tovar y Tous, 1989; Espinosa, 1996; Gómez et al., 1993).

Con relación al contenido total de MPs, estos resultados se pueden comparar con los obtenidos en el estudio de tres ríos alemanes. Ellos reportaron valores entre 826 y 1619 mg kg⁻¹ en el Río Elba, entre 151 y 1271 mg kg⁻¹ en el Río Scheldt y entre 491 y 576 mg kg⁻¹ en el Río Llobregat (Tuikka et al., 2011).

El alto contenido de Cd fue notable en San Pablo y Gamarra; Co en Neiva y Campo de la Cruz; así como Cu en Puerto Boyacá; Ni en Gamarra y Campo de la Cruz; Pb en Neiva y Gamarra; Hg en Barranquilla; y Zn en Neiva y San Pablo. Los mayores contenidos de Cr fueron encontrados en Calamar y Campo de la Cruz; As en San Pablo y Gamarra; Sr en Girardot, Plato y Calamar; Ag en Honda; Ce en Natagaima y Girardot; Gd en Girardot; Pt en Honda; Th en Girardot; y U en Natagaima.

Muestra	Cr	Co	Ni	Cu	Zn	As	Sr	Ag	Cd	Ce	Gd	Pt	Hg	Pb	Th	U	Total
Garzón	18.54	5.97	9.02	17.39	54.55	2.46	24.76	0.35	0.23	40.40	3.25	0.00	0.01	15.88	13.67	3.97	210.45
Neiva	14.62	13.15	22.00	38.17	118.15	2.14	28.33	0.34	0.30	16.62	1.78	0.00	0.05	18.05	4.89	3.86	282.45
Natagaima	32.44	7.16	10.54	21.32	48.34	3.24	45.80	0.16	0.22	64.43	3.58	0.00	0.02	10.18	9.83	10.75	268.01
Girardot	64.65	5.13	8.94	74.54	43.67	2.76	91.61	0.35	0.28	80.57	5.63	0.00	0.01	6.28	17.96	4.90	407.28
Honda	28.30	4.43	8.89	15.40	35.97	4.66	27.00	0.59	0.30	20.28	1.85	0.35	0.01	4.26	4.68	3.43	160.40
La Dorada	17.26	5.56	9.79	12.49	43.22	2.60	20.54	0.31	0.25	16.32	1.97	0.00	0.03	5.42	4.38	4.83	144.97
Puerto Boyacá	26.40	6.35	11.82	211.48	94.17	4.92	21.83	0.33	0.16	35.03	1.67	0.00	0.04	12.06	8.87	5.37	440.50
Puerto Berrío	25.36	5.44	12.76	13.15	71.02	3.66	46.64	0.15	1.41	21.20	1.97	0.00	0.01	7.83	5.01	5.98	221.59
Barrancabermeja	21.62	5.09	19.07	12.67	99.35	6.67	60.98	0.35	2.25	11.71	2.65	0.00	0.01	14.59	13.88	5.16	276.05
San Pablo	33.09	6.92	21.68	32.66	107.54	8.91	35.61	0.42	3.42	27.33	3.22	0.00	0.01	16.08	15.26	6.55	318.70
Simítí	17.30	5.63	16.26	12.45	89.96	4.71	24.83	0.19	1.87	21.51	2.41	0.00	0.03	10.46	9.39	5.41	222.41
Gamarra	38.26	7.03	23.90	29.16	131.83	9.51	50.16	0.45	4.05	26.46	3.45	0.00	0.06	18.04	16.20	7.22	365.78
Barranco de Loba	20.90	4.73	12.63	14.47	80.23	4.37	28.58	0.35	1.32	18.31	2.01	0.00	0.02	11.56	12.52	5.12	217.12
El Banco	21.56	6.22	18.99	16.42	105.54	5.81	24.86	0.18	2.19	16.10	2.50	0.00	0.06	11.45	9.55	4.88	246.31
Mompox	34.07	6.25	19.17	21.42	103.18	6.90	44.15	0.19	2.40	20.96	2.78	0.00	0.02	14.16	13.48	5.97	295.10
Magangué	24.94	7.29	19.21	16.64	61.66	4.87	27.01	0.31	0.84	14.56	1.74	0.01	0.04	10.63	6.69	2.80	199.24
Plato	43.75	7.30	17.79	26.18	71.54	5.99	93.86	0.39	0.57	23.35	3.25	0.00	0.04	12.85	11.05	4.34	322.25
Calamar	165.00*	7.31	21.42	38.31	79.22	6.90	114.00	0.18	1.44	23.56	2.37	0.00	0.05	11.30	11.08	5.12	487.26
Campo de la Cruz	95.06	10.16	28.80	56.13	88.00	7.16	45.10	0.38	1.46	33.01	3.14	0.00	0.07	13.10	12.60	5.36	399.53
Barranquilla	46.14	9.48	26.77	32.31	98.98	7.70	33.38	0.40	2.02	25.15	3.24	0.00	0.12	16.80	17.26	5.73	325.48
Promedio	39.46	6.83	16.97	35.64	81.31	5.30	44.45	0.32	1.35	27.84	2.72	0.02	0.04	12.05	10.91	5.34	290.54
Valor mínimo	14.62	4.43	8.89	12.45	35.97	2.14	20.54	0.15	0.16	11.71	1.67	0.00	0.01	4.26	4.38	2.80	144.97
Valor máximo	165.00	13.15	28.80	211.48	131.83	9.51	114.00	0.59	4.05	80.57	5.63	0.35	0.12	18.05	17.96	10.75	487.26

*. Valores mayores que el promedio más 1.5 desviaciones estándar aparecen en negrita.

Tabla 5. Análisis de metales en las muestras de sedimentos, µg/g de peso seco.

Los valores de Sr, Ce, Gd y Th se encuentran dentro del rango reportado para sedimentos de ríos del mundo (Bayon et al., 2015).

6.1.3. Hidrocarburos aromáticos polinucleares

Los resultados del contenido de HAPs se evidencian en la Tabla 6. Las muestras más representativas de contaminación con estos hidrocarburos fueron Neiva, Magangué y Barranquilla, caracterizadas por la explotación de crudos (Neiva), transporte a través del ferry (Magangué) y la heterogénea actividad industrial y portuaria (Barranquilla). Estos resultados se pueden comparar con los obtenidos en los sedimentos de los Ríos Scheldt (entre 0.5 y 3.0 $\mu\text{g/g}$) y Llobregat (0.1 $\mu\text{g/g}$) en Alemania (Tuikka et al., 2011).

Muestra	HAP* ($\mu\text{g/g}$)	Muestra	HAP* ($\mu\text{g/g}$)
Garzón	0.00	Simití	0.01
Neiva	0.13	Gamarra	0.02
Natagaima	0.06	Barranco de Loba	0.00
Girardot	0.03	El Banco	0.03
Honda	0.04	Mompox	0.05
La Dorada	0.00	Magangué	0.41
Puerto Boyacá	0.00	Plato	0.03
Puerto Berrío	0.00	Calamar	0.00
Barrancabermeja	0.03	Campo de la Cruz	0.01
San Pablo	0.00	Barranquilla	0.08

Tabla 6. Análisis de hidrocarburos aromáticos polinucleares en las muestras de sedimentos

6.2. Riesgo toxicológico de sedimentos

TEC y PEC. MacDonald y Ingersoll (2002) desarrollaron una guía basada en consenso para valores de Concentración de Efecto Límite (TEC) y Concentración de Efecto Probable (PEC) para sedimentos de agua fresca. El TEC identifica concentraciones por debajo de los cuales es raro que ocurran efectos dañinos en animales bentónicos. Por su parte, el PEC identifica la concentración por encima de la cual, efectos en organismos bentónicos aparecen con frecuencia.

Estos valores son presentados en la Tabla 7

Metales ($\mu\text{g/g}$)	TEC	PEC
Arsénico	9.79	33.0
Cadmio	0.99	4.98
Cromo	43.4	111
Cobre	31.6	149
Plomo	35.8	128
Mercurio	0.18	1.06
Níquel	22.7	48.6
Zinc	121	459
HAP totales	1.61	22.8

Tabla 7. Valores TEC y PEC (MacDonald y Ingersoll, 2002)

Un esquema en el cual se observan las estaciones que sobrepasan los valores de TEC y PEC para As, Cd, Cr, Cu, Pb, Hg, Ni, Zn e HAPs totales se presenta en la Figura 9. En relación con los valores obtenidos para Cd, las muestras recolectadas en Puerto Berrio, Barrancabermeja, San Pablo, Simití, Gamarra, Barranco de Loba, El Banco, Mompo, Calamar, Campo de la Cruz y Barranquilla están por encima del TEC, y entre estas muestras, San Pablo y Gamarra se destacan por estar también por encima del PEC., indicando que es probable que ocurran efectos adversos. Con respecto al Cr, los sedimentos de Girardot, Calamar, Campo de la Cruz, Plato y Barranquilla

estuvieron sobre el TEC, y Calamar, también sobre el PEC. Con relación al Cu, Neiva, Girardot, Puerto Boyacá, San Pablo, Calamar, Campo de la Cruz y Barranquilla estuvieron por encima del TEC, y Puerto Boyacá de igual forma, sobre el PEC. De acuerdo con el contenido de Ni, Gamarra, Campo de la Cruz y Barranquilla sobrepasaron el TEC, y las dos últimas, también sobrepasaron el valor de PEC. La concentración de Zn estuvo sobre el PEC en Gamarra. En contraste, las concentraciones de As, Pb, Hg e HAPs estuvieron por debajo del TEC en todas las estaciones de muestreo, mostrando que estas sustancias no estarían involucradas en la aparición de efectos adversos en los organismos. En conclusión, de acuerdo con los valores de TEC y PEC, metales como Cr, Cd, Cu y Ni podrían estar relacionados con efectos biológicos adversos en organismos vivos en Gamarra, Calamar, Campo de la Cruz y Barranquilla, en las cuales más de dos metales estuvieron por encima del TEC, y al menos uno por encima del PEC.

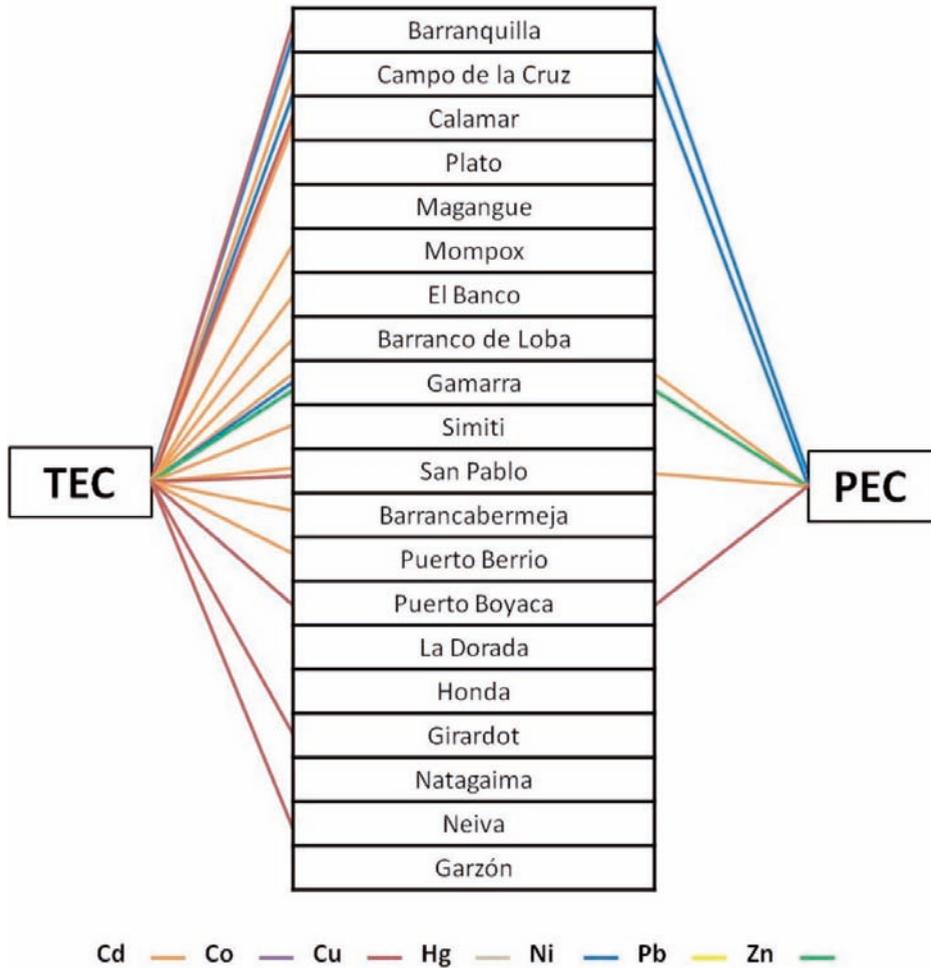


Figura 9. Sedimentos con calidad por encima de los Límites de Referencia TEC y PEC. Los elementos presentados son los que tienen valores reportados de TEC y PEC.

6.2.1. Factor de contaminación

El nivel de contaminación de un sedimento con relación al contenido de metales, puede ser expresado por el factor de contaminación (f_i), calculado como el cociente entre la concentración de cada metal en el sedimento (C_i) y el valor de referencia (C_b). Debido a la carencia de valores de referencia en las áreas estudiadas, el valor promedio de la concentración del metal registrado en la corteza terrestre es usualmente empleado como valor de fondo (Lide, 2015).

$$f_i = \frac{C_i}{C_b} \quad (\text{Ecuación 1})$$

$f_i < 1$ indica que no hay contaminación; $1 < f_i < 3$ refleja contaminación moderada; $3 < f_i < 6$ corresponde a considerable contaminación, y $f_i > 6$ es una medida de muy alta contaminación (Hakanson, 1980).

Los valores de f_i para los sedimentos del Río Magdalena se muestran en la Tabla 8, donde las celdas en verde representan contaminación nula; en amarillo, contaminación moderada; en naranja, contaminación considerable; y en rojo, muy alta contaminación. De acuerdo con f_i , el Cd contribuye a generar una contaminación muy alta en 11 sitios de muestreo localizados entre Puerto Berrío y Barranquilla, considerable contaminación en dos sitios (Magangué y Plato), y moderada contaminación en siete sitios entre Garzón y Puerto Boyacá. Teniendo en cuenta los valores de f_i para Ag, Honda presentó muy alta contaminación, 13 sitios presentaron contaminación considerable, y seis sitios moderada. Con respecto al Pt, Honda está muy contaminado y Magangué moderadamente. Los valores para As y U muestran siete sitios con considerable contaminación y 13 con moderada. Con relación a Cu, Puerto Boyacá presentó fuerte contaminación, y Girardot moderada. En cuanto al Pb y el Th, 16 muestras tuvieron contaminación moderada, y de acuerdo con Zn, 12 estaciones tenían esa misma condición. Por otro lado, Campo de la Cruz y Barranquilla mostraron contaminación moderada con respecto al Hg y Natagaima y Girardot con relación al Ce, y sólo Girardot con el Gd. Finalmente, en referencia a Co, Ni y Sr, no hubo contaminación en ninguna muestra.

6.2.2. Índice de Carga de Contaminación

El término Índice de Carga de Contaminación (*PLI*) fue introducido por Priju y Narayana (2006). Éste índice representa el número de veces que la concentración de un metal pesado excede la concentración de fondo. Para un sitio de muestreo, *PLI* es:

$$PLI = \sqrt[n]{\prod f_i} \quad (\text{Ecuación 2})$$

Donde n es el número de metales. Si $PLI > 1$, hay contaminación con metales (Harikumar et al., 2009; Chandrasekaran et al., 2015). El *PLI* calculado para cada muestra es presentado en la Tabla 8. De acuerdo con este índice, sólo Gamarra, Campo de la Cruz y Barranquilla presentan contaminación muy alta por metales.

6.2.3. Índice de Riesgo Ecológico Potencial

El Índice de Riesgo Ecológico Potencial (*RI*), desarrollado por Hakanson (1980), es usado para evaluar el nivel de contaminación con MPs en sedimentos de acuerdo con su toxicidad y a la respuesta del ambiente. *RI* puede ser calculado como:

$$RI = \sum E_i = \sum T_i f_i = \sum T_i \frac{C_i}{C_b} \quad (\text{Ecuación 3})$$

Donde E_i es el coeficiente del riesgo ecológico potencial de cada metal; T_i es el coeficiente de toxicidad de cada metal. De acuerdo con el coeficiente de toxicidad de MPs, los valores de T_i para Hg, Cd, As, Pb, Cu, Co, Ni, Cr y Zn son 40, 30, 10, 5, 5, 5, 5, 2 y 1, respectivamente. El riesgo de contaminación con respecto al valor de *RI* y E_i para cada sitio de muestreo es presentado en la Tabla 9.

Muestra	f _i														PLI		
	Cr	Co	Ni	Cu	Zn	As	Sr	Ag	Cd	Ce	Gd	Pt	Hg	Pb		Th	U
Garzón	0.13	0.20	0.10	0.26	0.69	1.17	0.07	4.38	1.53	0.67	0.63	-	0.15	1.59	2.28	2.21	0.53
Neiva	0.10	0.44	0.24	0.56	1.50	1.02	0.08	4.25	2.00	0.28	0.34	-	0.75	1.81	0.82	2.14	0.63
Natagaima	0.23	0.24	0.12	0.31	0.61	1.54	0.13	2.00	1.47	1.07	0.69	-	0.30	1.02	1.64	5.97	0.63
Girardot	0.46	0.17	0.10	1.10	0.55	1.31	0.25	4.38	1.87	1.34	1.08	-	0.15	0.63	2.99	2.72	0.74
Honda	0.20	0.15	0.10	0.23	0.46	2.22	0.08	7.38	2.00	0.34	0.36	94.6	0.15	0.43	0.78	1.91	0.60
La Dorada	0.12	0.19	0.11	0.18	0.55	1.24	0.06	3.88	1.67	0.27	0.38	-	0.45	0.54	0.73	2.68	0.42
Puerto Boyacá	0.19	0.21	0.13	3.11	1.19	2.34	0.06	4.13	1.07	0.58	0.32	-	0.60	1.21	1.48	2.98	0.70
Puerto Berrío	0.18	0.18	0.14	0.19	0.90	1.74	0.13	1.88	9.40	0.35	0.38	-	0.15	0.78	0.84	3.32	0.53
Barrancabermeja	0.15	0.17	0.21	0.19	1.26	3.18	0.17	4.38	15.0	0.20	0.51	-	0.15	1.46	2.31	2.87	0.70
San Pablo	0.24	0.23	0.24	0.48	1.36	4.24	0.10	5.25	22.8	0.46	0.62	-	0.15	1.61	2.54	3.64	0.91
Simítí	0.12	0.19	0.18	0.18	1.14	2.24	0.07	2.38	12.5	0.36	0.46	-	0.45	1.05	1.57	3.01	0.63
Gamarra	0.27	0.23	0.27	0.43	1.67	4.53	0.14	5.63	27.0	0.44	0.66	-	0.90	1.80	2.70	4.01	1.14
Barranco de Loba	0.15	0.16	0.14	0.21	1.02	2.08	0.08	4.38	8.80	0.31	0.39	-	0.30	1.16	2.09	2.84	0.61
El Banco	0.15	0.21	0.21	0.24	1.34	2.77	0.07	2.25	14.6	0.27	0.48	-	0.90	1.15	1.59	2.71	0.71
Mompox	0.24	0.21	0.21	0.32	1.31	3.29	0.12	2.38	16.0	0.35	0.53	-	0.30	1.42	2.25	3.32	0.79
Magangú	0.18	0.24	0.21	0.24	0.78	2.32	0.08	3.88	5.60	0.24	0.33	2.70	0.60	1.06	1.12	1.56	0.63
Plato	0.31	0.24	0.20	0.39	0.91	2.85	0.26	4.88	3.80	0.39	0.63	-	0.60	1.29	1.84	2.41	0.82
Calamar	1.18	0.24	0.24	0.56	1.00	3.29	0.32	2.25	9.60	0.39	0.46	-	0.75	1.13	1.85	2.84	0.97
Campo de la Cruz	0.68	0.34	0.32	0.83	1.11	3.41	0.13	4.75	9.73	0.55	0.60	-	1.04	1.31	2.10	2.98	1.10
Barranquilla	0.33	0.32	0.30	0.48	1.25	3.67	0.09	5.00	13.5	0.42	0.62	-	1.79	1.68	2.88	3.18	1.08

Verde = No hay contaminación; Amarillo = Contaminación moderada; Naranja = Considerable contaminación; Rojo = Muy alta contaminación

Tabla 8. Factor de contaminación e Índice de Carga de Contaminación

E_i	RI	Nivel de Contaminación
< 30	< 50	No contaminado
30 - 60	50 -100	Moderadamente contaminado
60 - 120	100 - 200	Fuertemente contaminado
120 - 240	200 - 400	Muy fuertemente contaminado
> 240	> 400	Extremadamente contaminado

Tabla 9. Riesgo ecológico potencial de metales pesados (adaptado de Song et al., 2015).

Estos valores fueron usados para evaluar el riesgo toxicológico de los sedimentos del Río Magdalena, como puede apreciarse en la Tabla 10. El Cd fue el principal contribuyente al alto riesgo toxicológico que existe en la zona baja del Río, iniciando en Puerto Berrío. El As también contribuyó con una moderada contaminación aguas abajo de Barrancabermeja; y de igual forma el Hg, que hace su entrada moderada en Gamarra, cerca de las áreas de minería del oro, y es fuerte en Barranquilla. Estas áreas presentan varias actividades antropogénicas tales como transporte y refinación de petróleo, agricultura y minería de oro. En general, los sitios con concentrada actividad industrial se caracterizaron por un *RI* más alto, en comparación con las áreas de menor desarrollo económico.

Muestra	E_i										RI
	Cr	Co	Ni	Cu	Zn	As	Cd	Hg	Pb		
Garzón	0.26	1.00	0.50	1.28	0.69	11.7	46.0	5.97	7.94	75.4	
Neiva	0.21	2.19	1.22	2.81	1.50	10.2	60.0	29.9	9.03	117	
Natagaima	0.46	1.19	0.59	1.57	0.61	15.4	44.0	11.9	5.09	80.9	
Gitardot	0.92	0.86	0.50	5.48	0.55	13.1	56.0	5.97	3.14	86.6	
Honda	0.40	0.74	0.49	1.13	0.46	22.2	60.0	5.97	2.13	93.5	
La Dorada	0.25	0.93	0.54	0.92	0.55	12.4	50.0	17.9	2.71	86.2	
Puerto Boyacá	0.38	1.06	0.66	15.55	1.19	23.4	32.0	23.9	6.03	104	
Puerto Berrío	0.36	0.91	0.71	0.97	0.90	17.4	282	5.97	3.92	313	
Barrancabermeja	0.31	0.85	1.06	0.93	1.26	31.8	450	5.97	7.30	499	
San Pablo	0.47	1.15	1.20	2.40	1.36	42.4	684	5.97	8.04	747	
Simití	0.25	0.94	0.90	0.92	1.14	22.4	374	17.9	5.23	424	
Gamarra	0.55	1.17	1.33	2.14	1.67	45.3	810	35.8	9.02	907	
Barranco de Loba	0.30	0.79	0.70	1.06	1.02	20.8	264	11.9	5.78	306	
El Banco	0.31	1.04	1.06	1.21	1.34	27.7	438	35.8	5.73	512	
Mompox	0.49	1.04	1.07	1.58	1.31	32.9	480	11.9	7.08	537	
Magangué	0.36	1.22	1.07	1.22	0.78	23.2	168	23.9	5.32	225	
Plato	0.63	1.22	0.99	1.93	0.91	28.5	114	23.9	6.43	178	
Calamar	2.36	1.22	1.19	2.82	1.00	32.9	288	29.9	5.65	365	
Campo de la Cruz	1.36	1.69	1.60	4.13	1.11	34.1	292	41.8	6.55	384	
Barranquilla	0.66	1.58	1.49	2.38	1.25	36.7	404	71.6	8.40	528	

Azul = No contaminado; Verde = Moderadamente contaminado; Amarillo = Fuertemente contaminado; Naranja = Muy contaminado; Rojo = Extremadamente contaminado.

Tabla 10. Riesgo ecológico potencial de metales pesados en sedimentos del Río Magdalena

6.3. Ensayos de toxicidad relacionados con la biología en el extracto acuoso

6.3.1. Mortalidad

Los resultados del ensayo de mortalidad se encuentran en la Figura 10. Todas las muestras presentaron diferencias significativas con respecto al control cuando se usó el extracto completo, y nueve de ellas fueron estadísticamente diferentes al control, incluso cuando se usó la dilución al 50%, mostrando toxicidad por exposición aguda. Adicionalmente, 12 de las 20 muestras registraron significancia estadística entre los promedios de mortalidad derivada de la exposición al extracto total, con respecto a los observados para la dilución al 50%. Las muestras tomadas en La Dorada y Puerto Berrío fueron las de menor toxicidad con 7.03% y 6.30% de mortalidad, respectivamente. Por otro lado, las muestras que presentaron mayor letalidad fueron tomadas en Neiva, Girardot, Puerto Boyacá, Barrancabermeja, Gamarra y Barranquilla. Estos sitios están relacionados con algún tipo de actividad industrial en la región.

Neiva, por ejemplo, es una ciudad con una población superior a los 300.000 habitantes con ausencia de planta de tratamiento de sus aguas residuales domésticas, localizada al sur del país cerca a regiones de concentrada actividad petrolera, con inherente capacidad para aportar MPs, los cuales pueden encontrarse en el crudo (Vale et al., 2008). Precisamente, el crudo Castilla, extraído de esta región, se caracteriza por la presencia de Ni (Mogollón et al., 1998). También, la producción agrícola es elevada en esta zona, con la consecuente liberación de pesticidas a las aguas cercanas. Esta muestra presentó una mortalidad del 31.3%, una de las más altas registradas.

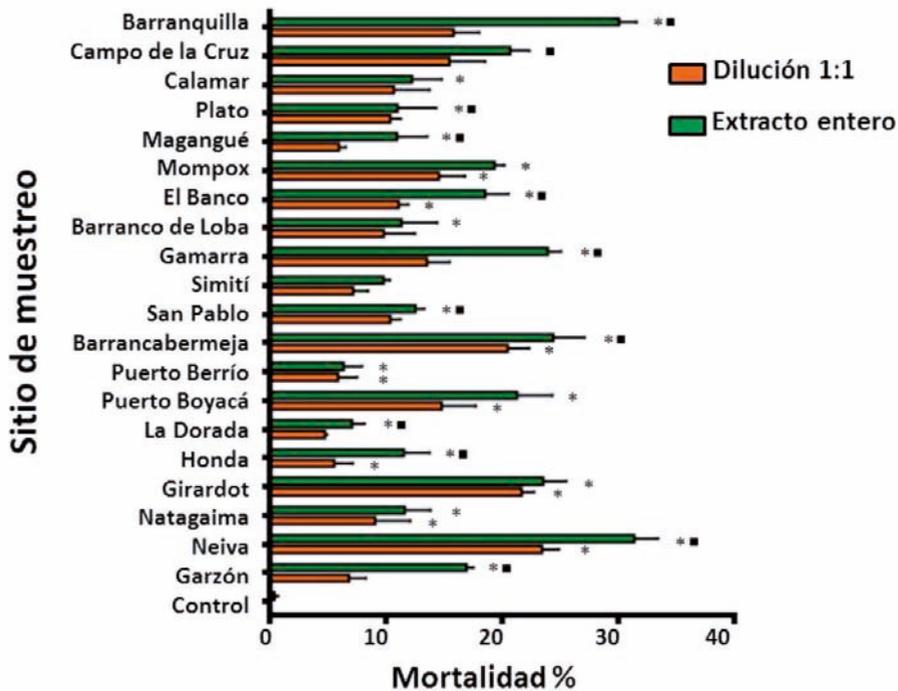


Figura 10. Mortalidad de nemátodos (*C. elegans*) expuestos a extractos acuosos de sedimentos. * Diferencias significativas con el control ($p < 0.05$). ■ Diferencia significativa entre 50 y 100% ($p < 0.05$)

Por otro lado está Girardot, población en la cual el Río Magdalena recibe las aguas del Río Bogotá, que a su vez drena las zonas rurales y suburbanas del Distrito Capital y es considerado uno de los más contaminados del país, después de haber estado expuesto durante años a varias fuentes de contaminación. Cerca del 28% de la actividad socio-económica de Colombia se genera en esta región. Más de 180 curtiembres se encuentran en la cuenca alta del Río descargando efluentes líquidos que incluyen cal, sulfatos libres, sulfuros y metales como el Cr, además de la deposición de las grasas animales, la materia orgánica y sólidos suspendidos (Rodríguez et al., 2009). Los efluentes de las curtiembres y otras industrias llegan al Río Magdalena en la ciudad de Girardot. Varias investigaciones han reporta-

do la presencia de metales como Pb y Cr en agua y organismos en el Río Bogotá (Lora y Bonilla, 2010). La mortalidad mostrada por esta muestra fue de 23.5%.

Puerto Boyacá se destaca por la actividad relacionada con el petróleo, como el paso del gasoducto Cosacol-Confurca, que ha generado contaminación de fuentes hídricas e impactos ambientales negativos en la Ciénaga Palagua. La muestra tomada en este lugar tuvo una mortalidad de 21.2%.

En Barrancabermeja se encuentra la segunda refinería de petróleo de Colombia y la planta de poliolefinas. En esta región el Río Magdalena recibe efluentes tratados y sin tratar de diferentes industrias relacionadas con la actividad petrolera, en particular el impacto del transporte de hidrocarburos, como también las deposiciones de compuestos y partículas provenientes de las chimeneas de la refinería. A pesar de que las aguas residuales de Ecopetrol son tratadas, muchos contaminantes, entre estos, metales provenientes del crudo o de los catalizadores usados en el proceso de refinación, llegan al agua del Río y tras procesos fisicoquímicos de adsorción, óxido-reducción o metilación, se incorporan a los sedimentos (Wang et al., 2014). Los efluentes de refinерías de petróleo han sido asociados con una disminución de la producción de fitoplancton y peces en los sistemas receptores debido a la acumulación de HAPs. Debido a su hidrofobicidad, algunos HAPs vertidos en las aguas residuales de petróleo son adsorbidos por las partículas y se establecen en los sedimentos aguas abajo de sus fuentes puntuales (Loughery et al., 2014). La mortalidad de esta muestra fue de 24.3%.

Gamarra posee una amplia zona dedicada a cultivos de arroz y sorgo, y genera procesos de contaminación por aguas servidas resultado de la ausencia de servicios públicos de aseo y alcantarillado, así como por la influencia del poliducto y gasoducto. Esta muestra tuvo una mortalidad de 23.9%. Finalmente, Barranquilla se encuentra en la orilla oeste del Río, tiene un Distrito Industrial y un importante puerto marítimo-fluvial (Barón et al., 2013). La industria química, petroquímica, farmacéutica, metalmecánica y agroquímica son de gran auge en esta zona estuarina que recibe la contaminación acumulada a lo largo del Río, incluyendo las descargas generadas en la misma ciudad. Esta muestra tuvo una mortalidad de 30.0%.

6.3.2. Locomoción

El comportamiento de la locomoción en *C. elegans* ha sido usado como un indicador de daño neurológico (Li et al., 2012a), como muchos pesticidas comúnmente utilizados en la agricultura son neurotóxicos, el comportamiento es usualmente empleado como punto final de toxicidad para evaluar el efecto de los pesticidas en *C. elegans* (Salim y Rajini, 2014). Los resultados de locomoción, expresados como número de curvamientos del cuerpo en 20 segundos, son presentados en la Figura 11.

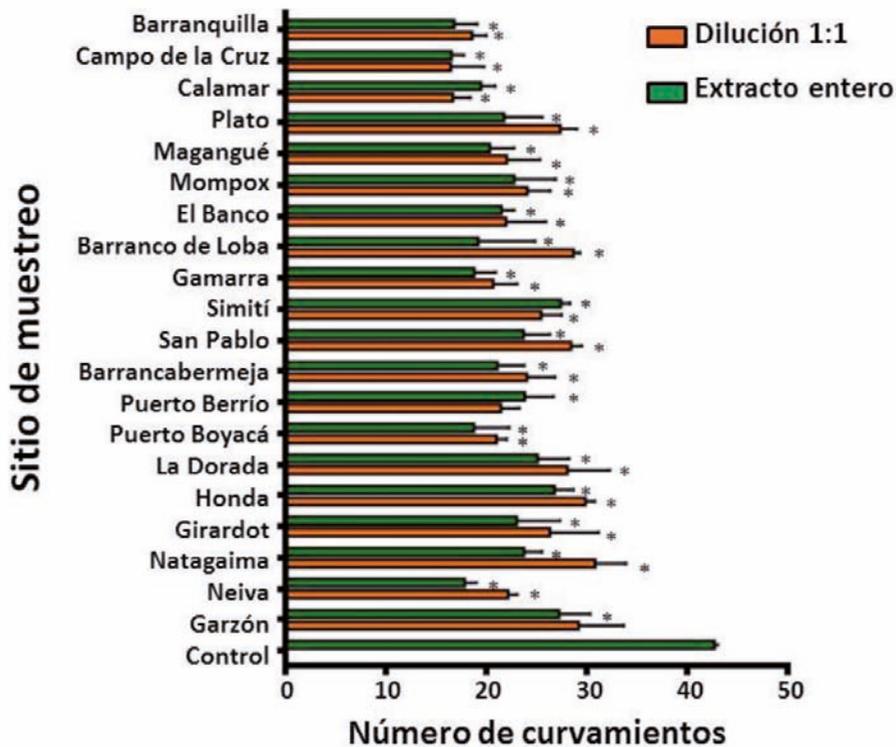


Figura 11. Locomoción de nemátodos (*C. elegans*) expuestos a extractos acuosos de sedimentos. *Diferencias significativas con el control ($p < 0.05$).

Todas las muestras evaluadas registraron diferencia estadística en comparación con el control, con excepción de la disolución al 50% del extracto de la muestra tomada en Garzón. Sin embargo, no hubo diferencias significativamente en relación con la concentración de extracto. Las muestras que más inhibieron el comportamiento de locomoción fueron tomadas en Neiva, Puerto Boyacá, Gamarra, Barranco de Loba, Calamar, Campo de la Cruz, y Barranquilla. Neiva y Barranquilla se caracterizan por la heterogeneidad de actividades económicas de las zonas y por ser capitales de departamentos; y las demás por la actividad agrícola preponderante. Por otro lado, las muestras que menos inhibieron el comportamiento de locomoción fueron tomadas en Garzón y Simití. En general, se observa una disminución en el número de curvamientos del cuerpo en dirección Sur a Norte, sugiriendo un probable proceso de acumulación en los sedimentos a lo largo del Río.

6.3.3. Crecimiento

La inhibición en el crecimiento es un indicador de toxicidad que puede ser evaluado por la longitud del cuerpo. Los promedios de la longitud del cuerpo expresada en μm son presentados en la Figura 12. De los sitios evaluados, 17 tuvieron diferencias significativas con el control cuando se expuso el extracto total, y seis con disolución al 50%. Adicionalmente, las muestras de Puerto Boyacá, Gamarra, Barranco de Loba, y Campo de la Cruz fueron estadísticamente diferentes con relación a la concentración del extracto. Las recolectadas en Garzón, Neiva, Simití, El Banco y Barranquilla generaron una significativa reducción en la longitud del cuerpo del nemátodo, con inhibiciones entre el 34 y el 38%. La muestra de Garzón, en la zona del Alto Magdalena, puede presentar aportes de la actividad agrícola, en especial de fincas cafeteras, mientras que las de Neiva y Barranquilla reciben aportes domésticos, agrícolas e industriales. En el caso de Simití y El Banco, están relacionadas con la actividad de minería de oro. Con relación al control, Natagaima y Plato fueron las que menos inhibieron el crecimiento, 6 y 8% respectivamente. En el estudio de sedimentos de tres ríos alemanes, usando *C. elegans* como modelo, la inhibición del crecimiento fue mucho más alta con valores de 80% para el Río Elba, entre 77 y 93% para el Río Scheldt y entre 47 y 72 % para el Río Llobregat (Tuikka et al., 2011).

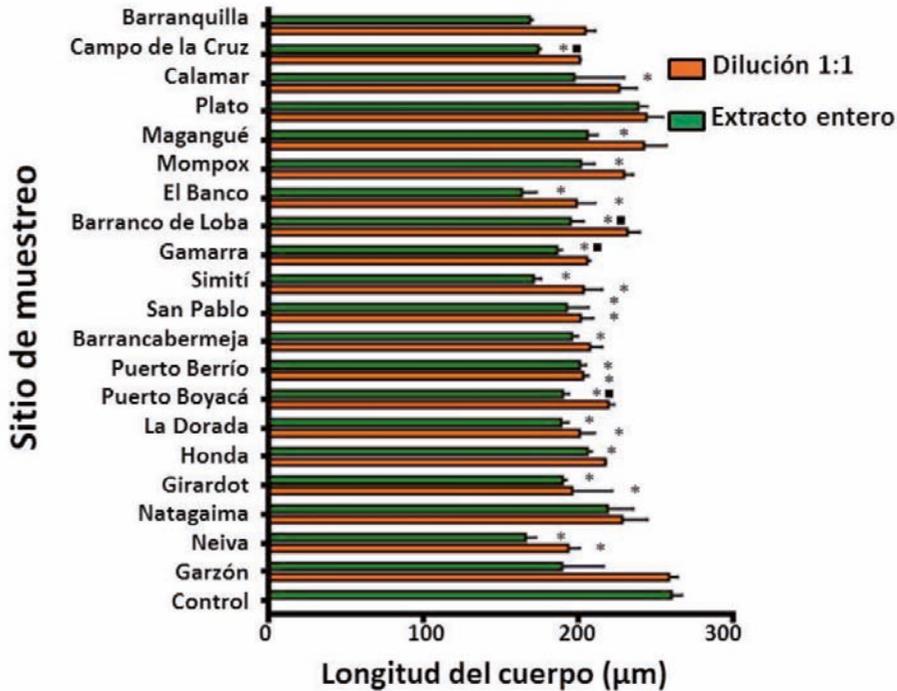


Figura 12. Crecimiento de nemátodos (*C. elegans*) expuestos a extractos acuosos de sedimentos. *. Diferencias significativas con el control ($p < 0.05$). ◻. Diferencia significativa entre 50% y 100% ($p < 0.05$).

6.4. Ensayos de toxicidad relacionados con la biología en el extracto metanólico

6.4.1. Mortalidad

Los resultados del ensayo de mortalidad son presentados en la Figura 13. De los 20 sitios, 14 tuvieron diferencias significativas en relación con el control para el extracto total y diez para la dilución al 50%. Las muestras de Girardot, Puerto Berrío, Gamarra, Barranco de Loba y Magangué presentaron diferencias estadísticamente significativas en relación con la concentración de extracto. En Girardot, Puerto Berrío, Barrancabermeja y Barranco

de Loba estuvieron las más tóxicas, con mortalidades entre 24.3 y 41.2%; destacándose Girardot por ser la más tóxica de todas, y Puerto Berrío, cuya toxicidad en el extracto acuoso fue moderada, lo cual puede deberse a la presencia de contaminantes insolubles en agua. La muestra de Barrancabermeja mantiene su condición de alta toxicidad en los dos extractos. Se observa que, Garzón, Neiva y Gamarra fueron menos tóxicas en comparación con el resultado del extracto acuoso. En contraste, las muestras de Girardot, Puerto Berrío y Barranco de Loba fueron más tóxicas para el extracto metanólico que para el acuoso.

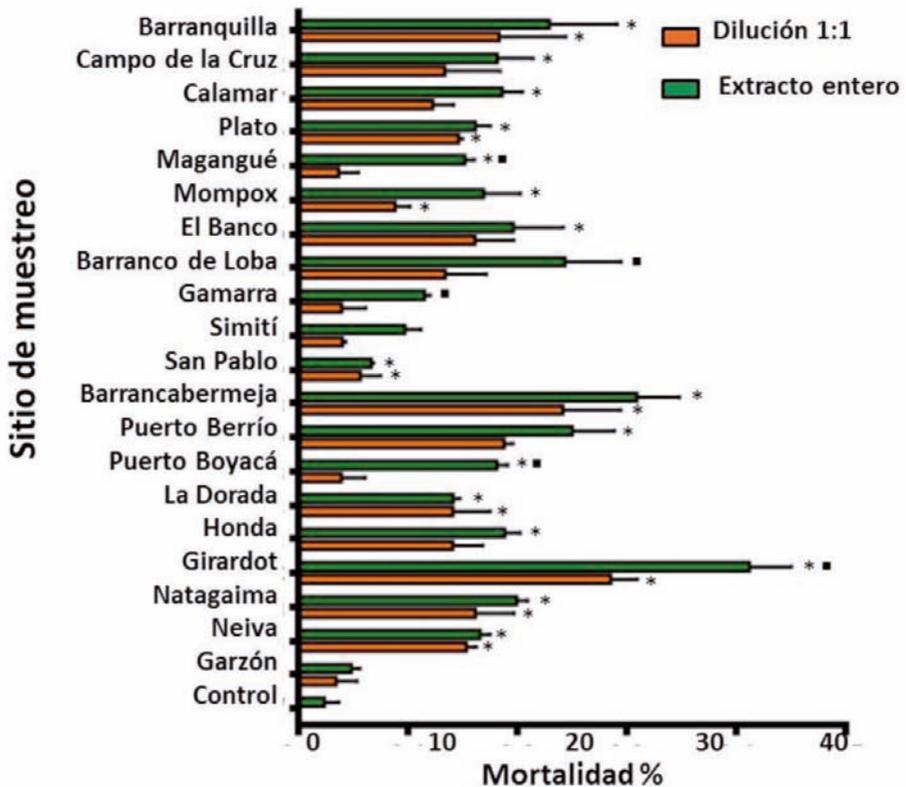


Figura 13. Mortalidad de nemátodos (*C. elegans*) expuestos a extractos metanólicos de sedimentos. *. Diferencias significativas con el control ($p < 0.05$). *. Diferencia significativa entre 50% y 100% ($p < 0.05$).

6.4.2. Locomoción

Los resultados del comportamiento de locomoción se evidencian en la Figura 14. De las 20 muestras, 18 tuvieron diferencias significativas en relación con el control para el extracto total y para la dilución al 50%. Sólo las muestras de Garzón y Natagaima no mostraron significancia con respecto al control. Ninguna de las muestras fue diferente significativamente entre las concentraciones usadas.

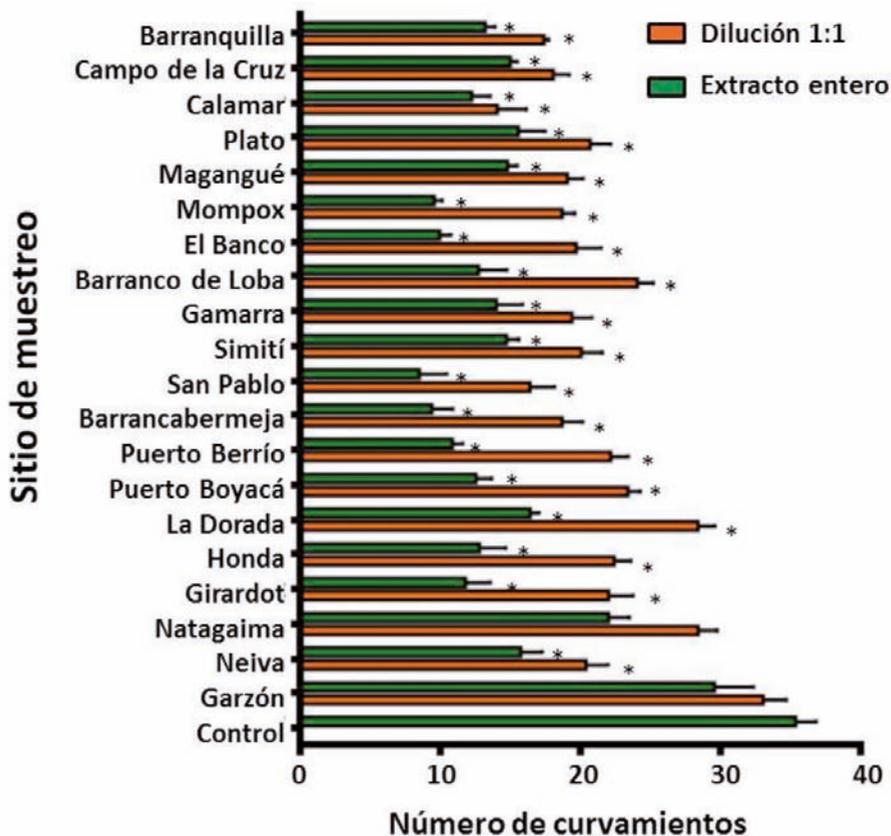


Figura 14. Locomoción de nemátodos (*C. elegans*) expuestos a extractos metanólicos de sedimentos. *.Diferencias significativas con el control ($p < 0.05$).

Las muestras más tóxicas con porcentaje de inhibición superior al 70% fueron las de Barrancabermeja, San Pablo, El Banco y Mompox, seguidas de Girardot, Honda, Puerto Boyacá, Puerto Berrío, Gamarra, Barranco de Loba, Calamar y Barranquilla con inhibiciones entre 60 y 70%. Al comparar la inhibición en la locomoción debida a los extractos metanólicos con los acuosos, se observa que en general, los extractos metanólicos inhibieron más este comportamiento, encontrándose valores incluso del 76%. Al comparar con el extracto acuoso, se observa un comportamiento similar de disminución del comportamiento de locomoción a lo largo del Río, verificando el efecto acumulativo de la toxicidad de los sedimentos.

6.4.3. Crecimiento

El comportamiento en el crecimiento es mostrado en la Figura 15. Todas las muestras fueron significativamente diferentes con respecto al control en las dos concentraciones evaluadas. Sin embargo, en relación con las concentraciones de extracto, no hubo diferencias significativas.

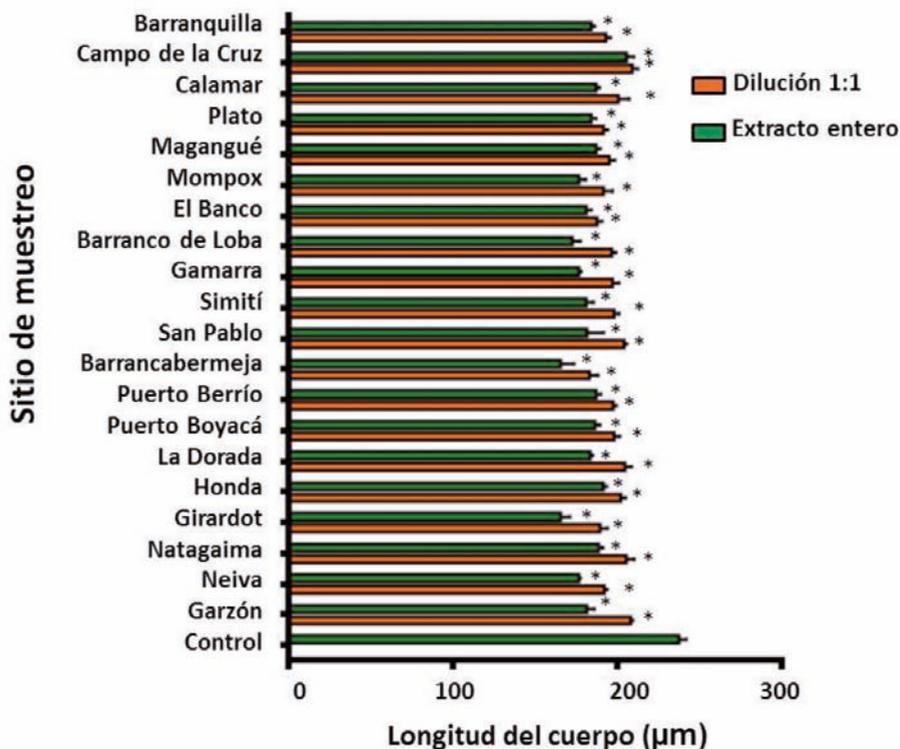


Figura 15. Crecimiento de nemátodos (*C. elegans*) expuestos a extractos metanólicos de sedimentos. *Diferencias significativas con el control ($p < 0.05$).

Las muestras que más inhibieron el crecimiento fueron tomadas en Girardot y Barrancabermeja, con un 30.4%. Honda y Plato fueron las que menos inhibieron el crecimiento, 19.4 y 13.4% respectivamente con relación al control. Al comparar con el extracto acuoso, Garzón, Neiva, Simití, El Banco, Campo de la Cruz y Barranquilla inhibieron más el crecimiento en el extracto acuoso; mientras que Natagaima, Barrancabermeja y Plato tuvieron más influencia en este comportamiento con el extracto metanólico.

6.5. Ensayos de toxicidad con marcadores gfp en el extracto acuoso

Las respuestas de genes a los extractos acuosos de los sedimentos se muestran en las Figuras 16 - 19 a las 24 h para diez genes que expresan respuesta al estrés por diversos mecanismos: unión a metales (*mtl-1* y *mtl-2*); grupo de estrés oxidativo (*sod-1*, *sod-4* y *gpx-6*), respuesta a xenobióticos (*gst-1* y *cyp-34A9*), y choque térmico (*hsp-6*, *hsp-16.2*, y *hsp-70*). Cambios en la expresión génica fueron evidenciados a través de la alta expresión de los genes *mtl-2*, *sod-4* y *gst-1*, sugiriendo que, los metales presentes inducen la respuesta a metalotioneínas, a estrés oxidativo y el metabolismo de respuesta a xenobióticos.

El gen *mtl-2* presentó la más alta relación entre la fluorescencia de la muestra y la del control. Esta cepa mostró una fluorescencia 3.4 veces la del control en la muestra tomada en Barrancabermeja, 2.5 veces en la muestra de Girardot, 2.2 veces en la muestra tomada en Barranquilla y 2.0 veces en las muestras tomadas en Neiva, Barranco de Loba y El Banco. La unión a metales a las metalotioneínas promueve la expresión del gen *mtl-2*, sugiriendo la presencia de metales en los sedimentos de estos sitios.

La cepa *sod-4* mostró alta sensibilidad (entre 2.0 y 3.0 veces la expresión del control) en las muestras tomadas en Neiva, Girardot, Puerto Berrío, Barrancabermeja y Barranquilla, sugiriendo la presencia en estos extractos de compuestos que generan la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO) activando así la expresión de genes antioxidantes como *sod-4*.

La cepa *gst-1* mostró alta respuesta en las muestras de Girardot, Barrancabermeja y Barranquilla, con expresiones entre 2.0 y 2.3 veces el control, verificando el mecanismo de respuesta a xenobióticos en estos sitios.

En general, las muestras que indujeron la respuesta más alta a las 24 horas fueron recolectadas en Neiva, Girardot, Barrancabermeja, y Barranquilla. Estos sitios se localizan en áreas de alta actividad industrial. En el caso de la muestra tomada en Neiva, cerca de regiones de concentrada actividad petrolera, la cepa *mtl-2* mostró una fluorescencia de 2.2 veces la del control y la cepa *sod-4*, 2.0 veces la del control. Por otro lado, la muestra colectada en Girardot, población en la cual el Río Magdalena recibe las aguas del Río Bogotá, incrementó la expresión de *mtl-2*, *gst-1*, *sod-4*, *cyp-34A9*, y *mtl-1* en 2.6, 2.2, 2.1, 2.1 y 2.1 veces el control respectivamente.

La muestra que más incrementó la expresión de genes de respuesta al estrés fue la muestra tomada en Barrancabermeja. La toxicidad de esta muestra en términos de la expresión de fluorescencia fue de 3.5, 2.9, 2.4, 2.3, 2.1, 2.1 y 2.0 veces el control para los genes *mtl-2*, *sod-4*, *cyp-34A9*, *gst-1*, *mtl-1*, *hsp-70* y *gpx-6*, respectivamente. Los sedimentos de Puerto Berrío y San Pablo, situados aguas arriba y aguas abajo de Barrancabermeja, y con mediana actividad relacionada con el petróleo, mostraron una fluorescencia alrededor de 2.0 veces la del control, para la cepa *mtl-2* y el gen *sod-4*, mostrando la presencia de metales y precursores de EROs.

Barranco de Loba y El Banco están ubicados en zona de minería de oro ilegal y artesanal, donde es común el uso de Hg para amalgamar el oro, por lo tanto, este metal es emitido a la atmósfera, después de ser quemado para liberarlo de la amalgama, o es vertido al agua del Río de manera directa durante el lavado de la tierra en busca del preciado metal. Una vez en el agua, puede sufrir transformaciones químicas catalizadas por bacterias convirtiéndose en metil mercurio, que por su alta hidrofobicidad tiende a depositarse en los sedimentos y compartimientos orgánicos (Marrugo et al., 2008; Olivero-Verbel et al., 2011; Cordy et al., 2011; De Miguel et al., 2014). La presencia de Hg en el sedimento es probablemente la causa de que la cepa *mtl-2* haya experimentado una expresión de fluorescencia 2.0 veces la del control durante la exposición a estos extractos.

Finalmente, la muestra recolectada en la desembocadura del Río en Barranquilla, la cuarta ciudad de Colombia, resultó en la expresión de *sod-4*, *mtl-2* y *gst-1* en 2.4, 2.3 y 2.0 veces el control respectivamente, relacionados con la exposición a metales, precursores de EROs y respuesta a xenobióticos.

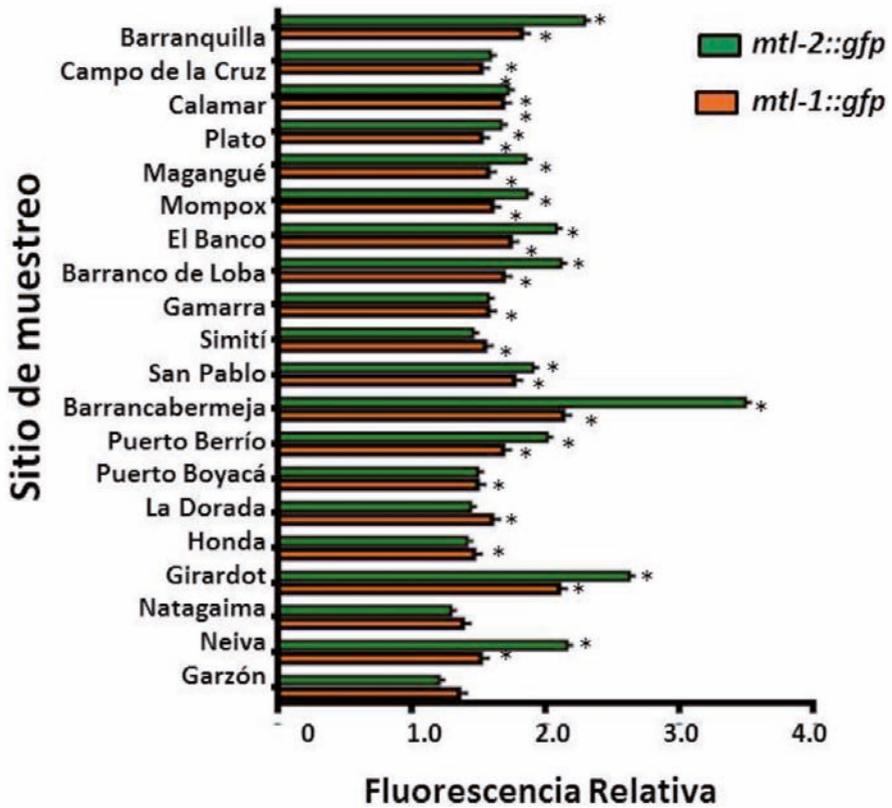


Figura 16. Respuesta de los genes *mtl-1* y *mtl-2* para el extracto acuoso. *. Diferencias significativas con el control ($p < 0.05$).

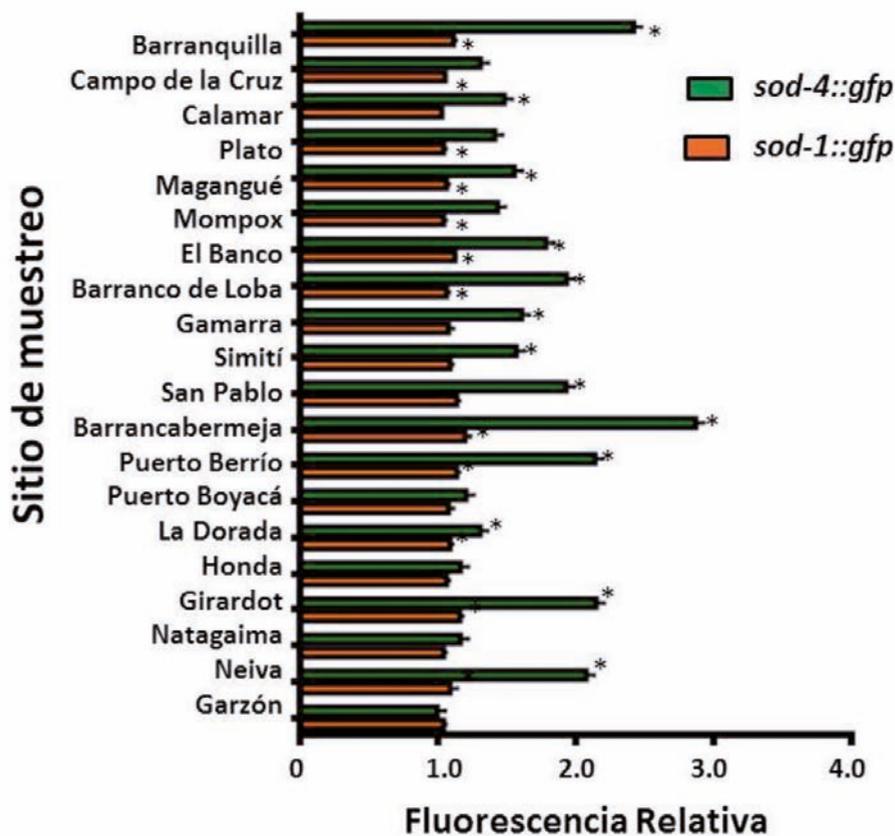


Figura 17. Respuesta de los genes *sod-1* y *sod-4* para el extracto acuoso. *. Diferencias significativas con el control ($p < 0.05$).

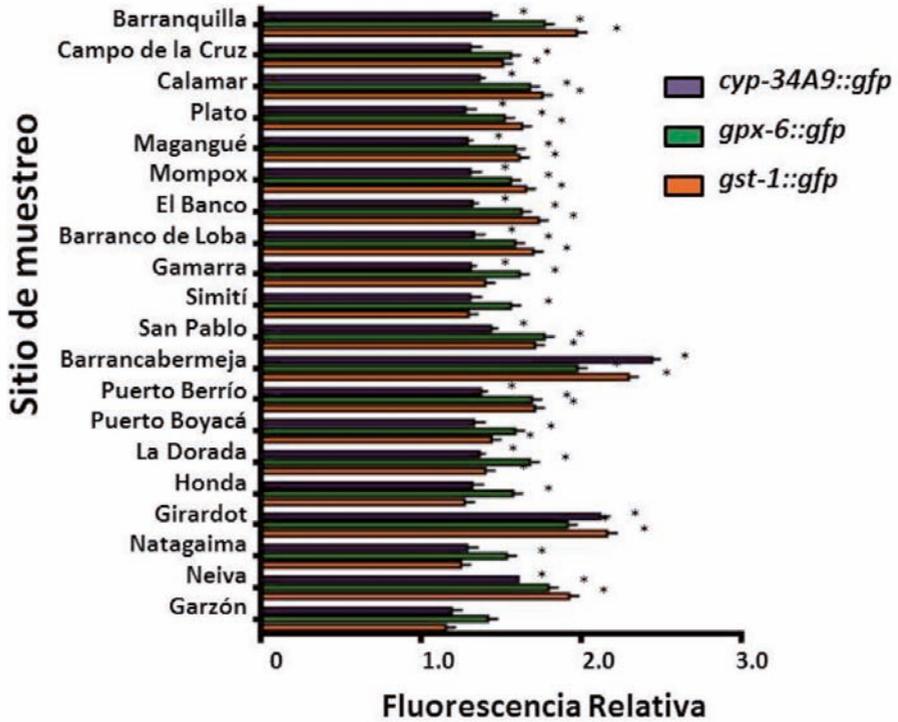


Figura 18. Respuesta de los genes *gst-1*, *gpx-6* y *cyp-34A9* para el extracto acuoso. *. Diferencias significativas con el control ($p < 0.05$).

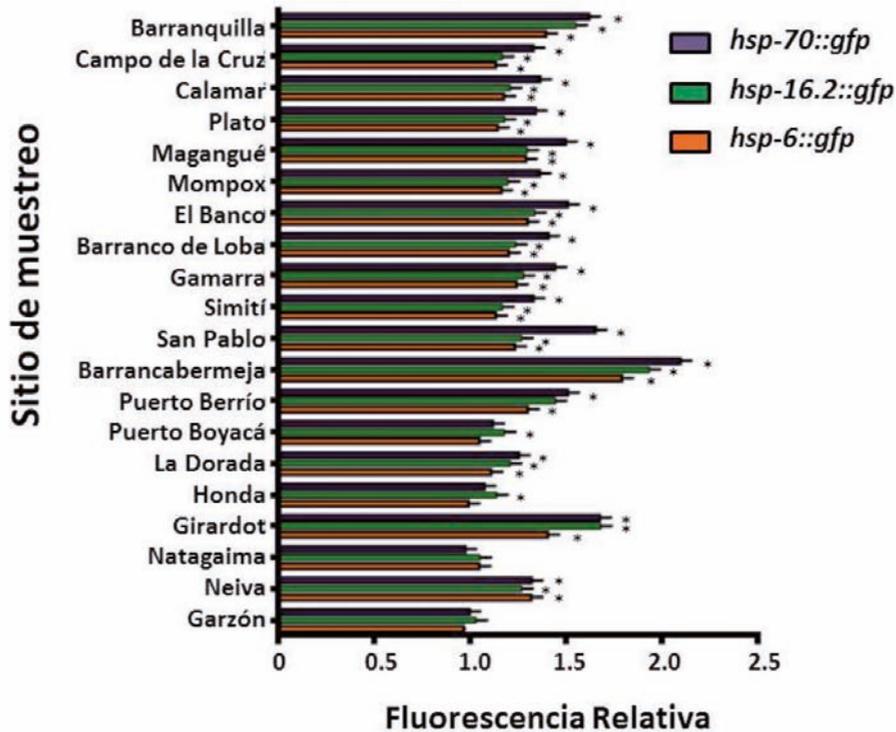


Figura 19. Respuesta de los genes *hsp* para el extracto acuoso. *. Diferencias significativas con el control ($p < 0.05$).

6.6. Ensayos de toxicidad con marcadores *gfp* en el extracto metanólico

La expresión de genes de respuesta al estrés para *C. elegans* transgénicos expuestos a los extractos metanólicos se muestran en las Figuras 20 - 23. El gen que fue más sensible a la exposición fue *sod-4*, con una expresión mayor a 2.0 veces la del control para 15 muestras, siendo las más altas en orden descendente las muestras recolectadas en Barrancabermeja, Barranquilla, San Pablo, Barranco de Loba y Neiva, similar al resultado encontrado con el extracto acuoso, corroborando la presencia de EROs en estas muestras. Otro gen de alta sensibilidad fue *cyp-34A9*, cuya exposición a los extractos

generó una expresión de fluorescencia más de 2.0 veces el control para 16 muestras, destacándose Barrancabermeja y Girardot. Este gen es expresado como respuesta a xenobióticos, por lo que se intuye la presencia de este tipo de compuestos en estos sedimentos. Genes como *mtl-1*, *sod-1*, *gst-1* y *hsp-6* mostraron baja sensibilidad con los extractos metanólicos. Este resultado es similar al obtenido para el extracto acuoso, destacándose las muestras recogidas en San Pablo y Barranco de Loba, entre las más tóxicas, probablemente por el mayor contenido de sustancias tóxicas en el extracto metanólico que en el acuoso.

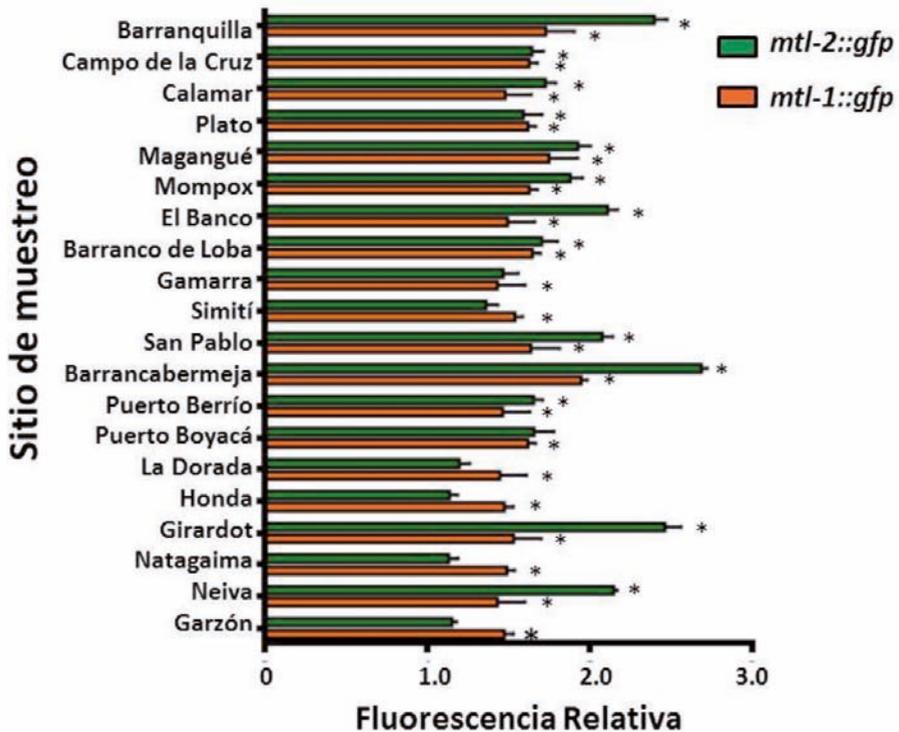


Figura 20. Respuesta de los genes *mtl* para el extracto metanólico. *. Diferencias significativas con el control ($p < 0.05$).

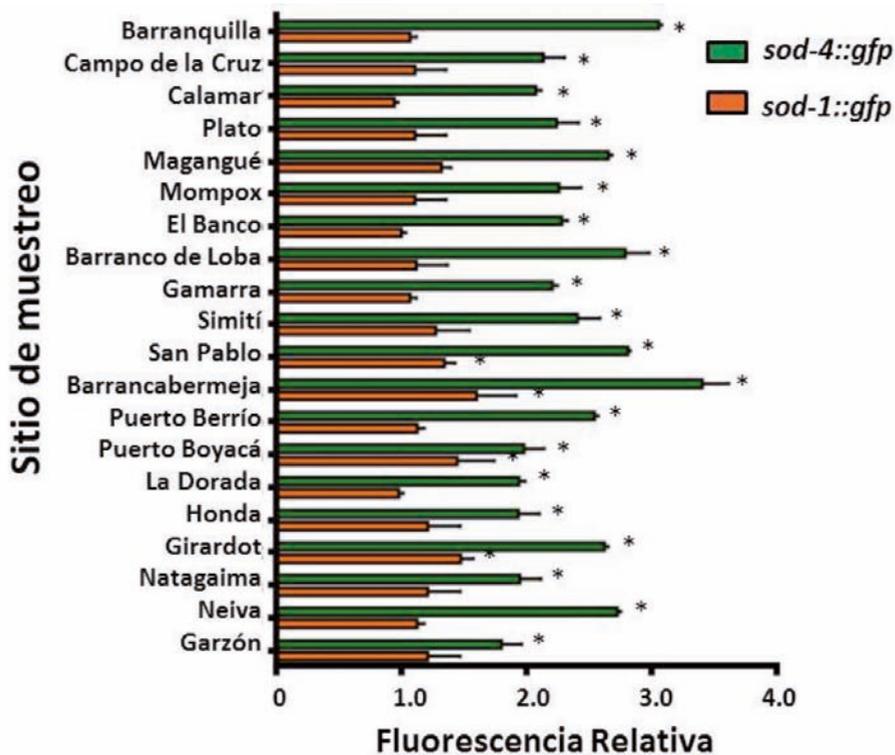


Figura 21. Respuesta de los genes *sod* para el extracto metanólico. *. Diferencias significativas con el control ($p < 0.05$).

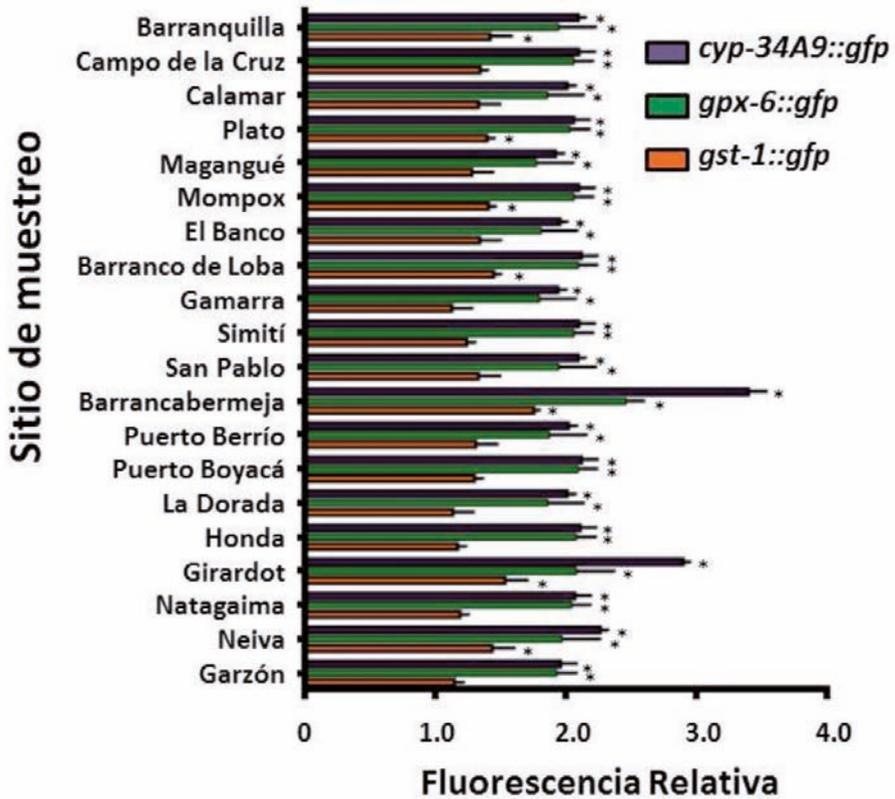


Figura 22. Respuesta de los genes *gst-1*, *gpx-6* y *cyp-34A9* para el extracto metanólico. *. Diferencias significativas con el control ($p < 0.05$).

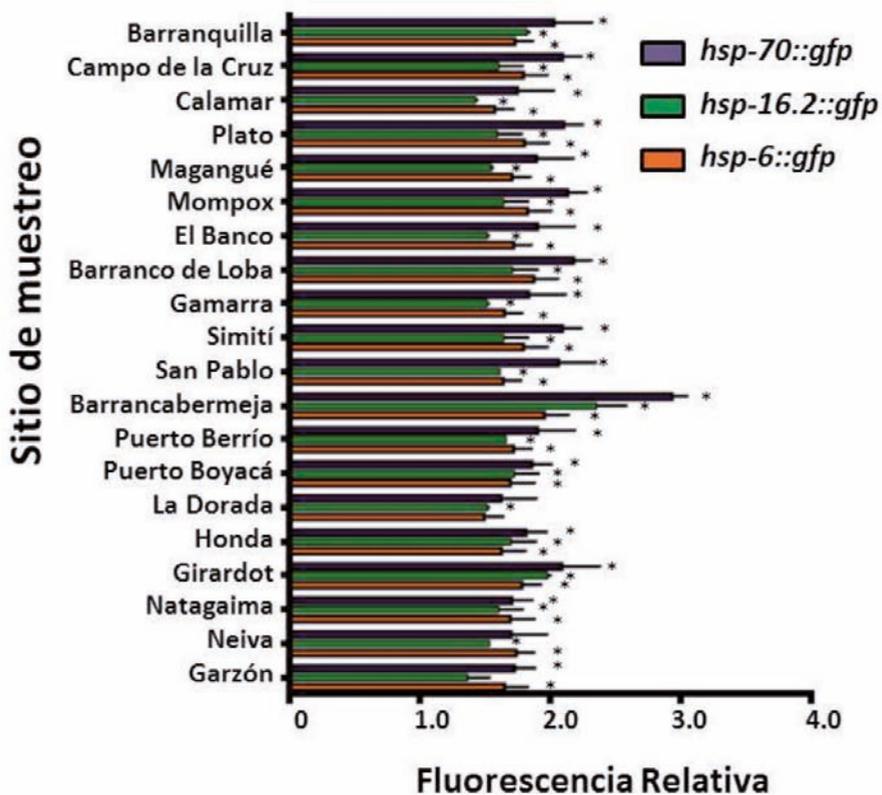


Figura 23. Respuesta de los genes *hsp* para el extracto metanólico. *. Diferencias significativas con el control ($p < 0.05$).

6.7. Análisis multivariado

6.7.1. Análisis de Componentes Principales para Metales (ACP)

Para el estudio de la variabilidad espacial de los metales presentes en los sedimentos del Río Magdalena, se efectuó un ACP usando la matriz rotada como se muestra en la Tabla 11. El ACP es una herramienta bien establecida para la reducir la magnitud de datos originales, modelar los datos, detectar valores atípicos, seleccionar variables principales, reconocer patrones, validar y predecir grupos de la muestra para obtener una visión de los datos en un espacio multidimensional reducido. Los nuevos ejes de coordenadas se denominan componentes principales CP. El CP1 es la variable latente lineal con la mayor varianza posible. La dirección de CP2 es ortogonal a la dirección de CP1, y tiene, de manera similar varianza máxima posible. Los posteriores CPs siguen esta regla. Sobre esta base, se pudo establecer que, cinco componentes principales cubren el 81% de la varianza de los quince elementos analizados. Los dos primeros explican el 40% de la varianza de los datos. CP1 muestra altas cargas de Ni, Zn, As, Cd, Pb y Th. CP2 presenta cargas de Ce, Gd y Th. CP3 se destaca con Co, Ni, Hg y Pb. CP4 presenta altas cargas de Ag, Pt y U. Y por último, CP5 tiene altas cargas de Cr y Sr. Esta relación muestra diferentes posibles fuentes de metales en los sedimentos. Por ejemplo, CP1 podría estar asociado con la explotación de petróleo mientras que los otros componentes se relacionan con la minería, y en su lugar, el CP3 puede estar asociado con la extracción de oro ilegal en el sur de Bolívar y en el Río Cauca, principal afluente del Río Magdalena.

Metal	CP1	CP2	CP3	CP4	CP5
Cr	0.054	0.095	0.198	0.019	0.919
Co	0.047	-0.097	0.887	0.082	0.058
Ni	0.688	-0.140	0.614	0.034	0.257
Cu	-0.306	0.321	0.444	-0.094	-0.091
Zn	0.738	-0.074	0.485	0.200	-0.192
As	0.884	0.077	0.128	-0.146	0.236
Sr	0.041	0.292	-0.067	0.090	0.851
Ag	0.145	0.174	0.102	-0.917	-0.144
Cd	0.965	0.040	-0.063	0.112	-0.013
Ce	-0.415	0.861	-0.051	0.112	0.135
Gd	0.083	0.887	-0.072	0.033	0.265
Pt	-0.170	-0.216	-0.341	-0.765	0.000
Hg	0.284	-0.085	0.742	-0.043	0.179
Pb	0.607	0.143	0.591	0.138	-0.217
Th	0.529	0.755	0.079	-0.015	0.161
U	0.202	0.461	-0.117	0.536	-0.061
% Varianza	23.93	16.6	16.97	11.54	12.23

Tabla 11. Matriz de componentes rotados para el análisis de metales.

6.7.2. Análisis de correlación

El análisis de correlación de variables entre los datos obtenidos del análisis fisicoquímico y la respuesta toxicológica se muestra en la Tabla 12 en términos de los coeficientes de Spearman y con su respectivo valor P entre paréntesis. La gama de colores muestra los valores más bajos en amarillo y los más altos en rojo. Los valores en blanco indican baja significancia estadística ($P > 0.05$).

R (p)	Co	Ni	Cu	Zn	As	Sr	Ag	Cd	Ce	Gd	Pt	Hg	Pb	Th	U	HAP	pH
Crecimiento	-0.249 (0.276)	-0.287 (0.207)	-0.213 (0.354)	-0.361 (0.108)	-0.007 (0.975)	0.188 (0.414)	-0.120 (0.604)	-0.163 (0.480)	-0.175 (0.447)	-0.124 (0.592)	0.242 (0.290)	-0.502 (0.020)	-0.358 (0.111)	-0.201 (0.382)	0.003 (0.989)	-0.007 (0.975)	-0.073 (0.754)
Mortalidad	0.416 (0.061)	0.509 (0.018)	0.651 (0.001)	0.638 (0.002)	0.390 (0.081)	0.295 (0.195)	0.459 (0.036)	0.329 (0.145)	0.318 (0.160)	0.379 (0.090)	-0.237 (0.301)	0.401 (0.072)	0.726 (0.000)	0.616 (0.003)	0.246 (0.282)	0.391 (0.079)	-0.234 (0.308)
Locomoción	-0.651 (0.001)	-0.731 (0.000)	-0.637 (0.002)	-0.583 (0.006)	-0.514 (0.017)	-0.338 (0.133)	-0.323 (0.153)	-0.316 (0.163)	-0.117 (0.614)	-0.052 (0.823)	0.120 (0.605)	-0.755 (0.000)	-0.607 (0.004)	-0.346 (0.125)	-0.186 (0.418)	-0.291 (0.201)	0.152 (0.511)
<i>mit-1</i>	-0.060 (0.795)	0.363 (0.105)	0.081 (0.728)	0.385 (0.084)	0.450 (0.041)	0.451 (0.040)	0.146 (0.527)	0.639 (0.002)	-0.094 (0.687)	0.259 (0.257)	-0.209 (0.363)	0.086 (0.711)	0.190 (0.408)	0.549 (0.010)	0.322 (0.154)	0.040 (0.865)	0.109 (0.638)
<i>mit-2</i>	0.290 (0.203)	0.600 (0.004)	0.369 (0.100)	0.688 (0.001)	0.431 (0.051)	0.452 (0.040)	0.322 (0.154)	0.575 (0.006)	-0.048 (0.836)	0.289 (0.204)	-0.227 (0.323)	0.357 (0.112)	0.621 (0.003)	0.618 (0.003)	0.204 (0.375)	0.398 (0.074)	-0.160 (0.489)
<i>sod-1</i>	-0.168 (0.467)	0.158 (0.495)	-0.009 (0.969)	0.364 (0.105)	0.120 (0.604)	0.088 (0.706)	0.215 (0.350)	0.369 (0.099)	-0.053 (0.820)	0.088 (0.705)	-0.108 (0.642)	-0.036 (0.877)	0.146 (0.527)	0.241 (0.292)	0.256 (0.263)	0.079 (0.733)	0.243 (0.288)
<i>sod-4</i>	0.062 (0.790)	0.468 (0.033)	0.101 (0.662)	0.524 (0.015)	0.294 (0.196)	0.451 (0.040)	0.169 (0.464)	0.579 (0.006)	-0.136 (0.555)	0.160 (0.489)	-0.210 (0.360)	0.151 (0.514)	0.348 (0.075)	0.438 (0.047)	0.287 (0.207)	0.229 (0.317)	0.003 (0.991)
<i>hsp-6</i>	0.198 (0.389)	0.523 (0.015)	0.199 (0.387)	0.521 (0.015)	0.291 (0.201)	0.497 (0.022)	0.112 (0.630)	0.541 (0.011)	-0.140 (0.544)	0.210 (0.360)	-0.179 (0.439)	0.239 (0.298)	0.396 (0.075)	0.458 (0.037)	0.192 (0.403)	0.352 (0.118)	0.038 (0.871)
<i>hsp-16.2</i>	0.062 (0.788)	0.414 (0.062)	0.138 (0.549)	0.430 (0.051)	0.312 (0.169)	0.416 (0.061)	0.147 (0.526)	0.513 (0.017)	-0.170 (0.460)	0.128 (0.580)	-0.069 (0.767)	0.190 (0.408)	0.270 (0.237)	0.398 (0.074)	0.195 (0.396)	0.253 (0.269)	0.208 (0.365)
<i>hsp-70</i>	0.012 (0.960)	0.457 (0.037)	0.131 (0.571)	0.445 (0.043)	0.514 (0.017)	0.513 (0.017)	0.221 (0.335)	0.687 (0.001)	-0.101 (0.662)	0.251 (0.273)	-0.094 (0.684)	0.093 (0.687)	0.269 (0.238)	0.561 (0.008)	0.276 (0.225)	0.129 (0.578)	0.020 (0.931)
<i>gst-1</i>	0.216 (0.348)	0.476 (0.029)	0.350 (0.120)	0.471 (0.031)	0.323 (0.153)	0.537 (0.012)	0.122 (0.597)	0.464 (0.034)	-0.090 (0.699)	0.135 (0.559)	-0.222 (0.334)	0.218 (0.343)	0.356 (0.113)	0.433 (0.050)	0.133 (0.567)	0.240 (0.295)	-0.069 (0.767)
<i>cyp-34A9</i>	-0.017 (0.942)	0.256 (0.263)	0.253 (0.268)	0.358 (0.111)	0.150 (0.516)	0.292 (0.199)	0.208 (0.365)	0.299 (0.187)	-0.024 (0.917)	-0.016 (0.945)	-0.181 (0.431)	0.033 (0.886)	0.212 (0.356)	0.267 (0.242)	0.213 (0.354)	0.012 (0.957)	0.053 (0.818)
<i>gpx-6</i>	0.074 (0.749)	0.356 (0.113)	0.232 (0.311)	0.384 (0.086)	0.192 (0.403)	0.326 (0.149)	0.180 (0.435)	0.371 (0.098)	-0.098 (0.672)	0.010 (0.965)	-0.084 (0.716)	0.110 (0.635)	0.237 (0.301)	0.277 (0.224)	0.165 (0.474)	0.135 (0.560)	0.099 (0.670)
Crecimiento	0.156 (0.500)	-0.138 (0.550)	-0.038 (0.871)	-0.522 (0.015)	-0.081 (0.728)	-0.196 (0.394)	-0.231 (0.314)	-0.409 (0.066)	0.040 (0.864)	-0.327 (0.147)	0.353 (0.116)	0.024 (0.916)	-0.441 (0.046)	-0.510 (0.018)	-0.157 (0.496)	-0.105 (0.652)	-0.014 (0.951)

Mortalidad	-0.119 (0.606)	-0.003 (0.991)	0.142 (0.540)	-0.013 (0.955)	0.067 (0.773)	0.494 (0.023)	-0.012 (0.960)	0.095 (0.681)	0.070 (0.763)	0.160 (0.487)	-0.018 (0.939)	0.027 (0.907)	-0.125 (0.590)	0.245 (0.284)	0.225 (0.326)	0.255 (0.264)	0.404 (0.069)
Locomoción	0.166 (0.471)	-0.253 (0.268)	-0.175 (0.447)	-0.473 (0.030)	-0.534 (0.013)	-0.387 (0.083)	-0.107 (0.645)	-0.637 (0.002)	0.019 (0.933)	-0.075 (0.748)	0.048 (0.835)	0.090 (0.697)	-0.160 (0.489)	-0.406 (0.067)	0.042 (0.856)	0.042 (0.856)	-0.144 (0.533)
<i>mtl-1</i>	0.159 (0.491)	0.367 (0.101)	0.159 (0.492)	0.277 (0.224)	0.512 (0.018)	0.224 (0.328)	0.275 (0.228)	0.398 (0.074)	0.019 (0.935)	0.162 (0.483)	0.103 (0.656)	0.130 (0.574)	0.293 (0.197)	0.467 (0.033)	0.204 (0.375)	0.256 (0.263)	0.034 (0.882)
<i>mtl-2</i>	0.242 (0.291)	0.512 (0.018)	0.390 (0.081)	0.558 (0.009)	0.355 (0.114)	0.368 (0.101)	0.166 (0.471)	0.480 (0.028)	-0.095 (0.683)	0.102 (0.660)	-0.122 (0.597)	0.240 (0.295)	0.451 (0.040)	0.477 (0.029)	0.095 (0.681)	0.337 (0.135)	-0.027 (0.907)
<i>sod-1</i>	-0.207 (0.368)	-0.192 (0.406)	0.109 (0.639)	-0.000 (1.000)	-0.104 (0.653)	0.045 (0.847)	0.218 (0.343)	-0.105 (0.652)	0.251 (0.273)	0.069 (0.765)	0.238 (0.299)	-0.455 (0.038)	0.044 (0.851)	0.188 (0.415)	0.098 (0.671)	0.149 (0.519)	0.218 (0.343)
<i>sod-4</i>	0.160 (0.489)	0.535 (0.012)	0.105 (0.650)	0.565 (0.008)	0.349 (0.120)	0.361 (0.108)	0.234 (0.307)	0.583 (0.006)	-0.157 (0.496)	0.126 (0.586)	-0.097 (0.676)	0.141 (0.542)	0.449 (0.041)	0.438 (0.047)	0.260 (0.254)	0.323 (0.153)	-0.040 (0.862)
<i>hsp-6</i>	0.083 (0.722)	0.306 (0.177)	0.056 (0.810)	0.391 (0.079)	0.213 (0.353)	0.385 (0.084)	0.138 (0.552)	0.375 (0.094)	-0.044 (0.849)	0.260 (0.254)	-0.222 (0.334)	0.156 (0.499)	0.339 (0.132)	0.378 (0.091)	0.199 (0.387)	0.359 (0.110)	-0.013 (0.955)
<i>hsp-16.2</i>	-0.223 (0.332)	-0.007 (0.975)	0.129 (0.578)	0.120 (0.603)	0.209 (0.364)	0.257 (0.261)	0.310 (0.171)	0.180 (0.436)	0.170 (0.462)	0.113 (0.625)	0.064 (0.783)	-0.162 (0.484)	0.031 (0.893)	0.336 (0.136)	0.359 (0.110)	0.210 (0.360)	0.230 (0.315)
<i>hsp-70</i>	-0.061 (0.793)	0.307 (0.176)	0.052 (0.823)	0.374 (0.095)	0.514 (0.017)	0.437 (0.047)	0.300 (0.186)	0.588 (0.005)	0.029 (0.902)	0.320 (0.158)	-0.138 (0.552)	0.027 (0.906)	0.269 (0.238)	0.539 (0.012)	0.322 (0.154)	0.103 (0.656)	-0.066 (0.777)
<i>gst-1</i>	0.177 (0.442)	0.371 (0.098)	0.351 (0.119)	0.403 (0.070)	0.239 (0.297)	0.501 (0.021)	0.198 (0.390)	0.339 (0.133)	-0.010 (0.967)	0.212 (0.356)	-0.245 (0.285)	0.152 (0.512)	0.379 (0.090)	0.466 (0.033)	0.093 (0.688)	0.313 (0.167)	-0.131 (0.573)
<i>cyp-3A49</i>	-0.099 (0.670)	0.010 (0.966)	0.281 (0.218)	0.212 (0.356)	0.007 (0.974)	0.208 (0.366)	0.323 (0.153)	0.038 (0.871)	0.171 (0.458)	0.055 (0.813)	-0.089 (0.700)	-0.123 (0.595)	0.176 (0.446)	0.236 (0.304)	0.156 (0.499)	0.178 (0.441)	-0.039 (0.867)
<i>gpx-6</i>	-0.202 (0.380)	-0.139 (0.549)	0.192 (0.404)	0.078 (0.736)	0.048 (0.837)	0.191 (0.408)	0.315 (0.165)	-0.020 (0.931)	0.262 (0.251)	0.145 (0.531)	-0.061 (0.792)	-0.191 (0.408)	0.078 (0.736)	0.264 (0.247)	0.205 (0.373)	0.084 (0.716)	0.051 (0.827)

Tabla 12. Correlación entre variables fisicoquímicas y respuestas tóxicas.

Es evidente la fuerte correlación entre el contenido de Cd, Ni y Zn con la mayoría de las respuestas toxicológicas encontradas, principalmente con las asociadas con cambios en la expresión génica. La presencia de Pb correlaciona bien con seis de las respuestas. Las respuestas mejor correlacionadas con los metales fueron la mortalidad y locomoción del extracto acuoso y la expresión de *mtl-2* en los dos extractos. De este análisis se puede intuir que, la toxicidad encontrada está relacionada con el contenido de metales como Cd, Ni, Zn y Pb provenientes de actividades antropogénicas como la metalurgia, petroquímica y el transporte fluvial en el Río Magdalena.

Adicionalmente, se muestra la correlación entre la respuesta obtenida por la exposición de *C. elegans* a los dos extractos en la Tabla 13. La gama de colores muestra los valores más bajos en verde y los más altos en rojo. Los valores en blanco indican baja significancia estadística ($P > 0.05$).

Los parámetros que mejor correlacionaron fueron la expresión de genes *mtl-2*, *sod-4*, *gst-1*, *cyp-34A9* y *hsp-70* en el extracto acuosos con la expresión de genes *mtl-2*, *sod-4* y *gst-1* en el extracto metanólico, demostrando la diversidad de mecanismos de toxicidad implicados en los dos extractos. Los puntos finales relacionados con la biología como mortalidad, locomoción y crecimiento, mostraron baja correlación entre sí, pero estuvieron relacionados con los genes anteriores.

6.7.3 Análisis por conglomerados

El análisis por conglomerados mostrado en la Figura 24 agrupa los puntos de muestreo de manera que las muestras recolectadas en Calamar, Plato y Natagaima, con baja respuesta al estrés, forman un grupo. Otras muestras de toxicidad moderada integran un segundo grupo; y otros seis grupos están independientemente formados por las muestras tomadas en Neiva, Girardot, Puerto Boyacá, Barrancabermeja, Simití, Garzón, Campo de la Cruz, El Banco y Barranquilla, con la toxicidad más alta entre todas las muestras. Esto indica que estos sitios poseen características específicas e inherentes a sus actividades propias, como la explotación de petróleo en Neiva, el aporte del Río Bogotá en Girardot, los derrames históricos de petróleo en Puerto Boyacá, la refinería de petróleo en Barrancabermeja, la minería en Simití, el cultivo de café en Garzón, y la gran actividad portuaria en Barranquilla.

R ² (p)	M	L	C	mtl-1	mtl-2	sod-1	sod-4	hsp-6	hsp-16.2	hsp-70	gst-1	cyp-34A9	gpx-6
M	0.301 (0.192)	-0.292 (0.133)	-0.483 (0.823)	0.244 (0.014)	0.615 (0.014)	0.176 (0.075)	0.377 (0.016)	0.338 (0.026)	0.319 (0.016)	0.190 (0.193)	0.520 (0.132)	0.509 (0.822)	0.338 (0.014)
L	-0.340 (0.202)	0.180 (0.434)	0.159 (0.912)	-0.408 (<0.01)	-0.557 (<0.01)	0.116 (0.01)	-0.435 (<0.01)	-0.384 (0.011)	-0.213 (<0.01)	-0.254 (0.202)	-0.525 (0.433)	-0.296 (0.912)	-0.167 (<0.01)
mtl-1	0.541 (0.304)	-0.772 (0.073)	-0.563 (0.545)	0.504 (0.023)	0.805 (0.081)	0.066 (0.382)	0.777 (0.101)	0.398 (0.123)	0.489 (0.145)	0.580 (0.303)	0.650 (0.073)	0.311 (0.544)	0.132 (0.023)
mtl-2	0.567 (<0.01)	-0.607 (0.013)	-0.666 (0.223)	0.391 (<0.01)	0.894 (<0.01)	0.112 (<0.01)	0.883 (<0.01)	0.576 (<0.01)	0.477 (<0.01)	0.516 (<0.01)	0.795 (0.014)	0.454 (0.226)	0.183 (<0.01)
sod-4	0.546 (0.103)	-0.604 (0.05)	-0.613 (0.534)	0.378 (<0.01)	0.834 (<0.01)	0.192 (<0.01)	0.923 (<0.01)	0.545 (<0.01)	0.525 (<0.01)	0.525 (<0.01)	0.727 (<0.01)	0.436 (<0.01)	0.167 (<0.01)
hsp-6	0.515 (0.152)	-0.545 (0.091)	-0.596 (0.735)	0.357 (0.085)	0.899 (0.011)	0.135 (0.255)	0.866 (0.010)	0.498 (0.021)	0.366 (0.123)	0.427 (0.074)	0.708 (0.032)	0.293 (0.431)	0.012 (0.591)
hsp-16.2	0.545 (0.184)	-0.623 (0.377)	-0.545 (0.723)	0.348 (0.031)	0.856 (0.032)	0.136 (0.013)	0.807 (0.023)	0.355 (0.111)	0.425 (0.061)	0.388 (0.042)	0.598 (0.042)	0.246 (0.013)	-0.015 (0.082)
hsp-70	0.456 (0.414)	-0.756 (0.278)	-0.507 (0.723)	0.506 (0.012)	0.824 (0.024)	0.167 (0.176)	0.828 (0.022)	0.412 (0.062)	0.445 (0.093)	0.616 (<0.01)	0.613 (0.031)	0.227 (0.382)	0.034 (0.543)
gst-1	0.617 (0.013)	-0.665 (0.024)	-0.516 (0.634)	0.425 (<0.01)	0.945 (<0.01)	0.091 (0.073)	0.808 (<0.01)	0.483 (<0.01)	0.456 (<0.01)	0.478 (<0.01)	0.865 (<0.01)	0.484 (0.012)	0.217 (0.012)
cyp-34A9	0.556 (0.024)	-0.617 (0.213)	-0.489 (0.812)	0.176 (0.182)	0.737 (0.041)	0.216 (0.042)	0.654 (0.053)	0.182 (0.211)	0.534 (0.292)	0.208 (0.356)	0.595 (0.034)	0.617 (<0.01)	0.306 (0.061)

M: Mortalidad, L: Locomoción, C: Crecimiento

Tabla 13. Correlación entre respuestas biológicas y bioquímicas generadas para los extractos acuoso vs. extractos metanólicos.

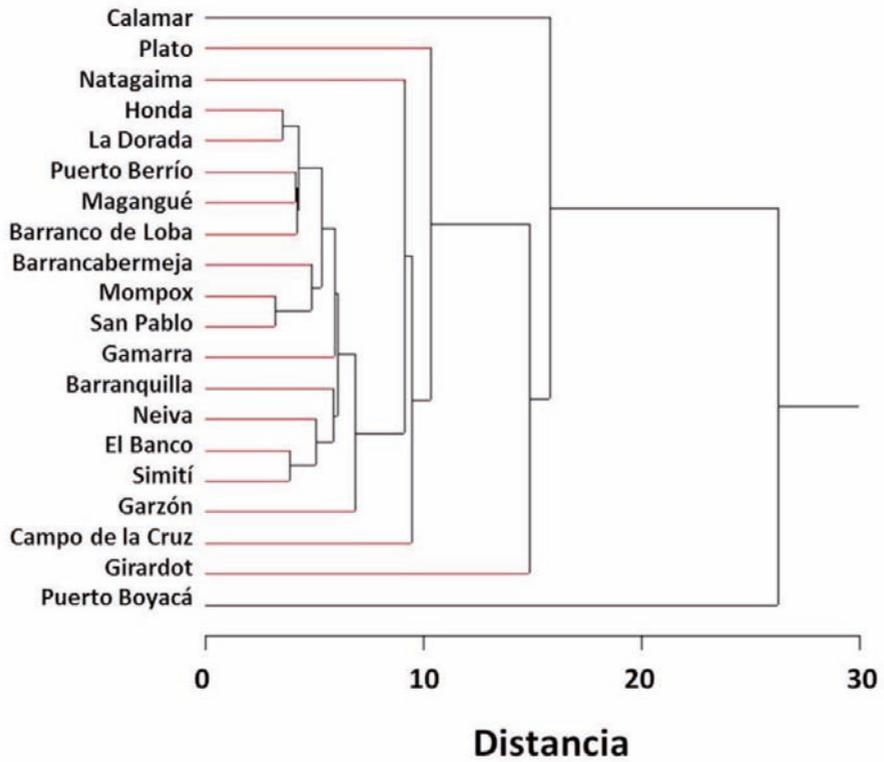


Figura 24. Análisis por conglomerados por sitio de muestreo



7. Conclusiones

Las concentraciones más altas de cromo en sedimentos se encontraron en Calamar y Campo de la Cruz; níquel en Campo de la Cruz y Barranquilla; arsénico y cadmio en San Pablo y Gamarra; plomo en Neiva y Gamarra; y mercurio en Barranquilla.

Las concentraciones más altas de hidrocarburos aromáticos polinucleares fueron halladas en los sedimentos colectados en Neiva, Magangué y Barranquilla.

En los sedimentos recolectados en Gamarra, Calamar, Campo de la Cruz y Barranquilla, las concentraciones de metales como cromo, cadmio, cobre y níquel estuvieron por encima de los valores consensuados de TEC y PEC, por lo que existe una alta probabilidad de que estén generando efectos biológicos adversos en organismos presentes en este ecosistema.

El valor del Índice de Carga de Contaminación, basado en la concentración de metales para los sedimentos de Gamarra, Campo de la Cruz y Barranquilla, indicó que en estos sitios, el nivel de contaminación por metales es considerado alto.

Los sitios localizados en áreas de concentrada actividad minera e industrial como Barrancabermeja, San Pablo, Simití, Gamarra, El Banco, Mompo y Barranquilla, registraron los Índices de Riesgo Ecológico Potencial más altos, evidenciando contaminación muy alta por metales pesados. El cadmio fue el metal más importante en este indicador.

Los extractos acuosos y metanólicos de los sedimentos obtenidos en Neiva, Girardot, Puerto Boyacá, Barrancabermeja, Gamarra, Barranco de Loba y Barranquilla, produjeron un aumento en la mortalidad del nemátodo *C. elegans*.

La locomoción de los nemátodos disminuyó en la dirección del recorrido del Río, sugiriendo un probable proceso de acumulación de tóxicos a lo largo del mismo. Este fenómeno fue visible tanto con los extractos acuosos como con los metanólicos, aunque estos últimos generaron mayor efecto.

Los extractos acuosos, en comparación con los metanólicos, tuvieron mayor capacidad de inhibir el crecimiento de los nemátodos, sugiriendo que los compuestos que afectan el desarrollo de los gusanos son sustancias solubles en agua.

El efecto de la exposición a los extractos acuosos y metanólicos sobre la expresión de genes de respuesta al estrés fue superior para los sedimentos extraídos de Barranquilla, Girardot y Barrancabermeja, lo cual concuerda con lo encontrado para los efectos biológicos.

En general, los extractos acuosos indujeron incrementos en la expresión génica de *mtl-2*, *sod-4* y *gst-1*, mientras que los extractos metanólicos causaron incrementos en la expresión de los genes *sod-4* y *cyp-34A9*.

La mortalidad estuvo correlacionada con el contenido de Pb y Zn, la locomoción estuvo inversa y moderadamente asociada con la presencia de Co, Cu, Ni y Pb.

La expresión de *mtl-2* mostró asociación con la presencia de Zn, Ni, Cd, Pb y Th; mientras que la de *sod-4* se correlacionó con la concentración de Zn, Cd y Ni.

Las características químicas y toxicológicas de los sedimentos del Río Magdalena pueden ser agrupadas en varios grupos. El primero formado por las muestras de Calamar, Plato y Natagaima con baja respuesta al estrés; un segundo grupo con toxicidad moderada lo integran La Dorada, Magangué y Barranco de Loba. Mientras que las muestras de Neiva, Girardot, Puerto Boyacá, Barrancabermeja, Simití, Garzón, Campo de la Cruz, El Banco y Barranquilla, con los niveles de toxicidad más altos, se destacaron por poseer propiedades químicas y toxicológicas particulares.

Los resultados presentados en esta investigación revelan que las actividades antropogénicas realizadas en las regiones ubicadas cerca a los sitios de muestreo, afectan la calidad de los sedimentos del Río. Dentro de estas actividades se encuentran la agricultura, ganadería, minería, explotación, transporte y refinación de petróleo, la industria manufacturera y la presencia de asentamientos urbanos que descargan sus desechos líquidos y sólidos, tratados y sin tratar, entre muchas otras fuentes.

A pesar de la alta carga de contaminantes a la cual está sometido el Río Magdalena y muchos de sus afluentes, la capacidad de autodepuración del Río es tal, que varios de los efectos encontrados disminuyen en su dirección de flujo. Sin embargo, el acelerado crecimiento de la población y los megaproyectos que buscan aumentar su navegabilidad, pueden poner en peligro su delicado equilibrio ecológico, aumentando aún más la problemática.



8. Recomendaciones

A la comunidad académica

- Continuar los estudios con *C. elegans* y otros organismos indicadores en los sitios identificados como de mayor vulnerabilidad, complementando los mismos con otros puntos finales de toxicidad.
- Realizar estudios a lo largo del Río Magdalena, donde se contemple la recolección de muestras de macrófitas e invertebrados con el fin de explorar los posibles efectos sobre la biota.

A las autoridades de la salud

- Realizar el mapa de salud del Río Magdalena, de tal forma que, pueda conocerse el estado de salud/enfermedad de los pobladores de las zonas más afectadas de acuerdo con el perfil toxicológico del Río.

A las autoridades ambientales

- Planear y llevar a cabo campañas educativas para crear en la comunidad una conciencia ambiental para la protección del Río Magdalena.
- Hacer vigilancia y seguimiento permanente para que las industrias localizadas en las zonas cercanas al Río Magdalena, y a sus principales afluentes, no arrojen residuos sólidos y líquidos sin tratar al Río.
- Realizar vigilancia y control para que todos los municipios de las regiones cercanas al Río implementen sus sistemas de potabilización del agua que toman del Río Magdalena y sus PTAR, para evitar verter las aguas domésticas sin tratar.
- Desarrollar programas de minería del oro sostenible entre los pequeños y grandes mineros con el fin de prevenir la descarga al agua de tóxicos como el mercurio y el cianuro.

Al gobierno central y entidades financiadoras de proyectos

- Establecer convocatorias para la financiación de proyectos de investigación con el objetivo de recuperar el Río Magdalena.

Agradecimientos

los autores agradecen al Dr. David De Pomerai en la Universidad de Nottingham (Reino Unido) por su apoyo en esta investigación y el suministro de cepas transgénicas; al Dr. Joel Meyer en la Universidad de Duke (Estados Unidos) por el suministro de cepas de *C. elegans*; a la Universidad de Cartagena (Colombia) para el apoyo financiero a través de la Convocatoria de Movilidad Internacional 2013 y por su decidido y permanente apoyo a este proceso de investigación; a Albertina Cavadía Torres por su apoyo en la revisión del documento, a los miembros del Grupo de Química Ambiental y Computacional de la Universidad de Cartagena por su colaboración en todos los aspectos técnicos relacionados con la investigación; al Grupo de Universidades de la Rábida por otorgar a los autores el IX Premio Internacional de Estudios de la Rábida; y a la Universidad de Andalucía por la publicación de este libro.



Referencias

1. Adam, S. 2009. The nuclear transport machinery in *Caenorhabditis elegans*: A central role in morphogenesis. *Sem Cell Dev Biol.* 20 (5): 576-581.
2. Aguirre, G., Rudolph, A., Ahumada, R., Loyola, R., Medina, V. 2009. Toxicidad no específica en sedimentos portuarios, una aproximación al contenido de contaminantes críticos. *Rev Biol Marítima y Oceanográfica.* 44(3): 725-735.
3. Anbalagan, C., Lafayette, I., Antoniou-Kourounioti, M., Gutierrez, C., Martin, J., Chowdhuri, D., De Pomerai, D. 2012. Transgenic nematodes as biosensors for metal stress in soil pore water samples. *Ecotoxicology.* 21(2): 439-55.
4. Anbalagan, C., Lafayette, I., Antoniou-Kourounioti, M., Gutierrez, C., Martin, J., Chowdhuri, D., De Pomerai, D. 2013. Use of transgenic GFP reporter strains of the nematode *Caenorhabditis elegans* to investigate the patterns of stress responses induced by pesticides and by organic extracts from agricultural soils. *Ecotoxicology.* 22(1): 72-85.
5. Argueta, C., Yuksek, K., Summers, M. 2004. Construction and use of GFP reporter vectors for analysis of cell-type-specific gene expression in *Nostoc punctiforme*. *J Microbiol Methods.* 59(2): 181-8.
6. Arnold, M., Badireddy, A., Wiesner, M., Di Giulio, R., Meyer, J. 2013. 2013. Cerium Oxide Nanoparticles are More Toxic than Equimolar Bulk Cerium Oxide in *Caenorhabditis elegans*. *Arch Environ Contam Toxicol.* 65(2): 224-33.
7. Avellaneda, A. 1990. Petróleo e impacto ambiental en Colombia. *Rev UNAL.* 6: 21-28.
8. Barceló, I., Laure, A., Solis, H., Avila, P., Carapia, L., Barrios, L. 2002. Evaluación de los contaminantes metálicos de los sedimentos de la presa J.A. Alzate en el edo. de México. XXVIII Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental. México.

9. Barjhoux, I., Baudrimont, M., Morin, B., Landi, L., Gonzalez, P., Cachot, J. 2012. Effects of copper and cadmium spiked-sediments on embryonic development of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Eco Environ Saf.* 79 (1): 272-282.
10. Barón, E., Gago, P., Gorga, M., Rudolph, I., Mendoza, G., Zapata, A., Díaz, S., Barra, R., Ocampo-Duque, W., Páez, M., Darbra, R., Eljarrat, E., Barceló, D. 2013. Occurrence of hydrophobic organic pollutants (BFRs and UV-filters) in sediments from South America. *Chemosphere.* 92 (3): 309-316.
11. Beck, V., Pfitscher, A., Jungbauer, A. 2005. GFP-reporter for a high throughput assay to monitor estrogenic compounds. *J Biochem Biophys Methods.* 64(1): 19-37.
12. Besser, J., Brumbaugh, W., Allert, A., Poulton, B., Schmitt, C., Ingersoll, C. 2009. Ecological impacts of lead mining on Ozark streams: Toxicity of sediment and pore water. *Eco Environ Saf.* 72: 516-526.
13. Boyd, W., McBride, S., Rice, J., Snyder, D., Freedman, J. 2010. A high-throughput method for assessing chemical toxicity using a *Caenorhabditis elegans* reproduction assay. *Toxicol Appl Pharmacol.* 245 (2): 153-159.
14. Cha, Y., Lee, J., Choi, S. 2012. Apoptosis-mediated in vivo toxicity of hydroxylated fullerene nanoparticles in soil nematode *Caenorhabditis elegans*. *Chemosphere.* 87 (1): 49-54.
15. Chandrasekaran, A., Ravisankar, R., Harikrishnan, N., Satapathy, K., Prasad, M., Kanagasabapathy, K. 2015. Multivariate statistical analysis of heavy metal concentration in soils of Yelagiri Hills, Tamilnadu, India – Spectroscopical approach. *Spectrochim.* 137: 589-600.

16. Chen, C., Chen, C., Dong, C., Tu, Y. 2012. Composition and source apportionment of PAHs in sediments at river mouths and channel in Kaohsiung Harbor, Taiwan. *J Environ Monit.* 14(1): 105-115.
17. Chen, W., Rezaizadehnajafi, L., Wink, M. 2013. Influence of resveratrol on oxidative stress resistance and life span in *Caenorhabditis elegans*. *J Pharm Pharmacol.* 65(5): 682-8.
18. Cheng, Z., Tian, H., Chu, H., Wu, J., Li, Y., Wang, Y. 2014. The effect of tributyltin chloride on *Caenorhabditis elegans* germline is mediated by a conserved DNA damage checkpoint pathway. *Toxicol Lett.* 225(3): 413-421.
19. Cordy, P., Veiga, M., Salih, I., Al-Saadi, S., Console, S., Garcia, O., Mesa, L., Velásquez-López, P., Roeser, M. 2011. Mercury contamination from artisanal gold mining in Antioquia, Colombia: The world's highest per capita mercury pollution. *Sci Total Environ.* 410-411: 154-160.
20. Cormagdalena. 2007. Actualización del PMA de los dragados de relimpia y mantenimiento del Canal del Dique.
21. Covaci, A., Gheorghe, A., Voorspoels, S., Maervoet, J., Steen, E., Blust, R., Schepens, P. 2005. Polybrominated diphenyl ethers, polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in sediment cores from the Western Scheldt River (Belgium): analytical aspects and depth profiles. *Environ Inter.* 31(3): 367-375.
22. De Miguel, E., Clavijo, D., Ortega, M., Gómez, A. 2014. Probabilistic meta-analysis of risk from the exposure to Hg in artisanal gold mining communities in Colombia. *Chemosphere.* 108: 183-9.
23. Dimitriadi, M., Hart, A. 2010. Neurodegenerative disorders: Insights from the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Neurobiology of Disease.* 40(1): 4-11.

24. Du, M., Wang, D. 2009. The neurotoxic effects of heavy metal exposure on GABAergic nervous system in nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environ Toxicol. Pharmacol.* 27: 314-320.
25. Eom, H., Ahn, J., Kim, Y., Choi, J. 2013. Hypoxia inducible factor-1 (HIF-1)-flavin containing monooxygenase-2 (FMO-2) signaling acts in silver nanoparticles and silver ion toxicity in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Toxicol Appl Pharmacol.* 270(2):106-113.
26. Espinosa, L., Ramírez, G., Campos, N. 1995. Análisis de residuos de organoclorados en los sedimentos de zonas de manglar en la Ciénaga Grande de Santa Marta y la Bahía de Chengue, Caribe Colombiano. *INVEMAR.* 24: 79-94.
27. Espinosa, L., Wallner-Kersanach. 1996. Heavy metal contamination in sediments from the Magdalena river and part of the lagoon complex of Ciénaga Grande de Santa Marta, Colombia.
28. Fuentes, M., Rojas, L., Días, A., Martínez, G. 2010. Distribución de metales pesados en los sedimentos superficiales del Saco del Golfo de Cariaco, Sucre, Venezuela. *Rev Bio Trop.* 58(3): 129-140.
29. García-Sancho, M. 2012. From the genetic to the computer program: the historicity of 'data' and 'computation' in the investigations on the nematode worm *C. elegans* (1963-1998). *Studies in History and Philosophy of Science Part C. Stud Hist Philos Biol Biomed Sci.* 43(1): 16-28.
30. Giles, A., Rankin, C. 2009. Behavioral and genetic characterization of habituation using *Caenorhabditis elegans*. *Neurobiol Learning Mem.* 92(2): 139-146.
31. Gómez, Q., Martínez, R., Podlesky, E. 1993. Contenido de mercurio en varias especies de peces del río Magdalena y en harinas comerciales de pescado. *Biomédica.* 15(3): 183.

32. Guo, X., Bian, P., Liang, J., Wang, Y., Li, L., Wang, J., Yuan, H., Chen, S., Xu, A., Wu, L. 2014. Synergistic effects induced by a low dose of diesel particulate extract and ultraviolet-A in *Caenorhabditis elegans*: DNA damage-triggered germ cell apoptosis. *Chem Res Toxicol.* 27(6): 990-1001
33. Hakanson, L. 1980. Ecological risk index for aquatic pollution control. A sedimentological approach. *Water Res.* 14, 975-1001.
34. Harikumar, P., Nasir, U., MujeebuRahman, M. 2009. Distribution of heavy metals in the core sediments of a tropical wetland system. *Int J Environ Sci Technol.* 6: 225-232.
35. Helmcke, K., Aschner, M. 2010. Hormetic effect of methylmercury on *Caenorhabditis elegans*. *Toxicol Appl Pharmacol.* 248(2): 156-164.
36. Höss, S., Fritzsche, A., Meyer, C., Bosch, J., Meckenstock, R., Totsche, K. 2015. Size- and composition-dependent toxicity of synthetic and soil-derived Fe oxide colloids for the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environ Sci Technol.* 49(1): 544-52.
37. Höss, S., Haitzer, M., Traunspurger, W., Steinberg, C. 2009b. Growth and fertility of *Caenorhabditis elegans* (nematoda) in unpolluted freshwater sediments: Response to particle size distribution and organic content. *Environ Toxicol Chem.* 18(12): 2921-2925.
38. Höss, S., Jansch, S., Moser, T., Junker, T., Römbke, J. 2009a. Assessing the toxicity of contaminated soils using the nematode *Caenorhabditis elegans* as test organism. *Ecotoxicol Environ Saf.* 72(7): 1811-1818.
39. Höss, S., Menzel, R., Gessler, F., Nguyen, H., Jehle, J., Traunspurger, W. 2013. Effects of insecticidal crystal proteins (Cry proteins) produced by genetically modified maize (Bt maize) on the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environ Pollut.* 178: 147-151

40. Höss, S., Menzel, R., Gessler, F., Nguyen, H., Jehle, J., Traunspurger, W. 2013. Effects of insecticidal crystal proteins (Cry proteins) produced by genetically modified maize (Bt maize) on the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environ Pollut.* 178: 147-51.
41. Hu, Y., Wang, Y., Ye, B., Wang, D. 2008. Phenotypic and Behavioral Defects Induced by Iron Exposure Can Be Transferred to Progeny in *Caenorhabditis elegans*. *Biomed Environ Sci.* 21(6): 467-473.
42. Hunter, S., Gustafson, M., Margillo, K., Lee, S., Ryde, I., Meyer, J. 2012. *In vivo* repair of alkylating and oxidative DNA damage in the mitochondrial and nuclear genomes of wild-type and glycosylase-deficient *Caenorhabditis elegans*. *DNA Repair.* 11(11): 857-863.
43. Ideam. 2006. Monitoreo de calidad de agua y diagnóstico de calidad de agua del Río Magdalena. Informe final Convenio 024/2005 Ideam - Cormagdalena.
44. Ideam. 2007. Nueva medición de la calidad de agua en los ríos Magdalena y Cauca.
45. Ideam. 2008. Nueva medición de la calidad de agua en los ríos Magdalena y Cauca, Convenio IDEAM, Cormagdalena y ONF Andina.
46. Inzunza, B., Orrego, R., Peñalosa, M., Gavilán, J., Barra, R. 2006. Analysis of CYP4501A1, PAHs metabolites in bile, and genotoxic damage in *Onchorhynchus mykiss* exposed to Biobío River sediments, Central Chile. *Ecotoxicol Environ Saf.* 65(2): 242-51.
47. ISO. 2005. ISO 10390 Soil quality -- Determination of pH.
48. Ju, J., Lieke, T., Saul, N., Pu, Y., Yin, L., Kochan, C., Putschew, A., Baberschke, N., Steinberg, C. 2014. Neurotoxic evaluation of two organobromine model compounds and natural AOBBr-containing surface water samples by a *Caenorhabditis elegans* test. *Ecotox Environ Saf.* 104: 194-201.

49. Kain, S. 1999. Green fluorescent protein (GFP): applications in cell-based assays for drug discovery. *Drug Discov Today*. 4(7): 304-312.
50. Kosmehl, T., Otte, J., Yang, L., Legradi, J., Bluhm, K., Zinsmeister, C., Keiter, S., Reifferscheid, G., Manz, W., Braunbeck, T., Ströhle, U., Hollert, H. 2012. A combined DNA-microarray and mechanism-specific toxicity approach with zebrafish embryos to investigate the pollution of river sediments. *Reprod Toxicol*. 33: 245-253.
51. Kumar, S., Aninat, C., Michaux, G., Morel, F. 2010. Anticancer drug 5-fluorouracil induces reproductive and developmental defects in *Caenorhabditis elegans*. *Reprod Toxicol*. 29(4): 415-420.
52. L'Hernault, S. 2009. The genetics and cell biology of spermatogenesis in the nematode *C. elegans*. *Mol Cell Endocrinol*. 306(1-2): 59-65.
53. Leelaja, B., Rajini, P. 2013. Biochemical and physiological responses in *C. elegans* exposed to sublethal concentrations of the organophosphorus insecticide, monocrotophos. *Ecotoxicol Environ Saf*. 94(1): 8-13
54. Leung, M., Goldstone, J., Boyd, W., Freedman, J., Meyer, J. 2010. *Caenorhabditis elegans* generates Biologically Relevant Levels of Genotoxic Metabolites from Aflatoxin B1 but Not Benzo[a]pyrene *In Vivo*. *Toxicol Sci*. 118(2): 444-453.
55. Lewis, J., Gehman, E., Baer, C., Jackson, D. 2013. Alterations in gene expression in *Caenorhabditis elegans* associated with organophosphate pesticide intoxication and recovery. *BMC Genomics*. 14: 291.
56. Li, Q., Zhang, s., Yu, Y., Wang, L., Guan, S., Li, P. 2012b. Toxicity of Sodium Fluoride to *Caenorhabditis elegans*. *Biomed Environ Sci*. 25(2): 216-223.
57. Li, Y., Wang, Y., Yin, L., Pu, Y., Wang, D. 2009. Using the nematode *Caenorhabditis elegans* as a model animal for assessing the toxicity

- induced by microcystin-LR. *Journal of Environmental Sciences*. 21(3): 395-401.
58. Li, Y., Yu, S., Wu, Q., Tang, M., Pu, Y., Wang, D. 2012a. Chronic Al²O₃-nanoparticle exposure causes neurotoxic effects on locomotion behaviors by inducing severe ROS production and disruption of ROS defense mechanisms in nematode *Caenorhabditis elegans*. *J Hazard Mater*. 219-220: 221-230.
 59. Lide, D. 2008. *CRC Handbook of Chemistry and Physics, Geophysics, Astronomy, and Acoustics. Abundance of elements in the Earth's crust and in the sea*, 89th edn. CRC Press: Boca Raton, FL.
 60. Liu, F., Liu, J., Chen, Q., Wang, B., Cao, Z. 2013. Pollution characteristics, ecological risk and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in surface sediment from Tuhai-Majia River system, China. *Procedia Environ Sci*. 13: 1301-1314.
 61. Liu, P., He, K., Li, Y., Wu, Q., Yang, P., Wang, D. 2012a. Exposure to mercury causes formation of male-specific structural deficits by inducing oxidative damage in nematodes. *Ecotoxicol Environ Saf*. 79: 90-100.
 62. Liu, F., Liu, J., Chen, Q., Wang, B., Cao, Z. 2012b. Pollution characteristics, ecological risk and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in surface sediment from Tuhai-Majia River system, China. *Procedia Environ Sci*. 13: 1301-1314.
 63. Lora, R., Bonilla, H. 2010. Remediation of a soil contaminated with the heavy metals cadmium and chromium on the high basin of the Bogota River. *Revista U.D.C.A*. 13: 61-70.
 64. Loughery, J., Arciszewski, T., Kidd, K., Mercer, A., Hewitt, L., Macclatchy, D., Munkittrick, K. 2014. Understanding the chronic impacts

- of oil refinery wastewater requires consideration of sediment contributions to toxicity. *Arch Environ Contam Toxicol.* 66(1):19-31.
65. MacDonald, D., Ingersoll, C., Berger, T. 2000. Development and evaluation of consensus-based sediment quality guidelines for freshwater ecosystems. *Arch Environ Contam Toxicol.* 2000. 39: 20-31.
 66. Mancera, N., Alvarez, R. 2005. Estado del conocimiento de las concentraciones de hidrocarburos y residuos organoclorados y peces dulceacuicolas de Colombia. *Rev Asoc Col Ictiol.* 8: 89-103.
 67. Mancera, N., Alvarez, R. 2006. Estado del conocimiento de las concentraciones de mercurio y otros metales pesados en peces dulceacuicolas de Colombia. *A Biol Col.* 11: 3-23.
 68. Marrugo, J., Benitez, L., Olivero, J. 2008. Distribution of mercury in several environmental compartments in an aquatic ecosystem impacted by gold mining in northern Colombia. *Arch Environ Contam Toxicol.* 55(2): 305-316.
 69. Matsuura, T., Miura, H., Nishino, A. 2013. Inhibition of gustatory plasticity due to acute nicotine exposure in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Neurosci Res.* 77(3): 155-161.
 70. Megalou, E., Tavernarakis, N. 2009. Autophagy in *Caenorhabditis elegans*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Mol Cell Res.* 1793(9): 1444-1451.
 71. Menzel, R., Swain, Hoess, S., Claus, S., Menzel, S., Steinberg, S., Reifferscheid, G., Stürzenbaum, S. 2009. Gene expression profiling to characterize sediment toxicity - a pilot study using *Caenorhabditis elegans* whole genome microarrays. *BMC Genomics.* 10(160): 1-15.
 72. Meyer, J., Lord, C., Yang, X., Turner, E., Badireddy, A., Marinakos, S., Chilkoti, A., Wiesner, M., Auffan, M. 2010. Intracellular uptake and

- associated toxicity of silver nanoparticles in *Caenorhabditis elegans*. *Aquatic Toxicol.* 100(2): 140-150.
73. Mogollon, L., Rodriguez, R., Larrota, W., Ortiz, C., Torres, R. 1998. Biocatalytic removal of nickel and vanadium from petroporphyrins and asphaltenes. *Appl Biochem Biotechnol.* 70(72): 765-777.
74. Monteiro, L., Brinke, M., Dos Santos, G., Traunspurger, W., Moens, T. 2014. Effects of heavy metals on free-living nematodes: A multifaceted approach using growth, reproduction and behavioural assays. *Eur J Soil Biol.* 62: 1-7.
75. Moreno, M., Rickman, D., Ogashawara, I., Irwin, D., Ye, J., Al-Hamdan, M. 2015. Using remote sensing to monitor the influence of river discharge on watershed outlets and adjacent coral Reefs: Magdalena River and Rosario Islands, Colombia. *Intl J App Earth Observ Geoinform*, 38: 204-215.
76. Nam, S., An, Y. 2010. Assessing the ecotoxicity of vinyl chloride using green alga *P. subcapitata*, nematode *C. elegans*, and the SOS chromotest in a closed system without headspace. *Sci Total Environ.* 408(15): 3148-3152.
77. Nilin, J., De Castro, C., Pimentel, M., Franklin, W., De Matos, R., Lotufo, T., Costa-Lotufo, L. 2007. Water Toxicity Assessment of the Ceará River Estuary (Brazil), *J Braz Soc Ecotoxicol.* 2(2): 107-113.
78. Nyström, J., Shen, Z., Aili, M., Flemming, A., Leroi, A., Tuck, S. 2002. Increased or decreased levels of *Caenorhabditis elegans* lon-3, a gene encoding a collagen, cause reciprocal changes in body length. *Genetics.* 161(1): 83-97.
79. Odigie, K., Flegal, R. 2014. Trace metal inventories and lead isotopic composition chronicle a forest fire's remobilization of industrial con-

- taminants deposited in the Angeles National Forest. *PLoS One*. 9, e107835.
80. Olivero, J., Caballero, K., Marrugo, J. 2011. Relationship between localization of gold mining areas and hair mercury levels in people from Bolivar, north of Colombia. *Biol Trace Elem Res*. 144: 118-132.
 81. Olivero, J., Caballero, K., Turizo, A. 2015. Mercury in the gold mining district of San Martin de Loba, South of Bolivar (Colombia). *Environ Sci Pollut Res Int*. 22(8): 5895-5907.
 82. Olivero, J., Johnson, B., Mendoza, C., Paz, R. Olivero, R. 2004. Mercury in the Aquatic Environment of the Village of Caimito at the Mojana Region, North of Colombia. *Water, Air, & Soil Pollut*. 159: 409-420.
 83. Olivero, J., Solano, B. 1998. Mercury in environmental samples from a waterbody contaminated by gold mining in Colombia, South America. *Sci Total Environ*. 217: 83-89.
 84. Olivero, J., Young, F., Caballero, K. 2014. Contaminación por mercurio en aire del Distrito minero de San Martín de Loba en el departamento de Bolívar. *Rev Int Contam*. 30(1): 7-13.
 85. Peluso, L., Abelando, M., Apartín, C., Almada, P., Ronco, A. 2013. Integrated ecotoxicological assessment of bottom sediments from the Paraná basin, Argentina. *Ecotoxicol Environ Saf*. 98: 179-86.
 86. Peng, S., Wang, W., Li, X., Yen, Y. 2004. Metal partitioning in river sediments measured by sequential extraction and biomimetic approaches. *Chemosphere*. 57(8): 839-851.
 87. Pointet, K., Milliet, A. 2000. PAHs analysis of fish whole gall bladders and livers from the Natural Reserve of Camargue by GC/MS. *Chemosphere*. 40: 293-299.

88. Polak, N., Read, D., Jurkschat, K., Matzke, M., Kelly, F., Spurgeon, D., Stürzenbaum, S. 2014. Metalloproteins and phytochelatin synthase may confer protection against zinc oxide nanoparticle induced toxicity in *Caenorhabditis elegans*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 160: 75-85.
89. Polli, J., Zhang, Y., Pan, X. 2014. Dispersed crude oil amplifies germ cell apoptosis in *Caenorhabditis elegans*, followed a CEP-1-dependent pathway. *Arch Toxicol*. 88(3): 543-551.
90. Power, R., De Pomerai, D. 1999. Effect of single and paired metal inputs in soil on a stress-inducible transgenic nematode. *Arch Environ Contam Toxicol*. 503-511.
91. Priju, C., Narayana, A. 2006. Spatial and temporal variability of trace element concentrations in a tropical lagoon, southwest coast of India: Environmental Implications. *J. Coast Res*. 39: 1053-1057.
92. Procuraduría General de la Nación. 2013. Río Magdalena, Informe social, económico y ambiental Colombia.
93. Restrepo, J. 2006. Fluvial fluxes into the Caribbean Sea and their impacts on coastal ecosystem: The Magdalena River, Colombia, *Global and Planetary Change*. 50: 33-49.
94. Restrepo, J. 2008. Applicability of LOICZ catchmentm Coast continuum in a major Caribbean basin: The Magdalena River, Colombia. *Estuarine, Coastal and Shelf Sci*. 77: 214-229.
95. Restrepo, J., Kjerfve, B., Hermelin, M., Restrepo, J. 2006. Factors controlling sediment yield in a major South American drainage basin: the Magdalena River, Colombia. *J Hydrol*. 316: 213-232.
96. Restrepo, J., Ortíz, J., Pierini, J., Schrottke, K., Maza, M., Otero, L. 2014. Freshwater discharge into the Caribbean Sea from the rivers of North-

- western South America (Colombia): magnitude, variability and recent changes. *J. Hydrol.* 509: 266-281.
97. Rippey, B., Rose, N., Yang, H., Harrad, S., Robson, M., Travers, S. 2008. An assessment of toxicity in profundal lake sediment due to deposition of heavy metals and persistent organic pollutants from the atmosphere. *Environ Int.* 34(3): 345-356.
98. Rocha, P., Bernecker, C., Strecker, R., Mariani, C., Pompeo, M., Storch, V., Hollert, H., Braunbeck, T. 2011. Sediment-contact fish embryo toxicity assay with *Danio rerio* to assess particle-bound pollutants in the Tiete River Basin (Sao Paulo, Brazil). *Ecotoxicol Environ Saf.* 74: 1951-1959.
99. Rodríguez, A., González, J., Suárez, R. 2009. Accumulation of lead, chromium, and cadmium in muscle of capitán (*Eremophilus mutisii*), a catfish from the Bogota River basin. *Arch Environ Contam Toxicol.* 57: 359-365.
100. Roh, J., Choi, J. 2011. Cyp35a2 gene expression is involved in toxicity of fenitrothion in the soil nematode *Caenorhabditis elegans*. *Chemosphere.* 84(10): 1356-1361.
101. Rudel, D., Douglas, C., Huffnagle, I., Besser, J., Ingersoll, C. 2013. Assaying environmental nickel toxicity using model nematodes. *PLoS One.* 8(10):e77079
102. Rudgalvyte, M., VanDuyn, N., Arnaio, V., Heikkinen, L., Peltonen, J., Lakso, M., Nass, R., Wong, G. 2013. Methylmercury exposure increases lipocalin related (*lpr*) and decreases activated in blocked unfolded protein response (*abu*) genes and specific miRNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Toxicol Lett.* 222(2): 189-96
103. Rui, Q., Zhao, Y., Wu, Q., Tang, M., Wang, D. 2013. Biosafety assessment of titanium dioxide nanoparticles in acutely exposed nematode

- Caenorhabditis elegans* with mutations of genes required for oxidative stress or stress response. *Chemosphere*. 93(10): 2289-2296.
104. Salim, C., Rajini, P. 2014. Glucose feeding during development aggravates the toxicity of the organophosphorus insecticide Monocrotophos in the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Physiol Behav*. 131: 142-148
105. Shen, L., Xiao, J., Ye, H., Wang, D. 2009. Toxicity evaluation in nematode *Caenorhabditis elegans* after chronic metal exposure. *Environ Toxicol Pharmacol*. 28 (1): 125-132.
106. Smith, M., Zhang, Y., Polli, J., Wu, H., Zhang, B., Xiao, P., Farwell, M., Pan, X. 2013. Impacts of chronic low-level nicotine exposure on *Caenorhabditis elegans* reproduction: Identification of novel gene targets. *Reprod Toxicol*. 40: 69-75.
107. Song, J., Yang, X., Zhang, J., Long, Y., Zhang, Y., Zhang, T. 2015. Assessing the Variability of Heavy Metal Concentrations in Liquid-Solid Two-Phase and Related Environmental Risks in the Weihe River of Shaanxi Province, China. *Int J Environ Res Public Health*. 12: 8243-8262.
108. Soto-Jimenez, M., Hibdon, S., Rankin, C., Aggarawl, J., Ruiz, A., Paez, F., Flegal, A. 2006. Chronically a century of lead pollution in Mexico: stable lead isotopic composition analyses of dated sediment cores. *Environ Sci Technol*. 40: 764-70.
109. Stashenko, E., Martínez, J. 2007. Sampling volatile compounds from natural products with headspace/solid-phase micro-extraction. *J Biochem Biophys Methods*. 70(2): 235-42.
110. Sun, L., Lin, Z., Liao, K., Xi, Z., Wang, D. 2015. Adverse effects of coal combustion related fine particulate matter (PM_{2.5}) on nematode *Caenorhabditis elegans*. *Sci Total Environ*. 512: 251-260.

111. Tejada, L., Olivero-Verbel, J. 2016. *Caenorhabditis elegans*, a biological model for research in toxicology. *Rev Environ Contam Toxicol.* 237:1-35.
112. Thuong, N., Yoneda, M., Ikegami, M., Takakura, M. 2013. Source discrimination of heavy metals in sediment and water of To Lich River in Hanoi City using multivariate statistical approaches. *Environ Mon Assess.* 185(10): 8065-75.
113. Tollefsen, K., Bratsberg, E., Bøyum, O., Farmen E., Gregersen, I., Hegseth, M., Sandberg, C., Hylland, K. 2006. Use of fish *in vitro* hepatocyte assays to detect multi-endpoint toxicity in Slovenian river sediments. *Marine Environ Res.* 62(1): 356-359.
114. Tous, G., Tovar, A. 1989. Estudio de la contaminación por metales tóxicos (cadmio, cromo, plomo, mercurio y zinc) en el medio y bajo Magdalena y en el bajo Cauca. Informe Técnico.
115. Traunspurger, W., Haitzer, M., Höss, S., Beier, S., Ahlf, W., Steinberg, G. 2009. Ecotoxicological assessment of aquatic sediments with *Caenorhabditis elegans* (nematoda) – a method for testing liquid medium and whole-sediment samples. *Environ Toxicol Chem.* 16(2): 245-250.
116. Tuikka, A., Schmitt, C., Höss, S., Bandow, N., Von der Ohe, P., de Zwart, D., de Deckere, E., Streck, G., Mothes, S., van Hattum, B., Kocan, A., Brix, R., Brack, W., Barceló, D., Sormunen, A., Kukkonen, J. 2011. Toxicity assessment of sediments from three European river basins using a sediment contact test battery. *Ecotoxicol Environ Saf.* 74: 123-131.
117. Turner, E., Kroeger, G., Arnold, M., Thornton, B., Di Giulio, R., Meyer, J. 2013. Assessing different mechanisms of toxicity in mountaintop removal/valley fill coal mining-affected watershed samples using *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One.* 8: e75329.

118. Vale, M., Silva, M., Damin, I., Sanches-Filho, P., Welz, B. 2008. Determination of volatile and non-volatile nickel and vanadium compounds in crude oil using electrothermal atomic absorption spectrometry after oil fractionation into saturates, aromatics, resins and asphaltenes. *Talanta*. 74: 1385-1391.
119. Van Ael, E., Covaci, A., Blust, R., Bervoets, L. 2005. Persistent organic pollutants in the Scheldt estuary: Environmental distribution and bioaccumulation. *Environ Int*. 48(1): 17-27.
120. Wang, D., Liu, P., Yang, Y., Shen, L. 2010a. Formation of a combined Ca/Cd toxicity on lifespan of nematode *Caenorhabditis elegans*. *Ecotoxicol Environ Saf*. 73(6): 1221-1230.
121. Wang, D., Wang, Y., Shen, L. 2010b. Confirmation of combinational effects of calcium with other metals in a paper recycling mill effluent on nematode lifespan with toxicity identification evaluation method. *J Environ Sci*. 22(5): 731-737.
122. Wang, H., Wick, R., Xing, B. 2009a. Toxicity of nanoparticulate and bulk ZnO, Al₂O₃ and TiO₂ to the nematode *C. elegans*. *Environ Pollut* 157(4): 1171-1177.
123. Wang, S., Wu, L., Wang, Y., Luo, X., Lu, X. 2009b. Copper-induced germline apoptosis in *Caenorhabditis elegans*: The independent roles of DNA damage response signaling and the dependent roles of MAPK cascades. *Chem Biol Interact*. 180(2): 151-157.
124. Wang, X., Shen, L., Yu, H., Wang, D. 2008. Toxicity evaluation in a paper recycling mill effluent by coupling bioindicator of aging with the toxicity identification evaluation method in nematode *Caenorhabditis elegans*. *J Environ Sci*. 20: 1373-1380.
125. Wang, Y., Ezemaduka, A. 2014. Combined effect of temperature and zinc on *Caenorhabditis elegans* wild type and daf-21 mutant strains. *J Therm Biol*. 41:16-20.

126. Wang, Y., Wang, S., Luo, X., Yang, Y., Jian, F., Wang, X., Xie, L. 2014. The roles of DNA damage-dependent signals and MAPK cascades in tributyltin-induced germline apoptosis in *Caenorhabditis elegans*. *Chemosphere*. 108: 231-238.
127. Wang, Y., Xu, S., Liu, J., Zhang, Y., Guo, T. 2014. Regulation of lead toxicity by heat shock protein 90 (daf-21) is affected by temperature in *Caenorhabditis elegans*. *Ecotoxicol Environ Saf*. 104: 317-22.
128. Williams, P., Dusenbery, D. 1990. Aquatic toxicity testing using the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Environ. Toxicol. Chem*. 9: 1285-1290.
129. Wu Q., Nouara A., Li, Y., Zhang, M., Wang, W., Tang, M., Ye, B., Ding, J., Wang, D. 2013. Comparison of toxicities from three metal oxide nanoparticles at environmental relevant concentrations in nematode *Caenorhabditis elegans*. *Chemosphere*. 90(3): 1123-1131.
130. Wu, Q., Qu, Y., Li, X., Wang, D. 2012. Chromium exhibits adverse effects at environmental relevant concentrations in chronic toxicity assay system of nematode *Caenorhabditis elegans*. *Chemosphere*. 87(11): 1281-1287.
131. Yu, Z., Chen, X., Zhang, J., Wang, R., Yin, D. 2013a. Transgenerational effects of heavy metals on L3 larva of *Caenorhabditis elegans* with greater behavior and growth inhibitions in the progeny. *Ecotoxicol Environ Saf*. 88: 178-184.
132. Yu, Z., Chen, X., Zhang, J., Yin, D., Deng, H. 2013b. Inhibitions on the behavior and growth of the nematode progeny after prenatal exposure to sulfonamides at micromolar concentrations. *J Hazard Mater*. 250(251): 198-203.
133. Yu, Z., Jiang, L., Yin, D. 2011. Behavior toxicity to *C. elegans* transferred to the progeny after exposure to sulfamethoxazole at environmentally relevant concentrations. *J Environ Sci*. 23(2): 294-300.

134. Zhang, Y., Chen, D., Ennis, A., Polli, J., Xiao, P., Zhang, B., Stellwag, E., Overton, A., Pan, X. 2013. Chemical dispersant potentiates crude oil impacts on growth, reproduction, and gene expression in *Caenorhabditis elegans*. Arch Toxicol. 87(2): 371-82.
135. Zhao, Y., Lin, Z., Jia, R., Li, G., Xi, Z., Wang, D. 2014. Transgenerational effects of traffic-related fine particulate matter (PM2.5) on nematode *Caenorhabditis elegans*. J. Hazard Mater. 274: 106-114.
136. Zhuang, Z., Zhao, Y., Wu, Q., Li, M., Liu, H., Sun, L., Gao, W., Wang, D. 2014. Adverse Effects from Clenbuterol and Ractopamine on Nematode *Caenorhabditis elegans* and the Underlying Mechanism. PLoS One. 9(1): e85482.

Pr
E de Estudios
Iberoamericanos
Grupo La Rábida
mio 9

www.unia.es

un
i Universidad
Internacional
de Andalucía
A

une

UNIÓN DE EDITORIALES
UNIVERSITARIAS ESPAÑOLAS
www.une.es

"Esta editorial es miembro de la UNE,
lo que garantiza la difusión y comercialización
de sus publicaciones a nivel
nacional e internacional".