

Bioacumulación y daños genotóxicos en Pez Cebra (*Danio rerio*) por arsénico en aguas de Zimapán, Hidalgo (México). Ensayos en cortos plazos

Olivería A. Báez Ramírez, Francisco Prieto García, Carlos A. Galán Vidal

Centro de Investigaciones Químicas. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo
Carretera Pachuca-Tulancingo, km 4,5, Ciudad Universitaria, Pachuca, Hidalgo (México)
e-mail: prietog@uaeh.reduaeh.mx

Resumen

En aguas bicarbonatadas cálcico-magnésicas, pozo UAEH y pozo V de Zimapán, ésta última con contenidos de arsénico de 0,50 mg/l, fue estudiada la bioacumulación de este elemento en Pez Cebra (*Danio rerio*) y los probables daños genotóxicos en células de branquias, evaluando la inducción de micronúcleos. Los ejemplares del Pez Cebra fueron estudiados durante 30 días en tres lotes separados (control negativo en agua del pozo UAEH, control positivo de 5 mg/l de As(V) y las aguas del pozo V de Zimapán), con 50 ejemplares por cada lote. En las aguas se observó la disminución de las concentraciones de As en el tiempo en tanto que en peces se produce un incremento. A los 30 días se había producido una disminución en las aguas del control positivo de 1,000 mg/l (0,035 mg/l/día) en tanto que en peces se incrementó por bioacumulación en 0,015 mg/Kg. (0,0005 mg/kg/día). Para las aguas del experimento (pozo V de Zimapán), una disminución de 0,200 mg/l (0,0067 mg/l/día) y en peces un incremento de 0,0005 mg/kg (0,00017 mg/kg/día). Con relación a la inducción de micronúcleos (MNs) en células de branquias, se encontró que en los controles negativos existe una inducción por generación espontánea que al término de 30 días es de 8 MNs por cada 1000 células contadas. En el control positivo de 5,000 mg/l de As una inducción de MNs 15,38 veces mayor que el control negativo, en tanto que para los peces en las aguas del pozo V de Zimapán se apreció un incremento de inducción de MNs de 2,38 veces más con respecto al control negativo. Todo ello pone de manifiesto un efecto de genotoxicidad por As.

Summary

Bioaccumulation and genotoxic damages in Zebra Fish (*Danio rerio*) by arsenic in Zimapán waters, Hidalgo (Mexico)

In bicarbonated calcic-magnesian waters from UAEH and Zimapán V wells, the last with arsenic (As) content of 0,50 mg/l, were studied As bioaccumulation in Zebra Fish (*Danio rerio*) and the probably genotoxic damages in gill cells, evaluating micronuclei (MNs) induction. The animals were studied for 30 days in three separated groups (negative control with UAEH wellwater, positive control with 5 mg As/l, and Zimapán V wellwater) with fifty individuals per group. In waters diminished As concentration with time, in fish had an increase. To the thirty days it had produced a decrease in the water of positive control of 1 mg As/l (0,035 mg As/l/day), and in fish had a bioaccumulation of 0,015 mg As/kg (0,0005 mg As/kg/day). In Zimapán V wellwater had a drop of 0,2 mg As/L (0,0067 mg As/l/day), and in fish an increase of 0,0005 mg As/kg (0,00017 mg As/kg/day). On the other side, in negative control was detected a spontaneous micronuclei induction (MI) in gill cells of 8 MNs/1000 cells. In positive control had a MI 15,38 times greater than negative control, and in fish exposed to Zimapán V wellwater were appreciated a MI increase of 2,38 times more than negative control. All of this reveals a genotoxicity effect due to As.

Introducción

El arsénico (As) es conocido como un agente carcinógeno al que están expuestos numerosos grupos humanos en todas partes del mundo y cuya actividad genotóxica

ha sido demostrada en grupos de individuos expuestos (del Razo, 1990). La bioconcentración del As depende de la velocidad de absorción y eliminación en un organismo.

El trióxido de arsénico causa toxicidad en los peces con una concentración letal del 50% (CL₅₀) a las 96 horas de 50-100 mg/l para el Pez Dorado, de 30-40 mg/l para la Carpa, de 20-25 mg/l para la Trucha, y de 25-30 mg/l para otros. La concentración de arsenitos y arsenatos, considerada como segura para peces y otros organismos acuáticos, es de 15-23 mg/l (Meteliev y cols., 1983). En otro estudio, se obtuvo una CL₀ y una CL₅₀ a las 96 horas de 15,73 y 45,32 mg/l de As total para la Tilapia *Oreochromis niloticus*, administrado como trióxido de As. Asimismo, se sometieron peces sanos a 0; 0,05 y 15,73 mg/l As total en agua del pozo Zimapán 5 durante 96 horas, encontrándose un aumento en la concentración del metal en el pez completo y en el grado de lipoperoxidación en branquias con el incremento de la concentración en el agua y del tiempo (Baez, 2001). El As presente en el agua se absorbe por las branquias, por el tracto gastrointestinal y por la piel (Albert, 1997), se distribuye en hígado, riñón, piel y escamas (afinidad de los arsenitos por la queratina), branquias y músculo, donde el As inorgánico se biotransforma en As orgánico lipo e hidrosoluble (Lenihan y Fletcher, 1977).

Se han realizado investigaciones genéticas en el Pez Cebra y su desarrollo embrionario (Gaiano y Hopkins, 1996); se avanza en el descubrimiento y aplicaciones de los transposones de vertebrados como posibles vectores de transferencia de genes (Ivics y cols., 1996; Lam, Lee, y Gilbert, 1996; Izsvak, Ivics, y Hackett, 1997; Coll, 2001).

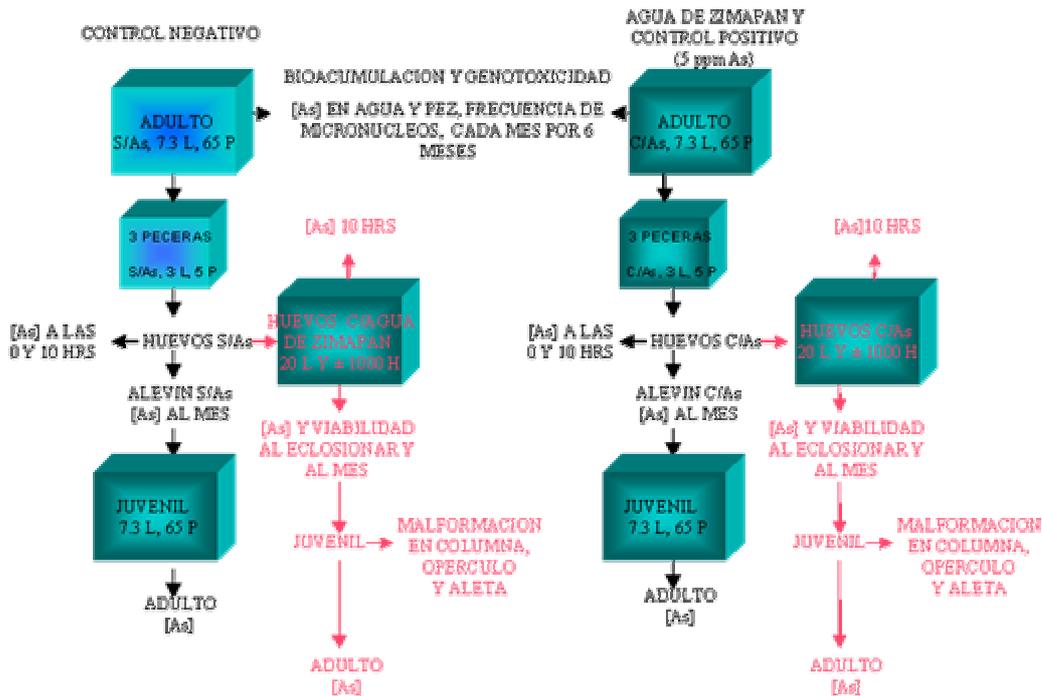
El Pez Cebra es uno de los peces que se encuentran más cercanos a la completa secuenciación de su genoma. Es único para obtener y mantener miles de mutantes gracias a sus especiales características; muchos de los fenotipos de los mutantes del Pez Cebra ya obtenidos se parecen a algunas enfermedades genéticas caracterizadas en el hombre, aportando un poderoso instrumento para ahondar en las correspondientes patologías humanas; se pueden buscar genes candidatos a enfermedades o anomalías en regiones cromosómicas humanas definidas por mutaciones en el Pez Cebra. Las alteraciones morfológicas en el desarrollo embrionario del Pez Cebra se han utilizado desde hace años para estudiar los efectos de los contaminantes. En esta investigación se pretende evaluar los efectos de la bioacumulación de arsénico contenido en el "agua potable" de Zimapán, Hidalgo y las consecuencias de este proceso en el Pez Cebra como indicador del posible daño genotóxico sobre la población de Zimapán que está expuesta a la contaminación por arsénico.

Material y métodos

Esquema del experimento

La metodología experimental se muestra en la Figura 1 en forma de diagrama de flujo donde se señalan las diferentes etapas de la investigación. Los ejemplares del Pez Cebra se colocaron en las peceras respectivas divididos en tres lotes, uno para el control negativo, en agua limpia del pozo de la Universidad Autónoma de Hidalgo (UAEH); otro para el control positivo, éste contiene agua del pozo UAEH y se le agregó arseniato ácido de sodio hasta alcanzar una concentración de 5 mg/l de As en el agua; y por último el lote para el agua del pozo V de Zimapán. En cada lote se colocaron 50 ejemplares bajo condiciones ideales de temperatura, oxigenación y alimentación.

Figura 1. Diagrama de flujo del experimento.



Análisis de aguas

Se realizaron muestreos mensuales de las aguas de los pozos V de Zimapán y pozo UAEH, este último ubicado en Ciudad Universitaria (UAEH) durante 9 meses. Se realizaron análisis fisicoquímicos y microbiológicos de acuerdo a la NOM-127-SSA1-1994 para agua de uso y consumo humano. Las determinaciones de metales se realizaron por Espectroscopía de Emisión con Acoplamiento Inductivo de Plasma (ICP) en un equipo Perkin-Elmer, en matrices de HNO₃.

Se tomaron las alícuotas necesarias de las muestras de agua en matriz nítrica al 3%, aforando a 25 ml. Para el caso de las determinaciones de As se realizó una prerreducción con ácido ascórbico y KI al 25% (2 ml), así como HCl concentrado y se determinó mediante generación de hidruros (2 ml) (Nölte, 1991).

Análisis de peces

Los ensayos directos de exposición al arsénico con Peces Cebrá se realizaron en un control negativo (agua del pozo UAEH), un control positivo de 5 mg/l de As(V) y las aguas del pozo V de Zimapán (con concentración de As de 0,48 mg/l) se sometieron 50 ejemplares por cada lote. Se utilizó adicionalmente un lote como control positivo en concentración de 15 mg/l de As como control (positivo) de elevada concentración.

Se sacrificaron a diferentes tiempos (1, 2, 3, 15 y 30 días) cinco ejemplares que se sometían a secado en horno eléctrico a temperatura de 60°C por 96 horas, extrayéndoles previamente las branquias. Ya secos se trituraban y pesaban, sometiendo estas muestras a digestión con 5 ml de HNO₃ en horno microondas modelo Marx 5, con programación. Los digestatos se aforaron a 25 ml y se reservaron para los ensayos de As por generación de hidruros, con previa prerreducción como se indicó para los análisis de agua.

Evaluaciones de inducción de micronúcleos (MNs)

Se detectaron micronúcleos por cada 1000 células, en un microscopio compuesto, por tinción de las células branquiales con colorante Giemsa a los 0, 1, 2, 3, 15 y 30 días en los 3 tratamientos. En un mortero se trituran las 5 branquias, se les agrega 1 ml de agua desionizada y se pasarán a un tubo de microcentrífuga. Luego se agrega 0,1 ml de suero fetal de bovino inactivado con temperatura. Se resuspende la suspensión celular conseguida con una pipeta Pasteur para homogenizarla, se coloca en el extremo de una laminilla, se barre en toda la superficie con ayuda de un portaobjetos.

Ya realizado el frotis se deja secar 24 horas en condiciones ambientales para posteriormente fijarlo en metanol durante 10 minutos, se deja secar nuevamente al aire libre por 24 horas. Una vez fijada la laminilla se procede a realizar la tinción empleando una solución al 0,25% de May-Grunwald durante 7 minutos, y posteriormente otra solución al 0,125% de May-Grunwald por 3 minutos, finalmente la laminilla se pasa a una solución de Giemsa al 10% por 15 minutos y se enjuaga con agua desionizada. Luego se analizan 2000 células a 100x en el microscopio. Se realiza en eritrocitos jóvenes ó policromáticos (PCE) los cuales se tiñen de color azul.

Se calcula la frecuencia de micronúcleos en PCE mediante la identificación de MN en 2 000 células de PCE con la siguiente fórmula:

$$fMPCE = \frac{nMPCE}{(nMPCE + nPCE)}$$

donde:

fMPCE = frecuencia de micronúcleos en eritrocitos policromáticos.

nMPCE = número de micronúcleos en eritrocitos policromáticos.

nPCE = número de eritrocitos policromáticos.

Resultados y discusión

Caracterización de las aguas

Los resultados de caracterización de las aguas utilizadas en este trabajo aparecen en la Tabla 1, con resultados de tres réplicas y 9 meses (n=27). Los parámetros como conductividad, pH, sólidos totales disueltos, sulfatos y cloruros, entre otros, resultan ligeramente más altos en el agua del pozo UAEH que en la del pozo V de Zimapán, lo que pone de manifiesto que la primera está ligeramente más salinizada pero cumple con los parámetros establecidos por la normatividad mexicana para agua de uso y consumo humano (NOM-127-SSA1-1994), y es apta para ser utilizada en los ensayos con el Pez Cebra, sin riesgo aparente.

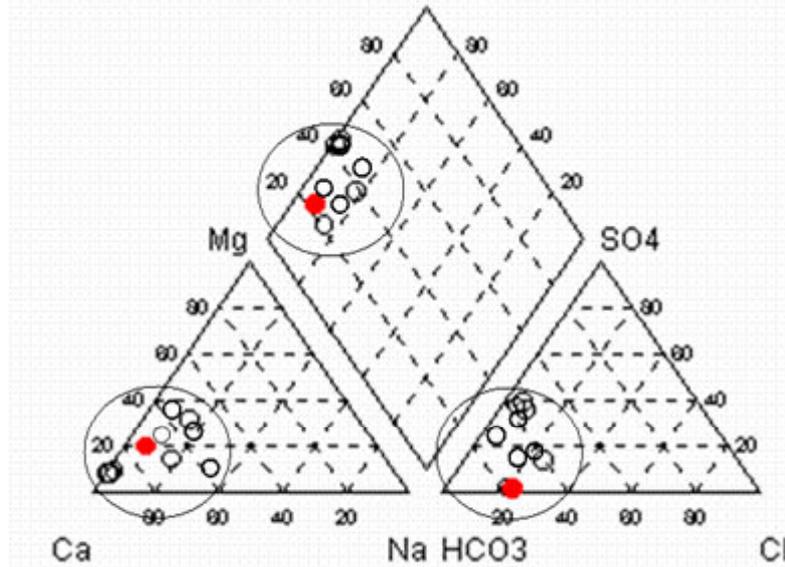
En ambos casos se trata de aguas bicarbonatadas cálcico-magnésicas, indicándose que en el caso del pozo UAEH, es ligeramente de mayor contenido cálcico. Mediante programa Aqua-Chem, versión 3.6, se obtuvo el diagrama de Piper que se muestra en la Figura 2. Se señala que en las aguas del pozo V de Zimapán la contaminación por As (casi 20 veces mayor que lo permitido por la normatividad, 0,025 mg/l). En la Tabla 2 podemos apreciar que las aguas del pozo de la UAEH son de baja dureza y de tipo temporal mayoritariamente.

Tabla 1. Promedio (% desviación estándar relativa) de los análisis de caracterización del agua de los pozos Zimapán V y UAEH (febrero-octubre/03).

Análisis	NOM	Pozo V	P UAEH
Cl₂ res (mg/l)	<1,5	<0,02	<0,02
Color UPC	<20	<5	2,50 (92,58)
Conductividad (mS/cm)	NN	0,477 (21,67)	0,69 (10,71)
Cl⁻ (mg/l)	<250	3,41 (3,36)	24,73 (40,22)
Dureza Ca (mg/l)	NN	161,00 (46,59)	102,26 (25,79)
Dureza Total (mg/l)	<500	295,03 (99,72)	207,07 (18,03)
HCO₃⁻² (mg/l)	<300	323,39 (8,59)	112,65 (2,77)
N-NO₂⁻ (mg/l)	<0,05	0,001 (0,0001)	<0,001
N-NO₃⁻ (mg/l)	<10	0,16 (0,43)	2,11 (91,95)
Olor	Agradable	Agradable	Agradable
Oxígeno Disuelto (mg/l)	NN	ND	5,08 (24,18)
pH	6,5-8,5	7,40 (0,22)	8,13 (12,08)
Sabor	Agradable	Agradable	Agradable
SDT (mg/l)	<1000	244,47 (0,51)	511,14 (14,01)
ST (mg/l)	NN	307,33 (7,08)	552,95 (12,37)
SO₄²⁻ (mg/l)	<400	47,42 (6,85)	114,09 (80,64)
Temperatura (°C)	NN	26,9 (3,41)	21,98 (8,07)
Turbidez (mUTN)	<5000	296 (2,90)	50,35 (87,28)
Al (µg/l)	<200	48 (0,80)	2,19 (54,35)
As (µg/l)	<25	330,00 (0,18)	4,36 (47,01)
Ba (µg/l)	<700	88 (0,06)	9,44 (16,40)
Ca⁺² (mg/l)	<0,005	44,92 (38,62)	17,69 (27,12)
Cd (µg/l)	<5	2 (0,004)	<2,085
Cr Total (µg/l)	<50	4 (0,004)	<0,219
Cu (µg/l)	<2000	11 (0,016)	<0,480
Fe (µg/l)	<300	260 (0,48)	79,01 (11,01)
Hg (µg/l)	<25	< 1	3,90 (2,68)
K⁺ (mg/l)	NN	1,88 (2,20)	2,27 (30,73)
Mg⁺² (mg/l)	NN	10,51 (8,04)	9,22 (19,68)
Mn (µg/l)	<150	330 (0,37)	10,11 (57,18)
Na⁺ (mg/l)	<200	6,65 (6,35)	7,06 (7,74)
Pb (µg/l)	<25	4 (0,01)	0,32 (29,24)
Zn (mg/l)	<5	0,06 (0,07)	4,08 (44,05)
Coliformes fecales (NMP/100 ml)	NN	Ausencia	Ausencia
Coliformes Totales (NMP/100 ml)	< 1,1	No detect	No detect
Mesófilos aerobios (UFC/ml)	< 100	No detect	No detect

NOM: Valores establecidos por la Norma Oficial Mexicana. NN: No Normado. Los valores entre paréntesis indican DER.

Figura 2. Diagrama de Piper para clasificación de las aguas del pozo UAEH.



Las aguas del Pozo de la UAEH (simbolizadas con O) clasifican como un pozo con aguas bicarbonatadas calcico-magnésicas y de clasificación similar al agua del pozo V de Zimapán (simbolizado con •). Se muestran los nueve meses muestreados (febrero-octubre 2003).

Tabla 2. Balance promedio de las aguas del Pozo UAEH en el período comprendido de febrero/octubre 2003.

Muestra:	POZO UAEH				
Localización:	Único				
Sitio:	UAEH				
Fecha de muestreos:	02-10/2003				
Geología:	Natural				
Estimación del tipo de agua:	Ca-Mg-HCO ₃ -SO ₄ (bicarbonatada cálcica-magnésica y sulfática)				
VALORES PROMEDIOS DE:					
Suma de Aniones (meq/l):	2,15				
Suma de Cationes (meq/l):	1,85				
Balance:	7,6%				
Sólidos totales disueltos:	4,0 meq/l 147,4 mg/l				
Dureza:	meq/l	°f	°g	mg/l CaCO ₃	
Dureza total:	1,48	7,41	4,15	74,11	
Dureza permanente:	0,19	0,97	0,54	9,72	
Dureza temporal:	1,29	6,43	3,60	64,32	
Alcalinidad total:	1,29	6,43	3,60	64,32	
(1 °f = 10 mg/l CaCO ₃ 1 °g = 10 mg/l CaO)					
Mejor composición iónica promedio:					
	Mg/l	mmol/l	meq/l	meq%	
Na ⁺	6,501	0,283	0,283	7,083	
K ⁺	3,182	0,081	0,081	2,027	
Ca ²⁺	16,740	0,418	0,835	20,899	
Mg ²⁺	7,850	0,323	0,646	16,168	
Cl ⁻	19,381	0,547	0,547	13,691	
SO ₄ ²⁻	15,220	0,158	0,317	7,934	
HCO ₃ ⁻	78,510	1,287	1,287	32,211	
RELACIONES					
	Mg/l	mmol/l			
Ca ²⁺ /Mg ²⁺	2,132	1,293			
Ca ²⁺ /SO ₄ ²⁻	1,101	2,636			
Na ⁺ /Cl ⁻	0,335	0,517			
Posibles minerales disueltos:					
	mg/l	mmol/l			
Halita (NaCl):	16,542	0,2827			
Dolomita (CaMg(CO ₃) ₂):	59,448	0,3232			
Anhidrita (CaSO ₄):	21,581	0,1580			

Bioacumulación de arsénico

Los resultados se muestran en la Tabla 3 que indican disminuciones de las concentraciones de As en las aguas en el tiempo por los distintos lotes y el incremento en peces totales. Para cada caso se tomaron alícuotas de agua (cinco réplicas), preparadas en matriz nítrica de 3% y se analizó [As(V)]; asimismo en peces, sacrificando 5 ejemplares por lote (previamente se les retiró las branquias para las evaluaciones y ensayos de inducción de micronúcleos); fueron llevados a masa seca en estufa y por su peso seco se sometieron a digestión en horno de microondas con ácido nítrico concentrado (5 ml). Posteriormente se analizó [As total].

Tabla 3. Concentraciones de As promedios en muestras de aguas y peces en los controles negativos, positivos y experimento.

Días	As promedio en Aguas en $\mu\text{g/l}$ (%DER)			
	Negativo	Positivo (15 mg/l)	Positivo (5 mg/l)	Zimapán (0,5 mg/l)
0	<1,12	12 300 (0,79)	5 056 (1,06)	451 (1,92)
1	<1,12	12 221 (0,38)	4 937 (0,64)	430 (0,32)
2	<1,12	12 167 (0,12)	4 926 (0,61)	417 (1,29)
3	<1,12	12 085 (0,13)	4 799 (1,05)	388 (1,27)
15	<1,12	11 220 (0,15)	4 512 (0,90)	322 (2,46)
30	<1,12	10 747 (0,82)	3 975 (1,04)	252 (2,34)

Días	As promedio en peces en $\mu\text{g/kg}$ (%DER)			
	Negativo	Positivo (15 mg/l)	Positivo (5 mg/l)	Zimapán (0,5mg/l)
0	<1,12	<1,12	<1,12	<1,12
1	<1,12	86,55 (4,49)	1,31 (2,03)	1,19 (4,43)
2	<1,12	98,04 (1,21)	1,42 (4,59)	1,21 (1,56)
3	<1,12	155,39 (2,86)	1,94 (2,45)	1,27 (0,99)
15	<1,12	262,56 (0,58)	6,26 (6,83)	2,96 (8,95)
30	<1,12	480,73 (4,07)	14,74 (1,49)	5,29 (1,83)

Entre paréntesis aparecen los % Desviación Estándar Relativa (%DER). Los resultados corresponden a 5 réplicas promediadas.

Como se aprecia en los controles negativos (para aguas y peces) los resultados arrojaron valores menores que el límite de detección (LD) experimental encontrado (<1,12 $\mu\text{g/l}$). Para un control positivo de elevada concentración (15 000 $\mu\text{g/l}$) se observó que en 30 días se había producido una disminución en las aguas de 1 550 $\mu\text{g/l}$ (52 $\mu\text{g/l/día}$), acompañada de un incremento en peces de aproximadamente 500 $\mu\text{g/kg}$ (16 $\mu\text{g/kg/día}$); esto tuvo su principio de observación denotándose una mortalidad en peces a partir de las 72 horas y un 50% al término de 15 días. Para el control positivo de 5000 $\mu\text{g/l}$ se observó una disminución en la concentración de As de las aguas de 1000 $\mu\text{g/l}$ aproximadamente (35 $\mu\text{g/l/día}$) en tanto que en peces se incrementó en unos 15 $\mu\text{g/kg}$ (0,5 $\mu\text{g/kg/día}$). Por su parte las aguas del experimento (pozo V de Zimapán) mostraron una disminución de 200 $\mu\text{g/l}$ (6,7 $\mu\text{g/kg/día}$) y en peces un incremento de 5 $\mu\text{g/kg}$ (0,17 $\mu\text{g/kg/día}$). En las Figuras 3 y 4 se muestran estos resultados de manera gráfica para disminuciones e incrementos en aguas y peces respectivamente, así como la ecuación y regresión lineal de estas tendencias.

Figura 3. Disminución de las concentraciones de As en las aguas.

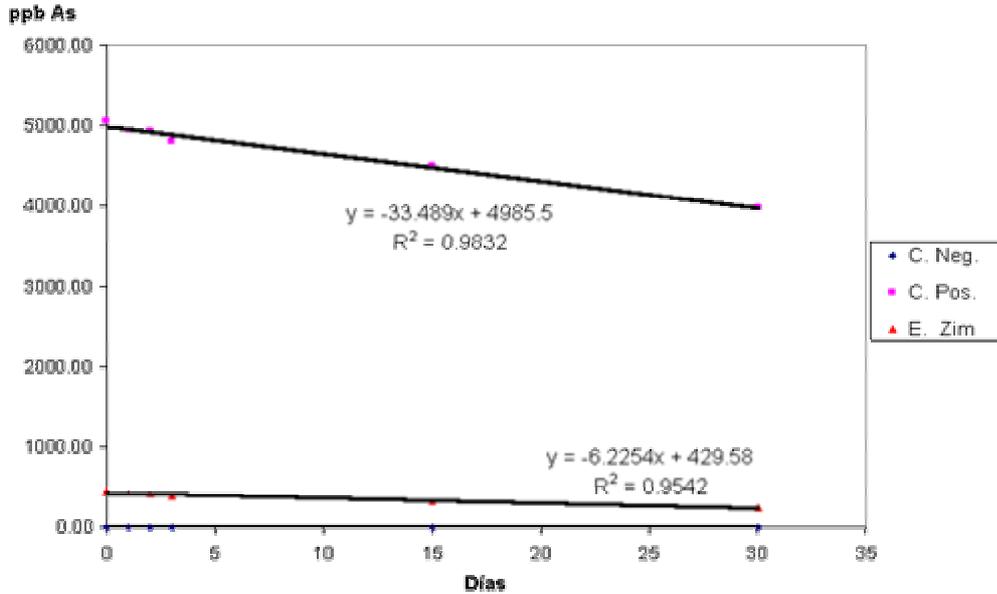
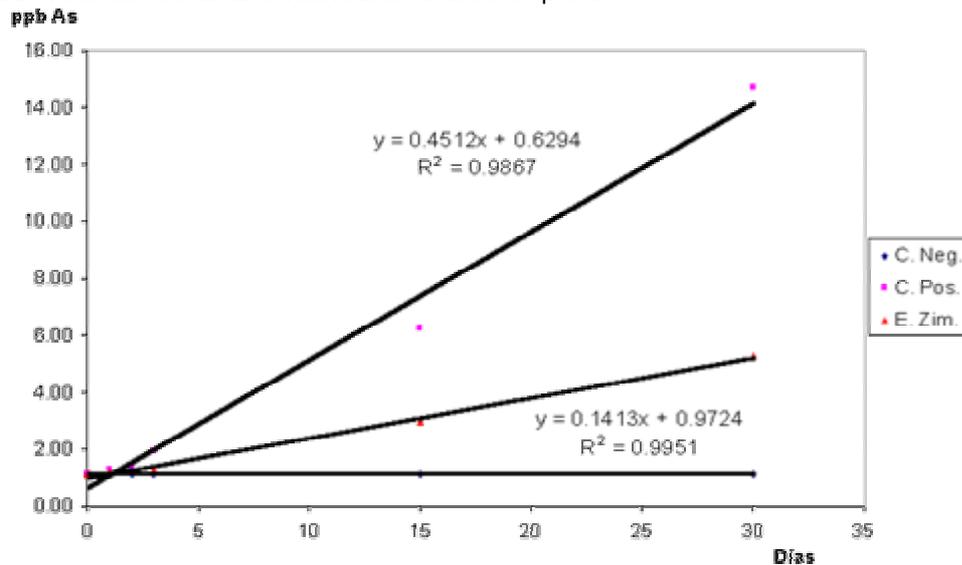


Figura 4. Incremento de las concentraciones de As en peces.



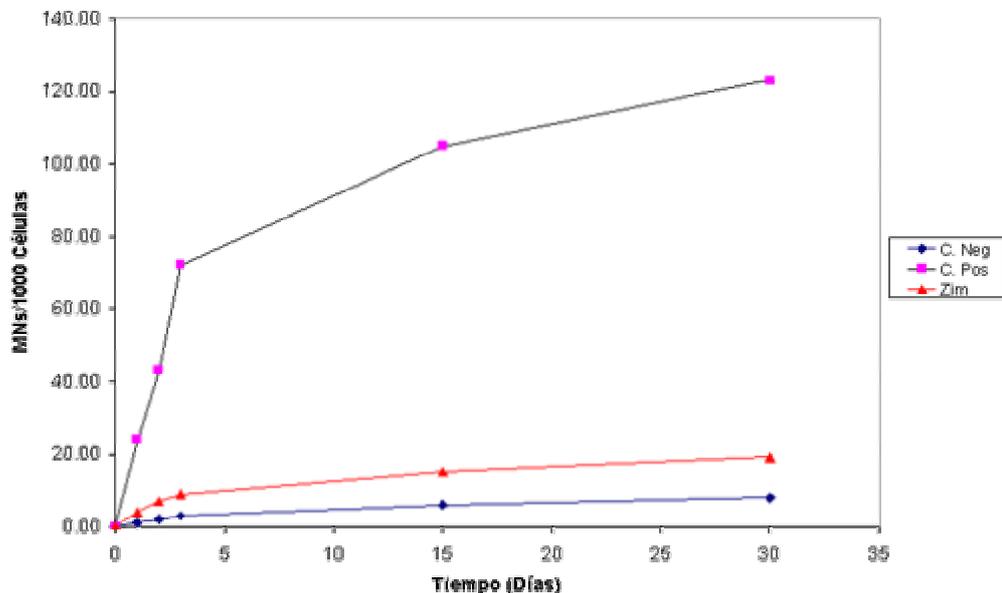
Como se observa se logran regresiones mayores de 0,95 y las pendientes de las líneas rectas de disminuciones en aguas (pendientes negativas) con valores de -33,5 y -6,22 $\mu\text{g/l/día}$ se corresponden con los valores antes discutidos, así como las pendientes de incrementos en peces con valores de 0,45 y 0,14 $\mu\text{g/kg/día}$, estos últimos valores interpretados velocidad de bioacumulación de As en Pez Cebra.

Evaluación de daños genotóxicos

Con relación a la inducción de micronúcleos (MNs) evaluados en células sanguíneas de las branquias de los peces sacrificados, se puede observar que en los controles negativos existe una inducción por generación espontánea de formación de MNs que al término de 30 días es de 8 MNs por cada 1000 células contadas. Por su parte el control positivo de 5000 $\mu\text{g/l}$ de As arrojó una inducción de MNs en células sanguíneas de 15,38 veces mayor que el control negativo, en tanto que para los peces en las aguas del pozo V de Zimapán se apreció un incremento de inducción de MNs de

2,38 veces más con respecto al control negativo. Esto permite corroborar el efecto genotóxico que provoca la presencia de As en aguas de la región de Zimapán. En la Figura 5 se muestran estos resultados.

Figura 5. Evaluación de la inducción de micronúcleos (MNs) en células sanguíneas tomadas de las branquias del Pez Cebra.



Bibliografía

1. Albert Lilia, A. (1997). Introducción a la toxicología ambiental. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, División de Salud y Ambiente, Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud y Secretaría de Ecología. Metepec, Estado de México, México
2. Baez Ramírez, O.A. (2001). Toxicidad del arsénico de fuentes subterráneas naturales de agua potable y presa Fernando Hirirart Balderrama de Zimapán, Hidalgo en *Oreochromis niloticus*. Tesis de maestría. Instituto Politécnico Nacional
3. Coll, J.M. (2001). El transposon SB de salmonidos como vector para transferencia de genes en vertebrados. Investigaciones Agrarias, en prensa
4. del Razo, L.M., M.A. Arellano y M.E. Cebrián. (1990). The oxidation states of arsenic in well-water from a chronic arsenicism area of northern Mexico. *Environ. Pollut.*, 64:143-153
5. Gaiano, N. y N. Hopkins. (1996). Insertional mutagenesis and rapid cloning of essential genes in Zebrafish. *Nature*, 383:829-832
6. Ivics, Z., Z. Izsvak, A. Minter y P.B. Hackett. (1996). Identification of functional domains and evolution of Tc1-like transposable elements. *Proceedings National Academy Sciences, USA*, 93:5008-5013
7. Izsvak, Z., Z. Ivics y P.B. Hackett. (1997). Repetitive elements and their genetic applications in Zebrafish. *Biochemical Cell. Biology*, 75:507-523
8. Lam, W.L., T.S. Lee y W. Gilbert. (1996). Active transposition in zebrafish. *Proceedings National Academy Sciences, USA*, 93:10870-10875
9. Lenihan, J. y W.W. Fletcher. (1977). The chemical environment. En: *Environment and man*. Blackie Glasgow and London. Vol. 6
10. Metelev, V.V., A.I. Kanaev y N.G. Dzasokhova. (1983). *Water toxicology*. Amerind Publishing Co. New Delhi
11. Nölte, J. (1991). Continuous-flow hydride generation combined with conventional nebulization for ICP-AES determination. *Atomic Spectroscopy*, 12(6):199-203
12. Secretaría de Salud. (2000). Norma oficial mexicana NOM-127-SSA1-1994. Agua para uso y consumo humano (potable)