

# Análisis genotóxico de muestras de agua del río *Ramis* (Departamento de Puno, Perú) utilizando eritrocitos de la sangre periférica del pez Cebra (*Danio rerio*)

Genotoxic analysis of water samples from the Ramis river (department of Puno, Peru) using erythrocytes (peripheral blood of Cebra fish (*Danio rerio*))

Recibido: diciembre 12 de 2012 | Revisado: febrero 15 de 2013 | Aceptado: mayo 15 de 2013

CARLOS SCOTTO<sup>\*1</sup>  
JAVIER ALVAREZ<sup>\*1</sup>  
CARLOS LLANOS<sup>\*1</sup>  
OMAR LEYVA<sup>\*1</sup>  
SÁUL SOTOMAYOR<sup>\*2</sup>  
KAROL CHÁVEZ<sup>\*2</sup>  
EBER JUSTO<sup>\*2</sup>  
OLIVER CASSO<sup>\*2</sup>  
CÉSAR LARICO<sup>\*2</sup>  
WILMAR MAYTA<sup>\*\*</sup>  
WILSON SANGA<sup>\*\*\*</sup>

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA  
UNIVERSIDAD NACIONAL FEDERICO VILLARREAL

## ABSTRACT

Mine tailings release several genotoxic compounds into the environment. Neighboring river basins are the most affected, so it is important to determine the quality of its waters. Micronucleus test (MN) quantifies the genotoxic damage produced in erythrocytes of Cebra fish (*Danio rerio*) due to genotoxic compounds present in contaminated rivers. It is because of this that the research analyzed five points in the Ramis River Basin (Department of Puno, Peru) using zebrafish as a biomarker and the MN test; the fish were exposed during 24, 48 and 72 hours to 3 different volumes (1x, 1/2x and 1/4x) for each point sampled. Among the most striking results, after 24 hours of exposure, the sample taken from the Laguna Lunar de Oro (M5) revealed fatal results for the fish (100%) at 1X, while the sample taken from La Pampilla (M4) presented a 23% of MN at 1/2X, and the sample taken at the Taraco river (M1) showed a 12% of MN. The analysis at 48 and 72 h of exposure showed the presence of a maximum of 5% of MN for all samples. We can, therefore, conclude that the MN test serves as an efficient genotoxicity indicator to determining the quality of river water contaminated by mine tailings.

## Keywords::

*Danio rerio*, erythrocyte micronucleus test, genotoxicity, cyclophamide, mine dumps, minero

## RESUMEN

Los relaves mineros liberan al ambiente diversos compuestos genotóxicos. Las cuencas de los ríos aledaños son los más afectados, por ello es importante determinar la calidad de sus aguas. El test de Micronúcleos (MN) cuantifica el daño genotóxico producido en los eritrocitos del pez Cebra (*Danio rerio*) por acción de los compuestos genotóxicos presentes en las aguas de los ríos contaminados. Por lo tanto, la presente investigación analizó cinco puntos de la cuenca del río Ramis (departamento de Puno, Perú) utilizando el test de MN y al pez Cebra como bioindicador, que fueron evaluados a las 24, 48 y 72 horas de exposición a tres diferentes volúmenes (1X, 1/2X y 1/4X) para cada punto muestreado. Entre los resultados más resaltantes, a las 24 h de exposición, tenemos la muestra tomada de la laguna Lunar de Oro (M5) que fue mortal (100%) a 1X; mientras que la muestra tomada de la Pampilla (M4) presentó hasta un 23% de MN a 1/2X; y la muestra del río Taraco (M1) presentó un 12% de MN. El análisis a las 48 y 72 horas de exposición mostró la presencia de un máximo de 5% de MN para todas las muestras. Con esto podemos concluir que el test de MN sirve como ensayo de genotoxicidad rápido y eficaz para determinar la calidad de agua de los ríos contaminados por un relave minero.

## Palabras claves:

*Danio rerio*, eritrocitos, test de micronúcleos, genotoxicidad, ciclofosfámid, relave

\*\* Laboratorio de Mejora Genética y Reproducción Animal, Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas, Universidad Nacional Federico Villarreal, Calle Río Chepén s/n. El Agustino. Lima -Perú. Email: carlosscottoespinoza@gmail.com

\*2 Facultad de Ingenierías y Ciencias Puras, Universidad Andina Néstor Cáceres Velásquez, Pasaje la Cultura, Edificio el Campin No. 305, Tercer piso. Juliaca - Perú. Email: inka\_man@hotmail.com

\*\*\*\* Dirección General de Asuntos Ambientales Mineros del Ministerio de Energía y Minas. Av. Las Artes Sur 260. San Borja. Lima. Email: wsanga@hotmail.com

## Introducción

Los estudios de genotoxicidad y/o teratogenia que evalúen y determinen la calidad del agua de los ríos, lagos, humedales, bofedales u otras fuentes de agua en el Perú; y que potencialmente puedan afectar a la salud humana o animal, y contaminar al medioambiente son muy escasos o inexistentes. Actualmente, existe la presencia de contaminantes mineros como los metales pesados (metil mercurio, sulfuro de plomo, arsénico, cadmio y otros) en los ambientes acuáticos. Se sospecha que sean los factores causantes en cascada de daño a nivel genético molecular, cromosómico, celular, embrionario y/o fetal. Muchas veces “imperceptible” o de detección tardía cuando el daño al organismo ya se produjo irremediablemente causando incluso la muerte del individuo o de la población.

Esta investigación utilizó al pez Cebra (*Danio rerio*), el cual es un animal modelo de laboratorio universal y un vertebrado filogenéticamente muy cercano al humano, por lo que cualquier daño producido mediante diversos contaminantes acuáticos, permiten su extrapolación probada al humano para obtener resultados confiables e inmediatos. Además, son peces fáciles de manipular y soportan grandes números en poco espacio; y poseen una alta capacidad reproductiva (entre 300-400 huevos por puesta), lo cual facilita realizar diferentes experimentos con varias repeticiones por contaminante analizado.

Un rasgo anatómico muy importante para esta propuesta es que los peces poseen glóbulos rojos con núcleo, el cual contiene el material genético o ADN visible por simple tinción lo que hace posible observar fácilmente cualquier efecto genotóxico adverso en forma directa por microscopía y evaluar rápidamente los efectos nocivos de un contaminante acuático de interés (Anitha, Chandra, Gopinath, y Durairaj, 2000); Llanos, Monteza y Scotto, 2013; Scarpato, Migliore, Alfinito-Cognetti, y Barale 1990; De Flora, Vigano, D'Agostini Camoirano, Bagnasco, Bennicelli, Melodia, y

Arillo 1993) . A diferencia de otras técnicas que utilizan técnicas moleculares de última generación para la detección de los mismos efectos genotóxicos, pero que son muy costosos en reactivos y equipamiento.

Los genotóxicos mineros en general, penetran hasta el núcleo de las células humanas y de los animales y dañan su ADN (mutaciones en los genes), lo que a su vez daña a los cromosomas y esto produce alteraciones en el embrión (teratogenia), que finalmente se traduce en daño en el individuo adulto.

Heddle (1973) y Schmid (1975) fueron los primeros investigadores que propusieron un ensayo alternativo y simple para determinar el daño nuclear y cromosómico in vivo mediante el conteo de micronúcleos (MN) en diferentes poblaciones celulares. Los peces por representar varios niveles de la cadena alimenticia acuática son excelentes indicadores de la contaminación del agua, puesto que pueden bioacumular y biomagnificar a través de ella altas concentraciones de estos elementos. Un ejemplo claro de esto es el mercurio, el cual es bioamplificado casi en su totalidad por los peces en forma de metilmercurio sustancia altamente tóxica y de fácil fijación en los tejidos musculares y adiposos, convirtiéndola en elemento clave en el transporte de este metal en las cadenas alimentarias acuáticas que culminan en el consumo humano (CEPIS, 1978; WHO, 2003; Álvarez-León, 2009; Reish & Oshida, 1987).

El pez Cebra (*Danio rerio*) Hamilton, (1822) constituye hoy en día, el modelo animal vertebrado acuático por excelencia para la genética, embriología, ecología, reproducción y otras ramas de la ciencia. Varios rasgos inherentes de su biología los hacen ideales para ser utilizados como “Biosensores de la contaminación ambiental” : viven en grandes grupos de hasta seis individuos por litro y en poco espacio en acuarios acondicionados a temperaturas a 26 °C. Es el pez más resistente y fácil de criar entre los ovíparos sin muchos requisitos estrictos en cuanto a su mantenimiento y alimentación. Obtiene la madurez

sexual entre los 3 y 4 meses. Son fáciles de sexar. Es sencillo hacerlos desovar y producen alrededor de 300 a 400 embriones. Sus embriones son transparentes y se desarrollan completamente en 72 horas (Rocha et al., 2002). Además, poseen glóbulos rojos sanguíneos nucleados (con ADN) a diferencia de los mamíferos que son anucleados (Sprague et al., 2001; Hill, 2004; McHugh, 2001). Y un aspecto importante es que permiten realizar estudios alométricos, es decir sus resultados al ser un vertebrado es extrapolable a los humanos (“Lo que le suceda al núcleo o al embrión del pez Cebra, le sucederá lo mismo al del humano”).

Por lo tanto, por las características biológicas y fisiológicas óptimas, esta investigación propone al pez Cebra como una especie dulceacuícola para ser utilizada como bioindica-

dor en ensayos toxicológicos de diversos contaminantes mineros del agua.

### Método

La presente investigación se desarrolló entre enero y noviembre del año 2012. Los peces fueron seleccionados del stock de *Danio rerio* pertenecientes al laboratorio de Mejora Genética y Reproducción Animal de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemática de la Universidad Nacional Federico Villarreal, ubicado en Calle río Chepén s/n Cuadra N° 1, El Agustino, Lima, Perú.

### Ubicación geográfica y toma de muestras de agua a lo largo de la cuenca del río Ramis (Puno, Perú)

Las muestras colectadas fueron realizadas en: (Figura 1):

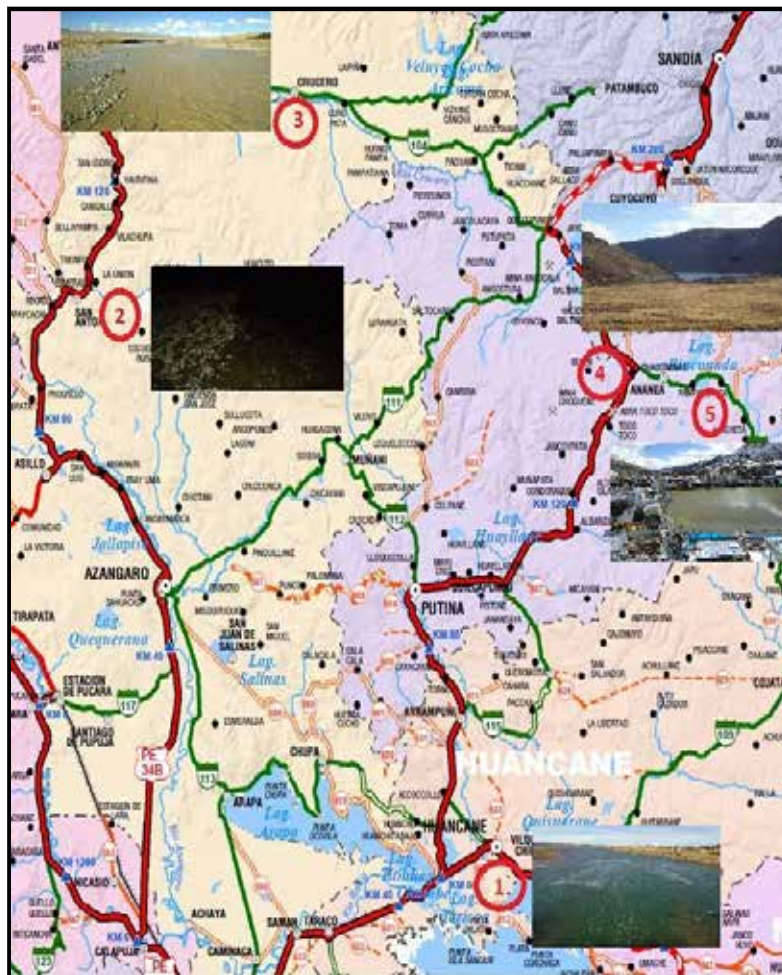


Figura 1. Ubicación de las cinco zonas de muestreo a lo largo del río Ramis en el departamento de Puno.

- Muestra 1 (M1): Microcuenca del río Taraco (distrito de Taraco – puente rumbo a Chupa). (Latitud: 15°34'48"S, Longitud: 70°04'59"O).
- Muestra 2 (M2): Microcuenca del río San Antón (distrito San Antón). (Latitud: 14°36'92"S, Longitud: 70°19'17"O).
- Muestra 3 (M3): Microcuenca del río Crucero (Latitud: 14°20'44.32"S, Longitud: 70°0'57.76"O).
- Muestra 4 (M4): Río Ramis (distrito de Ananea). (Latitud: 14°40'25.91"S, Longitud: 69°31'43.35"O).
- Muestra 5 (M5): laguna Lunar de Oro (distrito de Ananea). (Latitud: 14°38'7.57"S, Longitud: 69°26'18.91"O).

### Materiales

- 5 muestras de agua de relave (M1, M2, M3, M4 y M5)
- 48 peces Cebra adulto (*Danio rerio*)
- 2 acuarios de 40 litros
- 2 termostatos de 40 Watts
- 45 envases plástico de 1 litro
- Alimento seco importado de la marca SERA
- Microscopio Bilocular Plan Acromático con cámara digital incorporada
- Refrigeradora
- Compresora de aire
- Solución de Giemsa al 10%
- Láminas portaobjetos
- Jarra Couplins
- Medicamentos varios
- Metanol absoluto
- Agua mineral no gasificada
- Agua destilada

### Procesamiento de muestras

El presente estudio requirió de una muestra total de 48 peces adulto Cebra (*Danio rerio*).

Estos fueron aclimatados en dos acuarios de 40 litros a temperatura controlada de 26°C con termostatos de 40W que sirve como componente de un sistema de control simple que abre o cierra un circuito eléctrico en función de la temperatura y una compresora de aire que oxigenó constantemente los acuarios.

Se les alimentó ad *libitum* con alimento seco importados de la marca SERA.

Cada muestra de agua fue fraccionada en 3 volúmenes (1X, 1/2X y 1/4X) complementándose con agua mineral no gasificada para obtener un volumen total de 200 mL por envase plástico, a diferentes tiempos de exposición (24, 48 y 72 horas) con un control de agua mineral no gasificada. Para ello, se expuso cada muestra de agua del río Ramis a un volumen y tiempo de exposición establecidos.

Del universo analizado se realizó el conteo directo de los glóbulos rojos afectados observándose diferentes tipos de MN por cada una de las fracciones de volúmenes obtenidos por muestra. Posterior al conteo de MN se evaluó estadísticamente las muestras de los diferentes tipos de MN presentes en los eritrocitos de la sangre periférica del pez Cebra (*Danio rerio*) ante la acción de los agentes genotóxicos presentes en las muestras de agua de la zona minera de río Ramis (departamento de Puno) sobre los eritrocitos de la sangre periférica del pez Cebra (*Danio rerio*). Se consideró como daño genotóxico positivo la presencia de un micronúcleo por eritrocito (MN1), dos micronúcleos por eritrocitos (MN2), núcleo en forma arriñonada (MN3), con membrana nuclear rota (MN4) o con núcleo fragmentado (MN5) (Tabla 1).

**Tabla 1**

*Tipos de micronúcleos producidos por daño genotóxico sobre los glóbulos rojos en el pez Cebra (*Danio rerio*)*

Célula con MN1	Célula con MN2	Células con MN3	Células con MN4	Células con MN5
				

## Obtención de Micronúcleos

Con la finalidad de obtener la sangre periférica, se sacrificó cada pez Cebra (expuesto al volumen establecido para cada tiempo de control) realizando un corte en la parte anterior del mismo entre el opérculo y las aletas pectorales. (Figura 2).



Figura 2. Sacrificio del pez Cebra

Se colectó la sangre periférica y colocó una gota de la misma en un extremo de la lámina e inmediatamente se realizó el frotis extendiendo la sangre en la lámina portaobjetos (Figura 3). Se dejó secar el portaobjeto con el frotis correspondiente para cada muestra a temperatura ambiente durante 15 minutos (Figura 4). Se fijaron las muestras sumergiéndolas por 15 minutos en metanol absoluto refrigerado (4°C), luego se procedió a retirarlas y dejarlas secar durante 15 minutos a temperatura ambiente (Figura 5).



Figura 3. Frontis de sangre periférica

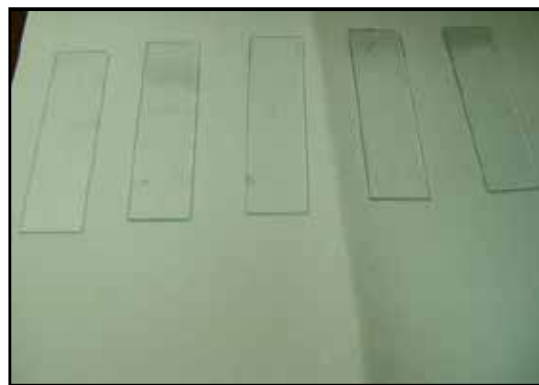


Figura 4. Secado de láminas con sangre



Figura 5. Fijación de muestras en metanol frío

Después las muestras se colorearon con GIEMSA al 10% durante ocho minutos (Figura 6). Posteriormente, las muestras se lavaron superficialmente con agua destilada para retirar el exceso de colorante y se dejó secar por una hora a temperatura ambiente (Figura 7 y Figura 8). Por último, se procedió a la observación microscópica de las muestras para el conteo final, utilizando objetivos de 400X (Figura 9) y 1000X (Figura 10). En esta última observación se le agregó aceite de inmersión a la muestra 8.

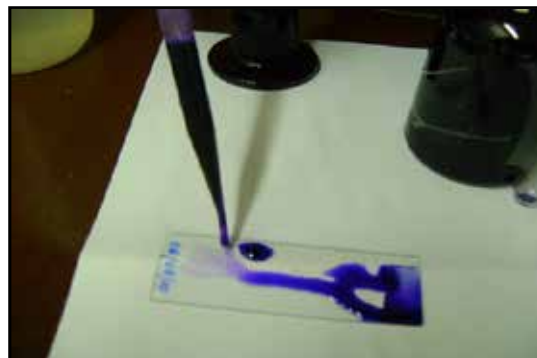


Figura 6. Coloración de la muestra



Figura 7. Lavado de las muestras con agua destilada

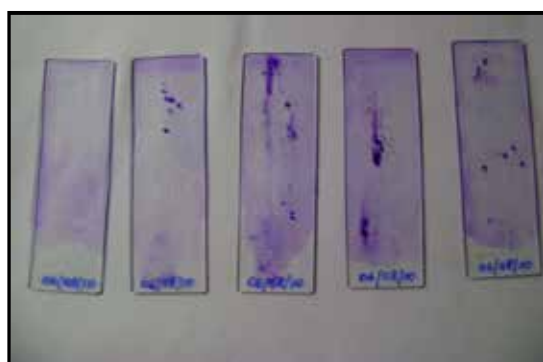


Figura 8. Secado de las muestras coloreadas

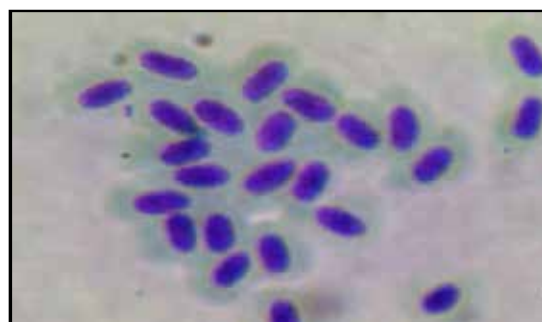


Figura 9. Eritrocitos nucleados sin MN a 400X de aumento (Control)

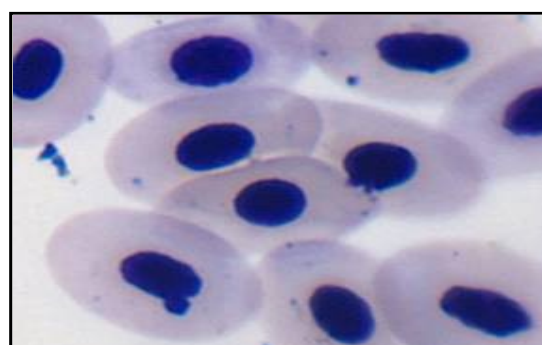


Figura 10. Eritrocitos nucleados sin MN a 1000X de aumento (Control)

## Resultados

Las siguientes tablas muestran el número total de MN contabilizados a diferentes tiempos de

exposición de las muestras de agua procedentes del río Ramis. La Tabla 2 muestra el número total de eritrocitos con daño genotóxico y los tipos de MN presentes en ellos a las 24 horas.

Tabla 2

*Tipos de MN producidos por daño genotóxico sobre los eritrocitos en el pez Cebra (Danio rerio) a las 24 horas*

Muestras	Tipos de MN obtenidos a 24 h						Total
	N.N.	MN 1	MN 2	MN 3	MN 4	MN 5	
M1 (1/4)	94	0	0	0	4	2	100
M1 (1/2)	92	0	0	0	8	0	100
M1	88	0	0	2	8	2	100
M2 (1/4)	98	1	0	0	0	1	100
M2 (1/2)	93	0	1	1	3	2	100
M2	92	0	0	3	1	4	100
M3 (1/4)	95	2	0	1	2	0	100
M3 (1/2)	94	0	0	0	3	3	100
M3	No se observaron eritrocitos integros						0
M4 (1/4)	96	0	0	0	4	0	100
M4 (1/2)	77	0	0	0	15	8	100
M4	No se observaron eritrocitos						0
M5 (1/4)	89	0	0	0	8	3	100
M5 (1/2)	No se observaron eritrocitos integros						0
M5	Pez muerto antes de las 24 h						0
Control	100	0	0	0	0	0	100

N.N. = No hay presencia de micronúcleos  
 MN1 = 1 MN por eritrocito  
 MN2 = 2 MN por eritrocito

MN3 = Núcleo en forma arriñonada  
 MN4 = Membrana nuclear rota  
 MN5 = Núcleo fragmentado

La Tabla 3 muestra el número total de eritrocitos con daño genotóxico y los tipos de MN presentes en ellos a las 48 horas.

**Tabla 3**

*Tipos de MN producidos por daño genotóxico sobre los eritrocitos en el pez Cebra (Danio rerio) a las 48 horas*

Muestras	Tipos de MN obtenidos a 48 h						Total
	N.N.	MN 1	MN 2	MN 3	MN 4	MN 5	
M1 (1/4)	98	2	0	0	0	0	100
M1 (1/2)	100	0	0	0	0	0	100
M1	100	0	0	0	0	0	100
M2 (1/4)	98	1	0	0	1	0	100
M2 (1/2)	97	0	0	3	0	0	100
M2	98	0	0	2	0	0	100
M3 (1/4)	98	1	0	0	1	0	100
M3 (1/2)	95	4	0	0	1	0	100
M3	99	1	0	0	0	0	100
M4 (1/4)	97	2	0	1	0	0	100
M4 (1/2)	96	0	0	1	3	0	100
M4	98	1	0	0	1	0	100
M5 (1/4)	96	0	0	1	2	1	100
M5 (1/2)	97	0	0	2	1	0	100
M5	Pez muerto antes de las 24 h						0
Control	100	0	0	0	0	0	100

N.N. = No hay presencia de micronúcleos

MN1 = 1 MN por eritrocito

MN2 = 2 MN por eritrocito

MN3 = Núcleo en forma arriñonada

MN4 = Membrana nuclear rota

MN5 = Núcleo fragmentado

La Tabla 4 muestra el número total de eritrocitos con daño genotóxico y los tipos de MN presentes en ellos a las 72 horas

**Tabla 4**

*Tipos de MN producidos por daño genotóxico sobre los eritrocitos en el pez Cebra (Danio rerio) a las 72 horas*

Muestras	Tipos de MN obtenidos a 72 h						Total
	N.N.	MN 1	MN 2	MN 3	MN 4	MN 5	
M1 (1/4)	95	2	0	3	0	0	100
M1 (1/2)	98	1	0	1	0	0	100
M1	100	0	0	0	0	0	100
M2 (1/4)	97	3	0	0	0	0	100
M2 (1/2)	98	2	0	0	0	0	100
M2	100	0	0	0	0	0	100
M3 (1/4)	98	2	0	0	0	0	100
M3 (1/2)	100	0	0	0	0	0	100
M3	99	1	0	0	0	0	100
M4 (1/4)	97	3	0	0	0	0	100
M4 (1/2)	97	3	0	0	0	0	100
M4	100	0	0	0	0	0	100
M5 (1/4)	98	2	0	0	0	0	100
M5 (1/2)	No se observaron eritrocitos						0
M5	Pez muerto antes de las 24 h						0
Control	100	0	0	0	0	0	100

N.N. = No hay presencia de micronúcleos

MN1 = 1 MN por eritrocito

MN2 = 2 MN por eritrocito

MN3 = Núcleo en forma arriñonada

MN4 = Membrana nuclear rota

MN5 = Núcleo fragmentado

Para la muestra 1, a una concentración normal de la muestra, de cien células contabilizadas con repetición se observó hasta ocho células con núcleos membrana nuclear rota (Tipo IV), hasta 2 células con núcleo fragmentados (Tipo V) y 2 células núcleo arriñonado (Tipo III). Siendo negativo para los tipos I y II. (Figura 11).

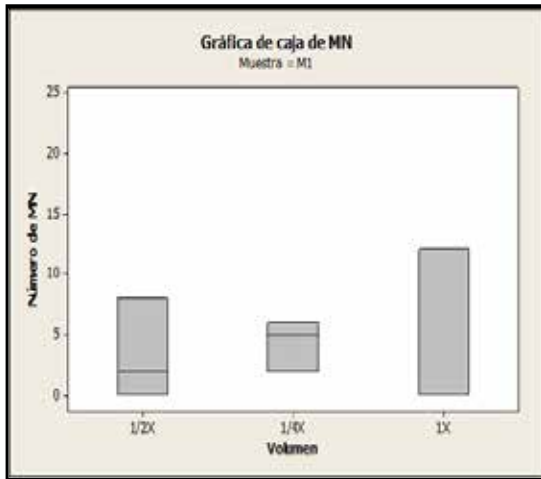


Figura 11. Diagrama de cajas representando el número y tipo de MN por tiempo de exposición en muestras de agua de la M1

Para la muestra 2, a una concentración de 1/2 de la muestra, de cien células contabilizadas con repetición se observó hasta dos células con 1 MN (Tipo I), hasta 3 células con membrana nuclear rota (Tipo IV), y 2 células con núcleos fragmentados (Tipo V), y solo 1 célula con núcleo arriñonado, y negativo para las células con 2 MN (Tipo II). (Figura 12).

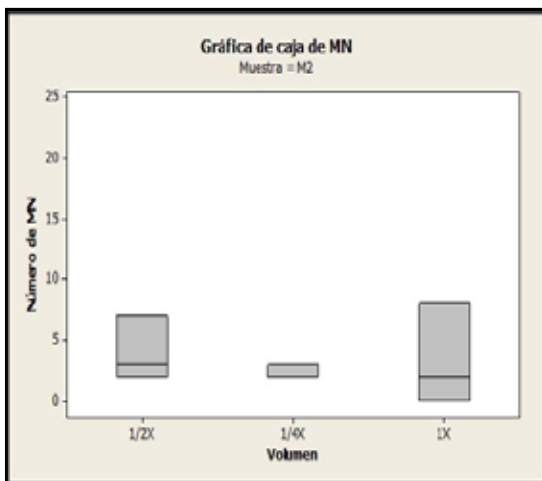


Figura 12. Diagrama de cajas representando el número y tipo de MN por tiempo de exposición en muestras de agua de la M2

Para la muestra 3, a una concentración de 1/2 de la muestra, de cien células contabilizadas con repetición se observó entre 0 a 4 células con 1 MN (Tipo I), de 1 a 3 células con núcleo arriñonado (Tipo III), de 0 a 3 MN tipo III y IV. Y negativo para el tipo II. (Figura N°13). Para la muestra 4, a una concentración de 1/2 de la muestra, de cien células contabilizadas con repetición se observó entre 3 a 15 células con membrana nuclear rota (Tipo IV) y entre 0 a 8 células con núcleo arriñonado (Tipo III). Siendo negativos los demás tipos de MN. (Figura 14).

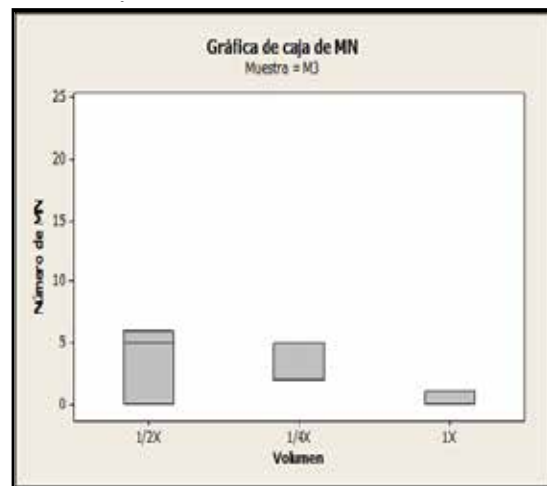


Figura 13. Diagrama de cajas representando el número y tipo de MN por tiempo de exposición en muestras de agua de la M3

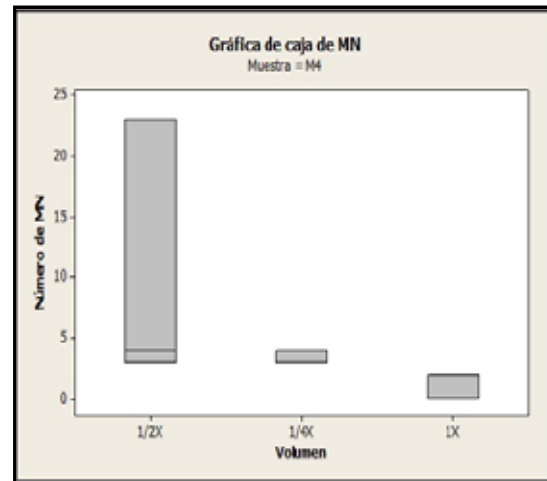


Figura 14. Diagrama de cajas representando el número y tipo de MN por tiempo de exposición en muestras de agua de la M4

Para la muestra 5, a una concentración de 1/4 de la muestra, de cien células contabilizadas con repetición se observó entre 1



a 3 células con núcleos fragmentados (Tipo V), 2 a 8 células con membrana nuclear rota (Tipo IV) y entre 0 a 2 células con 1 MN (Tipo I). Y ninguna célula con 2 MN (Tipo II), ni núcleo arriñonado (Tipo III). (Figura 15)

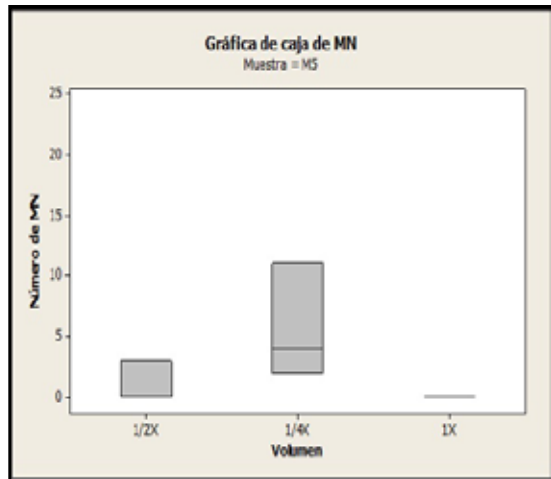


Figura 15: Diagrama de cajas representando el número y tipo de MN por tiempo de exposición en muestras de agua de la M4

## Discusión

Las investigaciones relacionadas con el tema de la genotoxicidad adquieren cada vez mayor importancia a nivel local, nacional y mundial, debido al creciente deterioro del ambiente al que se encuentra expuesto por las diferentes actividades del hombre moderno (Thomann, 1982). El uso de los ensayos de genotoxicidad en el pez Cebra propuesto en esta investigación, constituye el primer paso que asegure la toma de medidas de bioseguridad apropiadas, y permita realizar los análisis y la gestión de riesgos a priori en el componente biológico ante un determinado contaminante del agua (Agencia AUPEC, 1998; Acta Toxicológica Argentina, 2007; ACGIH. 2010).

En el año 2012 por Resolución Ministerial N° 225-2012- MINAM el Ministerio del Ambiente aprobó el nuevo Plan de Estándares de Calidad Ambiental (ECA) y Límites Máximos Permisibles (LMP) para el período 2012-2013 para el Perú, donde se realiza una corporación o revisión de nuevos ECA priorizados para agua en lo que respecta a los aceites y grasas, cianuro, cloruros, nitratos,

nitritos, nitrógeno amoniacal, sólidos totales en suspensión, sulfatos, sulfuros, fosfatos, fósforo total, antimonio, arsénico, cadmio, manganeso, mercurio, níquel, termotolerantes y organolépticos. Así mismo, incorpora como novedad a la norma, la elaboración del ECA para agua subterránea que antes solo existía para aguas superficiales.

Para los LMP relacionados al agua, en el sector minero se deberá hacer una revisión del LMP de las emisiones de las actividades mineras y metalúrgicas. Para el sector industrial se deberá elaborar los LMP de los efluentes y emisiones para industria petroquímica intermedia y avanzada; para la industria de la imprenta, para las actividades del subsector industria y para la industria siderúrgica. Para el sector agricultura se deberá elaborar los LMP de los efluentes de las actividades agroindustriales, tales como canales y plantas de beneficio.

Y para el sector vivienda se ha incorporado la elaboración de LMP de efluentes de plantas desalinizadoras. De este modo, actualmente la legislación y normatividad peruana actual están siendo revisadas y actualizadas en sus Estándares de Calidad Ambiental (ECA) y sus Límites Máximos Permisibles (LMP) para que estén acorde a los estándares internacionales y se evalúe primerolaseguridad biológica detodo tipo de producto potencialmente peligroso.

Por lo expuesto, la implementación de la nueva normatividad apunta a muy corto plazo al uso de nuevos bioindicadores ambientales, tanto en animales como en plantas, para la determinación de los contaminantes del agua en territorio peruano los cuales serán utilizados como una nueva herramienta de biomonitoreo para complementar los nuevos ECAs y LMPs a implementarse transversalmente en los estudios de impacto ambiental en diferentes sectores de interés.

Estos bioindicadores deberán ser elegidos por su rápida reproducción en pequeños espacios que permita tener grandes stock de

organismos para diversos ensayos y repeticiones, y que no representen varias semanas o meses de análisis, que sean económicos en su crianza, y que se posea un amplio conocimiento de su biología para su facilidad de manejo laboratorial y ser adaptables a diversos laboratorios para lograr su replicación. A nivel de bioensayos laboratoriales en el Perú, se ha recomendado el uso de los siguientes organismos invertebrados: los crustáceos *Artemia* sp. y *Daphnia magna*, el insecto *Chironomus calligraphus* y el anélido *Paragrellus redivivus*. Y el uso de los siguientes organismos vertebrados: el pez Cebra (*Danio rerio*), la trucha Arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) y el ratón (*Mus musculus*). Y en vegetales el uso de la cebolla (*Allium cepa*), la haba (*Phaseolus* sp.) y la microalga *Chrolorella* sp.

La aplicación del ensayo de micronúcleos está siendo utilizada para el monitoreo de la contaminación de los ambientes acuáticos junto con un biocontrol para la detección de la genotoxicidad. Teniendo como material biológico a los eritrocitos nucleados (presencia de ADN nuclear) de la sangre periférica del pez Cebra (*Danio rerio*) se detectó el daño celular en forma directa por microscopia permitiendo evaluar rápidamente (24 a 72 horas) los efectos nocivos de un contaminante acuático de interés que otros ensayos no pueden hacerlo. Es un primer paso para alertar con el tiempo el padecer mutaciones, alteraciones cromosómicas, desarrollar malformaciones embrionarias o fetales y causar finalmente la mortalidad en un ambiente acuático contaminado con metales pesados.

### Conclusiones

- Para la muestra del río Taraco (M1) se observó el mayor efecto genotóxico (12%) sobre los glóbulos rojos del pez Cebra (*Danio rerio*) en el volumen de X a una ex-

posición de 24 horas. Las mediciones a las 48 y 72 horas revelaron índices de MN de 2% y hasta 5%, respectivamente.

- Para la muestra del río San Antón (M2) se observó el mayor efecto genotóxico (8%) sobre los glóbulos rojos del pez Cebra (*Danio rerio*) en el volumen de X a una exposición de 24 horas. Las mediciones a las 48 y 72 horas revelaron índices de MN de hasta 3%, en ambos casos.
- Para la muestra del río Crucero (M3) se observó el mayor efecto genotóxico (6%) sobre los glóbulos rojos del pez Cebra (*Danio rerio*) en el volumen de 1/2 X a una exposición de 24 horas. Las mediciones a las 48 y 72 horas revelaron índices de MN de 4% y hasta 2%, respectivamente.
- Para la muestra de Pampilla (M4) se observó el mayor efecto genotóxico (23%) sobre los glóbulos rojos del pez Cebra (*Danio rerio*) en el volumen de 1/2X a una exposición de 24 horas. Las mediciones a las 48 y 72 horas revelaron índices de MN hasta 3%, en ambos casos.
- Para la muestra de la laguna Lunar de Oro (M5) se observó el mayor efecto genotóxico (11%) sobre los glóbulos rojos del pez Cebra (*Danio rerio*) en el volumen de X a una exposición de 24 horas. Las mediciones a las 48 y 72 horas revelaron índices de MN de 3% y hasta 2%, respectivamente.
- A exposiciones de 24 o 48 horas el daño genotóxico sobre los glóbulos rojos del pez Cebra siguió el siguiente orden creciente: M5>M4>M3>M2>M1. Por lo que la tendencia en el río Ramis es de presentar más daño genotóxico a medida que se avanza río arriba hacia la zona de minería informal presente a lo largo de la cuenca estudiada.

## Referencias

- Álvarez-León, R. (2009). *Efectos del aprovechamiento de metales preciosos en Colombia: Los metales pesados en las aguas continentales, estuarinas y marinas*. Simposio efectuado en el Segundo Congreso Internacional sobre geología y minería en la ordenación del territorio y en el desarrollo, Colombia.
- American Conference of Governmental Industrial Hygienists [ACGIH]. (2010) Recuperado de <http://www.acgih.org/store/ProductDetail.cfm?id=652>
- Anitha, B., Chandra, Gopinath, P y Durairaj, G. (2000). Genotoxicity evaluation of heat shock in gold fish (*Carassius auratus*). *Mutation Research*, 469, 1-8.
- CEPIS. (2001). (Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente). *Manual de evaluación y manejo de sustancias tóxicas en aguas superficiales*. Sección 1: Perspectiva Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente. OPS/CEPIS/PUB/01.65;2001.
- De Flora, S., Vigano, F., D'Agostini, A., Camoirano, M., Bagnasco, C., Bennicelli, F., Melodia, F. y Arillo, A. (1993). Multiple genotoxicity biomarkers in fish exposed in situ to polluted river water. *Mutation Research*, 319, 167-177.
- Heddle, J. (1973). A rapid in vivo test for chromosomal damage. *Mutation Research*, 18,187-190.
- Hill, A., Teraoka, H., Heideman, W. y Peterson, R. (2004). Cebra fish as a Model Vertebrate for Investigating Chemical Toxicity. *Toxicological Sciences*, 86(1), 6-19.
- Llanos, C., Monteza, C y Scotto, C. (2013). *Toxicidad aguda del etanol y del peróxido de hidrógeno sobre Danio rerio (Cypriniformes Cyprinidae): Efecto genotóxico en eritócitos de sangre periférica en pez cebra*. En Resúmenes de la XXI de la Reunión Científica del Instituto de Investigación de Ciencias Biológicas Antonio Raimondi (ICBAR), Lima.
- McHugh, J. (2001). Mechanistic considerations in small fish carcinogenity testing. *Ilas Journal*, 42(4), 274-284.
- Ministerio del Ambiente. (30 de agosto 2012). Resolución Ministerial N° 225-2012-MINAM. *El Peruano*,11-12.
- Parma, Julieta. (2007). Biomarcadores de contaminación por compuestos orgánicos y metales pesados en fauna íctica neotropical. Acta Toxicológica Argentina. Recuperado de [http://www.ataonline.org.ar/bibliotecavirtual/acta\\_toxicologica/VOL15supl.pdf](http://www.ataonline.org.ar/bibliotecavirtual/acta_toxicologica/VOL15supl.pdf)
- Reish, D. y Oshida, P. (1987). Manual of Methods in Aquatic Environment Research. Part. 10. Short Term Static Bioassays. *FAO Fisheries Technical Paper (247)*, 1-62.
- Rocha, A., Ruiz, S. y Coll, J. (2002). Método sencillo para producir huevos embrionados de pez Cebra. *Investigación agraria: Producción y sanidad animales*, 17, 1-2.

- Salas, H., Lobos, J., Dos Santos, J., De Fernícola, N. (2001). Sección 1 Perspectiva. En Organización Panamericana de la Salud (Ed.), *Manual de evaluación y manejo de sustancias tóxicas en aguas superficiales*. Lima: Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente.
- Scarpato, R., Migliore, L., Alfinito-Cognetti, L y Barale, R. (1990). Induction of micronuclei in gill tissue of *Mytilus galloprovincialis* exposed to polluted marine waters. *Marine Pollution Bulletin*, 21(2), 74-80.
- Schmid, W. (1975) . The micronucleus test. *Mutation Research*, 31, 9-15.
- Sprague, J., Doerry, E., Douglas, S., Westerfield, M. y ZFIN Group. (2001). The Cebra fish information network (ZFIN): a resource for genetic, genomic and developmental research. *Nucleic Acids Research*, 29(1), 87-90.
- Thomann, R. (1982). *Physico-chemical and ecological modeling of the fate of toxic substances in natural water systems*. En the Conference on Modelling the Fate and Effect of Toxic Substances in the Environment. Copenhagen, Denmark.
- World Health Organization [WHO]. (1983) *Report of the Interregional Review Meeting on Water Quality Monitoring Programmes, Burlington (Ontario)*.