

***ACTIVIDAD MUTAGÉNICA ASOCIADA A LA
CONTAMINACIÓN POR EFLUENTES DE CURTIEMBRES EN
AGUAS Y SEDIMENTOS DEL RÍO CERRITO***



GINA JENNIFER COLORADO-GUERRERO Bsc

UNIVERSIDAD DEL VALLE, SANTIAGO DE CALI
FACULTAD DE SALUD
ESCUELA DE CIENCIAS BÁSICAS
POSTGRADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
2018

***ACTIVIDAD MUTAGÉNICA ASOCIADA A LA
CONTAMINACIÓN POR EFLUENTES DE CURTIEMBRES EN
AGUAS Y SEDIMENTOS DEL RÍO CERRITO***



GINA JENNIFER COLORADO-GUERRERO Bsc

Trabajo de investigación presentado para optar al título de magister en Ciencias-
Biomédicas

Director

NEYLA BENÍTEZ CAMPO

Ph.D. Ciencias Ambientales

Codirector

FERNANDO ENRIQUE LARMAT GONZÁLEZ

Ph.D. Química

UNIVERSIDAD DEL VALLE, SANTIAGO DE CALI
FACULTAD DE SALUD
ESCUELA DE CIENCIAS BÁSICAS
POSTGRADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
2018

Nota de aceptación:

Los integrantes del jurado, designados por el comité de postgrado en Ciencias Biomédicas de la Universidad del Valle, abajo firmantes, revisaron y aprobaron el presente trabajo de investigación presentado por el estudiante **GINA JENNIFER COLORADO GUERRERO**, para optar al título de magister en Ciencias Biomédicas, el día ____ de _____ de 2018.

Firma del jurado

Firma del jurado

Firma del jurado

DEDICATORIA

“Gracias a Dios y a su hijo Jesús, por estar a mi lado en todo momento, incrementar mi Fe, brindándome la fortaleza suficiente para tener Esperanza y poner en mi camino personas maravillosas, que me apoyaron para alcanzar esta meta”

A mis Padres y hermanos, gracias por permanecer a mi lado día a día brindándome su amor y compañía, transmitiéndome su espíritu de lucha y las ganas de triunfar.

*A mi Esposo, por su apoyo incondicional y ser el gestor para que iniciará este camino.
A mi hijo Joseph Adrián, por ser el corazón y el amor de mi vida, él que me impulsa a seguir, a luchar y a soñar.*

AGRADECIMIENTOS

Universidad del Valle, mi *Alma Mater*, que me ha brindado la formación académica y parte de la experiencia profesional que hoy conservo.

Laboratorio Ambiental, Corporación Autónoma Regional del Valle del Cauca-CVC, por integrarme a sus actividades y a su grupo de profesionales, brindándome toda la colaboración para la realización del programa de monitoreos, en el río Cerrito.

Laboratorios de la Universidad del Valle: Laboratorio de Electroquímica y Absorción atómica del departamento de Química, por su confianza y colaboración para recibirme como una integrante más de su grupo, contando con su asesoría y guía, para realizar el componente químico de la investigación. *Laboratorio de Investigaciones Microbiológicas (LIM)* y el *Laboratorio de Docencia del departamento de Biología*, pues fueron el pilar para la realización de mi trabajo experimental, contando con su apoyo profesional e inmensa colaboración.

A mi directora, la Dra. *Neyla Benítez-Campo*, mis agradecimientos infinitos con todo mi corazón, por acompañarme durante este proceso, por ejercer diferentes roles durante este recorrido: guía, mentora en la academia y amiga para fortalecer mi caminar. Por su gran humanidad y bondad, impulsándome en cada momento; enseñando, que las metas y los triunfos, están únicamente en nuestras manos.

A mi codirector, Dr. Fernando Enrique Larmat González, por su simpatía y por su gran apoyo, favoreciendo siempre e impulsándome a continuar y alcanzar la meta propuesta.

A la Ing. *Luisa Marina Baena*; directora del Laboratorio Ambiental de la CVC, quien escuchó atenta mi propuesta de investigación, y con su colaboración, se me permitió vincular esta labor con la entidad.

A la Dra. *Marisol Gordillo Suárez* por su amabilidad y buena voluntad, ayudándome con componente estadístico de la investigación.

Al Dr. *Alejandro Soto*, por su amabilidad y colaboración en pro al desarrollo de la investigación.

Al Dr. *Enrique Javier Peña Salamanca*, por su amabilidad, enseñanza y colaboración para que llevase mi investigación a feliz término.

Al grupo de profesionales de los laboratorios de la Universidad del Valle: *Esperanza Obando, Carlos Villalobos, Alexander Ramírez, Yamileth Valencia y Yaneth Guevara*. Por su disposición infinita, por su confianza, camaradería, por su apoyo y cariño, en pro a minimizar las barreras, para desarrollar mi investigación y alcanzar la meta.

A los profesionales *James Larrahondo, Bibiana Landazabal, Carolina López y Edgar Correa* de la CVC; gratitud infinita, por su asesoría técnica, por sus enseñanzas, por su colaboración y gran amabilidad.

A mi *Papá Julio César* y *mi Mami Rosario*, por su apoyo y amor incondicional, por sus consejos, por confiar en mí, y alentarme a ser perseverante para que le robe muchos triunfos y alegrías a la vida.

A mis hermanos *Jean, Tatiana y Starlin*, que, aunque tengamos pensamientos diferentes, siempre nos une el amor, brindándome su fuerza, impulso y alegría, para seguir adelante cada día.

A mi *Esposo* y a mi hijo *Joseph Adrián*, por ser esa chispa que hace que mi luz no se apague y me esfuerce cada día, para ser feliz y perseverante en la conquista de la vida.

Muchas gracias y Dios les Bendiga....

CONTENIDO

LISTA DE TABLAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE ANEXOS	xi
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN.....	3
1. MARCO TEÓRICO CONCEPTUAL	8
1.1. Los Metales Pesados	8
2.1.1 El cromo	8
2.1.2. Efectos del cromo en la salud	10
2.1.3. Efectos del cromo en el ecosistema natural	14
2.1.4 El cromo en el proceso de curtido	17
2.2. El río Cerrito.....	20
2.2.1. Descripción del río Cerrito	20
2.2.2. Afectación del río Cerrito por efluentes de curtiembres.....	21
2.3. El método de la Prueba de Ames	24
3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD MUTAGÉNICA EN EL AGUA DEL RÍO CERRITO A TRAVÉS DE LA PRUEBA DE AMES CON LAS CEPAS TA97 Y TA100 DE <i>Salmonella typhimurium</i>	29
3.1. Introducción	29
3.2. Métodos.....	30
3.2.1. Área de estudio	30
3.2.2. Muestreo	33
3.2.3. Diseño experimental y análisis estadístico	39
3.3. Resultados	41
3.3.1. Caracterización fisicoquímica y microbiológica	41
3.3.2. Evaluación de la actividad mutagénica.....	46
3.4. Discusión.....	51
4. DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE MUTAGENICIDAD DE LOS SEDIMENTOS DEL RÍO CERRITO A TRAVÉS DE LA PRUEBA DE AMES CON LAS CEPAS TA97 Y TA100 DE <i>Salmonella typhimurium</i>	61

4.1.	Introducción	61
4.2.	Métodos.....	62
4.2.1.	Muestreo	62
4.2.2.	Análisis de cromo	63
4.2.3.	Evaluación de la actividad mutagénica con la prueba de Ames	63
4.2.4.	Diseño experimental y análisis estadístico	63
4.3.	Resultados	64
4.3.1.	Análisis de cromo	64
4.3.2.	Evaluación de la actividad mutagénica.....	65
4.4.	Discusión	68
5.	CONSIDERACIONES FINALES.....	75
	REFERENCIAS	78
	ANEXOS	94

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Enfermedades laborales por manipulación y exposición al cromo*	12
Tabla 2. Descripción de las sustancias contaminantes en efluentes industriales*	17
Tabla 3. Carga contaminante del agua residual con base a los parámetros fisicoquímicos, de tres curtiembres del municipio de El Cerrito*	20
Tabla 4. Monitoreo fisicoquímico del río Cerrito a su paso por el municipio de El Cerrito en los puntos entrada al municipio (aguas arriba) y salida del municipio (aguas abajo)*	23
Tabla 5. Comparación de los métodos de mutagenicidad microbiológica con la prueba de Ames (ventaja y desventajas) *	25
Tabla 6. Actividad mutagénica determinada a través de la <i>prueba de Ames</i> en diferentes matrices de estudio	26
Tabla 7. Cepas bacterianas de <i>Salmonella typhimurium</i> empleadas para la prueba de Ames*..	27
Tabla 8. Mutaciones de las cepas de <i>Salmonella typhimurium</i> *	27
Tabla 9. Genotipo de cepas bacterianas TA97 y TA100 de <i>Salmonella typhimurium</i> *	36
Tabla 10. Estructura factorial para muestra de agua superficial.....	40
Tabla 11. Caracterización fisicoquímica y microbiológica de las aguas del río Cerrito	42
Tabla 12. Actividad mutagénica en aguas superficiales del río Cerrito determinada con la cepa <i>Salmonella typhimurium</i> TA97 con y sin activación metabólica (S9)	47
Tabla 13. Actividad mutagénica aguas superficiales del río Cerrito determinada con la cepa <i>Salmonella typhimurium</i> TA100 con y sin activación metabólica (S9)	48
Tabla 14. Análisis de varianza del IM de la interacción entre los factores sitio, cepa y activación metabólica	49
Tabla 15. Actividad mutagénica en sedimentos del río Cerrito determinada con la cepa <i>Salmonella typhimurium</i> TA97	66
Tabla 16. Actividad mutagénica en sedimentos del río Cerrito determinada con la cepa <i>Salmonella typhimurium</i> TA100	67
Tabla 17. Análisis de varianza del IM de la interacción entre los factores sitio, cepa y activador enzimático.....	68
Tabla 18. Anova de IM con covariable matriz agua.....	95
Tabla 19. Anova de IM con covariable matriz sedimento.....	95

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo biogeoquímico del cromo*	9
Figura 2. Remojo de la piel de ganado vacuno.....	18
Figura 3. Piel curtidas al cromo (<i>wet blue</i>)	18
Figura 4. Ubicación geográfica del área de estudio.....	31
Figura 5. Sitio 1. Balneario Las Brisas (zona arriba-antes de la descarga de efluentes)	32
Figura 6. Sitio 2. Puente vía principal Cali-Buga (zona en el sitio-después de la descarga de efluentes de curtiembres).....	32
Figura 7. Sitio 3. Antes de la desembocadura al río Cauca-Puente Callejón San Fernando	33
Figura 8. Evaluación de la calidad del agua superficial del río Cerrito para consumo humano de acuerdo al ICA CETESB	44
Figura 9. Evaluación de la calidad del agua superficial del río Cerrito para uso de riego agrícola de acuerdo al ICA DINIUS	45
Figura 10. Evaluación de la calidad del agua del río Cerrito de acuerdo al Índice de contaminación por Materia Orgánica “ICA ICOMO”	46
Figura 11. Interacción entre el sitio de muestreo*activador enzimático	50
Figura 12. Interacción entre el activador enzimático (fracción microsomal S9)*cepa bacteriana de <i>Salmonella typhimurium</i> (TA97 – TA100).....	50
Figura 13. Concentración de cromo total en el sedimento del río Cerrito.....	65
Figura 14. Diseño de Parcelas divididas bajo un diseño de bloques	94
Figura 15. Validación del supuesto de normalidad en la variable Índice de Mutagenicidad (IM) en la matriz agua.....	96
Figura 16. Homogeneidad de varianzas entre la variable IM y las fuentes de variación (punto de muestreo, cepa y activador enzimático) en la matriz agua	96
Figura 17. Validación del supuesto de normalidad en la variable Índice de Mutagenicidad en la matriz sedimento.....	97
Figura 18. Homogeneidad de varianzas entre la variable IM y las fuentes de variación (repeticiones, punto de muestreo y cepa) en la matriz de sedimento	97
Figura 19. Interacción entre el sitio de muestreo, cepa y activador enzimático.	98

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Modelo Estadístico.....	94
Anexo 2. Anova con Covariable.....	95
Anexo 3. Validación de Supuestos de Normalidad	96
Anexo 4. Efecto de La Interacción entre los Factores en los Sedimentos	98

RESUMEN

El río Cerrito (Valle del Cauca), ha sido el reservorio de aguas residuales de origen doméstico, industrial y de curtiembres. Los efluentes de las curtiembres, son descargados al río sin ningún tratamiento; contienen sustancias químicas y sales de cromo, las cuales, causan contaminación a las aguas superficiales y a los sedimentos del río. Las propiedades químicas del cromo, le permiten acumularse en los sedimentos y transformarse e integrarse en la columna de agua. Este metal es considerado perjudicial para los organismos que habitan el ecosistema (flora-fauna) y nocivo para los seres humanos, se clasifica como un agente tóxico, mutagénico y cancerígeno, cuando se encuentra en forma de Cr (VI). Por tal razón, con el propósito de evaluar la posible actividad mutagénica por emisión de efluentes de las curtiembres, en aguas y sedimentos del río Cerrito, se realizaron tres muestreos, entre abril de 2014 a abril de 2015, en la zona antes de la descarga (sitio 1), después de la descarga (sitio2) y aguas abajo-antes la desembocadura al río Cauca (sitio3). Posteriormente, las muestras fueron analizadas mediante la prueba de Ames, con las cepas TA97 y TA100 de *Salmonella typhimurium*, con y sin activación enzimática (S9). El análisis estadístico de los datos se efectuó con el programa estadístico R, con un nivel de significancia del 5%. Mediante la caracterización fisicoquímica realizada en el Laboratorio Ambiental de CVC, se efectuó el cálculo de los índices de Calidad del agua (ICA), CETESB, DINIUS e ICOMO.

Los resultados de los ICA mostraron que el agua del río Cerrito se deteriora a su paso por el municipio de El Cerrito encontrándose mayor contaminación en el sitio 3, evidenciando que el agua no debe ser destinada para consumo humano, para recreación y ni siquiera para uso agrícola. Con respecto al Índice de Mutagenicidad (IM) en las aguas superficiales del río Cerrito, presentaron principalmente, un nivel *mutagénico leve* (1.1-1.9), generando mutaciones puntuales por cambio en el marco de lectura (cepa TA97), como también, *sustitución de pares de bases* (cepa TA100). Sin embargo, en el sitio 1 se presentó un IM mayor (2.3), que demuestra *mutagenicidad* (cepa TA97-S9), asimismo, el sitio 3 alcanzó un nivel *mutagénico* con un IM de 2.0 y 2.3 (cepa TA100+S9). Los resultados de la investigación demuestran, que la variable respuesta IM, está condicionada de forma significativa, por el efecto de las interacciones cepa*activador enzimático ($p=0.004$) y sitio de muestreo*activador enzimático ($p=0.04$). En cuanto a los sedimentos, se detectó un nivel de *mutagenicidad leve*, únicamente con la cepa TA97 con activación metabólica, indicando mutaciones puntuales por cambio en el marco de lectura. El sitio 1, presentó en tres oportunidades un nivel *mutagénico* alto, con un IM entre 2.0 y 2.4 (cepa TA97-S9). Para los sedimentos se demostró, que la variable de respuesta IM, está condicionada de forma significativa, por el efecto de las interacciones cepa*activador enzimático ($p=0.000$), sitio de muestreo*activador ($p=0.002$) y sitio de muestreo*cepa ($p=0.042$). Los sedimentos presentaron concentraciones promedio de cromo total de 346 mg/kg (sitio 1), 185.7 mg/kg (sitio 2) y 456 mg/kg (sitio 3). Esta investigación revela que tanto las aguas como los sedimentos del río Cerrito presentaron actividad mutagénica desde un nivel leve a mutagénico.

Palabras Clave: Calidad del agua, mutagenicidad, Prueba de Ames, Cromo, mutación, *Salmonella typhimurium*, cepa TA97, cepa TA100

ABSTRACT

The Cerrito River (Valle del Cauca), has been the reservoir of domestic, industrial and tannery origin wastewaters. The effluents of the tanneries are discharged to the river without any treatment; they contain chemicals and chromium salts, which cause pollution to surface waters and river sediments. The chemical properties of chromium allow it to accumulate in sediments and transform and integrate into the water column. This metal is considered harmful to the organisms that inhabit the ecosystem (flora-fauna) and harmful to humans, it is classified as a toxic, mutagenic and carcinogenic agent, when it is in the form of Cr (VI). For this reason, in order to evaluate the possible mutagenic activity by emission of effluents from the tanneries, in waters and sediments of the Cerrito River, three samplings were carried out, from April 2014 to April 2015, in the area before discharge (site 1), after the discharge (site2) and downstream-before the mouth to the Cauca river (site3). Subsequently, the samples were analyzed by the Ames test, with strains TA97 and TA100 of *Salmonella typhimurium*, with and without enzymatic activation (S9). The statistical analysis of the data was carried out with the statistical program R, with a level of significance of 5%. Through the physicochemical characterization carried out in the CVC Environmental Laboratory, the water quality indexes (ICA), CETESB, DINIUS and ICOMO were calculated.

The results of the ICA showed that the water of the Cerrito River deteriorates as it passes through the municipality of El Cerrito, with greater contamination found at Site 3, evidencing that the water must not be used for human consumption, for recreation or even for use. agricultural. With respect to the Mutagenic Index (MI) in the surface waters of the Cerrito River, they presented, mainly, a slight mutagenic level (1.1-1.9), generating mutations point due to change in the reading framework (strain TA97), as well as substitution of base pairs (strain TA100). However, in site 1 there was a higher MI (2.3), which shows mutagenicity (strain TA97-S9), also, site 3 reached a mutagenic level with an MI of 2.0 and 2.3 (strain TA100 + S9). The results of the investigation show that the MI response variable is significantly conditioned by the effect of the enzyme* enzyme activator strain ($p = 0.004$) and the enzyme activator * sampling site ($p = 0.04$). As for the sediments, a slight level of mutagenicity was detected, only with the TA97 strain with metabolic activation, indicating point mutations due to change in the reading framework. Site 1, presented on three occasions a high mutagenic level, with an MI between 2.0 and 2.4 (strain TA97-S9). For the sediments, it was shown that the MI response variable is significantly conditioned by the effect of the enzyme*enzyme activator strain ($p = 0.000$), sampling site*activator ($p = 0.002$) and sampling site*strain ($p = 0.042$). The sediments presented average concentrations of total chromium of 346 mg / kg (site 1), 185.7 mg / kg (site 2) and 456 mg / kg (site 3). This investigation reveals that both the waters and the sediments of the Cerrito River presented mutagenic activity from a slight to a mutagenic level.

Keywords: Water quality, Mutagenicity, Ames test, chromium, Mutation, *Salmonella typhimurium*, strain TA97, strain TA100

INTRODUCCIÓN

El cromo es un metal pesado que tiene diversos usos, destacándose en la industria metalúrgica, en los procesos de aleación con hierro, níquel y cobalto, por su capacidad de aumentar la dureza y la resistencia a la corrosión. Se emplea también en industrias de pinturas, del cemento, en el curtido del cuero entre otros usos (1)(2)(3). A su vez el uso industrial del cromo genera la producción de efluentes contaminados que terminan deteriorando los suelos y las aguas. Dicha contaminación se constituye en objeto de gran preocupación a nivel mundial, debido no solo, al incremento de sus producciones, sino también a los residuos tóxicos y contaminantes que genera, aunado a las características propias del metal que se caracteriza por ser no biodegradable.

Diferentes estudios han comprobado que este metal, se vincula a las cadenas alimenticias, debido a que se acumula en los sedimentos, ecosistemas acuáticos, peces, bivalvos, fitoplancton y especies vegetales como la elodea, que a su vez sirven de alimento a diferentes organismos superiores, lo cual resulta preocupante dado que al encontrarse en toda la cadena trófica, puede bioacumularse y biomagnificarse en organismos vivos alcanzando concentraciones más altas que las presentes en el ambiente (4).

El cromo es un metal clasificado como uno de los principales agentes contaminantes en los diversos efluentes del agua. Este metal se considera perjudicial para el medio ambiente y nocivo para los agentes biológicos al ser identificado como agente tóxico, mutagénico y cancerígeno (5). Tiene la propiedad de unirse al ADN, reemplazando un conjunto de pares de bases, originando mutaciones, por la modificación en la secuencia de nucleótidos.

Por otra parte, los diversos compuestos con cromo representan una gran amenaza para el ambiente y el hombre debido a sus efectos nocivos. Las intoxicaciones se manifiestan en lesiones renales, gastrointestinales, hepáticas, de la glándula tiroides y de la médula ósea (6). Un cuerpo de agua contaminado disminuye el valor de su uso como bebida o para fines agrícolas e industriales, afecta la vida acuática, mueren los peces por disminución del oxígeno disuelto y el agua se convierte en no apta para el consumo (7)(8). Asimismo, las condiciones fisicoquímicas del medio, favorecen la transformación del cromo en su forma soluble como cromo hexavalente, clasificado y confirmado con un carcinógeno humano por entidades como la Agencia de Protección Ambiental (EPA) y la Agencia de Investigación del Cáncer (IARC) (5). La liberación sin control de los efluentes de las curtiembres a los cuerpos naturales de agua incrementa los riesgos para la salud de los seres humanos y la contaminación ambiental.

A pesar de la reconocida toxicidad y problemática ecológica que ocasiona el cromo, este es utilizado por la industria del cuero para transformar la piel de animales como vacunos, ovinos

y caprinos, en cuero, material duradero, suave elástico y flexible que tiene un alto reconocimiento en el mercado. El proceso de curtido permite la estabilización de la materia orgánica, mediante una serie de etapas que requieren productos químicos y grandes volúmenes de agua, que suelen ser vertidos a los cuerpos de agua, produciendo consecuencias ambientales y de salud indeseables (9).

En Colombia, el sector de las curtiembres está compuesto en un 96% por microempresas y famiempresas que poseen una baja infraestructura con maquinaria y tecnología obsoleta (10), lo que refleja la baja capacidad de inversión, características que dificultan la implementación y sostenibilidad de sistemas y programas de prevención y control de la contaminación de los efluentes producidos en el proceso productivo (9) (11).

En el Valle del Cauca, el sector de las curtiembres se localiza en los municipios de Cartago y El Cerrito. En el caso específico de las curtiembres de El cerrito, lugar donde se realizó esta investigación, las primeras curtiembres se ubicaron en el corregimiento de Sabaletas a mediados de 1968, sector que fue creciendo, encontrándose en la actualidad 21 establecimientos, de los cuales ocho funcionan esporádicamente, conservándose activos los 13 restantes. Solamente una de las curtiembres activas, correspondiente a una mediana empresa, posee planta de tratamiento de aguas residuales, mientras que las demás curtiembres son microempresas con sistemas de tratamiento incompletos o incipientes, que permanecen sin operar. Esta situación indica que el 92.3% de las curtiembres activas del municipio de El cerrito vierten sus efluentes al alcantarillado o a las fuentes de agua sin tratamiento previo (12).

Adicionalmente, las curtiembres cerriteñas se encuentra ubicadas dentro de la zona urbana, ocasionando una problemática ambiental compleja debido a la alta contaminación generada durante años por estas empresas. El mayor impacto ambiental se viene dando en el recurso hídrico, por su consumo descontrolado y por las descargas de efluentes industriales sólidos y líquidos que finalizan en el río Cerrito (13). El proceso productivo de las curtiembres en El Cerrito, hace uso de tecnologías obsoletas y ambientalmente poco amigables, lo que conlleva a un grave daño ambiental por los diferentes desechos que resultan y de los cuales, en su mayoría, son efluentes que se vierten sin tratamiento directamente en el río Cerrito (10) (14). Por exigencia de las autoridades ambientales y municipales, las curtiembres están conectadas al colector de la planta de tratamiento de aguas residuales (PTAR) del municipio, a través del sistema de alcantarillado, siendo el emisor final el río Sabaletas. Sin embargo, se presentan descargas de efluentes al río Cerrito, por curtiembres ilegales mediante el sistema de bombeo.

En el proceso de curtido, el cromo es uno de los principales residuos descargados con los baños de curtición y recurtido en forma soluble, originando problemas de contaminación. Además, cuando se mezcla con aguas residuales de otras etapas del proceso, especialmente

si existen proteínas en el efluente, se da lugar a una reacción rápida que forma precipitados cromo-proteína. Estos aumentan la generación de lodos, los hidróxidos de cromo se precipitan y persisten en el ambiente e interrumpen las cadenas alimenticias de la biota acuática y posiblemente inhiben la fotosíntesis y otros procesos. Sin embargo, si las descargas de cromo son excesivas, el metal, puede permanecer en solución (15) (10).

En estos efluentes, el cromo puede encontrarse como cromo hexavalente (Cr^{+6}), en forma de ion cromato (CrO_4^{-2}), como ion dicromato ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{-2}$), o como cromo trivalente (Cr^{+3}) (3). El Cr^{+3} se encuentra en la forma de hidróxido de cromo $\text{Cr}(\text{OH})_3$, que es insoluble, mientras, el Cr^{+6} es soluble predominando la forma de ion cromato y donde a pH ácidos, sólo existe el ion dicromato (16). Por otra parte, las concentraciones promedio de cromo total en aguas superficiales no contaminadas generalmente están por debajo $1\mu\text{g/L}$ (17), esta concentración depende directamente de varios factores: geología regional, procesos de meteorización mineral, tasas de carga de sedimentos y patrones de precipitación. Sin embargo, cuando se vierten a los ríos efluentes industriales que contienen este metal, la concentración de cromo se incrementa, y puede alcanzar, concentraciones superiores a 25 mg/L (18).

A pesar de estos hechos, actualmente no existen reportes del efecto que pueda estar causando el cromo en las aguas del río Cerrito, como agente tóxico y mutagénico, integrado en los efluentes de las curtiembres. En este orden de ideas, es válido preguntarse si los efluentes de las curtiembres vertidos sobre el río Cerrito, están causando un efecto mutagénico en las aguas y en los sedimentos, teniendo en cuenta los diversos usos a que sus aguas son destinadas: agua para riego, para recreación y para abastecimiento público. En consecuencia, para responder la pregunta anterior, en esta investigación se pretende evaluar la posible actividad mutagénica por la emisión de efluentes de las curtiembres, en aguas y sedimentos en el río Cerrito. Por consiguiente, para el desarrollo de la investigación, se plantea la siguiente hipótesis de trabajo: los vertimientos de las curtiembres, pueden causar actividad mutagénica en el agua y los sedimentos del río Cerrito.

En concordancia con el propósito de la investigación, este documento está estructurado en los siguientes capítulos:

Capítulo 1. *Marco teórico-conceptual*. En este capítulo se revisan los aspectos conceptuales relacionados con la temática de la investigación. Se describen las características del cromo como un metal pesado, sus efectos en la salud y en el ecosistema acuático. Se enmarca la contaminación de los ecosistemas acuáticos, por los vertimientos industriales, específicamente por la emisión de cromo a través de la industria de curtiembres. Se aborda la problemática que atraviesa el río Cerrito, por las descargas de aguas residuales provenientes de las curtiembres, las cuales, están ubicadas en la zona urbana del municipio de El Cerrito, localizado en la cuenca del río Cerrito. Finalmente, se presenta la prueba de

Ames, como una herramienta aplicada para la evaluación de la actividad mutagénica, en el medioambiente.

Capítulo 2. *Determinación de la actividad mutagénica en el agua del río Cerrito, a través de la prueba de Ames, con las cepas TA97 y TA100 de Salmonella typhimurium.* Este capítulo tiene como objetivo, determinar la actividad mutagénica con y sin activador enzimático, en el agua del río Cerrito, a través de la prueba de Ames con las cepas TA97 y TA100 de *Salmonella typhimurium*. Se presenta el método de la investigación; con la descripción del área de estudio y el procedimiento de muestreo. Se describen los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos, que fueron la base para la caracterización de la calidad del agua del río Cerrito y a su vez, para determinar los Índices de Calidad del Agua (ICA): para consumo humano “ICA CETESB”, para riego agrícola “ICA DINIUS” y para evaluar el Índice de Contaminación por Materia Orgánica “ICA ICOMO”. Posteriormente, se describe el procedimiento para determinar la actividad mutagénica, con el consecuente montaje de la prueba de Ames, el diseño experimental y el análisis estadístico. A continuación, se presentan los resultados de la caracterización fisicoquímica y la evaluación de los índices de calidad del agua del río Cerrito. De igual manera, se muestran los resultados de la actividad mutagénica, determinada con las cepas TA97 y TA100 de *Salmonella typhimurium*, con activador y sin activador enzimático. Finalmente, se realiza la discusión de los resultados, lo que involucra: la caracterización fisicoquímica y microbiológica, los índices de calidad del agua en el eje longitudinal del río, y la variabilidad del resultado en la escala espacial y temporal. Con esta misma perspectiva, se argumentan los resultados de la actividad mutagénica, teniendo en cuenta, los efectos de las variables que interaccionan entre sí; sitio de muestreo*cepa*activador enzimático, cuyas interacciones influyen, en la respuesta mutagénica determinada en el agua superficial del río Cerrito.

Capítulo 4. *Determinación de la actividad mutagénica en el agua del río Cerrito, a través de la prueba de Ames, con las cepas TA97 y TA100 de Salmonella typhimurium.* Como su nombre lo indica, el objetivo de esta investigación fue determinar la actividad mutagénica con y sin activador enzimático, en el sedimento del río Cerrito, a través de la prueba de Ames con las cepas TA97 y TA100 de *Salmonella typhimurium*. Inicialmente, se presenta el método establecido para el procesamiento de la matriz de sedimento, el procedimiento para el análisis del cromo y el diseño experimental y estadístico. La presentación de resultados inicia con el análisis de la concentración de cromo total, en cada una de las estaciones de monitoreo. Posteriormente, se presentan los resultados de la actividad mutagénica con las cepas TA97 y TA100 con activador y sin activador enzimático. Asimismo, se muestra el análisis de varianza del IM de la interacción, entre los factores sitio de muestreo, cepa y activador enzimático. Finalmente, se presenta la discusión de los resultados, teniendo en cuenta cada uno de los sitios de muestreo, se evidencia el aumento de la concentración de cromo en la escala espacial. De la misma manera, se muestra que la prueba de Ames, permitió determinar

con las cepas TA97 y TA100, con y sin activador enzimático, un nivel de mutagenicidad leve, en los sedimentos del río Cerrito. Se presenta la interacción entre los factores sitio de muestreo*cepa*activador enzimático, cuyas interacciones influyen, en la respuesta mutagénica determinada en los sedimentos del río Cerrito.

Capítulo 5. *Consideraciones finales*. En este capítulo se presentan las conclusiones y las perspectivas, que surgen del desarrollo de esta investigación.

Bibliografía y Anexos: El documento finaliza con la *bibliografía y los anexos*. En los anexos, se presenta el modelo estadístico, el anova con covariable y la variación de los supuestos de normalidad para las matrices de agua y sedimento. Por último, se muestra en una figura de bloques, el efecto de la interacción entre los factores en la matriz de sedimento.

1. MARCO TEÓRICO CONCEPTUAL

1.1. Los Metales Pesados

Los metales pesados son elementos con gran peso atómico, tienen una densidad superior a 5.0 g/cm^3 o cuyo número atómico es superior 20 (excluyendo los metales alcalinos-alcalinotérreos). Existe un grupo de metales denominados oligoelementos o micronutrientes, que son esenciales para el metabolismo de los organismos vivos, como es el caso del Zn, Cr, Cu, Fe, Mo, Mn, B, Co, As, Ni y Se (19)(20). Los metales son componentes intrínsecos de la naturaleza, pueden ser integrados al medio por actividades antrópicas, principalmente la industrial, lo que causa un desequilibrio natural; pues se origina una gran acumulación de estos químicos, y en forma soluble, pueden integrarse a los acuíferos, y a la cadena trófica, afectando finalmente la salud de los seres humanos, pues los metales pueden resultar tóxicos a elevadas concentraciones, al acercarse al límite entre su necesidad y la toxicidad (21) (22) (23).

2.1.1 *El cromo*

El cromo es un metal pesado, que se halla en rocas, plantas, suelos, humus y gases volcánicos. Se encuentra en el ecosistema principalmente como cromita (FeCr_2O_4), una mezcla de óxido de hierro (II) y óxido de cromo (III) (CrO_3) y como crocoita (PbCrO_4) (24)(25). Se caracteriza porque puede funcionar con distintas valencias y formar iones complejos (26). Al reaccionar con óxidos e hidróxidos de manganeso (Mn), aluminio (Al) o hierro (Fe), puede precipitarse e integrarse a las partículas de suelos, formando complejos con compuestos orgánicos (27).

Este metal, puede tener distintos estados de oxidación, presentándose de forma iónica con valencia +2, +3 o +6. En general, los estados de oxidación, más importantes del cromo son el trivalente (+3) y el hexavalente (+6); el cromo (III) es un oligoelemento esencial en los seres humanos, pero la exposición crónica puede ser perjudicial y, por otro lado, el cromo (VI), es perjudicial para el medio ambiente y para la salud de los seres humanos, por su extrema toxicidad y designación como carcinógeno humano (28)

Por otro parte, la diversidad de la forma iónica del cromo, le permite beneficiarse de las condiciones químicas del medio, para movilizarse con facilidad de una fase sólida a una fase acuosa. La movilización, solubilidad y biodisponibilidad del cromo, depende en gran medida de las características fisicoquímicas de las diferentes matrices de los ecosistemas. Por ejemplo en el suelo, la especiación química del cromo varía dependiendo del potencial de oxido-reducción y del pH, lo que ocasiona la desorción del cromo (III) a pHs bajos y la

adsorción del cromo (VI) a las partículas del suelo con el incremento del pH. (29) (30). Estos cambios en la especiación del cromo se fundamentan en su ciclo biogeoquímico (Figura 1): el cromo (III) es oxidado a cromo (VI) por reacciones químicas [1]; mientras el cromo (VI) es reducido química o biológicamente a precipitados de cromo (III) [2] y a complejos órgano-solubles de cromo (III) [3], los microorganismos pueden transformar los compuestos órgano-solubles a precipitados de cromo (III) [4] (31), e igualmente, algunos agentes quelantes pueden unirse al cromo (III) para formar compuestos orgánicos.

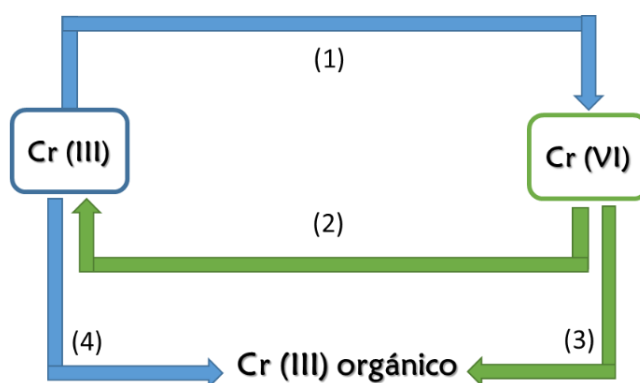


Figura 1. Ciclo biogeoquímico del cromo*

1). Oxidación química de Cr (III) a Cr (VI). (2). Reducción química o biológica de Cr (VI) a Cr (III). (3). Precipitación microbiana de compuestos de Cr (III). (4). Precipitación de Cr (III).

* Tomado de: (Puzón 2008)(32).

A nivel industrial el cromo tiene una amplia utilidad, es empleado en la industria de galvanotecnia, en la industria de pinturas, en el proceso de curtido de pieles, en productos de preservación de madera, en la química analítica para pruebas de calidad ambiental, entre otras. Uno de los usos más importantes tiene lugar en la preparación de aleaciones de acero; este proceso favorece la resistencia a la corrosión, al desgaste del metal y le da una buena apariencia (33). Los compuestos que contienen cromo son útiles en los procesos de curtido de pieles $[\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3]$ y como pigmentos para cerámica y tela. Los principales pigmentos de cromo incluyen el cromo amarillo, el cromo anaranjado y el óxido crómico verde (34).

El uso diverso del cromo a nivel industrial, origina la emisión de residuos a la atmósfera, al suelo y al agua, siendo las actividades industriales las precursoras del incremento en las concentraciones de cromo en el medio ambiente. Por ejemplo, el cromo trivalente se ve aumentado principalmente por la industria del acero, las curtiembres y la electroquímica. Igualmente, hay un porcentaje menor de industrias que manipulan el cromo hexavalente, como son; textiles, pinturas y recubrimientos (35)(2). La alta concentración de los metales pesados, los sitúan en un momento dado, en el umbral de toxicidad. Es por ello, que el cromo

sea por contacto directo, manipulación, o de forma indirecta a través del aire, del agua o de alimentos contaminados con esta sustancia, puede afectar la salud de los seres humanos, desencadenando reacciones metabólicas, que pueden terminar desarrollando cuadro genotóxicos, mutagénicos o cancerígenos.

2.1.2. Efectos del cromo en la salud

El cromo es un elemento identificado tanto como un micronutriente esencial y como un agente carcinogénico (36)(37). En la nutrición humana, su función principal es ser un componente integral del factor de tolerancia a la glucosa (Glucose Tolerance Factor-GTF) y actúa como cofactor de la hormona insulina. (38) (6), como también, en el metabolismo de los lípidos, de los carbohidratos (es decir, la tolerancia a la glucosa y la síntesis de glucógeno) y en la mejora nutricional de la energía (39) (40). Por el contrario, una deficiencia de cromo, puede desarrollar una alteración en la tolerancia a la glucosa (mantenimiento deficiente del nivel de azúcar en la sangre), hiperglucemia, y niveles elevados de colesterol y triglicéridos en la sangre (41) (42). Sin embargo, se convierte en una sustancia tóxica, cuando aumenta su concentración en los individuos. Además, reacciones bioquímicas pueden oxidarlo a cromo hexavalente, siendo el causante de alteraciones celulares; el estrés oxidativo, la reducción de Cr (VI) a Cr (III), y la unión de Cr (III) al ADN lo involucran en la genotoxicidad y la mutagénesis del ADN (43), posibilitando cambios en las células somáticas, que originan tumores, culminando en carcinogénesis (44)(6)(45).

Por tal razón, el cromo es uno de elementos químicos, que se encuentra reportado e identificado (Nº de ID de CAS: 7440-47-3) como una sustancia tóxica por la Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (ATSDR). Afecta la salud de los seres humanos, causando el deterioro el sistema inmunológico, el sistema urinario (riñones) y el sistema respiratorio; desde la nariz a los pulmones. Además, entidades como la Agencia de Protección Ambiental (EPA), la Agencia de Investigación del Cáncer (IARC) y en la Lista de Prioridades Nacionales (NPL); han clasificado y confirmado al Cromo (VI) como un carcinógeno humano (5).

Cabe mencionar, que en el año 2000 la división toxicológica de la ATSDR, socializó un Resumen de Salud Pública Cromo; con el objetivo de informar a la comunidad que el cromo se clasificaba como una sustancia tóxica, peligrosa y causante de efectos nocivos en la salud. En el caso de la IARC, evidenció la formación de células cancerosas en animales expuestos a cromato de calcio, trióxido de cromo y dicromato de sodio, los cuales son compuestos de cromo (VI). Asimismo, comprobó el desarrollo de cáncer en seres humanos expuestos a cromo (VI) en las industrias de producción de cromatos, de colorantes y de cromado de metales. Por esta razón, los compuestos de cromo (VI) han sido asociados a cáncer en el pulmón en trabajadores que están en contacto con dichas sustancias; siendo también

catalogados, como carcinogénicos en seres humanos por el Departamento de Salud y Servicios Humanos (DHHS) (46).

Los seres vivos incorporan a su organismo sustancias muy pequeñas de cromo por inhalación, la mayoría de las sustancias que contienen cromo, ingresan al organismo a través de los alimentos y del agua que se consume; la absorción en los intestinos depende de la forma química en que se presenta el cromo. Se asimilan aproximadamente entre un 20 a 25% de los complejos de cromo orgánico y entre un 0,5 a 1,0% del cromo inorgánico (35). Asimismo, el cromo se identifica como un agente causante de enfermedades profesionales asociadas a la industria y a ciertas ocupaciones laborales, tales como: productores, procesadores y usuarios de cromo, manipuladores de cuero, blanqueo e industrias de pieles (curtiembres), trabajadores de adhesivos, de pinturas y soldadores de la industria de acero inoxidable. Por ende, el contacto o la exposición al cromo genera diferentes enfermedades o anomalías en la salud, así como neoplasma maligno en la cavidad nasal, en tráquea, en bronquios o en pulmones, además de asma extrínseca y dermatitis alérgica de contacto (47).

En las curtiembres el personal que participa en el proceso productivo del cuero y la población de sectores aledaños, se encuentran en riesgo permanente debido a la exposición a cromo. Se ha encontrado, una asociación significativa entre la probabilidad de presentar alteraciones en la salud atribuibles a cromo (34.3%) con el hecho de trabajar actualmente en una curtiembre. Además, hay asociación entre, presentar hallazgos clínicos de cromo ($>10\mu\text{g/L}$ en orina) y vivir en la zona donde se ubican las curtiembres (48). Se puede decir, que la población en general está expuesta, debido a que la exposición de cromo contamina el agua y el aire, que están en contacto con los habitantes del sector. Lo que causa, diferentes efectos negativos en la salud, por ejemplo, afecciones oculares a nivel de la córnea; la queratitis lesiona el epitelio y las capas superficiales de la córnea. Igualmente, el ojo adquiere un color pardo por el óxido de cromo, sobre la parte no protegida de los párpados (49). Afecciones como: ulceraciones nasales y cutáneas, dermatitis por sensibilización crónica, rinitis y cáncer broncopulmonar; se han clasificado como enfermedades de riesgo laboral relacionadas con el cromo (Decreto 658/96) (50). En Colombia en el Decreto 1477 del 2014 (51), se establece el listado de ocupaciones e industrias, que, por su actividad y uso del cromo y sus compuestos tóxicos, fomentan riesgo de enfermedades laborales a los trabajadores (Tabla 1).

Con el crecimiento de las actividades industriales las fuentes de contaminación por cromo y otros metales han aumentado considerablemente, los principales compuestos que tienen interés por su prevalencia en el ambiente son los trivalentes (Cr_2O_3 , $\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3$) y los hexavalentes (CrO_3 , H_2CrO_4 , $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) (52) (26) (53). Los riesgos en la salud para las personas que laboran con cromo, son inminentes, casi el 30% de los operarios que trabajan con cromo desarrollan dermatitis, el cromo es irritante y destructivo para todas las células del organismo; las muertes por envenenamiento agudo se presentan por nefritis hemorrágica.

La incidencia del cáncer pulmonar, por contaminación de cromo (VI) incrementa 15 veces más, las posibilidades de carcinomas pulmonares (35). Un número alto de trabajadores están potencialmente expuestos al cromo. La probabilidad de exposición más alta, ocurre en las industrias metalúrgicas y de curtido, en donde los trabajadores pueden estar expuestos a cantidades altas de cromo en el aire (54).

Tabla 1. Enfermedades laborales por manipulación y exposición al cromo*

Agente etiológico o factor de riesgo ocupacional	Ocupaciones/industrias	Enfermedades
Cromo (ácido crómico, bicromatos, cromatos, alcalinos y cromato de zinc)	Fabricación de ácido crómico	Neoplasia maligna de bronquios y de pulmón
	Fabricación de pigmentos	Rinitis alérgicas
	Barnizados de muebles	Rinitis crónica
	Fijadores de tintorería y estampados de tela	Ulceración o necrosis del tabique nasal
	Curtidos de cuero	Asma
	Impresión fotomecánica	Dermatosis papulopostulosas y sus complicaciones infecciosas
	Galvanoplastia	Dermatitis alérgica de contacto
	Fabricación de vidrios y esmaltes de colores	Dermatitis de contacto por irritantes
	Fabricación de cemento y trabajos de construcción civil	Úlcera crónica de la piel
		Efectos tóxicos agudos
		Tumor maligno de la fosa nasal

* Tomado de: Ministerio de Trabajo. Decreto Número 1477 de 2014 (51).

La Occupational Safety and Health Administration (OSHA) establece los límites de exposición permisibles (PEL), para proteger la salud de los trabajadores de la exposición al cromo, durante la jornada laboral. En la tabla Límites de contaminantes Z-1 para contaminantes del aire, determina 0.005 mg/m³ para cromo (VI), 0.5 mg/m³ para cromo (III) y 1.0 mg/m³ para cromo (0), como promedios durante una jornada diaria de 8 horas (28). De igual manera, The National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH), en la Guide to Chemical Hazards, recomienda un límite de exposición de 0.5 mg/m³ para cromo metálico y compuestos de cromo (II) y cromo (III) en el aire como promedio durante una jornada de 8 horas diarias (55). NIOSH también recomienda un límite de exposición de 0.001 mg/m³ para compuestos de cromo (VI) en el aire como promedio durante una jornada diaria de 10 horas (54).

Existe gran evidencia de que una amplia variedad de agentes ambientales –incluyendo los carcinógenos- interactúan directamente con el ADN, produciendo cambios hereditarios. Por consiguiente, la reducción intracelular del cromo (VI) a cromo (III), genera consecuencias inminentes, por su capacidad de interactuar con aminoácidos, proteínas, y directamente con

el ADN; formando enlaces ADN-ADN, el daño y/o ruptura de la cadena de ADN, formación de aductos cromo-ADN, entrecruzamiento ADN-proteínas y transcripción y replicación de ADN disfuncional (56)(57) (58).

Por esta razón, los estudios de mutagenicidad son importantes para la evaluación de los riesgos de mutagénesis y carcinogénesis de los agentes físicos y químicos (59). Debido, a que, el ADN destruido, sería responsable de los cambios funcionales observados en su replicación y transcripción, aspecto crucial en el efecto carcinogénico de los compuestos de Cr (VI) (52). Las alteraciones a nivel genético pueden desencadenar mutaciones celulares que desarrollen carcinogénesis. Sin embargo, el nivel de daño al ADN va a depender del tiempo y la concentración del cromo al cual han estado expuestos los organismos (60). Por ejemplo, se ha reportado que los soldadores de acero, llevan a sus hogares el humus que contiene cromo, lo que ocasiona en las mujeres alteraciones genéticas o interrupciones (abortos) de los embarazos(47). Además, el cromo (III) también puede reaccionar con grupos carboxilos y sulfhídricos de las enzimas causando una alteración tanto en la estructura como en la actividad enzimática (57)(31).

Los fenómenos genéticos desempeñan un papel central, en el proceso general del desarrollo del cáncer. Por lo tanto, una sustancia con actividad mutagénica demostrada en ensayos *in vivo* podría ser considerada potencialmente carcinógena (61). Un estudio realizado en fibroblastos dérmicos humanos expuestos a 5 μ M de Cr (VI), registró que la citotoxicidad depende de la concentración, dando lugar a la inducción de la apoptosis. Igualmente, la exposición de los fibroblastos dérmicos de Cr (VI) dio lugar a estrés oxidativo. En comparación con el control de las células normales, los fibroblastos tratados con Cr (VI) mostraron un nivel celular significativamente elevados de antioxidantes capaces de inducir estrés oxidativo (62).

Las intoxicaciones por ingesta de compuestos de cromo (VI) como cromato de potasio, bicromato de potasio o ácido crómico se presenta con una dosis letal aproximadamente de 5 g. Las madres gestantes que consumen alimentos con niveles anormales de cromo por encima del máximo permisible (0,050 ppm), pueden sufrir repercusiones genéticas en el niño gestado, se ha comprobado que el cromo atraviesa la placenta contaminando los embriones y el feto (63)(31). La EPA ha establecido un nivel de contaminación máximo de 0.1 mg/L para la cantidad total de cromo en el agua potable, la FDA ha determinado que los niveles de cromo en el agua en botella no deben exceder 0.1 mg/L (54) y el valor de referencia de la OMS es de 0.05 mg/L para el agua de consumo humano (64).

Por consiguiente, los seres humanos y los diferentes ecosistemas pueden estar expuestos a la toxicidad del cromo por diferentes vías: por el consumo de agua y/o alimentos contaminados, por trabajar y habitar en zonas industriales que usan cromo en su manufactura; cuyos vapores contaminan el aire que se respira, por estar en contacto (a través de la piel) con desechos que contengan residuos de cromo, por corrientes de agua que reciben efluentes de industrias de

curtido de cuero, textiles y galvanoplastia, entre otras. Es importante tener en cuenta, que las aguas superficiales de los ríos, son destinadas para diferentes usos: para agua potable, para riego agrícola, para uso doméstico, para la acuicultura, para la actividad pesquera y, por último, para recreación, situación que con lleva a una exposición permanente a unos contaminantes presentes en las aguas.

2.1.3. Efectos del cromo en el ecosistema natural

En el contexto ambiental existe un conjunto de metales de importancia por su acción contaminante, como son; Arsénico (As), Cadmio (Cd), Cromo (Cr), Cobalto (Co), Cobre (Cu), Estaño (Sn), Plomo (Pb), Mercurio (Hg), Níquel (Ni), Vanadio (V) y Zinc (Zn) (65). Estos metales pueden tener un nivel de toxicidad extremo, incluso cuando las concentraciones son mínimas, pueden afectar el ecosistema natural, tienden acumularse en la cadena alimentaria, lo que es perjudicial para la salud de los seres humanos.(66)(67).

El cromo es un potencial contaminante del aire, suelo y agua. La contaminación debido a la producción o eliminación de elementos químico como el cromo, libera partículas que permanecen en el aire, y en menos de 10 días, el metal se adhiere fuertemente a las partículas del suelo. Sin embargo, la composición química de las partículas que se encuentran en el aire, pueden tener un efecto potencial en la salud humana, por la presencia de sustancias tóxicas y cancerígenas (3). Un estudio realizado en la zona industrial de Puente Aranda en Bogotá, reveló en las partículas de aire, la presencia de metales pesados; Fe y Pb, con concentraciones hasta de 4.000 ng/m³. El grupo de metales Cu, Cr, Zn, Ni, Mn se encontraron en un rango medio de concentración de 50 a 700 ng/m³ (68).

Los compuestos de cromo son considerados por la EPA, como uno de los 33 contaminantes tóxicos presentes en el aire, que proporcionan una de las mayores amenazas para la salud pública. Esta selección fue realizada teniendo en cuenta, la cantidad de contaminantes emitidos al aire, el daño (o toxicidad) que ellos causan y su concentración estimada (69). Se han identificado diversas fuentes de contaminación, una de ellas son las fuentes industriales de; textiles, pinturas, metalurgia, galvanizados, curtiembres, entre otras. Donde todo este conjunto, manipula compuestos o derivados de cromo como parte de sus procesos de forma continua, lo que genera una concentración puntual del químico en el aire. Estas personas, se exponen al contaminante del aire, permanentemente y en concentraciones suficientes; condición que los hacen más propensos a contraer cáncer u otras afecciones graves para la salud. Por ejemplo, daños en el sistema inmunitario, así como problemas de salud neurológicos, reproductivos (por ejemplo, fertilidad reducida), del desarrollo y respiratorios (70).

Del mismo modo, los sedimentos de los ríos se consideran como depósitos de metales pesados y fuentes de contaminación, ya que presentan una mayor facilidad para acumularlos; los metales pesados no se establecen de forma permanente, pueden ser liberados a la columna de agua por cambios ambientales como pH, potencial redox, oxígeno disuelto, o la presencia de quelatos orgánicos (71)(72). El cromo específicamente, se acumula como cromo trivalente, en los sedimentos fluviales de acuerdo al potencial de óxido-reducción y las condiciones fisicoquímicas del medio; el cromo aumenta su concentración, en aquellos sitios donde hay una mayor fracción orgánica, por el contrario, en la fracción arcillosa es relativamente muy baja, la presencia del metal (73).

Asimismo, los efectos toxicológicos causados por el cromo en los sedimentos, en el agua y en especies animales, están relacionados con las reacciones redox; procesos significativos que afectan la evolución de las especies y, por tanto, la biodisponibilidad y la toxicidad del cromo en los suelos. Igualmente, la toxicidad del cromo en los cuerpos de agua, también depende de la intervención de las especies, el cromo (III) tiene una disponibilidad biológica y una toxicidad muy inferior a la del cromo (VI) (74)(75) (76).

Los metales pesados como el cromo, se caracterizan por incorporarse a los órganos o tejidos de organismos acuáticos, movilizándose a través de tres procesos: *bioacumulación*, que es la acumulación de sustancias químicas en el organismo vivo, lo que conduce a la *bioconcentración*, que se presenta cuando la concentración de la especie química, es mayor en los tejidos del organismo vivo, que en el medio donde habita. 'La concentración del contaminante en el ecosistema acuático, va aumentando de forma gradual, al ascender en los niveles tróficos, provocando la *Biomagnificación* de la especie química. La transferencia de materia y energía de presa a depredador, hacen que la concentración de los metales pesados aumente, como también su toxicidad. Por lo tanto, la concentración es mucho mayor en los organismos superiores, debido que muchas toxinas que están diluidas en un medio, pueden alcanzar concentraciones dañinas dentro de las células, especialmente en los niveles superiores de la cadena trófica (77)(21).

Los sedimentos, el fitoplancton y el zooplancton hacen parte de la alimentación básica de especies acuáticas que habitan el fondo de lagos, ríos y mares. Se ha comprobado que el cromo trivalente se acumula en especies como; el bagre (*Ictalurus nebulosus*), los bivalvos, la ostra (*Crassostrea virginica*), el mejillón azul (*Mytilus edulis*) y la almeja de caparazón blando; integrándose de esta manera a la cadena alimentaria; originándose a su vez, el fenómeno de bioacumulación (16). Aunque el pescado, los moluscos y los crustáceos son una rica fuente de nutrientes en la dieta alimenticia de los seres humanos, se ven afectados por la bioacumulación de los metales pesados a causa de la industrialización. En el río Buriganga, Bangladesh, se evidenciaron acumulaciones relativamente altas de Cr, Mn, Zn y Se, en muestras del crustáceo (gamba) *Macrobrachium rosenbergii*. Con respecto a los peces,

la especie *Mastacembelus pancalus*, de acuerdo al Índice de Riesgo calculado, demostró ser un riesgo para la salud con la probabilidad de riesgo de cáncer objetivo, si su consumo es continuo en un promedio de vida de 70 años en los seres humanos (78).

El ecosistema del río Tunjuelo, se encuentra afectado por los vertimientos de las curtiembres, esto ha originado que en la cuenca baja del río, sus aguas alcancen una concentración promedio de cromo 73.53 ppm; ensayos de citotoxicidad realizados con la especie *Betta splendens*, cultivando el pez en aguas provenientes de la cuenca baja del río Tunjuelo, mostraron el desarrollo de procesos patológicos como Gliosis, hiperplasias, glomerulonefritis, y daños del parénquima hepático, evidenciando así, la toxicología del cromo. Cabe resaltar, que la hiperplasia linfoide evidenciada en el intestino del pez, confirma los daños cancerígenos que puede llegar a causar este contaminante y que posiblemente también pueda desarrollarse en personas que estén constantemente expuestas al cromo (79). Es por ello, que algunas sustancias cuando superan los límites permisibles, se convierten en sustancias tóxicas para el recurso hídrico, siendo los metales pesados los que presentan esta toxicidad, como, por ejemplo; hierro, cromo, cadmio, zinc y mercurio (80).

La contaminación de las aguas superficiales de los ríos, es generada por diferentes actividades humanas. Por ejemplo, el sector industrial, es considerado como un proveedor de sustancias contaminantes a través de sus efluentes; las descargas de aguas residuales son calificadas como una de las principales fuentes de contaminación de los ríos. Estas descargas, provienen del alcantarillado municipal, de origen doméstico y de vertimientos industriales (81)(82). El efecto de estas actividades es la movilización de sedimentos, nutrientes, material particulado, la integración de residuos agrícolas, y sustancias químicas de variada naturaleza (83). Es importante, tener en cuenta que los efluentes industriales son transportadores de sustancias que pueden interferir en el proceso biológico de auto depuración de los sistemas de agua.

Las sustancias contaminantes presentes en los efluentes son de diversa complejidad y pueden causar toxicidad; su acción depende tanto del tipo como de la cantidad, e igualmente de la clase de industria que genera el vertimiento. Los desechos que contienen los efluentes pueden ser de naturaleza química o biológica. En la tabla 2, se registran las principales industrias generadoras de sustancias contaminantes a través de los efluentes.

Las aguas residuales industriales, en su mayoría, contienen metales pesados, así como toxinas orgánicas y surfactantes. Efluentes de textiles, la galvanoplastia y otras industrias de procesamiento de metales tienen considerables cantidades de iones metálicos tóxicos (84). El problema se agudiza, cuando los efluentes no son tratados previamente antes de ser vertidos a los cuerpos de agua, además, mayores descargas de aguas residuales, minimizan

la capacidad de resiliencia de los mismos, dando origen a procesos de eutrofización, salinización y lixiviación (85).

Colombia no está ajena a esta problemática ambiental, el Ministerio del Medio Ambiente determinó en los años 90 que la mayor contaminación de los cursos de agua estaba asociada a los vertimientos de aguas negras de origen urbano y rural. Donde el 85 % de las aguas residuales industriales se vertía sin tratamiento adecuado, resultando en una contaminación industrial de 520 toneladas de DBO/día (86).

Tabla 2. Descripción de las sustancias contaminantes en efluentes industriales*

Tipo de Industria	Sustancias contaminantes en los efluentes
Industrias químicas	Variedad de ácidos orgánicos e inorgánicos, sales y metales pesados
Industrias papeleras	Sulfitos, sulfitos ácidos, materia orgánica, residuos fenólicos, cobre, zinc, mercurio
Industrias petroquímicas	Hidrocarburos, plomo, mercurio, aceites, derivados fenólicos, nafténicos, y residuos semisólidos
Industrias de alimentos	Nitritos, materia orgánica, ácidos, microorganismos, etc.
Industrias metalúrgicas	Metales tales como cobre, níquel, plomo, zinc, cromo, cobalto, cadmio, ácido clorhídrico, ácidos sulfúrico, ácido nítrico y detergentes
Industrias textiles	Sulfuros, anilinas, ácidos, hidrocarburos, detergentes
Industrias del cuero (curtiembres)	Cromo, sulfuros, compuestos nitrogenados, tinturas, microorganismos patógenos

*Adaptado de: Kraemer A. R, Choudhury K. y E. Kampa, 2001 (87).

2.1.4 El cromo en el proceso de curtido

Las curtiembres, curtidurías o tenerías, son las empresas que realizan el curtido del cuero; proceso químico mediante el cual se convierte la piel de los animales en cuero. El objetivo del curtido es producir un material duradero, que no esté sujeto a descomposición por mecanismos físicos o biológicos; proceso en el cual se emplean ácidos, álcalis, sales, enzimas y sulfato de cromo, entre otros (88). El curtido de pieles con sales de cromo representa el 85% de la producción total de cueros en el mundo. Entre el método de curtición del cuero, con taninos vegetales y sales de cromo; es el proceso de curtición al cromo el preferido por los curtidores, puesto que su utilización logra una buena calidad en la apariencia de los cueros.

El proceso comprende varias etapas: pelambre, curtido, recurtido, acondicionado y acabado. El objetivo del pelambre es limpiar las pieles antes del curtido (Figura 2), para eliminar los pelos, grasa y la pulpa, haciendo uso de ácidos, sulfuro y álcalis, que preparan la piel para el siguiente proceso. En el curtido se emplean enzimas y agentes curtientes, para disolver las grasas y las proteínas no fibrosas y enlazar las fibras de colágeno (89). La finalidad del curtido, es producir un material duradero que no esté sujeto a descomposición. El curtido puede realizarse mediante taninos vegetales (el quebracho y la mimosa), o el curtido al

cromo, que utiliza sustancias químicas, como el sulfato de cromo ($\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3$) principalmente, (90), al final se obtiene el cuero en azul o *wet blue* (Figura 3).



Figura 2. Remojo de la piel de ganado vacuno



Figura 3. Piel curtidas al cromo (*wet blue*)

Posteriormente se realiza el recurtido, adicionando nuevamente sales de cromo, con el propósito de fijarlo y darle ciertas características organolépticas al cuero. Seguidamente se realiza el teñido y acondicionado, con el propósito de darle al cuero el color deseado, brindarle elasticidad, textura y brillo (12).

En conjunto, el proceso de curtido es reconocido por la utilización de compuestos de cromo y otras sustancias contaminantes del recurso hídrico. El informe de *The World's Worst Pollution Problems* (Los peores problemas de contaminación en el mundo) 2016: *The Toxics*

Beneath Our Feet (8), presenta las principales diez industrias contaminantes basadas en la carga de morbilidad global de cada fuente, donde las curtiembres ocupan el cuarto lugar.

El vertimiento de los efluentes de las curtiembres causa problemas ecológicos por el alto contenido de cromo (91)(92)(93). Como, por ejemplo, la generación de lodos y aguas residuales emitidos por fábricas de cuero en Shuitou (China), han afectado los suelos aluviales con una concentración de cromo de 2484 mg/kg (94). Del mismo modo, en organismos vegetales expuestos a efluentes de tenerías, que contenían cromo hexavalente, se observó aumento en el índice mitótico y formación de micronúcleos en las puntas de las raíces de *Allium cepa* (95). Es por ello, que los efluentes no tratados previamente, se han convertido en un perjuicio continuo, por las emisiones de cromo, metal clasificado a nivel mundial por las diferentes organizaciones de salud como genotóxico, mutagénico y cancerígeno.

En este orden de ideas, el río Cerrito se ve afectado por las curtiembres ubicadas en el municipio de El Cerrito; al ser el receptor de las aguas residuales de las curtidoras a través del sistema de alcantarillado o por vertimientos puntuales a los cuerpos de agua. En la tabla 3, se evidencia la carga contaminante reportada en los baños de cromo en tres curtiembres cerriteñas, según los valores obtenidos para DBO₅, DQO, SST y cromo. Es preocupante la alta concentración de cromo, que estuvo entre 1067.2 a 3084 mg/L, (12), dichos valores no cumplen con los límites máximos permisibles, en Colombia para los vertimientos puntuales a cuerpos de aguas superficiales y a los sistemas de alcantarillado público, establecidos en la Resolución 0631 del 2015, del Ministerio de ambiente y desarrollo sostenible (96).

De acuerdo a la información anterior, se puede afirmar que la concentración de cromo total, de los baños de cromo de las tres curtiembres, presentan un incremento en un rango de 205 600% (curtiembre 1) – 71 146% (curtiembre 3), por encima del valor límite máximo permisible (1.5 mg/L), establecido por resolución ambiental. Se debe tener en cuenta, esta carga termina de una forma directa o indirecta en el río Cerrito, según las características de escaso o nulo tratamiento de los efluentes industriales, ya descrito para El Cerrito (12). Bajo esta premisa y con los distintos antecedentes, es necesario que se realicen estudios de mutagenicidad en las aguas superficiales del río Cerrito y por ende en los sedimentos. Pues, el cromo puede reaccionar con la materia orgánica y otros elementos del medio acuoso, lo que permite su precipitación y unión a las partículas de sedimento, como también su transformación recíproca de cromo trivalente a cromo hexavalente. Todo esto conlleva, a que el cromo siga la ruta de la cadena alimentaria; plancton, moluscos, crustáceos, peces, hasta llegar a los mamíferos. De esta manera, el cromo de forma pasiva se integra al metabolismo de los seres humanos causando reacciones negativas e irreversibles para la salud (97).

La toxicidad del cromo, su peligrosidad en los seres vivos, su propiedad de bioacumulación en suelos y su biodisponibilidad en el recurso hidrobiológico e incluso su efecto negativo en la salud de los seres humanos, crea una gran preocupación, sobre los vertimientos que se generan de este metal en las cuencas de los ríos a través de los efluentes industriales,

específicamente por el sector de las curtiembres. Se ha demostrado, como la bioconcentración del metal repercute en la salud del hombre, debido a que la contaminación se distribuye de forma ascendente a través de la cadena trófica. Por lo tanto, al ser el río Cerrito en el Valle del Cauca, receptor de efluentes de cromo (III) por más de cinco décadas, es indispensable conocer su estado mutagénico, a lo sumo, iniciando estudios preliminares en aguas y en los sedimentos que posiblemente de acuerdo a los antecedentes, pueden estar desarrollando actividad mutagénica.

Tabla 3. Carga contaminante del agua residual con base a los parámetros fisicoquímicos, de tres curtiembres del municipio de El Cerrito*

Parámetros	Unidades	Agua residual			+VLMP
		Curtiembre 1	Curtiembre 2	Curtiembre 3	
Temperatura	°C	24.7	28.8	37.1	-
pH	Unidades	5.5	4.0	3.9	6-9
Demanda Bioquímica de Oxígeno	mgO ₂ /L	478.0	1 361.0	2 725.0	600.0
Oxígeno disuelto	mgO ₂ /L	-	0.71	3.34	-
Demanda Química de Oxígeno	mgO ₂ /L	4 443.0	3 229.0	8 611.0	1 200.0
Sólidos Suspendidos Totales	mgO ₂ /L	104.0	220.0	2 035.0	600.0
Cromo Total	mg/L	3 084.0	1 470.0	1 067.2	1.5
Cromo Hexavalente		1.0	<0.05	<0.05	-

* Tomado de: Benítez-Campo, 2015 (12).

+VLMP: Valor Límite Máximo Permisible para vertimiento de aguas residuales no domésticas a cuerpos de agua superficiales y a los sistemas de alcantarillado público, para fabricación de artículos de piel, curtido y adobo de pieles. Resolución No. 0631 del 17 de marzo de 2015 (96).

2.2. El río Cerrito

2.2.1. Descripción del río Cerrito

El río Cerrito atraviesa el municipio de El Cerrito al sur de la cabecera municipal, en el departamento del Valle del Cauca y desemboca en la margen derecha del río Cauca. La cuenca hidrográfica limita al suroriente con la cuenca del río Amaime, al norte con la cuenca del río Sabaletas y al occidente con el cauce del río Cauca (98). La cuenca del río Cerrito forma parte de la red hidrográfica del municipio de El Cerrito; en general, todos los cuerpos de agua del municipio nacen en la Cordillera Central.

2.2.2. Afectación del río Cerrito por efluentes de curtiembres

Actualmente los ecosistemas se ven afectados por diversos factores resultantes de actividades humanas, los cuales originan alteraciones o transformaciones ecológicas considerables en las comunidades.

Los efluentes de las curtidurías pueden ser muy perjudiciales para el ecosistema; los principales problemas que surgen se deben: 1. Al gran volumen de sedimentos que proceden de las diferentes etapas de procesos. 2. El efluente de curtido tiene un contenido de sulfuro, por la utilización del sulfuro de sodio y el hidrosulfuro de sodio. Estos compuestos desencadenan alteraciones debido a que permanecen en la solución, cuando son dispuestos en los cuerpos de agua, producen una reducción del oxígeno disuelto y forman precipitados de color negro con ciertos minerales como el hierro (99). 3. Residuos de cromo resultante en la fase de curtido; el aporte del metal en el curtido se distribuye así: baño de curtido 60%, escurrido y reposo 20%, recurtido 18% y lavado final 2% (16).

El proceso de curtido se convierte en una de las principales fuentes de contaminación, el cuero solo utiliza el 60% - 80% del cromo aplicado, y el resto se descarga principalmente en las aguas residuales (2). Los efluentes de las curtiembres presentan variaciones de pH entre 2,5 y 12,0, estas variaciones afectan considerablemente la vida acuática de las corrientes receptoras. Si la carga contaminante presenta sustancias tóxicas (cromo y sulfuro) y es conducida a una planta de tratamiento, puede interferir con el proceso biológico de la planta. En lugares donde no existen plantas de tratamiento, estos contaminantes afectan la calidad del cuerpo de agua receptor y causan su deterioro (100).

Una de las fuentes de contaminación de agua en Colombia, se registra por la evacuación directa de aguas residuales, donde se descargan sustancias peligrosas, las cuales provienen entre otras de los procesos de la industria curtidora (101). Los sectores más afectados por el sector industrial se encuentran en Bogotá, el Vallé de Aburra, el área Cali-Yumbo-Palmira; y Barranquilla. La acumulación de residuos sólidos contribuye a las descargas de lixiviados, con altas concentraciones de residuos peligrosos; fenoles, cromo, mercurio y plomo. En efecto, la industria de curtiembres vierte metales pesados altamente tóxicos como el cromo a los ríos Bogotá, Cali, Pasto y Medellín, (101).

En el 2005 Gischler estudió las vías de migración de metales pesados hacia la Laguna de Sonso por el río Cauca (102), encontrando como focos de contaminación el complejo industrial Yumbo-Cali-Palmira y las curtiembres del municipio de El Cerrito; siendo este último, uno de los mayores contribuyentes de contaminación por cromo al río Cauca, con un aporte de 5.000 mg/kg de metal en sedimento. El sector de curtiembres aporta el 10% de SST que se vierten a las aguas superficiales en Colombia, se han encontrado valores de cromo alarmantes en los sedimentos del río Bogotá (>37.3 mg/kg) en las estaciones de Villapinzón

y Tocancipá por la tradicional actividad de curtiembres en los municipios de Villapinzón y Chocontá (103).

Efluentes industriales son vertidos sin previo tratamiento en el alcantarillado o directamente al río Cerrito, los residuos industriales sólidos y líquidos presentan; altos niveles de DBO, DQO, SST, elevadas concentraciones de cromo, sulfuros, pinturas y solventes entre otros; se hace énfasis, en el deterioro que se ocasiona a las redes sanitarias, la calidad de las aguas superficiales y subterráneas (88). Para enfrentar dicha problemática, en el año 2003, se adoptó la estrategia de “Producción Más Limpia”, con la participación de entidades como CINARA, la Universidad del Valle, El SENA, Colciencias, el CNP del cuero y el CRPML, alcanzando reducciones de las cargas totales vertidas, del orden del 47% de DBO5, 64% en SST y 42% en caudal (104)(88).

La Corporación Autónoma Regional del Valle del Cauca (CVC) inició un programa de muestreos de la calidad del agua en el río Cerrito en 1996, realizando un monitoreo a lo largo del río en cinco estaciones, con una frecuencia de dos veces al año, donde se miden 35 parámetros (105)(106). En la Tabla 4, se presentaron algunos de los resultados obtenidos de este monitoreo entre los años 2011 al 2013, teniendo en cuenta los puntos aguas arriba, Balneario Las Brisas y aguas abajo, antes de la desembocadura al río Cauca-Puente Callejón San Fernando (107). Es importante mencionar, que el río Cerrito es considerado, uno de los mayores contribuyentes de contaminación al río Cauca, por ser el reservorio de los vertimientos de cromo generados por las curtiembres.

Entre los años 2011 a 2013, se observa que el río Cerrito presenta un deterioro en la calidad de los cuerpos de agua, antes de la desembocadura al río Cauca (aguas abajo), haciendo evidente la contaminación por materia orgánica debido al incremento de parámetros como la turbiedad, el color aparente, los sólidos totales, DBO5, DQO y de forma recíproca, el bajo nivel en la concentración de oxígeno (1.61 mg/L - <0.500 mg/L). En cuanto a los parámetros microbiológicos, en el punto aguas arriba, se registran valores de Coliformes totales y fecales, que cumplen para que el agua sea destinada para riego agrícola, de acuerdo al Decreto 1076 de 2015 (108), donde el menor valor para Coliformes totales corresponde a 5000 NMP/100 mL y para fecales a 2000 NMP/100 mL. Sin embargo, estos parámetros exceden los valores límites establecidos para que el agua sea destinada a la recreación de contacto directo (Coliformes totales 1000 NMP/100 mL y fecales 200 NMP/100 mL).

Para el año 2013, el río registró una mayor contaminación a la salida del municipio (aguas abajo), evidenciado por el aumento considerable en Coliformes totales (1.67×10^7 NMP/100 mL) y fecales (5.90×10^6 NMP/100 mL). El incremento de la DBO5 de 109.6 mg/L y una concentración de 933.0 mg/L de ST, mostraron alta contaminación por materia orgánica, al relacionar también, la turbiedad (1 084.1 mg/L), los SSD (886.5 mg/L) y DQO (266.6 mg/L).

Lo anterior, se refleja en la mínima concentración de oxígeno, equivalente a <0.500 mg/L. Por tal razón, las aguas superficiales del río Cerrito, antes de la desembocadura al río Cauca, en el año 2013 no cumplían los valores permisibles, para ser destinadas a tratamiento de potabilización para consumo humano, para uso agrícola, ni tampoco para recreación (Decreto 1075 de 2015)(108).

Tabla 4. Monitoreo fisicoquímico del río Cerrito a su paso por el municipio de El Cerrito en los puntos entrada al municipio (aguas arriba) y salida del municipio (aguas abajo)*

Parámetros fisicoquímicos	Unidades	2011		2012		2013	
		A	B	A	B	A	B
Temperatura	°C	18.3	24.5	18.3	23.7	18.8	24.75
pH	Unidades	8.01	7.57	8.03	7.64	7.98	7.75
Conductividad	µS/cm	128.5	507.5	131.5	696.0	126.5	1 379.0
Turbiedad	UNT	14.0	54.5	5.5	28.0	1.3	1 084.1
Color aparente	UPC	15.0	101.3	7.7	45.0	1.80	97.0
Sólidos Totales	mg/L	109.0	372.0	84.0	478.5	124.5	933.0
Sólidos suspendidos	mg/L	11.8	48.7	7.35	23.75	<11.4	46.3
Sólidos disueltos	mg/L	97.2	323.5	76.7	455.0	113.3	886.5
Demanda Bioquímica de Oxígeno	mg/L	<1.94	24.7	<0.954	22.0	1.1	109.6
Demanda Química de Oxígeno	mg/L	<5.33	79.1	6.35	66.6	<5.33	266.5
Oxígeno disuelto	mg/L	7.80	1.61	7.76	<0.500	7.54	<0.500
Cromo Total	mg/L	<0.297	0.467	<0.294	0.316	<0.294	0.36
Coliformes Totales	NMP/100 mL	8,97E+03	1,67E+07	4,35E+03	1,75E+07	5,80E+03	1,53E+08
Coliformes Fecales	NMP/100 mL	1,35E+02	5,90E+06	4,83E+02	1,08E+07	6,35E+02	6,70E+07

A. Entrada al municipio (aguas arriba). **B.** Salida del municipio (aguas abajo).

* Adaptado del Laboratorio Ambiental- Corporación Autónoma Regional del Valle del Cauca (107)

De acuerdo a la localización geográfica, el río Cerrito atraviesa de lado a lado el municipio de El Cerrito, lo que origina un impacto negativo pues se encuentra expuesto a una contaminación continua; su paso por el área urbana, conformada en la cabecera municipal por 25 barrios (109). Entre los cuales, sobresalen los barrios Álvaro Navia Prado, Chapinero, El Centro y Santa Bárbara, por encontrarse cerca de la ribera del río. Específicamente, en el barrio Santa Bárbara, se encuentran ubicadas las curtiembres del municipio, siendo este punto el mayor foco de riesgo para el río, por la generación de los residuos sólidos y líquidos, propios del proceso de curtido de cuero, como también los residuos domésticos. Además, el alcantarillado municipal vierte dos descargas sin ningún tipo de tratamiento dos descargas al río Cerrito y una descarga al río Sabaletas (98). En el año 2010 la CVC (110), hizo entrega al municipio de El Cerrito, la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR), para su administración y manejo, la cual recoge las aguas residuales domésticas y de curtiembres (111). Las curtiembres deben realizar un tratamiento previo para la remoción de cromo,

sulfuros, grasas y sólidos gruesos, antes de verter los efluentes al alcantarillado, pues la PTAR realiza solamente un tratamiento biológico (105). Sin embargo, no todas cumplen con este requerimiento, e igualmente curtiembres ilegales, están descargando sus efluentes directamente al río Cerrito, a través de sistemas de bombeo. Por otra parte, el sistema de alcantarillado no alcanza a cubrir la zona rural, lo que genera la contaminación de las aguas subterráneas y superficiales del río Cerrito. (105).

Por otra parte, el 55.94% del área de la cuenca del río Cerrito, está sembrada por cultivos agrícolas, específicamente por caña de azúcar en la zona plana de Piedemonte, y en la zona de montañosa, se ubica la producción cafetera, de lechería y cultivos de pan coger; lo que también puede afectar el río por la generación, de residuos sólidos y agroquímicos (109) (105).

Lo expuesto anteriormente, evidencia la situación preocupante del río Cerrito, que no solo es receptor de desechos domésticos sino también de residuos de las curtiembres con cromo, de manera sostenida por un tiempo superior a cuatro décadas, situación que justifica la importancia de determinar la posible mutagenicidad tanto del agua como de los sedimentos de esta fuente hídrica.

2.3. El método de la Prueba de Ames

Existen una variedad de pruebas que sirven de herramienta para la evaluación de la mutagenicidad en el medioambiente. Algunas de ellas son: la *prueba Ames*, la *prueba Ara* y la *prueba Umu*. No obstante, la *prueba Ames* se ha distinguido por ser uno de los métodos más aplicados por los investigadores desde hace algún tiempo, debido a la correlación entre los resultados positivos en el test, para ciertas sustancias determinadas como mutagénicas y el desarrollo del cáncer (35). Por consiguiente, se constituye en una prueba de gran utilidad para determinar la mutagenicidad, y a su vez la genotoxicidad de sustancias originadas por contaminación antropogénica, que podrían ser consideradas tóxicas con efectos perjudiciales para la salud de los seres vivos.

Sin embargo, Wegrzyn & Czyz en el 2003 (112), realizaron un comparativo entre los métodos mutagenicidad microbiológica, Vitatox, Mutatox y el ensayo con la bacteria *Vibrio harveyi*, con la prueba Ames. Este análisis hizo referencia, a las ventajas y desventajas que pueden presentar los diferentes ensayos, relacionados con: patogenicidad del microorganismo, sensibilidad en la detección del mutágeno, tiempo de realización y respuesta de la prueba, entre otras. Llegando a la conclusión, que no existe una prueba que pueda llamarse efectiva u idónea para todas las investigaciones. Pues, dependiendo de la naturaleza del estudio, las

necesidades del investigador, el ecosistema y la matriz de estudio, se podrá considerar una prueba con mayor efectividad sobre la otra, en un momento determinado (Tabla 5).

Tabla 5. Comparación de los métodos de mutagenicidad microbiológica con la prueba de Ames (ventaja y desventajas) *

Parámetro	Características del análisis de mutagenicidad			
	Prueba de Ames	Mutatox	Vitotox	Ensayo de <i>Vibrio harveyi</i>
Organismo expuesto a la sustancia problema	<i>Salmonella typhimurium</i> (patogénica)	Cepa bacteriana luminiscente M169 (no patogénica)	<i>S. typhimurium</i> (patogénica)	<i>V.harveyi</i> (no patogénica)
Sensibilidad a factores ambientales (no mutagénicos)	Alta	Baja	Alta	Baja
Tiempo de respuesta de la prueba	48 horas	24 horas	3 horas	48 horas
Sensibilidad a mutágenos ambientales	Aceptable para laboratorio de ensayo	Comparable con la prueba de Ames	Hasta 1000 veces más alto que la prueba de Ames	2-25 veces más alto que la prueba de Ames (según el naturaleza del mutágeno)
Clase de agentes mutagénicos detectables	Generalmente de todos los tipos	Generalmente de todos los tipos	Agentes que inducen respuesta SOS	Generalmente de todos los tipos
Requiere de equipo especial	No	Si	Si	No

*Adaptado de: Węgrzyn, G., Czyz, A. Detection of mutagenic pollution of natural environment using microbiological assays. Journal of Applied Microbiology. 2003 95(6), 1175–1181.(112)

La fortaleza de la prueba de Ames desarrollada en la década de 1970 por Bruce Ames (113), profesor de Bioquímica en UC-Berkeley, está cimentada en la combinación de un ensayo de mutación que origina células bacterianas revertantes y complementada con una simulación del metabolismo de los mamíferos. De esta manera, se desarrolla una prueba altamente sensible para sustancias químicas incorporadas al medio ambiente, que pueden ser analizadas como mutágenos ambientales, que se convierten en un riesgo por su capacidad de originar mutaciones en el ADN. En la Tabla 6, se referencian diferentes investigaciones realizadas con la prueba Ames, para determinar actividad mutagénica en diferentes matrices.

El método de la prueba de Ames está basado, en utilizar cepas bacterianas de *Salmonella typhimurium* auxótrofas para la histidina (*his*-), es decir, incapaces de sintetizar dicho aminoácido y, por lo tanto, de crecer en un medio carente del mismo. Las bacterias requieren del aminoácido histidina, para sintetizar muchas de sus proteínas. Estas bacterias mutantes,

se les llama *revertantes* porque han revertido el genotipo y fenotipo (*his+*) y ahora, son capaces de crecer en medios con trazas de histidina.

Tabla 6. Actividad mutagénica determinada, a través de la prueba de Ames en diferentes matrices de estudio

Matriz de estudio	Cepa <i>Salmonella typhimurium</i>	Referencia
Agua residual concentrada	YG7108 (derivado de la 15A35)	Giebner et al. 2018 (114)
Extracto de Plantas (EP)	TA98	Makhuvele et al. 2018(115)
EP con aflatoxina B1	TA100	Shi et al.2018 (116)
Agua potable	TA98	
Extracto de agua superficial de río	TA98 y TA100	Arboleda et al. 2017 (117)
Extractos orgánicos de agua superficial de río	TA98	Guan et al. 2017 (118)
Extracto de sedimentos de río	TA97	Hilario et al. 2017 (119)
Extracto de agua superficial	TA98 y TA100	Vivas et al. 2014 (120)
Extracto de sedimento estuarino	TA98	Liu et al. 2015 (121)
Extracto orgánicos en agua cruda (río), agua tratada y agua abastecimiento público	TA98 (sin s9)	Lv et al. 2015 (122)
Suelo y aguas residuales	TA98 y TA100	Okunola et al. 2014 (123)
Extractos orgánicos de agua y sedimentos de río	TA98, TA100, YG1041 e YG1042	Warren et al. 2015 (124)
Extracto agua superficial de río	TA98 y TA100	Sánchez, 2014 (125)
Flavonoides: quercitina, kaempferol, galangina, flavona, kaempferol	TA98 TA102	Resende et al. 2012 (126)
Extractos orgánicos de agua de río	TA98 y TA100	Sierra et al. 2012 (127)
Extracto agua superficial de río	TA98 y TA100	Táquez, 2011 (128)
Nanopartículas de óxido metálico	TA97 y TA100	Pan et al. 2010 (129)
Extracto de efluente de curtiembre	TA97, TA98 y TA102	Zubair et al. 2010 (130)
Suelo agrícola	TA98 y TA100	Ansari et al. 2009 (131)
Agua superficial y sedimentos de río	TA98 y TA100	Kutlu et al. 2004 (132)
Agua de río y efluente industrial (textil y tintes)	TA98-TA100	Mathur et al. 2004 (133)
Extracto de aguas residuales y aguas superficiales de río	TA98, YG1021 e YG1024	Nagai et al. 2002 (134)
Agua superficial, agua intersticial y sedimentos de río	TA97, TA98, TA100, TA102 y TA1535	Ferrão et al. 2001 (135)
Agua de río	TA100	López et al. 1999 (136)
Derivados del dimetacrilato	TA97, TA98, TA100 y TA102	Schweikl et al. 1998 (137)
Hidrocarburos aromáticos policíclicos	TA97, TA98 y TA100	Sakai et al 1985 (138)
Agente de la toxina PR (<i>Penicillium roqueforti</i>)	TA97 y TA1537	Levin et al. 1982 (139)

El ensayo de Ames, consiste en sembrar en placa un inóculo de *Salmonella typhimurium*, en medios con trazas de histidina y la adición de sustancias químicas para analizar su mutagenicidad. La cantidad de colonias que crecen en la placa indica la cantidad de revertantes (140).

En la Tabla 7 se puede observar que las distintas cepas se diferencian en el gen del operón de la histidina que está mutado, así como en el tipo de mutación que poseen, unas por desfase y otras por sustitución (141)(142).

Estas bacterias tienen otras mutaciones que incrementan su sensibilidad frente a la acción de los compuestos mutagénicos (Tabla 8) e igualmente, por disponer de la presencia del plásmido pKM101, con un gen que interviene en el sistema de reparación propenso a errores de transcripción (143)(144)(141).

Tabla 7. Cepas bacterianas de *Salmonella typhimurium* empleadas para la prueba de Ames*

Estirpe bacteriana	Tipo de mutación		Gen mutado
TA 100	Sustitución	AT→GC (mutado)	hisG
TA 102	Sustitución	GC→AT (mutado)	hisG
TA 97	Desfase	Ganancia CC	hisD
TA 98	Desfase	Pérdida C	hisD
TA 1537	Desfase	Ganancia CCC	hisC
TA 1538	Desfase	Pérdida C	hisD

*Tomado de: Mortelmans K, Zeiger E. The Ames Salmonella / microsome mutagenicity assay. Mutat Res. 2000 (141).

Tabla 8. Mutaciones de las cepas de *Salmonella typhimurium**

Mutación	Descripción
<i>Uvrβ</i>	Deleción de un gen que codifica para el sistema de reparación de la escisión del DNA, y produce un aumento de la sensibilidad en la detección de mutágenos. La deleción incluye también genes de la biotina y de la nitrato reductasa.
<i>Rfa</i>	Mutación que causa pérdida parcial de la barrera lipopolisacárida de la pared bacteriana, aumentando la permeabilidad a grandes moléculas que no atraviesan paredes celulares normales.
<i>pKM101</i>	Factor R. Confiere resistencia a ampicilina y aumenta la mutagénesis espontánea e inducida porque incrementa el sistema de reparación con error.

*Tomado de: Mortelmans K, Zeiger E. The Ames Salmonella / microsome mutagenicity assay. Mutat Res. 2000 (141).

En el ensayo de mutagenicidad, se evalúan varias dosis de los compuestos de interés con un mínimo de cinco dosis, y se incluyen los correspondientes controles negativos y positivos. Se debe verificar que las sustancias de ensayo, no son compuestos promutagénicos. Para ello, se realiza la prueba de Ames, en presencia y ausencia de un activador enzimático o fracción S9, lo que permite determinar si se trata de un mutágeno directo o dependiente (142)(145).

En este sentido, algunos compuestos químicos son intrínsecamente reactivos, es decir, pueden formar aductos con el ADN directamente. Se trata de compuestos electrofílicos, que reaccionan con los centros nucleofílicos (grupos aminos, grupos sulfhídricos, etc.) presentes en el ADN, se les consideran compuestos genotóxicos directos (52)(146). Otros compuestos, en cambio, necesitan de una activación metabólica antes de ser genéticamente activos; son los compuestos genotóxicos indirectos, que *per se* carecen de carácter electrofílico, pero se convierten en metabolitos electrofílicos por la acción de algunos sistemas enzimáticos presentes en las células de los mamíferos (147)(6)(142).

El uso del extracto enzimático (S9), obtenido de hígado de rata, en el ensayo de Ames, crea un modelo que ejemplifica lo que sucedería en la fisiología de los mamíferos; si una sustancia mutagénica fuera ingerida; las enzimas hepáticas de mamíferos pueden modificar los compuestos, pues la función del hígado es mitigar su toxicidad. Sin embargo, algunos compuestos se vuelven más tóxicos después de la modificación. El cambio en la estructura del químico, que en un principio no era mutagénico, permite generar mutaciones en el ADN de la bacteria, dando positivo en el ensayo de Ames (141).

En resumen, la prueba de Ames es una herramienta práctica que brinda resultados básicos y confiables en los estudios de mutagenicidad que se realizan en el medio ambiente. Teniendo en cuenta, que el río Cerrito ha sido el reservorio de los efluentes de las curtiembres, cuyas aguas residuales contienen residuos de cromo; que estas aguas están disponibles para los habitantes del municipio de El Cerrito y, asimismo, para ser utilizadas como aguas de riego para los cultivos de la región, es fundamental desarrollar investigaciones que determinen si el cromo o la mezcla de sustancias químicas presentes en el río Cerrito, han desencadenado actividades de mutagenicidad tanto en las aguas como en los sedimentos. Situación que finalmente afectaría la salud de los pobladores del municipio de El Cerrito, los cultivos agrícolas y sus productos derivados; los cuales son para el consumo humano.

3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD MUTAGÉNICA EN EL AGUA DEL RÍO CERRITO A TRAVÉS DE LA PRUEBA DE AMES CON LAS CEPAS TA97 Y TA100 *DE Salmonella typhimurium*

3.1. Introducción

La industria de curtiembres se caracteriza por el consumo de grandes volúmenes de agua; para el lavado, el remojo de las pieles, y la preparación de líquidos de curtición. Su insumo principal es el sulfato de cromo, que contiene el metal en forma trivalente. El metal se constituye en un residuo químico, en las aguas residuales del proceso de curtido y de esta manera, pasa a formar parte de los vertimientos, que son descargados a través del alcantarillado o directamente a los cuerpos de agua superficiales en los ríos.

Las características químicas del cromo y de los efluentes de las curtiembres que tienen un alto contenido de materia orgánica, en conjunto con las condiciones físico-químicas del medio, y a través de reacciones de óxido-reducción, le confieren al cromo la posibilidad de transformarse de la forma trivalente a la hexavalente. El cromo hexavalente es considerado perjudicial para la salud de los seres humanos, por sus propiedades genotóxicas, mutagénicas y carcinogénicas (148)(64) (149)(54) (150). Debido a que puede unirse a la cadena de ADN, formando aductos, alterando la secuencia de nucleótidos; por adición o sustitución de bases nitrogenadas, donde estas alteraciones van a causar cambios, lo que se refleja como una mutación en la cadena de ADN.

Esta problemática en los ecosistemas, genera preocupación de forma global en todo el mundo, pues la contaminación por metales pesados, no solo afecta las aguas superficiales, sino, todo el ecosistema, incluyendo los organismos vivos; este detrimento de los ecosistemas afecta también a los seres humanos, pues ellos utilizan, y necesitan, los servicios que el ecosistema brinda para subsistir, lo que origina un riesgo para su salud, que se puede ver lesionada por esta sustancia tóxica (cromo). Por tal razón, se utilizan diferentes recursos que permiten evaluar el alcancen de la contaminación por metales pesados y la mutagenicidad en el medioambiente; la Prueba de Ames, es uno de los métodos más aceptados y utilizados, pues su ventaja radica en que permite evidenciar la mutagenicidad en la matriz expuesta al contaminante, como también, incorporar un sistema exógeno de activación metabólica, que simula el efecto del contaminante en el sistema de los mamíferos.

Las actividades propias de las curtiembres en el municipio de El Cerrito, como son el consumo de agua excesivo, la generación de residuos sólidos y líquidos, cargados de

sustancias químicas como sulfuros y cromo trivalente, han sido de gran preocupación tanto por las entidades ambientales, como por el sector académico. Pues los efluentes de las curtiembres, suelen ser descargados a través del alcantarillado municipal o directamente al río Cerrito, por muchos años. Sin embargo, pequeñas curtidurías aún realizan descargas al río. De este modo, el río Cerrito se convirtió en el reservorio de los efluentes de las curtiembres, y hasta al momento se desconoce si la acción conjunta de los residuos, y específicamente del cromo, pueden estar afectando al río de tal manera, que causen una actividad mutagénica. Con el fin de obtener una evidencia, sobre la posibilidad de que las aguas del río Cerrito, estén desarrollando procesos mutagénicos, el objetivo de esta investigación fue determinar la actividad mutagénica en el agua del río Cerrito a través de la prueba de Ames con las cepas TA97 y TA100 de *Salmonella typhimurium*.

3.2. Métodos

3.2.1. Área de estudio

Este estudio se desarrolló en la zona baja de la cuenca del río Cerrito, delimitada entre el corregimiento del Pomo y antes de la desembocadura del río Cauca-Puente del Callejón de San Fernando en el municipio de El Cerrito. En esta zona se establecieron tres (3) estaciones de monitoreo (Figura 4). Los muestreos se realizaron antes de la descarga de los efluentes de las curtiembres, en el Balneario Las Brisas (sitio1) (Latitud: 03°38'26,250'' - Longitud: 076°11'05,700'') (Figura 5). En el punto después de la descarga, en el sitio (2) Puente vía principal Cali-Buga (Latitud: 03°40'44,400'' - Longitud: 076°18'11,400'') (Figura 6) y antes de la desembocadura al río Cauca - Puente callejón San Fernando (sitio 3) (Latitud: 03°41'12,169'' - Longitud: 076°20'53,304'') (Figura 7).

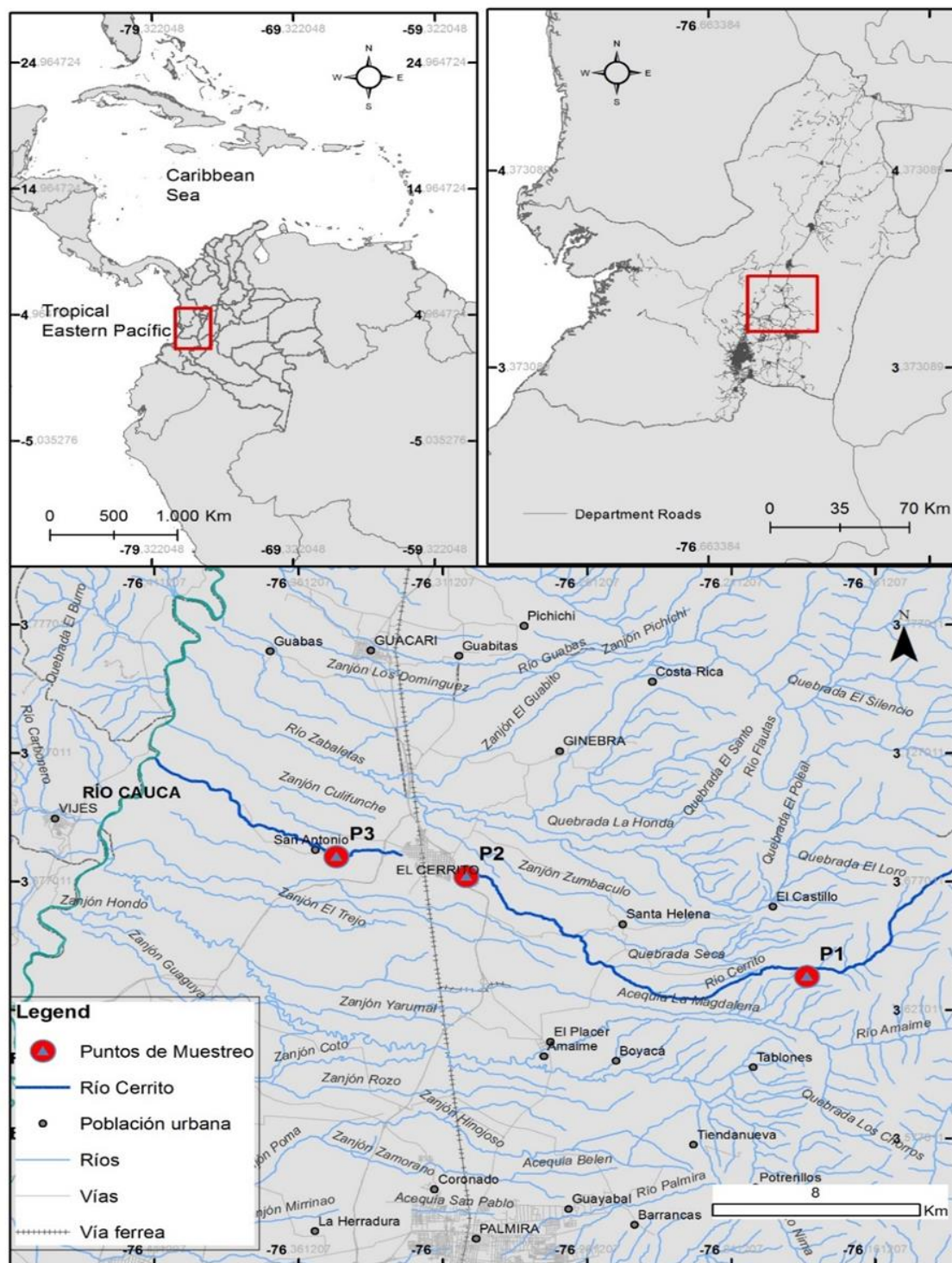


Figura 4. Ubicación geográfica del área de estudio

P1. Balneario Las Brisas (Sitio 1). P2. Puente vía principal Cali-Buga (Sitio 2). P3. Antes de la desembocadura al río Cauca-Puente Callejón San Fernando (Sitio 3).

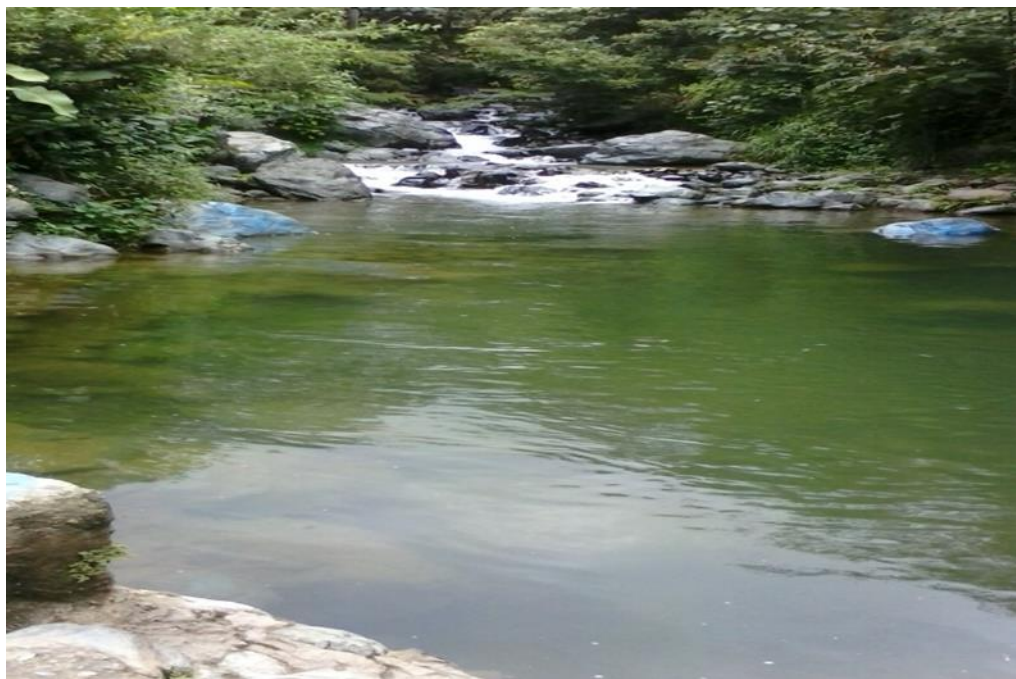


Figura 5. Sitio 1. Balneario Las Brisas (zona arriba-antes de la descarga de efluentes)



Figura 6. Sitio 2. Puente vía principal Cali-Buga (zona en el sitio-después de la descarga de efluentes de curtiembres)



Figura 7. Sitio 3. Antes de la desembocadura al río Cauca-Puente Callejón San Fernando (zona abajo)

3.2.2. Muestreo

3.2.2.1. Recolección de las muestras

La recolección de las muestras se efectuó durante un año, a partir del mes de abril de 2014 hasta el mes de abril del 2015. El muestreo se realizó de acuerdo a la programación previamente establecida por el Laboratorio Ambiental de la Corporación Autónoma Regional del Valle del Cauca (CVC), para el río Cerrito.

En cada estación de monitoreo se tomó una muestra de 6 L de agua superficial en el cauce del río, a una profundidad de 50 cm aproximadamente, de acuerdo a Junk et al. (1974)(151). Cada muestra se dividió en partes iguales, para aplicar distintos tratamientos en campo, con el objetivo de realizar en Laboratorio Ambiental (CVC) análisis fisicoquímicos y en los laboratorios de la Universidad del Valle el análisis de mutagenicidad. Las muestras fueron, finalmente, guardadas y rotuladas en recipientes de polietileno (llenados en su totalidad para evitar el contenido del aire) y posteriormente conservadas a una temperatura de 4°C hasta el momento de su procesamiento.

3.2.2.2. *Pretratamiento de las muestras*

El tratamiento de las muestras de agua para la evaluación de la actividad mutagénica, consistió en la concentración de las muestras mediante columnas de extracción y la utilización de ácido nítrico (HNO_3) y ácido clorhídrico (HCl). Los procesos de concentración de las muestras se llevaron a cabo en el Laboratorio de Electroquímica y Absorción atómica del departamento de Química y el análisis de actividad mutagénica mediante la Prueba de Ames, se efectuó en el Laboratorio de Investigaciones Microbiológicas (LIM) del departamento de Biología de la Universidad del Valle.

a. Extracción de metales pesados asociados a sólidos suspendidos: Inicialmente, se filtró al vacío un volumen de muestra de 250 mL, utilizando filtros de membrana con un diámetro de poro de $0.45 \times 0.47 \mu\text{m}$. Para la obtención del extracto, los filtros cargados con partículas o sólidos suspendidos se disolvieron en 15 mL de HNO_3 concentrado y se evaporó a casi sequedad. El extracto final se llevó a matraz aforado, se reconstituyó con HNO_3 2M y se enrasó a un volumen de 10 mL.

b. Extracción de metales pesados asociados a sustancias orgánicas (húmicas): Para la obtención del extracto, el filtrado de 250 mL se pasó a través de una columna de extracción, empaquetada con 400 mg de resina Amberlite XAD-16 no iónica (previamente activada). Se realizaron eluciones de los metales retenidos en la resina con 25 mL de HCl 1M en acetona. El eluido se evaporó a casi sequedad, y el extracto final se reconstituyó con HNO_3 2M en un matraz aforado y se enrasó a un volumen de 10 mL.

c. Extracción de iones libres de metales pesados: Para su obtención, al efluente de 250 mL resultante del proceso de extracción b., se le añadió tetraborato de sodio hasta alcanzar un pH de 9.18. Esta solución se pasó a través de la columna de extracción y los metales retenidos en la resina, se eluyó con 25 mL de HCl 1M en acetona. Luego de la evaporación del eluido, el extracto final se reconstituyó con HNO_3 2M en un matraz aforado y se enrasó a un volumen de 10 mL.

d. Extractos para la Prueba de Ames: Para la preparación de los extractos totales, se tomaron 6 mL de cada uno de los tres tipos de extractos descritos anteriormente. Los 18 mL fueron mezclados, neutralizados y evaporados casi a sequedad. Posteriormente, se reconstituyen con Dimetilsulfóxido (DMSO) y se enrasó a un volumen final de 5 mL.

3.2.2.3. Caracterización fisicoquímica y microbiológica del agua superficial

En el sitio de muestreo se realizaron mediciones de pH, Conductividad, Turbiedad y Temperatura. Estas mediciones se efectuaron con el Medidor Multiparamétrico Horiba 129 previamente calibrado. El estudio fisicoquímico fue realizado por el Laboratorio Ambiental de la CVC, siguiendo los métodos estandarizados para el análisis de agua superficial del Standard Methods (152). La concentración de cromo total, se realizó mediante la técnica de espectrometría de absorción atómica de llama, de acuerdo al método 3111B. De igual manera, el laboratorio efectuó los análisis de los parámetros fisicoquímicos, correspondientes al programa de monitoreo para la valoración de los Índices de Calidad del Agua (ICA) (105):

- a. ICA CETESB: índice que permite comprobar la calidad del agua para consumo humano, clasifica el agua desde de pésima calidad hasta excelente calidad, incluye los siguientes parámetros; temperatura, fósforo total, pH, Sólidos Totales (ST), Oxígeno disuelto (OD), Turbiedad, Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO5), Coliformes fecales y Nitrógeno Total.
- b. ICA DINIUS: índice que permite comprobar la calidad del agua para uso agrícola (riego) y califica el nivel de contaminación entre 0 y 100, incluye los siguientes parámetros; DBO5, OD, pH, Color, Dureza total, Nitratos, Temperatura, Cloruros, Conductividad, Alcalinidad, Coliformes fecales y Coliformes totales.
- c. ICOMO: índice de contaminación por materia orgánica, arroja un valor entre 0 y 100, que califica el nivel de contaminación del agua e incluye los siguientes parámetros; DBO5, Coliformes totales y Porcentaje de Saturación de Oxígeno.

3.2.2.4. Determinación de la actividad mutagénica

Los extractos totales fueron evaluados con el Método de Concentración Directa (extracto puro) según Vargas et al. (2001)(135), mediante el ensayo de *Salmonella*-fracción microsomal (Prueba Ames); empleando el Ensayo de Preincubación y con el agregado de un sistema exógeno de activación metabólica (Mezcla S-9 al 10%). La mezcla S9, permite determinar la posible mutagenicidad indirecta en el sistema de los mamíferos, de acuerdo a Maron y Ames (1983)(144). Se evaluó la respuesta del Índice de Mutagenicidad (IM), con y sin activación metabólica, con cada una de las cepas bacterianas.

Para la prueba se utilizaron dos cepas de *Salmonella typhimurium* dependientes de histidina (his-): TA97 y TA100. Todas las cepas empleadas en la Prueba de Ames, son dependientes de histidina y cuentan con ciertas alteraciones genéticas que las hacen mucho más sensibles

y eficientes en cuanto a la evaluación de la actividad mutagénica. Sus características genotípicas se resumen en la Tabla 9.

Tabla 9. Genotipo de cepas bacterianas TA97 y TA100 de *Salmonella typhimurium* *

Cepa	Alelo blanco	Tipo de mutación	Defecto LPS	Sistema de reparación	Plásmido
TA97	<i>hisD6610</i>	Cambio marco de lectura	Rfa	Δ uvrB	pKM101
TA100	<i>hisG46</i>	Sustitución pares de bases	Rfa	Δ uvrB	pKM101

*Adaptado de Mortelmans K, Zeiger E. The Ames Salmonella / microsome mutagenicity assay. Mutat Res. 2000 (141).

3.2.2.5. **Reactivación de la cepa.**

Los cultivos bacterianos de las cepas liofilizadas se conservaron a -20°C, la reactivación de las cepas TA97 y TA100 se realizó mediante un proceso inicial de aclimatación a temperatura ambiente durante 30 minutos. Cada una de las cepas se cultivó en 25 mL de caldo nutritivo OXOID No. 2 complementado con 78 μ L de ampicilina (8 mg/L), incubando a 37°C bajo agitación constante a 120 rpm en agitador 110 HEIDOLPH durante la noche por 12 a 14 horas. El cultivo overnight de cada una de las cepas permitió alcanzar una densidad óptima de $1-2 \times 10^9$ células; alcanzada la densidad óptima, se pudo confirmar la estabilidad de las marcas genotípicas.

3.2.2.6. **Preparación de cultivos congelados permanentes**

Para la preparación de cultivos congelados permanentes, se inoculó cada una de las cepas provenientes del cultivo overnight en cajas Petri con agar nutritivo, se realizó una siembra en superficie por estrías, para asegurar el crecimiento de colonias aisladas, por último, se llevó a incubación a 37°C por 48 horas. La purificación del cultivo se efectuó mediante la revisión del crecimiento bacteriano y la característica morfológica de la cepa, se tomó la mejor colonia aislada, la cual se sembró por estrías en la superficie de una caja de Petri con agar mínimo glucosa (GM) suplementado con un exceso de His/Bio y ampicilina, se llevó a incubación a 37°C por 48 horas. Luego, se realizó el mismo procedimiento, obteniendo una segunda purificación del cultivo (141).

Posteriormente, se tomaron cinco colonias del último cultivo purificado y se inocularon por estría en la superficie de una caja de Petri con agar mínimo (GM) suplementado con un exceso de His/Bio y ampicilina, se llevó a incubación a 37°C por 48 horas. Finalmente, confirmado el crecimiento bacteriano se tomó un inóculo de cada estría, y cada uno se sembró en 5 mL de caldo nutritivo, se realizó un cultivo overnight a 37°C para confirmar las marcas genotípicas.

Identificada la colonia con mayor viabilidad genética, de la caja Petri que contenía el cultivo puro, se tomó un inóculo de dicha colonia, y se realizó un nuevo cultivo overnight en 4.5 mL de caldo nutritivo, se llevó a incubación a 37°C con agitación a 120 rpm para alcanzar una densidad cercana a $1-2 \times 10^9$ células. Se adicionó a dicho cultivo 0,5 mL de un criopreservado estéril (glicerol/DMSO), se realizó la homogenización por vortex los 5 mL resultantes, se distribuyeron en 5 tubos criogénicos estériles, los cuales fueron almacenados a -80°C (141).

3.2.2.7. Confirmación de marcas genotípicas

El análisis de las características genotípicas de las cepas *TA97* y *TA100* (véase Tabla 9), se realizó de acuerdo a Mortelmans & Zeiger (2000)(141):

Dependencia de histidina: Se mezcló 0.1 mL de L-histidina 0.1 M y 0.1 mL de D-biotina 0.5 mM en agar mínimo (GM). Se sembraron placas de control de biotina y de histidina-biotina y se incubaron a 37°C por 48 horas (la dependencia histidina, impide el crecimiento bacteriano, en las placas carentes de histidina).

Mutación *rfa*: Se adicionó 0.1 mL de los cultivos incubados a 45°C (previamente agitado tres veces) en una placa de agar. Posteriormente, se difunden 10 µL de solución cristal violeta (1 mg/mL) en el centro de un disco de papel filtro Whatman estéril que se dispuso sobre el agar. Luego de 12 horas de incubación a 37°C, debe aparecer una zona de inhibición de aproximadamente 14 mm alrededor del disco, indicando así la presencia de la mutación *rfa* (la mutación *rfa* altera la estructura correcta de la barrera lipopolisacárida que rodea a la bacteria, haciéndola más permeable a distintas sustancias a las que es expuesta).

Mutación *uvrB*: Se sembraron alícuotas de las cepas en cajas de Petri con agar, se cubrieron hasta la mitad con papel aluminio y se irradiaron con la luz ultravioleta de una lámpara germicida de 15 W y 280 nm de longitud de onda a una distancia de 33 cm durante ocho segundos. Las cajas se incubaron durante 24 horas y posteriormente se verificó el crecimiento (la mutación *uvrB* no permite un correcto arreglo de fallas en la recombinación del DNA como producto de la exposición ante agentes mutagénicos).

Factor R (Plásmido *pKM101*): El Factor R otorga resistencia a la ampicilina y debe ser evaluado rutinariamente dada su inestabilidad y alta probabilidad de perderse. En esta prueba, las cepas se sembraron durante 12 a 14 horas en agar mínimo (GM) con 0.1 mL de ampicilina a 0.1 M (10 µL de 8 mg/mL en 0,02N NaOH) (153). En esta prueba, sólo aquellas cepas que contengan el plásmido *pKM101* crecerán.

3.2.2.8. Preparación de las cajas maestras y cultivos en agar inclinado

De un cultivo overnight en caldo nutritivo, se tomó un inóculo y se sembró en superficie por estría en caja Petri con agar GM suplementado con 0,05 mM de histidina y 25 µg/mL de ampicilina, se incubó durante 48 horas a 37°C. Al finalizar la incubación, se seleccionaron

las cajas que presentaron un mejor crecimiento bacteriano. Se tomó un inóculo y se sembró por estría en la superficie de agar GM inclinado (10 mL) en tubos de ensayo, se incubó a 37°C por 48 horas. Transcurrido el periodo de incubación, se verificó el crecimiento bacteriano. Posteriormente son conservados en refrigeración a 4°C por 2 meses, tiempo en el cual los cultivos conservan sus características genotípicas (154).

3.2.2.9. Preparación de la mezcla de activador enzimático S-9

Por cada mililitro de mezcla se adicionaron 0.04 µL de fracción de S-9, 8 µmoles de MgCl₂, 33 µmoles de KCl, 5 µmoles de Glucosa-6-fosfato, 4 µmoles de NADP y 100 µmoles de fosfato de sodio a pH 7.4. Las soluciones de NADP (0.1 M) y glucosa-6-fosfato (1M) se prepararon con agua destilada y se almacenaron en tubos estériles a -20°C. Las soluciones de las sales MgCl₂ (0.4M) y KCl (1.65 M) y del buffer de sodio a pH 7.4 (0.2 M), se esterilizaron en autoclave y se conservaron en refrigeración (153).

3.2.2.10. Prueba de Ames

El ensayo de mutagenicidad se desarrolló para cada extracto de muestra (de cada punto de muestreo) y para cada una de sus concentraciones determinadas mediante el ensayo preliminar de dosis-respuesta. Este ensayo se realizó por triplicado para las cepas *TA97* y *TA100*, con y sin activación enzimática (S-9) considerando la evaluación de actividad mutagénica de la sustancia problema y dos controles: uno positivo (para confirmar las características genotípicas de las cepas) y uno negativo. Se empleará el DMSO como el solvente de control en los controles negativos y 2-aminofluorono (2-AF) (1 mg/mL) junto con Azida de sodio (AZ) (1 mg/mL), como sustancias mutagénicas conocidas para los controles positivos con y sin activación metabólica (Mezcla S-9 al 10%) respectivamente (144)(141).

El ensayo de mutagénesis incluyó el procedimiento de Incorporación en placa: se adicionó 0.1 mL del cultivo de la cepa con una densidad de $1-2 \times 10^9$ cel. /mL a 2,0 mL de agar superior entre 43°C y 45°C, con 0.2 mL de L-histidina/D-biotina 0.5 mM, 0.5 mL de la mezcla S-9 si es el caso y 0.5 mL del extracto de la muestra de agua del río Cerrito. Incorporado el inóculo, se agitó suavemente la mezcla y se vertieron rápidamente sobre cajas de Petri con agar mínimo (GM) y se incubaron a 37°C durante 48 horas. En cada uno de los ensayos, se incluyeron controles negativos y positivos.

Interpretación de resultados. Para determinar el Índice Mutagénico (IM), se empleó la regla del *two-fold increase*; una muestra se considera Mutagénica (M) si la relación entre las revertantes espontáneas obtenidas en la muestra y las revertantes espontáneas obtenidas en el control negativo (DMSO) es igual o mayor a dos (≥ 2). De igual manera, se consideró Levemente mutagénica (LM) si el IM fue inferior a dos (< 2), pero diferente de uno ($\neq 1$) (144)(153). Finalmente, los índices menores a uno (> 1) se consideran como no mutagénicos (NM) (155)(141).

3.2.3. Diseño experimental y análisis estadístico

Selección y descripción de la investigación. El estudio se clasificó como una investigación experimental, transversal.

- a. Experimental:** La variable experimental en el agua (concentración de la muestra) se evaluó en diferentes ensayos con dos especies de cepas microbiológicas, con o sin activación enzimática; con el objetivo de determinar efecto sobre la variable respuesta y evidenciar la posible actividad mutagénica.
- b. Transversal:** El estudio de las variables se realizó en un momento dado en el tiempo; la recolección de las muestras se efectuó en un periodo de un año, iniciando en el mes de abril del 2014.

Población de estudio y muestra. En esta investigación la población de estudio fue el agua del río Cerrito en el Valle del Cauca. La muestra estudio estaba comprendida en tres puntos que corresponden al programa de muestreos de la Corporación Autónoma Regional del Valle del Cauca (CVC) para la cuenca del río Cerrito en el Valle del Cauca. Las estaciones de muestreo fueron establecidas teniendo en cuenta la cabecera del municipio de El Cerrito; siendo este el punto de referencia de acuerdo al objetivo de la investigación, los cuales se describieron en el área de estudio. La investigación se realizó con muestreos que se repiten tres veces, debido al costo y al tiempo de realización de los muestreos programados por la CVC.

Diseño experimental. Para el análisis estadístico de la investigación, se utilizó un experimento de parcelaciones divididas bajo un diseño de bloques con estructura factorial de 12 tratamientos ($3 \times 2 \times 2$), 3 réplicas cada uno. Se definió como:

Unidad experimental: Placas con Agar Glucosa Mínimo (GM) (numeral 2.2.2.1)

Variable de respuesta: Índice de mutagenicidad (IM).

Determinación de niveles, factores y tratamientos.

- a. Factor 1.: Punto de muestreo de agua**

Para el cual se tuvo en cuenta tres niveles: aguas arriba (Balneario las brisas), aguas en el sitio (Puente Cali-Buga) y aguas abajo (Puente Callejón San Fernando, antes de la desembocadura al río Cauca).

- b. Factor 2.: Cepa de *Salmonella typhimurium***

Para la cual se tuvo en cuenta dos niveles que fueron las cepas TA97 y TA100

c. *Factor 3.: Tratamiento de activación metabólica*

Para el cual se tuvo en cuenta dos niveles: ausencia de la mezcla S-9 y presencia de la mezcla S-9.

Por lo tanto, se tendrán 12 tratamientos ($3 \times 2 \times 2$), con 3 réplicas cada uno. En la Tabla 10 se muestra la estructura factorial de esta experimentación.

Tabla 10. Estructura factorial para muestra de agua superficial

	Factores	Niveles
F1	Agua	Sitio 1: zona arriba (antes de la descarga)
		Sitio 2: zona en el sitio (después de la descarga)
		Sitio 3: zona abajo (antes de la desembocadura al río Cauca)
F2	Bacterias	T97
		TA100
F3	Tratamiento de activación metabólica	Con S9
		Sin S9

La aleatorización de los experimentos se realizó con la recolección de las muestras agua al azar en los diferentes sitios. Posteriormente entran en proceso de pre tratamiento y después del pretratamiento, se le asigna al azar la cepa bacteriana y el tratamiento de activación metabólica.

Análisis estadístico. Dadas las condiciones como se realizó el experimento, corresponde a un Experimento de Parcelas divididas bajo un Diseño de bloques, como se evidencia en el modelo estadístico (Anexo 01). Las hipótesis que se probaron para este modelo fueron:

Hipótesis de interacción: Esta es la primera que debe probarse, la significancia de la interacción.

$H_0: (\tau\gamma)_{ikl} = 0 \quad \forall_{ij}$ (no hay interacción entre los factores sitio, cepa y activación metabólica).

$H_0: (\tau\gamma)_{ik} = 0 \quad \forall_{ij}$ (no hay interacción entre los factores sitio, cepa).

$H_0: (\tau\alpha)_{ii} = 0 \quad \forall_{ij}$ (no hay interacción entre los factores sitio, activación).

$H_0: (\gamma\alpha)_{kl} = 0 \quad \forall_{ij}$ (no hay interacción entre los factores cepa y activación metabólica).

Hipótesis de efectos principales:

$$H_0: \tau_1 = \tau_2 = \tau_3 = \tau \quad \text{vs.} \quad H_1: \tau_i \neq \tau_{i'}, \forall i \neq i',$$

$$H_0: \gamma_1 = \gamma_2 = \gamma \quad \text{vs.} \quad H_1: \gamma_k \neq \gamma_{k'}, \forall k \neq k',$$

$$H_0: \alpha_1 = \alpha_2 = \alpha \quad \text{vs.} \quad H_1: \alpha_l \neq \alpha_{l'}, \forall l \neq l',$$

Los cálculos de los resultados de estos experimentos como son el análisis de la varianza, comparaciones múltiples, prueba de Levene y gráficos se efectuaron en el programa estadístico R, en el cual se contrastan las pruebas de hipótesis de interacción y de efectos principales frente a un nivel de significancia del 5%.

Se determinaron las interacciones entre: el sitio de muestreo y el activador enzimático; la cepa y el activador enzimático, donde la significancia de estas interacciones se comprobó por medio de la Prueba de Tukey (nivel de significancia del 5%). Finalmente, se mostró el efecto entre los factores, sitio de muestreo, cepa y activador enzimático.

3.3. Resultados

El estudio de la mutagenicidad por efecto de los efluentes de las curtiembres en aguas superficiales del río Cerrito, inicia con la caracterización fisicoquímica y la evaluación del índice de calidad del agua. Posteriormente, se realiza la evaluación de la actividad mutagénica mediante la prueba de Ames, con las cepas TA97 y TA100 de *Salmonella typhimurium*. Estos análisis se realizaron en cada una de las estaciones de monitoreo: Sitio 1 (Balneario Las Brisas -zona arriba, antes de la descarga), Sitio 2 (Puente vía principal Cali-Buga-zona en el sitio, después de la descarga) y Sitio 3 (Antes de la desembocadura al río Cauca-Puente Callejón San Fernando, zona abajo).

3.3.1. Caracterización fisicoquímica y microbiológica

La determinación de las condiciones fisicoquímicas y microbiológicas del agua superficial del río Cerrito, se presentan en la Tabla 11. Se puede observar que las condiciones de pH del agua en el río, son iguales en las diferentes estaciones de muestreo, pero se presentó un leve aumento en el Sitio 1. Balneario Las Brisas (zona arriba-antes de la descarga), en un rango entre 7.86 – 8.02. La conductividad aumentó a lo largo que se desplazan las corrientes en el río, siendo menor en el Balneario Las Brisas con un valor promedio de 141.3 $\mu\text{S}/\text{cm}$ y mayor, antes de la desembocadura al río Cauca (zona abajo) con un valor promedio de 385 $\mu\text{S}/\text{cm}$.

Por otro lado, se registró una mayor turbiedad en el Sitio 2. Puente Principal Cali-Buga (zona en el sitio-después de la descarga), seguido del Sitio 3, antes de la desembocadura al río

Cauca y del punto Balneario La Brisas. Por consiguiente, el color aparente fue mayor en el Puente vía Principal Cali-Buga, en el primer (65.8 UPC) y tercer muestreo (21 825.0 UPC).

Tabla 11. Caracterización fisicoquímica y microbiológica de las aguas del río Cerrito

Parámetros	Unidades	Abril 2014			Septiembre 2014			Abril 2015		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3
Temperatura	°C	20	23.7	24	19.8	23.4	24.8	18.0	25.0	25
pH	Unidades	7.86	7.65	7.57	7.94	7.65	7.51	8.02	7.57	7.41
Conductividad	µS/cm	147.0	270.0	372.0	139.0	231.0	300.0	138	297	483
Turbiedad	UNT	10.0	240.0	177.0	33.0	158.0	42.0	0.83	28.4	12.5
Color aparente	UPC	2.0	65.8	40.9	9.0	7.65	30.0	4.60	21 825.0	45.8
Sólidos Totales	mg/L	44.0	209.0	306.0	110.0	214.0	230.0	126	26 108.0	416
Sólidos suspendidos	mg/L	19.5	97.5	76.9	<11.4	44.0	18.0	<11.4	22 667.0	82.0
Sólidos disueltos	mg/L	24.5	122.0	229.0	98.6	170.0	212.0	115	3 441.0	334
Demanda Bioquímica de Oxígeno	mg/L	<0.954	1.37	21.2	2.76	3.83	9.39	1.14	97.9	16.7
Demanda Química de Oxígeno	mg/L	<5.33	12.0	164.0	18.1	3.83	146.0	94.7	695.0	144
Oxígeno disuelto	mg/L	7.26	6.12	3.43	7.32	6.98	2.52	7.59	(-)	3.03
Oxígeno porcentaje saturación	%S	94.42	81.59	45.82	94.82	92.52	34.19	94.71	(-)	41.26
Alcalinidad	mg/L	72.2	109.0	135.0	79.2	111.0	121.0	68.4	245	164.0
Dureza	mg/L	67.3	123.0	141.0	81.6	123.0	119.0	74.5	133	159
Cloruros	mg/L	2.19	5.26	15.6	<2.33	5.47	13.3	<2.33	4.72	32.1
Nitrógeno Total	mg/L	<2.08	<2.08	3.07	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Nitratos	mg/ NO ₃	1.62	3.56	3.44	0.616	2.13	1.16	1.96	6.60	5.94
Nitritos	mg/L NO ₂	(-)	0.0452	0.173	0.0128	0.0776	0.569	0.0206	0.0961	0.296
Sulfatos	mg/L	<5.0	13.8	19.5	5.17	16.3	25.6	5.91	15.9	43.6
Fósforo Total	mg/L	<0.0509	0.0670	0.380	<0.0509	0.0905	0.526	<0.0509	0.115	0.319
Hierro Total	mg/L	<0.240	9.57	4.52	<0.240	2.66	2.67	0.295	386.0	1.29
Manganeso Total	mg/L	<0.246	0.370	0.302	0.595	0.828	<0.246	1.20	16.0	1.48
Cromo Total	mg/L	<0.294	<0.294	<0.294	<0.294	<0.294	<0.294	<0.294	1.24	<0.294
Coliformes Totales	NMP/100mL	6,6,E+04	1,1,E+06	1,5,E+07	9,3,E+02	6,6,E+05	1,1,E+07	6,6,E+03	6,6,E+05	6,6,E+07
Coliformes Fecales	NMP/100mL	4,3,E+03	4,3,E+04	2,3,E+06	2,3,E+02	2,4,E+05	9,3,E+05	7,5,E+02	2,4,E+05	2,4,E+07

1: Sitio 1 (Balneario Las Brisas-Zona arriba). 2: Sitio 2. (Puente vía principal Cali-Buga-Zona en el sitio). 3: Sitio 3. (Antes de la desembocadura al río Cauca-Puente Callejón San Fernando-Zona abajo).

De igual manera, los Sólidos Totales (ST) presentaron un incremento antes de la desembocadura al río Cauca, a excepción del año 2015, donde la mayor concentración de ST se registró en el Sitio 2, después de la descarga (26 108.0 mg/L). Los Sólidos Suspendidos

(SS) presentaron una mayor concentración en el Sitio 2 - después de la descarga, seguido del Sitio 3-antes de la desembocadura al río Cauca y posteriormente, el Sitio 1-antes de la descarga. En el año 2015, también se registró una mayor concentración de Sólidos Disueltos (SD), en el Sitio 2, zona después de la descarga (3 441 mg/L), seguido del Sitio 3 (334 mg/L) y, por último, en el Sitio 1-antes de la descarga (115 mg/L). Del mismo modo, la Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO): 97.9 mg/L y la Demanda Química de Oxígeno (DQO): 695 mg/L, presentaron su mayor concentración en el Sitio 2. En general, se observó que el agua superficial del río Cerrito presenta mayor DQO en cada sitio (<5.33 mg/L a 695 mg/L), al comparar con las DBO5, la cual registró concentraciones más bajas (<0.954 mg/L a 97.9 mg/L). En cuanto al porcentaje de saturación de oxígeno, se observa que disminuye a medida que las corrientes de agua, avanzan hacia el Sitio 3 (zona abajo, antes de la desembocadura al río Cauca). Con un mayor porcentaje, en la Sitio 1 (zona arriba-antes de la descarga), con un valor promedio de 94.65% y menor en la zona abajo-antes de la desembocadura al río Cauca, con un valor promedio de 40.42%.

De acuerdo a los análisis microbiológicos, se encontró un mayor número de microorganismos Coliformes (totales y fecales) en la zona abajo, antes de la desembocadura al río Cauca; en promedio se registró 3.1×10^7 NMP/100 mL para Coliformes totales y 9.1×10^6 NMP/100 mL para Coliformes fecales. Para el año 2015, se presentó el aumento de estos microorganismos en esta zona. Por el contrario, zona arriba (antes de la descarga), se presentó un menor número de microorganismos Coliformes. De igual modo, la alcalinidad, también aumenta a medida que las corrientes de agua avanzan, hacia el punto antes de la desembocadura al río Cauca, con un valor promedio de 139 mg/L. Siendo menor, zona arriba-antes de la descarga con un valor promedio de 73.26 mg/L. El mismo comportamiento se registra, con la dureza y los cloruros. Con respecto a los iones de Hierro (Fe), Manganeseo (Mn) y Cromo (Cr); el hierro muestra una mayor concentración en la zona en el sitio-después de la descarga, en el primer semestre del año 2014 y en el año 2015. Pero, en el segundo semestre del año 2014 muestra igual concentración en las zonas en el sitio-después de la descarga y en la zona abajo-antes de la desembocadura al río Cauca. El Mn, siempre registra una mayor concentración en la zona-después de la descarga, específicamente en el punto, Puente vía principal Cali-Buga. Se evidencia un aumento gradual en el tiempo, con concentraciones que van desde 0.370 mg/L (1^{er} muestreo) y 0.828 mg/L (2^{do} muestreo), en el año 2014 y 16.0 mg/L (3^{er} muestreo) en el año 2015. La concentración Cr Total, puede ser detectable en el año 2015 con 1.24 mg/L, fecha en la cual, se evidencia un incremento en los niveles de los parámetros fisicoquímicos evaluados.

Con relación, a la valoración de los Índices de Calidad del Agua (ICA), los sitios estudiados, que el ICA CETESB (Figura 8) indica, que las aguas superficiales del río Cerrito zona arriba, en el punto Balneario Las Brisas (antes de la descarga), presentan una *buena calidad*. La cual, se va deteriorando a medida que las corrientes avanzan el curso hacia la zona abajo,

antes de la desembocadura al río Cauca; pasando a *regular calidad* en el Puente vía principal Cali-Buga (después de la descarga) a *mala calidad* en la zona abajo-Puente Callejón San Fernando.

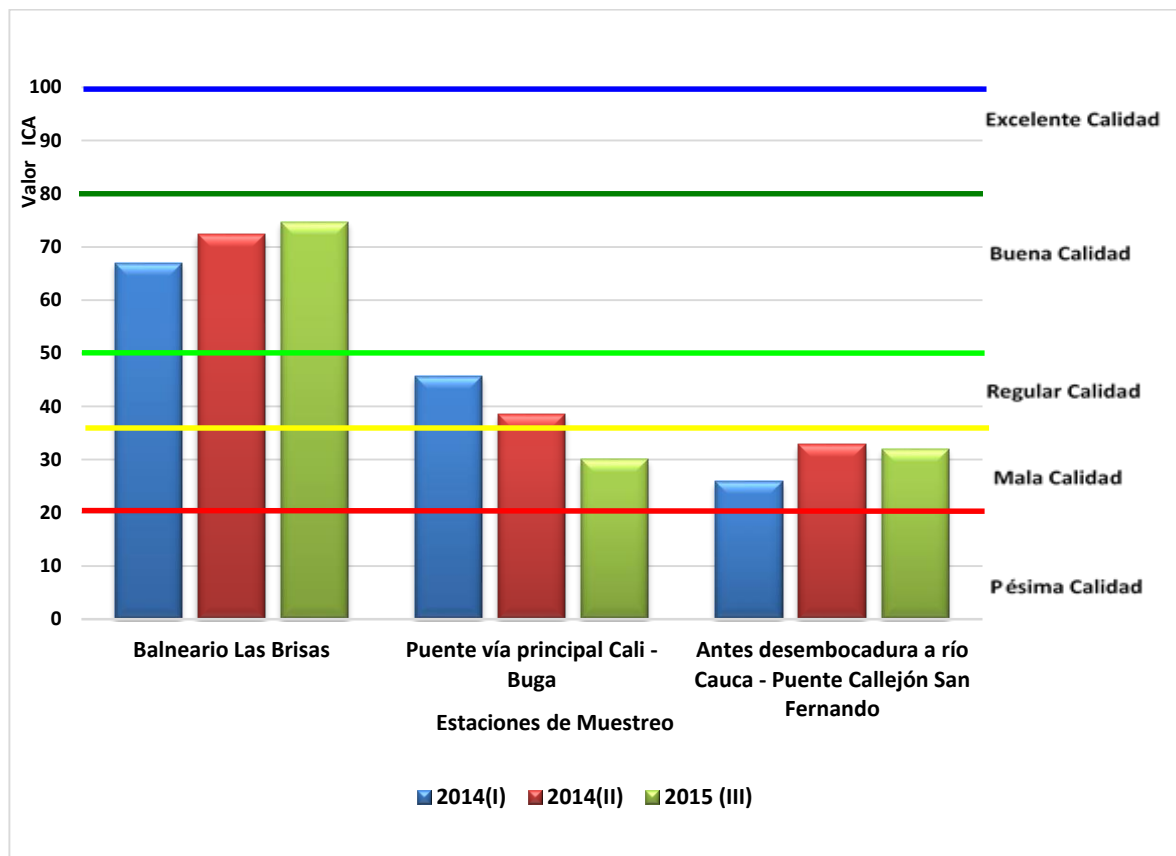


Figura 8. Evaluación de la calidad del agua superficial del río Cerrito para consumo humano de acuerdo al ICA CETESB

Al evaluar la calidad del agua superficial del río Cerrito, para ser destinada como agua de riego agrícola, a través del ICA DINIUS (Figura 9), se determina que las corrientes de agua en la zona arriba-antes de la descarga, pueden ser utilizadas con un tratamiento menor en aquellos cultivos, que requieran agua de alta calidad. En la zona después de la descarga solo es utilizable en el año 2015, sin tratamiento alguno para la mayoría de los cultivos. Sin embargo, el deterioro de la calidad del agua al llegar a la zona abajo-antes de la desembocadura al río Cauca, condiciona su uso, pues requiere un tratamiento para ser utilizada en la mayoría de los cultivos.

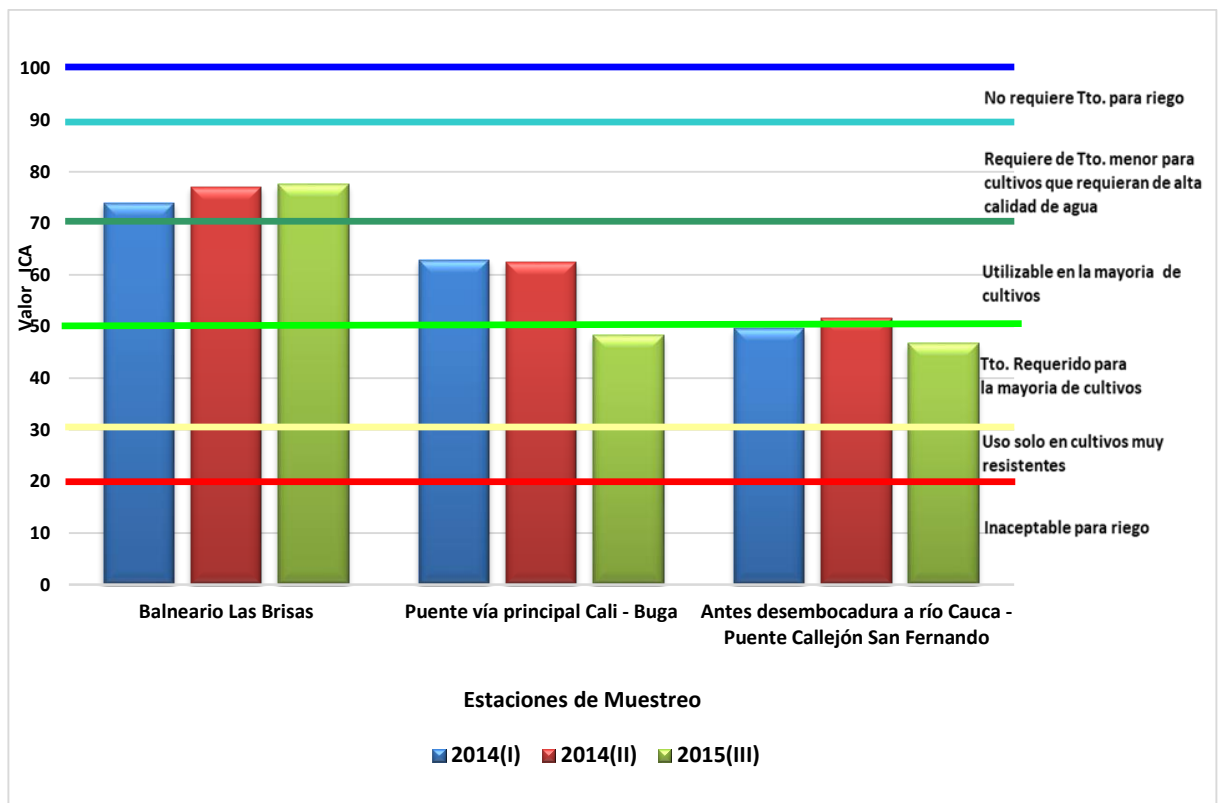


Figura 9. Evaluación de la calidad del agua superficial del río Cerrito para uso de riego agrícola de acuerdo al ICA DINIUS

Al evaluar la contaminación por materia orgánica, a la que está expuesta el río Cerrito, se evidencia a través del ICOMO (Figura 10), que los cuerpos de agua presentaron una baja contaminación en el Balneario Las Brisas, en el primer semestre del año 2014 y del año 2015, sin embargo, la contaminación disminuye en el segundo semestre del año 2014, considerándose muy baja. Al incursionar en el recorrido del cauce, la contaminación por materia orgánica se incrementa; se considera como media contaminación a partir del segundo semestre del 2014, en la zona después de la descarga, en el Puente vía principal Cali-Buga, hasta alcanzar una alta contaminación en el año 2015 en este sitio y de igual manera, en la zona abajo, antes de la desembocadura al río Cauca, durante todo el periodo de la investigación (abril 2014-abril 2015).

Finalmente, la evaluación de la calidad del agua del río Cerrito teniendo de en cuenta los parámetros fisicoquímicos e igualmente los valores ICA, muestran que hay una influencia no solo espacial, sino, también temporal en la calidad del agua. Específicamente lo temporal se evidencia, por las condiciones fisicoquímicas que muestran deterioro de la calidad del agua en el muestreo de abril del 2015, que coincidió con una temporada de lluvias, que contribuyó al incremento del color, ST, SS, SD, DBO y DQO, principalmente.

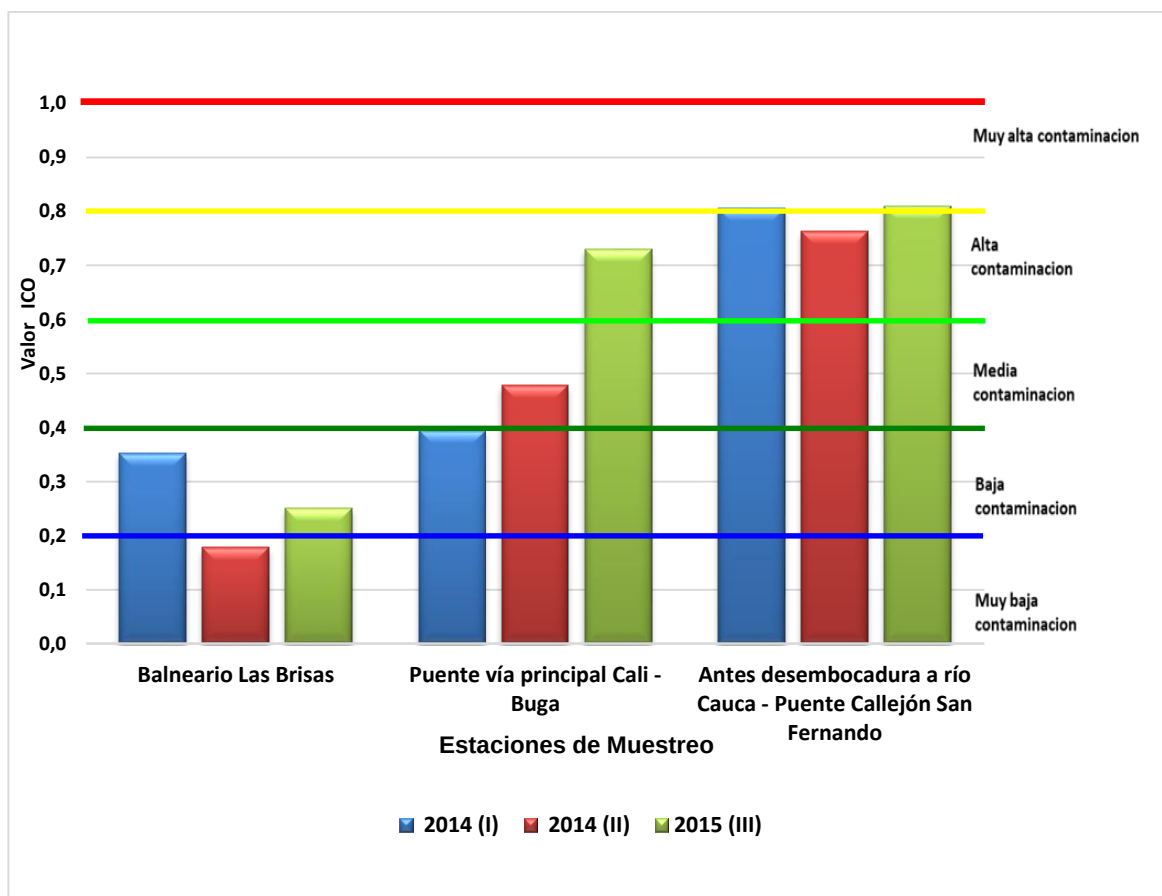


Figura 10. Evaluación de la calidad del agua del río Cerrito de acuerdo al Índice de contaminación por Materia Orgánica “ICA ICOMO”

3.3.2. Evaluación de la actividad mutagénica

En las tablas 12 y 13, se presentan los Índices de Mutagenicidad (IM) determinados en las aguas del río Cerrito utilizando las cepas TA97 y TA100 de *Salmonella typhimurium* con y sin activador enzimático. En general, los resultados muestran que las aguas superficiales del río Cerrito, alcanzaron un nivel *mutagénico leve*, con (+S9) y sin (-S9) activación metabólica con ambas cepas.

Se detectó mutagenicidad con la cepa TA-97 sin S9, solamente en el tercer muestreo realizado para el sitio 1 (zona arriba-antes de la descarga Balneario Las Brisas), con un IM: 2.3. Mientras que con la cepa TA100 más S9, se detectó mutagenicidad en el primero y tercer muestreo para el sitio 3 (zona abajo de la descarga, antes de la desembocadura al río Cauca) con un IM: 2.3 y 2.0 respectivamente.

Tabla 12. Actividad mutagénica en aguas superficiales del río Cerrito determinada con la cepa *Salmonella typhimurium* TA97 con y sin activación metabólica (S9)

Sitios de muestreo	Muestreo	Cr total	Dosis		TA97		
		(mg/L)	(uL/Plato)	(+ S9)	IM	(-S9)	IM
Sitio 1 (Zona arriba-antes de la descarga, Balneario Las Brisas)	A	<0.294	1E-02	174±0.0	1.6	140±24.0	1.3
			1E-03	187±4.2	1.7	181±0.0	1.7
			1E-04	152±10.6	1.4	178±16.3	1.7
	B	<0.294	1E-02	154±0.7	1.4	130±4.9	1.2
			1E-03	125±1.4	1.1	137±6.4	1.3
			1E-04	135±3.5	1.2	152±0.7	1.4
	C	<0.294	1E-08	152±2.8	1.4	144±0.6	1.3
			1E-09	156±8.5	1.4	121±12.7	1.1
			1E-10	148±11.3	1.4	242±3.5	2.3
Sitio 2 (Zona-sitio de la descarga, Puente vía principal Cali-Buga)	A	<0.294	1E-01	151±5.7	1.4	189±41.7	1.8
			1E-02	151±12.7	1.4	168±8.6	1.6
			1E-03	171±1.4	1.6	160±1.5	1.5
	B	<0.294	1E-02	135±0.7	1.2	145±35.4	1.4
			1E-03	145±0.7	1.3	156±0.0	1.5
			1E-04	165±0.0	1.5	129±15.5	1.2
	C	<0.294	1E-08	184±22.6	1.7	117±13.4	1.1
			1E-09	140±12.7	1.3	126±0.6	1.2
			1E-10	150±29.0	1.4	139±8.5	1.3
Sitio 3 (Zona abajo, Antes de la desembocadura al río Cauca-Puente Callejón San Fernando)	A	<0.294	1E-02	156±4.9	1.4	140±16.2	1.3
			1E-03	175±4.2	1.6	149±1.4	1.3
			1E-04	189±2.8	1.7	183±17.7	1.7
	B	1.24	1E-03	193±31.1	1.8	114±5.7	1.1
			1E-04	126±12.0	1.2	138±11.4	1.3
				165±4.2	1.5	122±18.4	1.1
	C	<0.294	1E-08	159±12.7	1.5	132±11.0	1.2
			1E-09	171±3.5	1.6	123±3.1	1.1
			1E-10	180±2.8	1.7	143±1.3	1.3
DMSO				109	107		

Muestreo: A. Abril 15-2014. B. Septiembre 27-2014. C. Abril 30-2015

(+S9) y (-S9): con y sin activador enzimático respectivamente

IM: Índice de Mutagenicidad. Nivel de mutagenicidad calificado como: No Mutagénico cuando los valores son <1. Levemente Mutagénico en el rango de 1.1 a 1.9 y Mutagénico para los valores ≥2.0

El análisis general de los resultados obtenidos frente a las fuentes de variación (Anexo 2), mostró que no hubo efecto de la dosis (p-valor = 0.668) empleada en los ensayos de mutagenicidad, indicando que no hubo una relación lineal entre la dosis y el IM, por lo tanto, es posible retirar su efecto del modelo estadístico. Los modelos estadísticos tanto con

covariable (dosis) como sin covariable cumplieron con el supuesto de normalidad a niveles de significancia mayores a 0.15 y homogeneidad de varianzas a niveles de significancia mayores a 0.18 (Anexo 3).

Tabla 13. Actividad mutagénica aguas superficiales del río Cerrito determinada con la cepa *Salmonella typhimurium* TA100 con y sin activación metabólica (S9)

Sitios de muestreo	Muestreo	Cr total	Dosis		TA100		
		(mg/L)	(uL/Plato)	(+ S9)	IM	(-S9)	IM
Sitio 1 (Zona arriba-antes de la descarga, Balneario Las Brisas)	A	<0.294	1E-01	93±0.7	1.2	133±7.1	1.7
			1E-02	81±12.0	1.0	113±5.7	1.5
			1E-03	74±0.7	1.0	103±1.4	1.3
	B	<0.294	1E-01	77±2.1	1.0	123±5.7	1.6
			1E-02	112±2.8	1.4	108±6.4	1.4
			1E-03	115±1.4	1.5	98±2.1	1.3
	C	<0.294	1E-01	90±1.2	1.2	89±7.5*	1.1
			1E-02	103±5.7	1.3	119±0.7*	1.4
			1E-03	82±0.7	1.0	122±1.4*	1.5
Sitio 2 (Zona-sitio de la descarga, Puente vía principal Cali-Buga)	A	<0.294	1E-01	93±1.4	1.2	108±8.5	1.4
			1E-02	86±2.8	1.1	119±2.0	1.5
			1E-03	74±2.8	1.0	111±5.0	1.4
	B	<0.294	1E-01	101±2.8	1.3	120±7.8	1.6
			1E-02	90±2.8	1.2	189±13.4	1.7
			1E-03	111±1.4	1.4	109±6.4	1.4
	C	<0.294	1E-01	106±17.0	1.4	144±19.8*	1.7
			1E-02	96±2.8	1.2	132±9.2*	1.6
			1E-03	85±9.9	1.1	100±6.0*	1.2
Sitio 3 (Zona abajo, Antes de la desembocadura al río Cauca- Puente Callejón San Fernando)	A	<0.294	1E-01	91±1.4	1.2	107±4.9	1.4
			1E-03	180±14.1	2.3	150±14.8	1.9
			1E-04	135±3.5	1.2	121±5.0	1.6
	B	1.24	1E-01	86±2.1	1.1	138±18.4	1.8
			1E-02	89±0.7	1.1	103±7.8	1.3
			1E-03	89±1.4	1.1	127±1.3	1.6
	C	<0.294	1E-01	121±12.7	1.6	110±9.9*	1.3
			1E-02	159±2.1	2.0	84±15.6*	1.0
			1E-03	104±17.7	1.3	133±13.4*	1.6
DMSO				79	77 – *83		

Muestreo: A. Abril 15-2014. B. Septiembre 27-2014. C. Abril 30-2015

(+S9) y (-S9): con y sin activador enzimático respectivamente

IM: Índice de Mutagenicidad. Nivel de mutagenicidad calificado como: No Mutagénico cuando los valores son <1. Levemente Mutagénico en el rango de 1.1 a 1.9 y Mutagénico para los valores ≥2.0

Por lo anterior, el análisis de varianza del Índice Mutagénico (IM) se realizó sin el efecto de la dosis (Tabla 14), donde se puede evidenciar que únicamente las interacciones Sitio de muestreo*activador enzimático y Cepa*activador enzimático, tienen un efecto significativo en el IM, con un p-valor de 0.04 y 0.004 respectivamente. La figura 11, muestra el efecto de la interacción entre el sitio de muestreo y el activador enzimático (S9), se observa que esta interacción causa un efecto directo en el índice de mutagenicidad el cual, aumenta o disminuye dependiendo de la interrelación entre el sitio, la presencia o la ausencia de la mezcla S9. De igual manera, la figura 12 muestra el efecto de la interacción entre la Cepa*activador enzimático, indicando que el IM tiende aumentar o a disminuir cuando interactúan las cepas TA97 o TA100, con activación o sin activación metabólica.

Tabla 14. Análisis de varianza del IM de la interacción entre los factores sitio, cepa y activación metabólica

Fuente de Variación	GL	SC	F-Valor	P-Valor
Rep/Bloque	2	0.24685	2.12	0.126
Sitio de muestreo	2	0.08907	1.38	0.468
Rep*Punto	4	0.12926		
Cepa	1	0.05333	0.92	0.341
Activador	1	0.10704	1.84	0.178
Sitio muestreo*Cepa	2	0.18167	1.56	0.216
Sitio muestreo*Activador	2	0.38685	3.32	0.04
Cepa*Activador	1	0.50704	8.71	0.004
Sitio muestreo*cepa*activador	2	0.04019	0.35	0.709
Error	90	5.237		
Total	107	6.9785		

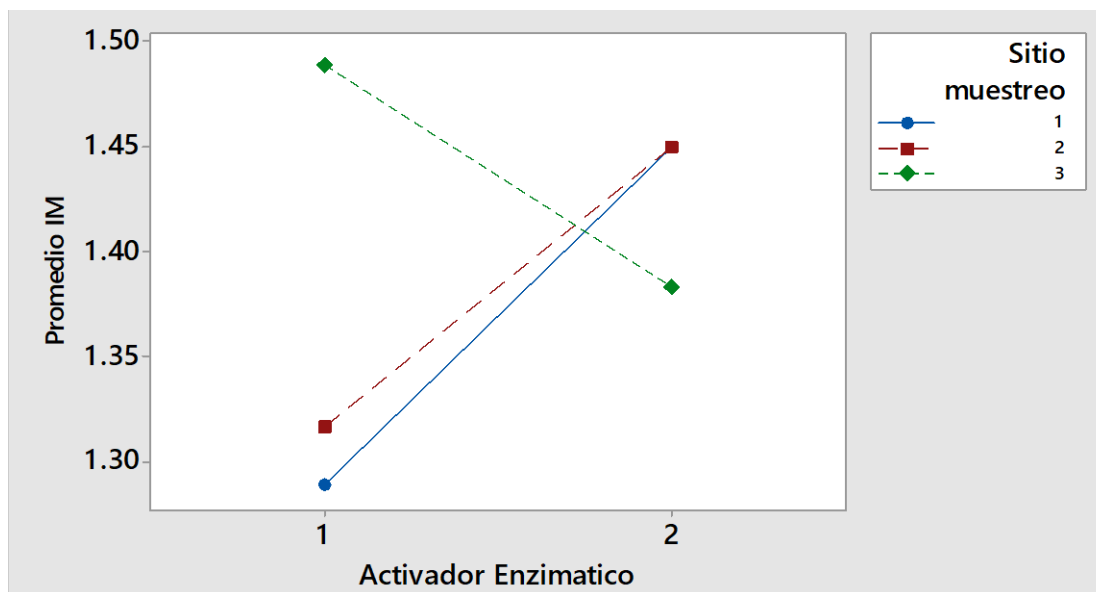


Figura 11. Interacción entre el sitio de muestreo*activador enzimático

Activador enzimático: 1. (+S9), 2. (-S9). Sitio de muestreo: 1. Balneario Las Brisas, 2. Puente vía principal Cali-Buga, 3. Antes de la desembocadura al río Cauca-Puente Callejón San Fernando.

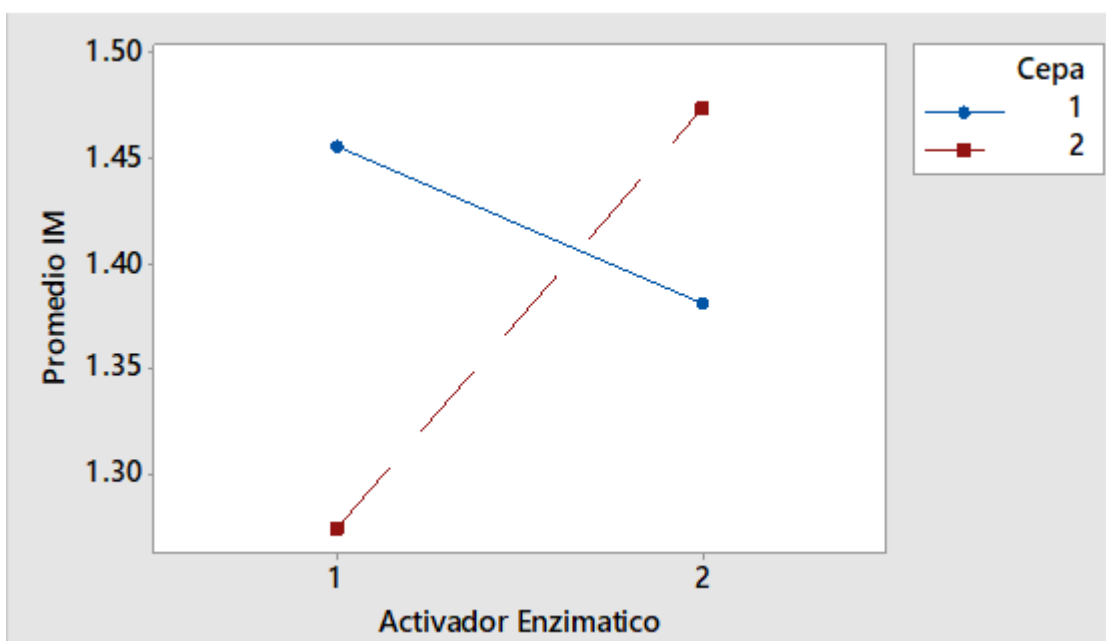


Figura 12. Interacción entre el activador enzimático (fracción microsomal S9)*cepa bacteriana de *Salmonella typhimurium* (TA97 – TA100).

Activador enzimático: 1. (+S9), 2. (-S9). Cepa *Salmonella typhimurium*: 1. TA97, 2. TA100.

3.4. Discusión

La estimación de los índices de calidad del agua (ICA) para el río Cerrito, es un indicativo que permite conocer el nivel de contaminación de las aguas superficiales, a partir del estudio de un conjunto de parámetros físico-químicos y microbiológicos (156). De acuerdo al ICA CETESB, el agua superficial del río Cerrito presenta una buena calidad, para ser destinada al consumo humano en el sitio 1 (Balneario Las Brisas) en un rango de 67.0 – 74.7 (valor ICA). Sin embargo, la calidad del agua disminuye de forma progresiva en dirección aguas abajo, calificando el cuerpo de agua en el sitio 2 (Puente vía principal Cali-Buga) de regular calidad (38.5-45.7), y al finalizar el recorrido en el sitio 3 (Antes de la desembocadura al río Cauca- Puente Callejón San Fernando), en todos los casos se clasificó de mala calidad para consumo humano, en un rango de 26.0 a 32.0 (valor ICA). En este último sitio para el año 2014, se registraron valores de DBO5 de 16.70 mg/L y 21.20 mg/L con porcentaje de saturación de oxígeno de 41.26 y 45.82, haciendo evidente el alto contenido de materia orgánica.

Por otro lado, los análisis microbiológicos, revelaron un incremento en los Coliformes totales y fecales, a medida que el río recorre el municipio; encontrándose valores mínimos de 9.3×10^2 y 2.3×10^2 NMP/100mL para Coliformes totales y fecales respectivamente, en el Sitio 1 y valores máximos de $6,6 \times 10^7$ y 2.4×10^7 NMP/100mL de Coliformes totales y fecales en el Sitio 3. Cabe mencionar, que de acuerdo a la ley colombiana que rige a partir del 2015 en el Decreto 1076 (108), se fija un límite permisible en aguas superficiales de 2.0×10^4 NMP/100mL para Coliformes totales y de 2.0×10^3 NMP/100mL para Coliformes fecales, en el caso que las aguas destinadas para consumo humano, requieran un tratamiento convencional.

De acuerdo a la Resolución 2115 (157), el agua para consumo humano debe cumplir con un conjunto de características físicas y químicas, de manera que no se presenten efectos adversos en la salud humana. Parámetros como la turbiedad y el color aparente, son alertas de la contaminación del agua, en los sitios muestreados se registraron valores de turbiedad entre 0.83 UNT – 240 UNT; esta condición se refleja en el color aparente, en el punto Puente vía principal Cali-Buga, después de la descarga y en la zona baja-antes de la desembocadura al río Cauca, alcanzando valores de 65.8 UPC en el primer semestre de 2014 y de 21 825 UPC en el primer semestre del 2015, en el punto después de la descarga. Igualmente, se registraron valores promedios de 38.9 UPC antes de la desembocadura al río Cauca. Cabe mencionar, que el agua para consumo humano establece un valor máximo aceptable de 2 UNT y de 15 UPC de color aparente. En cuanto a las características químicas, haciendo referencia a los iones de hierro y manganeso, se registraron concentraciones por encima de 0.3 mg/L y de 0.1 mg/L respectivamente (Tabla 11), siendo estas las concentraciones máximas permisibles, para el hierro y manganeso en el agua de consumo humano.

Las alteraciones de estos parámetros puntuales, se atribuyen a que en estos puntos el cauce de río recibe, residuos domésticos, de materiales y basuras, que la población descarta a la altura del Puente vía principal Cali-Buga, de igual manera la turbiedad está relacionada con los depósitos de materia orgánica que se generan con las descargas de los efluentes de las curtiembres (grasas y sólidos gruesos), presentándose, por lo tanto, residuos de las sustancias químicas utilizadas durante el proceso de curtido. A su vez, la demanda química de oxígeno es mayor a la demanda bioquímica que se presentó en las aguas superficiales del río Cerrito.

La mayor concentración en la DQO, indica la presencia de residuos químicos o de sustancias no biodegradables en las aguas vertidas, lo que también se evidencia con los altos niveles de sólidos disueltos (24.5 mg/L a 3 441 mg/L), los cuales integran trazas de sustancias contaminantes; diferentes razones pueden causar esta condición como son; los deslizamientos de rocas, de material vegetal, actividades antrópicas como la extracción de material de arrastre, la agricultura y las descargas de efluentes por las curtiembres ilegales; estos resultados se relacionan con los valores de ST y al observar, como disminuye la concentración de oxígeno a medida que las corrientes se desplazan de la zona arriba-antes de la descarga (7.39 mg/L valor promedio) hasta zona abajo-antes de la desembocadura al río Cauca (2.99 mg/L valor promedio). La disminución del oxígeno, puede afectar la vida acuática del ecosistema y la biodegradabilidad de la materia orgánica; disminuyendo su capacidad de repararse así mismo, su resiliencia (158) (159).

El ICA DINIUS, arrojó resultados similares al ICA CETESB en cuanto a la calidad del agua del sitio 1, solamente este punto del río Cerrito, se clasificó como agua aceptable (73.9 – 77.5 valor ICA) para ser destinada para riego agrícola. Por el contrario, las aguas provenientes del sitio 2, las zonas en el sitio de la descarga se categorizan como levemente contaminadas, utilizables para la mayoría de los cultivos. Pero, en el primer semestre de 2015, el agua de este punto, se clasificó como contaminada (48.3 valor ICA), por lo que, se debe realizar un tratamiento antes de ser utilizada en la mayoría de los cultivos. Esta situación se repite para el Sitio 3, la zona después de la descarga, durante el desarrollo de esta investigación, las aguas en este punto, se clasificaron como contaminadas en un rango, de 46.7 – 49.5 (valor ICA).

Por último, el Índice de Contaminación por Materia Orgánica (ICOMO), corrobora los resultados mencionados para las aguas superficiales del río Cerrito. El resultado obtenido para el ICOMO, hace evidente una fuerte carga de materia orgánica que está siendo vertida a los cuerpos de agua en el sitio 3, antes de la desembocadura al río Cauca. Presentando un índice en el rango de 0.79 – 0.82, en una escala de muy alta de contaminación, donde los valores son cercanos a 1. Este resultado se fundamenta con los valores de DBO₅, donde la menor demanda bioquímica de oxígeno se presentó el sitio 1 con un valor de 0.954 mg/L,

seguido del sitio 3 con 21.20 mg/mL y la mayor concentración se registró en el sitio 2 con 97.90 mg/mL. El monitoreo realizado por la CVC, al río Cerrito en los años 2016 y 2017, revelan igual comportamiento en los índices de contaminación para los sitios 1 y 3, donde la calidad del agua del río disminuye, desde el sitio 1 hacia el punto antes de la desembocadura al río Cauca, desde una muy baja contaminación (sitio 1) hasta una media y alta contaminación (sitio 3) (160).

Con base en lo anterior, es posible realizar un comparativo de las condiciones fisicoquímicas referentes a porcentaje de saturación de oxígeno (PSO), pH y límite de los microorganismos Coliformes, teniendo en cuenta que el sitio 1, es un balneario natural que es utilizado para la recreación de contacto directo. Los resultados de la investigación, revelan que el balneario Las Brisas presenta estos parámetros en los siguientes rangos: PSO 94.42% - 94.71%, pH 7.02-8.02 y un valor de microbiano para Coliformes totales de 9.3×10^2 NMP/100 mL - 6.6×10^4 NMP/100mL y de 2.0×10^2 NMP/100mL – 4.0×10^3 NMP/100mL. De acuerdo a lo establecido en el Decreto 1076 de 2015 (108), las aguas superficiales destinadas para tal fin, deben conservar un PSO de 70%, un pH 5.0 – 9.0 y un límite microbiano de Coliformes totales equivalentes 1×10^3 NMP/100mL y de Coliformes fecales de 2.0×10^2 NPM/100 mL. Lo anterior indica, que a pesar que las aguas del río Cerrito en el balneario cumplen los parámetros establecidos para PSO y pH, presentan contaminación por organismos Coliformes. Para el año 2013, se reportó una situación similar en la cuenca del río Cerrito, donde los análisis de Coliformes totales y fecales, registraron valores por encima de los permisibles 5.8×10^3 NMP/100mL y 6.35×10^2 NMP/100mL respectivamente (107). Por consiguiente, se observa un incremento del número de Coliformes en el Balneario Las Brisas.

La caracterización fisicoquímica y microbiológica de las aguas del río Cerrito, evidencian que la descarga de aguas residuales, en conjunto con los residuos sólidos y materia orgánica en general, alteran los criterios de calidad permisibles, para la destinación del recurso para uso humano. Los resultados obtenidos en la evaluación de los ICAS, revelaron el impacto negativo que están causando las diferentes actividades antropogénicas en la zona baja del río Cerrito, la contaminación se fomenta de manera progresiva desde el sitio 2 (después de la descarga de curtiembres) al sitio 3 (zona abajo), antes de la desembocadura al río Cauca. Por esta razón, el sitio 3 se caracteriza por contener aguas de mala calidad, con una alta contaminación, que no debe ser utilizada como agua de riego y mucho menos para consumo humano (161).

Se puede afirmar, que este suceso se adjudica a los vertimientos: domésticos, industriales, de curtiembres y a residuos de agroquímicos, que recibe el río. Es importante tener en cuenta, que el segundo tramo del río Cerrito se ve afectado, por los vertimientos domésticos que está expuesto continuamente y por los residuos de basura que arrojan en la ribera del río, a la

altura del Puente vía principal Cali-Buga. Lo que influye directamente, en el deterioro de la calidad del agua en este punto, y por ende se contribuye a minimizar la calidad del agua en la zona baja y en cuenca del río.

Cabe mencionar, que, en el primer semestre del año 2015, el agua superficial en el Puente vía principal Cali-Buga fue clasificada de mala calidad, con un valor de 30 de acuerdo al ICA CETESB. Por lo cual, las aguas de este tramo del río no calificaron para ser destinadas para el abastecimiento público. Esta misma situación, fue registrada en el Plan de ordenación y manejo de la cuenca hidrográfica del río Cerrito (105), donde se reporta que el sector rural dispone los residuos en espacios abiertos o también en el cauce del río; en sitios como El Castillo, El Placer y en la cabecera municipal de El Cerrito.

Estudios previos de la calidad del agua del río Cerrito revelaron que las condiciones físico-químicas se deterioran de un sitio a otro, pues se minimiza la calidad del cuerpo de agua progresivamente, al atravesar el municipio, haciéndose evidente el incremento de la materia orgánica desde el Balneario Las Brisas, hasta llegar al Puente Callejón San Fernando, antes de la desembocadura del río Cauca (106). Un comportamiento similar, se presenta para los parámetros físico-químicos en el río Bogotá, el cual es afectado por vertimientos domésticos, industriales y de curtiembres del municipio de Villapinzón (Cundinamarca); donde se reporta que la concentración de oxígeno disminuye a medida que el río continúa su curso pasando por el área urbana del municipio. Se observa el aumento en las concentraciones de DBO5 y DQO por el incremento de la materia orgánica (162). Parámetros como carbono total, color verdadero, turbiedad se incrementan, a medida que las corrientes de agua recorren el río, alcanzando su valor máximo permisible antes del casco urbano del municipio y sobrepasando el valor límite en el punto después de las curtiembres. De igual manera, las variables microbiológicas Coliformes totales y fecales, presentan valores por encima del nivel máximo (108) desde el nacimiento hasta el punto después de las curtiembres (163).

Del mismo modo, un estudio de modelación realizado en el río Aburra, demostró que los vertimientos de las curtiembres, contribuyen a la contaminación por materia orgánica, aumentando el DBO5 y la DQO, donde el agua residual de salida, supera los valores permisibles para aguas vertidas, alcanzando concentraciones de 1502 mg/L y 3633 mg/L respectivamente. Según la Resolución 631 de 2015 (96), las aguas residuales deben conservar una concentración de 600 mg/L de DBO5 y 1200 mg/L de DQO (164). Por otra parte, el río Pasto se encuentra afectado en la parte media por las descargas directas de curtiembres, las cuales utilizan grandes volúmenes de agua, aportando 4 432,85 kg/día DBO5, al cauce principal. Los vertimientos generados en sus procesos contienen altas cargas de contaminantes de cromo y sulfuros, afectando la calidad del cuerpo de agua, causando su deterioro (165).

A pesar que el propósito del estudio, no contemplaba la temporalidad climática; época seca y época de lluvia, la caracterización fisicoquímica en conjunto con los índices de calidad de agua (ICA) del río Cerrito, evidenciaron la influencia temporal que se presentó en el tercer monitoreo, en el periodo de abril del 2015, el cual estuvo asociado a una temporada de lluvias. Donde se observó, el incremento de dichos parámetros específicamente, en el sitio 2 (punto de la descarga), seguido del sitio 3 (antes de la desembocadura) y por último en el sitio 1 (antes de la descarga). Esta condición se adjudica, a que las precipitaciones aumentaron el caudal, teniendo en cuenta las escorrentías que se generan desde la parte alta de la cuenca (sedimentos y residuos de agroquímicos). De igual manera, el movimiento de las masas de agua, van a provocar la mezcla y la integración, de los elementos orgánicos e inorgánicos que se encuentra depositados en los sedimentos, por la contribución de las descargas de aguas residuales (166).

Dicha situación se refleja, en el aumento del color aparente, los sólidos totales, suspendidos y disueltos, DBO y DQO; este resultado, es reciproco con el incremento del ICOMO en este periodo, por tal razón, se presenta el incremento en la concentración de nutrientes y minerales; nitritos, nitratos, fosforo, hierro y manganeso, como también la concentración de cromo total (sitio 2), todo lo anterior, asociado a la materia orgánica acumulada en los sedimentos. Una situación similar, se reportó en el río Mini (India), la calidad del agua, se ve disminuida en la estación lluviosa, por el aumento de la contaminación por materia orgánica, presentando un ascenso en la concentración de sólidos totales, DBO, alcalinidad y sulfatos (167).

Los resultados de esta investigación, son consecuentes con los reportados para el río Córdoba (Magdalena), donde se evidencia el incremento de los sólidos totales, suspendidos y disueltos en dos periodos de lluvia, en la parte baja del río hasta la desembocadura (168). Un resultado equivalente se registró en el río Garagoa (Boyacá), debido a que parámetros como sólidos totales, nitratos, nitritos y fosfatos, presentaron una variación de acuerdo a la temporalidad, mostrando un aumento en la época de lluvias, este comportamiento es asociado al incremento del material de arrastre provocado por la intensidad de las lluvias (169).

Las aguas superficiales del río Cerrito, evidencian concentraciones de cromo total de $<0,294$ mg/L, se presenta una excepción en el sitio 2 (punto de la descarga) con una concentración de 1,24 mg/L. Asimismo, en el año 2013 se registró una concentración de cromo total en el sitio 3 (antes de la desembocadura al río Cauca) correspondiente a 0.426 mg/L (107). Aunque las concentraciones de cromo reales, estuvieron por debajo del límite de detección en la prueba realizada durante la investigación, no se puede afirmar, que estas concentraciones son inocuas para el medio ni para los organismos que habitan el ecosistema, pues estas concentraciones casi despreciables, son catalogadas como fracciones biodisponibles, que no

son detectables por métodos convencionales, donde los límites de detección no son lo suficientemente exactos, como para cubrir los niveles casi efímeros de cromo en el agua natural, es decir, μg , dm^3 o cantidades trazas (170).

Concentraciones entre 0.01 y 2.0 mg/L de cromo causan efectos subletales; alteraciones morfológicas en ciertas algas, disminución en el crecimiento y reproducción de algunos invertebrados (171). De igual manera, se ha reportado la biocumulación del metal en peces que habitan el río Ganges, el cual está expuesto a la contaminación con cromo por las descargas de industrias de tenerías. Se encontró que diferentes especies de peces que habitan sitios contaminados, registraron concentraciones de cromo en músculo ($0,89 \mu\text{g} / \text{g}$) y tejidos branquiales ($0,24 \mu\text{g} / \text{g}$) de *Labeo calbasu*; músculo ($0,44 \mu\text{g} / \text{g}$) y branquias ($1,23 \mu\text{g} / \text{g}$) de *Puntius sophore*; y músculo ($0.9617 \mu\text{g} / \text{g}$) y branquias ($0.3628 \mu\text{g} / \text{g}$) de *Mystus vittatus* (97).

Por otro lado, en Colombia aplica el Decreto 1076 de 2015 (108), donde se determinan para las aguas superficiales los criterios de calidad; de acuerdo a la destinación del recurso se establece solamente, límites para cromo (VI), tanto para consumo humano y doméstico (0.05 mg/L) como para el agua de uso agrícola (0.1 mg/L) y de la misma manera, para la preservación del hábitat (0.01 mg/L). Sin embargo, la FAO establece para uso agrícola (riego) una concentración de 0.1 mg/L; la EPA (2009)(172), determina un valor límite de 0.1 mg/L de cromo para aguas naturales y de abastecimiento público respectivamente. Por consiguiente, el sitio 2 estaría sobrepasando el valor límite permisible en 1240%, imposibilitando su uso como agua de riego o para abastecimiento público. Por tal razón, es indispensable fijar controles más rigurosos, pues las aguas superficiales del río Cerrito, tiene diferentes usos, como, por ejemplo, Campoalegre (Santa Elena), que cuenta con una acequia que conduce agua, específicamente para riego (aproximadamente 17 L/s) desde el Pomo. Otros usuarios, son los ingenios y los predios del sector, como La Hacienda La María (9 L/s), Pasatiempos (40 L/s) y Quitasueños (40 L/s), entre otras. Por otra parte, las aguas superficiales del río Cerrito, se unen con las aguas superficiales del río Amaime, para ser tratadas, suministradas y utilizadas como agua potable para la población del municipio de El Cerrito.

Por otra parte, se debe tener en cuenta que la PTAR del municipio de El Cerrito, fue diseñada para el tratamiento de aguas residuales municipales, y no industriales, y por ello, se ha establecido que se debe realizar un tratamiento previo para la remoción del cromo presente en el efluente de las curtiembres (111) (105); pero la mayoría de estas empresas realizan descargas directas al alcantarillado o al río Cerrito (9). Cabe la posibilidad que la concentración no detectable de cromo total ($<0.294 \text{ mg/L}$), supere el valor límite permisible para el agua de consumo humano; en Colombia la Resolución 2115 de 2007 (157), establece

la concentración máxima de cromo total en 0.05 mg/L, para el agua de consumo; concentración límite en la cual no causa efecto adverso en la salud humana.

En cuanto a los resultados revelados en el estudio de mutagenicidad con las cepas de *Salmonella typhimurium* TA97 y TA100, con y sin activación metabólica, se observa que las aguas superficiales del río Cerrito, presentaron un nivel *mutagénico leve* (Tabla 12 y 13), generando mutaciones puntuales *frameshift* (cepa TA97) por inserción o supresión de pares de bases Guanina-Citocina (G-C), como también, sustitución de pares de bases G-C (cepa TA100).

La actividad mutagénica que se presentó en las aguas superficiales del río Cerrito, son alusivas a la acumulación de sustancias con potencial mutagénico presentes en los efluentes de las curtiembres (173)(174). Sin embargo, no se puede menospreciar la carga contaminante que recibe el río correspondiente a residuos de agroquímicos, aguas residuales domésticas e industriales. Pese, a que la concentración de cromo total en las aguas del río Cerrito, no fue detectable ($<0,294 \text{ mgCr/L}$), es importante tener en cuenta, que la toxicidad del metal en el sistema acuático, no está siempre relacionada con la concentración de la sustancia contaminante, sino, con la condición química que le ofrece el medio, para que se dé la absorción del metal a los organismos vivos, esta oportunidad se presenta por la presencia y disponibilidad del metal en los cuerpos de agua, debido a que las concentraciones de cromo en agua y en materia particulada en suspensión suelen hallarse a niveles trazas (175).

En el sitio (1) Balneario Las Brisas la cepa TA97 sin S9 mostró IM de 2.3 que indica *mutagenicidad* por cambio en el marco de lectura, además, que las sustancias contaminantes presentes en este sitio, actúan como mutágenos directos, que no requieren activación metabólica. La actividad mutagénica que se presenta en este sitio, puede ser causada por dos fuentes; actividades agrícolas (aplicación de agroquímicos) y metales de formación rocosa. Así como la presencia de residuos orgánicos que ingresan al agua a consecuencia de actividades antropogénicas (154)(120). Este mismo resultado, fue evidenciado en el delta del río Perla (China), en el contenido orgánico de las muestras de agua, se realizó una correlación entre la genotoxicidad y los plaguicidas organoclorados (OCP), y se comprobó que los plaguicidas por sí solos, causaban mutación por cambio en el marco de lectura, en ausencia del activador enzimático, con la cepa TA98 de *Salmonella typhimurium* aplicando la prueba de Ames (118).

Se ha reportado que la siembra intensiva de caña de azúcar en la zona plana de la cuenca, influye en el desplazamiento de otros cultivadores a la zona alta de la cuenca. Las actividades agrícolas que se efectúan en la zona montañosa, involucran los corregimientos de El Pomo, El Castillo, Santa Elena y el Placer. Los cuales, conforma el corredor por el cual se extiende

la cuenca (105). El desarrollo agrícola y la consecuente aplicación de agroquímicos (fungicidas, pesticidas y fertilizantes), dan como resultado el incremento de los metales pesados en los suelos (176)(177). Se ha confirmado la presencia de metales pesados en los fertilizantes, tales como cromo, uranio, vanadio, arsénico, plomo, cadmio, torio, entre otros. (178). La aplicación de fertilizantes de fosfato, está directamente relacionada con el incremento de cromo en los suelos agrícolas y también del cromo soluble en agua (177). Por este motivo, la aplicación de fertilizantes en los cultivos se convierte en una fuente de contaminación tanto para los suelos como para las corrientes de agua cercanas (179)(180). La contaminación de los cuerpos de agua del río Cerrito por agroquímicos, se puede presentar por acción de la naturaleza; a través de las lluvias, inundaciones, escorrentías, sedimentación y por acción humana, debido al lavado de las bombas de aplicación de los agroquímicos que se realiza en el cauce del río (105).

Los metales pesados en los fertilizantes están relacionados con presencia de fosfatos, un estudio realizado por la Universidad Barcelona, constato que la aplicación de fertilizantes de fondo y cobertura, tienen contenidos elevados de cadmio, y que las concentraciones de metales como uranio, arsénico y cromo son 10 a 50 veces, mayores a las de cadmio (178).

La segunda fuente posible de activación mutagénica en el Balneario Las Brisas, localizado en el corregimiento de El Pomo, es de origen natural; la cuenca del río Cerrito tiene dos tipos de formaciones, una de ellas corresponde a rocas de afinidad volcánica y de edad cuaternaria, las cuales en su estructura de cristalización tienen una composición química, que corresponde a iones metálicos como por ejemplo azufre, aluminio, berilio, cromo, magnesio, manganeso, hierro, oxígeno, entre otros. La unión química de iones y cationes, permiten la formación de diferentes compuestos derivados del cromo como son la cromita Cr_2O_3 (181) (182). Estas rocas de afinidad volcánica son denominadas Formaciones de Amaime, y se encuentran afectadas por la falla regional Cauca-Almaguer, la cual causa fracturación de esta formación por su característica de roca dura, formando suelos residuales que se difunden en las épocas de lluvias, generando procesos erosivos, como deslizamientos rotacionales, caída y desprendimiento en la parte alta de la cuenca. De igual manera, se presentan acumulaciones de rocas de edad cuaternaria, que, por deslizamientos y movimientos de masa, se depositan en los ríos: Cerrito, Amaime y Sabaletes. (105). Los corregimientos de Aují, El Carrizal y El Pomo son los primeros en recibir los productos generados por deslizamientos, avalanchas y la erosión que sufren la cuenca en la parte alta, debido a los efectos ambientales.

En el sitio (2) Puente vía principal Cali-Buga, después de la descarga de las curtiembres se registró un IM de 1.8 (cepa TA97-S9), muy próximo al Nivel Mutagénico. Por tanto, se revela que las sustancias contaminantes presentes en este punto, causan una *leve mutagenicidad* por cambio en el marco de lectura, y lo más importante, es que no requieren activación

metabólica. Este resultado puede atribuirse a las descargas directas de efluentes de curtiembres, que el río recibe en este punto.

Por otra parte, en el sitio (3) zona abajo, antes de la desembocadura al río Cauca-Puente Callejón San Fernando, se presentó un comportamiento similar con la cepa TA97+S9 (IM 1.8), la cual desarrolló un nivel *mutagénico leve*. Sin embargo, las sustancias contaminantes que se encuentran en este sitio, requieren de la fracción microsomal, para que por acción enzimática se desencadena la leve mutación. Incluso, con la cepa TA100-S9 se alcanza este mismo nivel mutagénico (*leve*) y se registró un IM de 1.9 y 1.8. Pero, la leve mutagenicidad, es a consecuencia de la sustitución de pares de bases. No obstante, con la cepa TA100+S9, se presentó un nivel *mutagénico* con un IM de 2.3 y 2.0. De manera que, antes de la desembocadura al río Cauca, se encuentran sustancias promutagénicas, que requieren un activador enzimático para causar la mutación que ocurrió por sustitución de pares de bases.

Por esta razón, se puede decir que las aguas del río Cerrito contienen sustancias contaminantes que tienen la capacidad de provocar mutaciones, tanto por cambio en el marco de lectura como por sustitución de pares de bases. Observándose, una mayor respuesta al utilizar el activador metabólico, que reproduce su efecto en el sistema de los mamíferos. Pero, no siempre se requiere activación metabólica (S9), que le permitan iniciar un proceso mutagénico posiblemente a nivel celular. Los resultados de la investigación demuestran que la calidad del agua en cada sitio, es un factor importante que interacciona con la respuesta mutagénica que puedan tener las cepas TA97-TA100, presentándose un potencial genotóxico aguas abajo y con menor proporción aguas arriba, según los resultados de la prueba de Ames (183).

Por otra parte, las variaciones en los resultados de acuerdo al análisis de varianza están siendo explicadas por efectos aleatorios y no por los controlados en la investigación. Es el efecto de la interacción cepa*activador enzimático al que aporta más al total, siendo significativa a un nivel de 0.004 (valor-P). Seguido del sitio de muestreo*activador metabólico con una significancia de 0.04 (valor-P). Las interacciones restantes, no fueron significativas, con niveles de significancia mayores de 0.178.

El efecto de las interacciones tiene como consecuencia, que en el Balneario Las Brisas (sitio 1) y en el Puente vía principal Cali-Buga (sitio 2), el IM tiende aumentar a medida que se pasa del nivel con activador S9 (1) a sin activador S9 (2), obteniéndose un mayor índice de mutagenicidad, cuando no se tiene el activador enzimático ya sea el sitio de muestro 1 o 2. Indicando, que las probables sustancias contaminantes, presentes en estos puntos tienen la capacidad, de causar una posible mutación en las cadenas del ADN por sí mismas, no requieren enzimas metabólicas para ser biotransformadas, sino que actúan de forma directa.

Es importante mencionar, que antes del sitio de muestro (1) Balneario Las Brisas, se encuentran cultivos de frutales como por ejemplo moras, granadillas, tomates y pepinos; como también de legumbres como la habichuela. De igual manera, hay zonas de cultivos de café. En estos cultivos se utilizan insecticidas, fungicidas y fertilizantes. Estas actividades agrícolas, de una forma directa o indirecta, pueden estar influyendo de manera negativa en la calidad del agua de este sitio, ya que son fuentes de metales pesados y otros compuestos químicos (184)(4).

De acuerdo a los resultados de los IM promedio, se pudo comprobar que las variaciones se fundamentan en el tipo de sustancia mutagénica, que probablemente se encuentra presente en cada sitio. Lo que permitió en este caso, que la cepa TA100 con activador enzimático, determinará la existencia de sustancias mutagénicas, aguas abajo antes de la desembocadura al río Cauca-Puente Callejón San Fernando (sitio 3). Se debe tener en cuenta, que, en este sitio, el río ha atravesado el municipio de El Cerrito completamente, que han tenido contacto con sectores de cultivos de caña de azúcar, que han recibido residuos domésticos e industriales de forma directa. Aspectos que convierten al río en reservorio de una variedad de contaminantes, desde los domésticos con los denominados contaminantes emergentes, los residuos de sustancias químicas y de metales pesados, por acción de residuos industriales y de efluentes de curtiembres ilegales. Además, de la presencia de agroquímicos, que caen al río por el lavado del suelo que se presenta por irrigación y por acción de las lluvias, como también por el lavado de las bombas de aplicación de los agroquímicos en el cauce del río.

Otro hecho importante, es la estación de bombeo del Ingenio Providencia, que se encuentra en este sitio; los ingenios realizan lo que se llama *cambio de agua*, toman el agua limpia que viene en curso para riego y vierten en este punto, al río Cerrito agua residual, del sector de San Bernardo y Guacanal, que son corregimientos aledaños a El Cerrito. Por consiguiente, debido a los diferentes eventos que se presentan en el cauce del río Cerrito, el sitio muestreo es una variable importante que influyen en los resultados de la investigación y por ende esto se refleja en la respuesta de la interacción cepa*activador enzimático y por consiguiente sitio de muestreo*activador; este mismo suceso se presentó en la evaluación mutagénica de las aguas del río Cauca, donde el punto de muestreo incide en el incremento de la respuesta mutagénica (154).

4. DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE MUTAGENICIDAD DE LOS SEDIMENTOS DEL RÍO CERRITO A TRAVÉS DE LA PRUEBA DE AMES CON LAS CEPAS TA97 Y TA100 DE *Salmonella typhimurium*

4.1. Introducción

El ecosistema de un río está conformado por las corrientes de agua, los recursos hídricos (flora y fauna) y, por los sedimentos. Los sedimentos en un río juegan un papel fundamental, pues se convierten en una alfombra extensa, en la cual precipitan todas las sustancias sólidas o líquidas, que ingresan en la columna de agua. Estas sustancias, no permanecen por siempre formando parte de la fase acuosa, sino que descienden al sedimento, y por procesos químicos, pueden formar complejos estables o uniones transitorias con las partículas reactivas del sedimento, dependiendo de la naturaleza química de la sustancia y de las características físico-químicas del medio; pH, potencial redox, concentración de oxígeno, contenido de materia orgánica, reductores o mediadores, que funcionan como ligandos, entre otros factores (170)(58).

Por otra parte, las sustancias contaminantes pueden conservar sus propiedades, o transformarse en especies nuevas, como es el caso del cromo, que dependiendo de las condiciones de pH y potencial redox, puede transformarse de cromo (III) a cromo (VI) y viceversa. Con base en lo anterior, se puede decir, que los sedimentos son la trazabilidad de la calidad del ecosistema acuático, pero al mismo tiempo, constituyen un riesgo potencial en la calidad del agua y la biota, debido a que en sus partículas los metales pesados, son inmovilizados y pueden ser liberados de nuevo a la fase acuosa. Los sedimentos por su capacidad de acumulación, favorecen el incremento de la concentración de los metales pesados en su sistema, lo que origina que estos contaminantes, se conviertan en sustancias tóxicas.

Los sedimentos conforman un sistema dinámico, pues su composición cambia continuamente, las condiciones fisicoquímicas influyen en la biodisponibilidad y la incorporación de sustancias químicas en esta matriz; las sustancias químicas fluctúan del sedimento a la columna de agua y viceversa. Como también influyen, las perturbaciones naturales de los cuerpos de agua (movimiento de las corrientes). Por lo anterior, los sedimentos, se convierten en una fuente secundaria de contaminación permanente, pues se favorece el intercambio continuo del contaminante, con la columna de agua y, sobre todo, con los organismos que en el ecosistema habitan; el zooplancton, el fitoplancton, los moluscos, los crustáceos, los peces, etc., y finalmente, se incluyen los seres humanos, pues forman parte, de esta llamada cadena alimentaria para su subsistencia. Por consiguiente, si una sustancia tóxica ingresa a un cuerpo de agua de forma continua, como en este caso, el

cromo por la acción de las descargas de las curtiembres, puede acumularse a través del tiempo, y de igual manera, por la naturaleza química del metal puede desencadenar procesos de bioacumulación, bioconcentración y biomagnificación en los recursos hídricos.

Todo lo anterior, conduce a pensar, que, si se quiere conocer la actividad mutagénica general, que puede desarrollarse en el cauce del río Cerrito, se debe también evaluar la mutagenicidad en los sedimentos, pues esta es una vía muy importante que, por la afectación continua del recurso acuático, puede llegar afectar la salud de los seres humanos. Por esta razón, el objetivo de este capítulo fue, evaluar la actividad mutagénica en los sedimentos del río Cerrito a través de la prueba de Ames con las cepas mutantes TA97 y TA100 de *Salmonella typhimurium*.

4.2. Métodos

El área de estudio y el periodo de recolección de las muestras, para el desarrollo de la investigación en el matriz sedimento en el río Cerrito, se realizó de acuerdo a lo mencionado en el numeral 2.2.1 y 2.2.2.1 en el capítulo 2.

4.2.1. Muestreo

4.2.1.1. Recolección de las muestras

Las muestras fueron tomadas a una profundidad de 10 cm aproximadamente, desde la capa superficial del sedimento. En cada estación de muestreo se colectaron cuatro submuestras de 100 g en diferentes puntos, con el fin de obtener una única muestra compuesta de 400 g de sedimento, en cada uno de los puntos de muestreo. Finalmente, la muestra se distribuyó de la siguiente manera: 100 g para el análisis de cromo total, 100 g para el análisis de mutagenicidad y la muestra restante, se destinó como contra muestra para su almacenamiento.

Posteriormente, las muestras fueron depositadas y transportadas en bolsas de polietileno negras (para evitar la incidencia de la luz solar) etiquetadas y conservadas en refrigeración. Las muestras se trasladaron al Laboratorio Ambiental (CVC) para el análisis de cromo total y al Laboratorio de Investigaciones Microbiológicas (LIM) de la Universidad del Valle, para su almacenamiento y conservación a una temperatura de 4°C hasta el momento de su procesamiento.

4.2.2. Análisis de cromo

El análisis de la concentración de cromo total, fue realizado por el Laboratorio Ambiental de la CVC, siguiendo la metodología recomendada por la EPA (185). Se realizó la digestión ácida del sedimento (método 3050B), determinando la concentración de cromo mediante la técnica de espectrometría de absorción atómica de llama, de acuerdo al método 3111B (152).

4.2.3. Evaluación de la actividad mutagénica con la prueba de Ames

La evaluación de la actividad mutagénica en la matriz de sedimento, se realizó de acuerdo a la metodología expuesta en los numerales 2.2.2.4 al numeral 2.2.2.11 en el capítulo 2.

4.2.3.1. Pretratamiento de las muestras

Inicialmente las muestras fueron secadas a temperatura ambiente y finalmente macerada y tamizada en una malla de 63 μm de poro, según lo indicado por (186). Posteriormente, se realizó, la digestión ácida de las muestras de sedimento de acuerdo a la metodología recomendada por la Organización Internacional para la Estandarización ISO 11466 (1995)(187). Se pesaron 4 g de la muestra y se le adicionaron 28 mL de una mezcla 3:1 de HCl (37%) y HNO₃ (65%), dejando en reposo durante 16 horas a temperatura ambiente. Esta suspensión se sometió a calentamiento y a condición de reflujo a una temperatura de 130°C por 2 horas. La suspensión obtenida se filtró y diluyó con agua desionizada enrasando a 50 mL. Finalmente, la suspensión se almacenó en frascos de polietileno a 4°C. La suspensión ácida se evaporó hasta la obtención de un extracto cuyo pH se neutralizó con NaOH y reconstituyó con DMSO hasta un volumen final de 10 mL. El extracto obtenido correspondiente a la muestra de sedimento se analizó mediante la Prueba de Ames.

4.2.4. Diseño experimental y análisis estadístico

El diseño y el análisis estadístico de esta investigación experimental y transversal, está fundamentado en un Diseño de Parcelas divididas bajo un diseño de bloques, como se explicó en el numeral 2.2.3 en el capítulo 2. Con este modelo estadístico (Anexo 1), se probaron las hipótesis de interacción y la hipótesis de efectos principales, planteadas en el numeral 2.2.3, en este caso para las muestras de sedimentos.

Se hizo el análisis de la varianza del índice de mutagenicidad y la homogeneidad de varianzas se estableció mediante el Test Bartlett, todos los análisis se efectuaron en el programa estadístico R, en el cual se contrastaron las pruebas de hipótesis de interacción y de efectos principales frente a un nivel de significancia del 5%. Se determinaron las interacciones entre

los factores, sitio de muestreo, cepa y el activador enzimático; donde la significancia de estas interacciones se comprobó por medio de la Prueba de Tukey (nivel de significancia del 5%).

4.3. Resultados

El estudio de la mutagenicidad en los sedimentos del río Cerrito, inicia con el análisis de la concentración de cromo total en cada una de las estaciones de monitoreo; Sitio 1 (zona arriba-antes de la descarga, Balneario Las Brisas), Sitio 2 (zona en el sitio-después de la descarga, Puente vía principal Cali-Buga) y Sitio 3. (zona abajo, antes de la desembocadura al río Cauca-Puente Callejón San Fernando). Posteriormente, se realiza la evaluación de la actividad mutagénica mediante la prueba de Ames, con las cepas TA97 y TA100 de *Salmonella typhimurium*, con y sin la incorporación del sistema exógeno, de activación metabólica (S9).

4.3.1. Análisis de cromo

Los resultados del análisis de la concentración de Cromo (Cr) total en los sedimentos, se resumen en la Figura 13; se observa que los niveles más altos de Cr total, se encontraron en el sitio 3 (zona abajo-antes de la desembocadura al río Cauca), con una concentración entre 387 mg/kg a 545 mg/kg del metal, seguido del sitio 1 (zona arriba-Balneario Las Brisas), cuyas concentraciones de cromo, oscilaron entre 214 mg/kg a 458 mg/kg; encontrándose la menor concentración del metal en el sitio 2 (zona en el sitio- Puente vía principal Cali-Buga), cuyas concentraciones de cromo estuvieron entre 111 mg/kg y 231 mg/kg. Teniendo en cuenta, que en Colombia no existe una normativa que establezca límites permisibles de metales en sedimentos, los resultados obtenidos son comparados con la guía ambiental internacional; *Canadian Environmental Quality Guidelines* (CEQG), establece valores límites para la protección de la vida acuática y calidad del sedimento en *Interim Sediment Quality Guideline* (ISQG) 37.3 mg/kg, e igualmente, establece *Probable Effect Level* (PEL), señala la concentración en la cual el metal causará un probable efecto negativo (188).

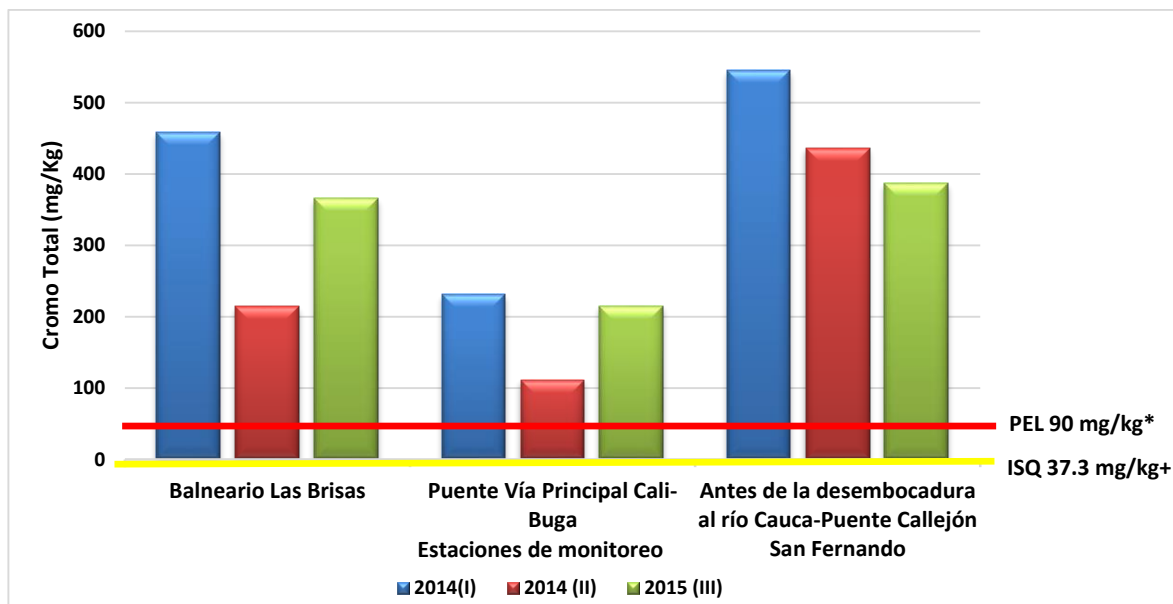


Figura 13. Concentración de cromo total en el sedimento del río Cerrito

ISQG: Límite provisional para la calidad del sedimento. PEL: Límite probable del efecto.

*+Tomado de: CEQG (188).

4.3.2. Evaluación de la actividad mutagénica

En las tablas 15 y 16, se presentan los Índices de Mutagenicidad (IM) determinados en los sedimentos del río Cerrito utilizando las cepas TA97 y TA100 de *Salmonella typhimurium*. Con el fin, de evidenciar el posible riesgo en la salud de los seres humanos, se determinó el IM, utilizando el activador enzimático fracción microsomal S9; simulando de esta manera, su efecto en el sistema de los mamíferos. En general, los resultados muestran que los sedimentos del río Cerrito, alcanzaron una *leve actividad mutagénica*, con (+S9) y sin (-S9) activación metabólica, este resultado se refleja tanto con la cepa TA97 como con la cepa TA100. Sin embargo, la evaluación mutagénica con la cepa TA97 sin activación metabólica (-S9), evidenció que los sedimentos alcanzaron un nivel *mutagénico* con un IM de 2.0 a 2.4, en las tres repeticiones correspondientes, al sitio 1 (zona arriba-Balneario Las Brisas, antes de la descarga); en el monitoreo del año 2015. Del mismo modo, se registra un nivel *mutagénico* con un IM de 2.0, en el sitio Puente vía principal Cali-Buga, después de la descarga.

El análisis general de los resultados obtenidos frente a las fuentes de variación (Anexo 2), mostró que no hubo efecto de la dosis (p-valor= 0.632) empleada en los ensayos de mutagenicidad, indicando que no hubo una relación lineal entre la dosis y el IM, por lo tanto, es posible retirar su efecto del modelo estadístico. Los modelos estadísticos tanto con covariable (dosis) como sin covariable cumplieron con el supuesto de normalidad a niveles de significancia mayores a 0.15 y homogeneidad de varianzas a niveles de significancia mayores a 0.18 (anexo 3).

Tabla 15. Actividad mutagénica en sedimentos del río Cerrito determinada con la cepa *Salmonella typhimurium* TA97

Sitio de muestreo	Muestreo	Cr total (mg/L)	Dosis (uL/Plato)	TA97				
				(+ S9)	IM	Dosis (uL/Plato)	(-S9)	IM
Sitio 1. Balneario Las Brisas Zona arriba- antes de la Descarga	A	458	1E-04	110±0.7	1.0	1E-01	185±17.7	1.9
			1E-05	91±11.3	0.8	1E-02	165±4.0	1.7
			1E-06	116±0.7	1.0	1E-03	185±8.5	1.9
	B	214	1E-04	155±1.4	1.4	1E-01	142±0.7	1.2
			1E-05	133±6.4	1.2	1E-02	128±8.5	1.1
			1E-06	150±9.9	1.3	1E-03	154±13.4	1.3
	C	366	1E-04	151±33.2	1.3	1E-04	194±3.5	2.0
			1E-05	126±8.5	1.1	1E-05	197±4.2	2.0
			1E-06	148±17.0	1.3	1E-06	238±6.4	2.4
Promedio		346						
Sitio 2. Puente vía principal Cali-Buga Zona en el sitio- después de la Descarga	A	231	1E-04	138±15.6	1.2	1E-04	139±0.6	1.2
			1E-05	137±2.1	1.2	1E-05	125±11.3	1.0
			1E-06	167±2.8	1.5	1E-06	150±61.5	1.2
	B	111	1E-04	102±0.7	0.9	1E-01	145±12.0	1.2
			1E-05	129±3.5	1.1	1E-02	135±10.6	1.1
			1E-06	159±21.2	1.4	1E-03	116±15.5	1.0
	C	215	1E-04	134±18.4	1.2	1E-01	174±1.4	1.8
			1E-05	134±12.7	1.2	1E-02	193±4.2	2.0
			1E-06	151±29.0	1.3	1E-03	179±2.1	1.8
Promedio		185.7						
Sitio 3. Antes de la Desembocadura al río Cauca- Puente Callejón San Fernando Zona abajo	A	545	1E-04	118±10.6	1.0	1E-01	159±26.2	1.3
			1E-05	144±14.8	1.3	1E-02	162±2.1	1.3
			1E-06	157±18.4	1.4	1E-03	167±6.4	1.4
	B	436	1E-04	139±23.3	1.2	1E-01	162±0.7	1.3
			1E-05	122±1.4	1.1	1E-02	176±2.1	1.5
			1E-06	148±1.3	1.3	1E-03	137±11.3	1.1
	C	387	1E-04	150±8.5	1.3	1E-01	146±1.4	1.5
			1E-05	143±11.3	1.3	1E-02	143±2.1	1.5
			1E-06	134±0.7	1.2	1E-03	168±1.4	1.7
Promedio		456						
		DMSO		114			97	

A. Abril 15 -2014. B. Septiembre 27 de 2014. C. Abril 30 de 2015.

(+S9) y (-S9): con y sin activador enzimático respectivamente.

IM: Índice de Mutagenicidad. Nivel de mutagenicidad calificado como: No Mutagénico cuando los valores son <1. Levemente Mutagénico en el rango de 1.1 a 1.9 y Mutagénico para los valores ≥2.0

Tabla 16. Actividad mutagénica en sedimentos del río Cerrito determinada con la cepa *Salmonella typhimurium* TA100

Sitios de muestreo	Muestreo	Cr total (mg/L)	Dosis		TA100		
			(uL/Plato)	(+ S9)	IM	(-S9)	IM
Sitio 1. Balneario Las Brisas Zona arriba-antes de la descarga	A	458	1E-01	107±2.1	1.4	120±1.4	1.5
			1E-02	100±0.7	1.3	117±12.0	1.5
			1E-03	118±1.4	1.5	101±3.2	1.3
	B	214	1E-01	111±21.9	1.4	117±8.1	1.5
			1E-02	112±0.7	1.4	103±0.7	1.3
			1E-03	110±13.4	1.4	107±9.5	1.3
	C	366	1E-01	114±14.1	1.5	108±25.5	1.4
			1E-02	99±2.8	1.3	96±20.1	1.2
			1E-03	123±2.4	1.6	126±19.3	1.6
	Promedio	346					
Sitio 2. Puente vía principal Cali-Buga Zona en el sitio- después de la descarga	A	231	1E-01	119±26.2	1.5	118±3.5	1.5
			1E-02	125±0.7	1.6	92±6.8	1.2
			1E-03	115±3.5	1.5	94±13.0	1.2
	B	111	1E-01	148±6.4	1.9	112±6.1	1.4
			1E-02	138±0.7	1.8	86±11.0	1.1
			1E-03	142±3.5	1.8	109±5.5	1.4
	C	215	1E-01	122±6.2	1.6	92±11.6	1.2
			1E-02	132±1.4	1.7	113±12.2	1.4
			1E-03	124±3.5	1.6	94±3.5	1.2
	Promedio	185.7					
Sitio 3. Antes de la desembocadura al río Cauca- Puente Callejón San Fernando Zona abajo	A	545	1E-01	104±10.6	1.3	97±14.6	1.2
			1E-03	104±0.7	1.3	116±2.1	1.4
			1E-04	123±0.7	1.6	108±9.2	1.5
	B	436	1E-01	108±11.3	1.4	111±7.5	1.4
			1E-02	103±14.1	1.3	116±16.2	1.5
			1E-03	127±2.8	1.6	98±18.1	1.2
	C	387	1E-01	138±0.7	1.8	93±16.6	1.2
			1E-02	108±4.2	1.4	116±12.3	1.5
			1E-03	125±0.7	1.6	123±19.1	1.6
	Promedio	456					
		DMSO		77		79	

A. Abril 15 -2014. B. Septiembre 27 de 2014. C. Abril 30 de 2015.

(+S9) y (-S9): con y sin activador enzimático respectivamente.

IM: Índice de Mutagenicidad. Nivel de mutagenicidad calificado como: No Mutagénico cuando los valores son <1. Levemente Mutagénico en el rango de 1.1 a 1.9 y Mutagénico para los valores ≥2.0

En consecuencia, el análisis estadístico de los datos se realizó mediante el análisis de varianza del IM (Tabla 17), sin el efecto de la dosis, donde se muestra el efecto de la interacción significativa, entre los factores; sitio de muestreo*cepa ($p=0.042$), sitio de muestreo*activador ($p=0.002$) y cepa*activador enzimático ($p=0.000$). Cuando se fija el sitio de muestreo y se comparan las cepas (TA97 y TA100), el IM tiende aumentar o a disminuir al evaluar la actividad mutagénica con una cepa u otra. De la misma manera, al comparar la actividad mutagénica con y sin activación enzimática, el IM aumenta o disminuye en el sitio de muestreo, cuando se realiza la prueba de Ames, con o sin S9 (Anexo 4).

Tabla 17. Análisis de varianza del IM de la interacción entre los factores sitio, cepa y activador enzimático

Fuente de Variación	GL	SC	F-Valor	P-Valor
Rep/Bloque	2	0.68056	7.53	0.01
Sitio de muestreo	2	0.02167	0.582	0.600
Rep*Punto	4	0.07444		
Cepa	1	0.17926	3.96	0.05
Activador	1	0.07259	1.61	0.208
Sitio muestreo*Cepa	2	0.29796	3.29	0.042
Sitio muestreo*Activador	2	0.58907	6.51	0.002
Cepa*Activador	1	1.517	33.55	0.000
Sitio muestreo*cepa*activador	2	0.18463	2.04	0.136
Error	90	4.069		
Total	107	7.6867		

4.4. Discusión

Los resultados de esta investigación muestran que los sedimentos del río Cerrito, han acumulado concentraciones de cromo muy elevadas en la fase particulada a través del tiempo, de esta manera se han convertido en reservorios de sustancias contaminantes, y su vez, son fuentes de contaminación secundaria, pues los movimientos naturales de las corrientes de agua o los ocasionados por las actividades del hombre, provocan una continua mezcla del contaminante con la columna de agua. Las descargas consecutivas de los efluentes de las curtiembres del municipio de El Cerrito, vierten con igual efectividad residuos de cromo; se han reportado concentraciones de cromo en los efluentes de las curtiembres en el rango de 3.000 mg/L y 4325 mg/L (88) (11). Benítez-Campo en el 2015 (12), reportó concentraciones de cromo total en tres curtiembres de El Cerrito, con valores que van desde 1067.2 mg/L, 1470 mg/L hasta 3084.0 mg/L de cromo.

Los resultados de la investigación, arrojan concentraciones de cromo en los sedimentos, en un rango de 111 mg/kg a 545 mg/kg, con base en los resultados se puede decir, que las descargas cromo a través de los efluentes de las curtiembres a lo largo del tiempo, han favorecido la concentración de cromo en las aguas del río, el cual por reacciones físicas y químicas se ha precipitado y acumulado en los sedimentos del río Cerrito (189)(190)(191). Adicionalmente, la concentración de cromo total en los sedimentos, presenta el mismo comportamiento que en aguas superficiales, teniendo en cuenta los sitios de muestreo, observándose la mayor concentración en el sitio 3, antes de la desembocadura al río Cauca.

En el sitio 1, Balneario Las Brisas (antes de la descarga) se registró una de las mayores concentraciones de cromo total, con un valor promedio de 346 mg/kg; cabe recordar, que la cuenca del río Cerrito está formada por dos tipos de rocas, una de ellas de afinidad volcánica, llamada Formación de Amaime (105). Parte de la composición química de estas rocas, es la presencia de iones metálicos como el cromo, hierro, manganeso, entre otros (23), además, por atracciones entre los diferentes elementos químicos presentes, y procesos de cristalización, se favorece la formación de compuestos derivados de cromo (182). Es más, por sucesos naturales como movimientos de masas y las lluvias; las rocas se fracturan, se acumulan, se deslizan y por gravedad o arrastre, se depositan en los cuerpos de agua; situación que se presenta en la parte alta de la cuenca, afectando el cauce del río y el corregimiento de El Pomo, donde se ubica el balneario. Por otro lado, la cuenca del río Cerrito, recibe sales de cromo por agroquímicos, utilizados en los cultivos ubicados en los corregimientos de la parte alta de la cuenca; frutales y cafetales (San Antonio, El Carrizal y El Pomo) (192)(105). Teniendo en cuenta, que los agroquímicos son proveedores de metales pesados como el cromo, a su vez, los fertilizantes incrementan el cromo presente en los suelos agrícolas, y que, por la acción de las lluvias, el lavado de los suelos, escorrentías, estos contaminantes con cromo llegan hasta las corrientes de agua del río, e incrementan las concentraciones naturales de cromo en este lugar (193) (78).

En resumen, este conjunto de acciones, se convierten en una problemática que enfrenta el río Cerrito en su parte alta de la cuenca, que afecta a las aguas con sales de cromo y, por consiguiente, a los sedimentos fluviales. Sumado a ello, también el cauce recibe, residuos de material vegetal por los movimientos de masas, que se presentan en la parte alta de la cuenca. Cabe mencionar, que de forma general las aguas del río Cerrito, presentaron concentraciones importantes de hierro y manganeso total, en un rango de <0.240 mg/L a 386 mg/L y de <0.246 a 0.828 mg/L respectivamente. De esta manera, las especies químicas insolubles de cromo, se precipitan y se acumulan en el sedimento, siendo favorecidas por la presencia de la materia orgánica. La fase acuosa de los sedimentos en conjunto con el oxígeno y las características fisicoquímicas del medio, proporcionan el ambiente idóneo para que se presenten reacciones de óxido-reducción de manera casi inmediata. Las especies más comunes de cromo son cromo (III) y cromo (VI); el cromo (III) puede ser oxidado a cromo (IV) por elementos oxidantes presentes en el sedimento por ejemplo dióxido de manganeso, al mismo tiempo, el cromo (VI) puede ser reducido a cromo (III) en presencia de óxido de manganeso. En los

sedimentos la reducción solo se presenta en presencia de materia orgánica que contienen ácidos orgánicos, hierro soluble (Fe II) o compuestos de sulfuro (194)(3).

Se ha reportado que los minerales presentes en el agua y los sedimentos superficiales del río Ortigueira, están influenciados principalmente por la composición rocosa del Complejo Cabo Ortegal, que se compone principalmente por rocas máficas y ultramáficas que se caracterizan por el alto contenido de Mg, Mn y minerales de crisolito y riebeckita. Como también de metales pesados presentes en rocas circundantes (195). Los suelos sobre rocas básicas y ultrabásicas, contienen 240 mg/kg a 11 000 mg/kg de cromo respectivamente (175). El complejo geológico contribuye al enriquecimiento de metales: cromo, níquel y cobalto, a los ríos Ortigueira y Barqueiro, debido a la erosión de los acantilados expuestos. En sedimentos superficiales se encontraron concentraciones de 1670 mg/kg de cromo. Dependiendo de la cercanía del río al complejo, se encontraron mayores concentraciones de cromo en aguas fluviales que van desde 0.47 mg/L a 0.37 mg/L (175).

La guía ambiental canadiense CEGQ (1998)(188), establece un valor límite de la concentración de cromo, que define la calidad de los sedimentos; esta norma es aplicada para los ríos tropicales. Esta guía establece un límite de calidad para sedimentos de 37.3 mg/kg y un límite de efecto probable de 90 mg/kg. En el caso de los sedimentos del río Cerrito, se encontró una concentración mínima de 111 mg/kg en el sitio 2: Puente vía principal Cali-Buga (después de la descarga), y la mayor concentración en el sitio 3: Antes de la desembocadura al río Cauca-Puente Callejón San Fernando con 545 mg/kg de cromo total. Se puede decir, que la alta concentración del metal, obedece a la tasa de descargas directas de efluentes de curtiembres, a residuos industriales y de talleres mecánicos que se encuentran en el municipio en cercanías al río, por la contaminación con agroquímicos y por el depósito de fragmentos de rocas de afinidad volcánica que forman la cuenca del río. Además, antes de la desembocadura al río Cauca (sitio 3), la acumulación de cromo en los sedimentos se facilita, debido a la contaminación por materia orgánica que se presentaron las aguas en este sitio, de acuerdo al ICOMO con un valor de 0.26.

Cabe mencionar, que el nivel de contaminación por materia orgánica que presenta el agua superficial del río Cerrito, aguas abajo (sitio 3), genera una concentración de sólidos disueltos en un rango de 212 mg/L a 334 mg/L, se observa que a medida que se incrementan los sólidos disueltos, se detecta la concentración de hierro total (1.29mg/L – 4.52 mg/L) y de manganeso (<0.246 mg/L – 1.48). Por lo tanto, el material inorgánico disuelto en el sedimento superficial, como son los iones de hierro (Fe^{+2}) y manganeso (Mn^{+2}), fijan e inmovilizan el cromo (III) en la matriz y además, permiten la formación de complejos organometálicos, favoreciendo la solubilidad, disponibilidad y dispersión del contaminante (20)(196)(197).

Resultados similares, se registran en el río Korotoa en Bangladesh, donde la concentración de cromo es mucho mayor que otros metales identificados (Ni, Cu, Pb), siendo este hecho la consecuencia de descarga directa de desechos no tratados de curtiembres y por las descargas

de domésticas e industriales que recibe el río, pues fluye a través de un área urbanizada, donde los niveles más altos del metal se detectan aguas abajo (78).

Los resultados de la investigación, también fueron comparados con los valores registrados en el *Screening Quick Reference Table for Inorganics in Sediment: Fresh water sediment de la National Oceanic and Atmospheric Administration* (NOAA), que identifica sustancias que pueden amenazar los recursos naturales y determina de forma preliminar, las concentraciones en las cuales la sustancia contaminante puede causar un impacto negativo en la matriz de estudio (198). Esta entidad, ha establecido una concentración de cromo de 1.1 mg/kg, como el valor de alerta para los sedimentos de agua dulce. Al comparar, la menor concentración (111 mg/kg) de cromo encontrada en los sedimentos del río Cerrito, se observa que esta es 100 veces mayor, al valor de alerta. Asimismo, la mayor concentración se encuentra 495.45 veces por encima, del límite de referencia rápida que emite NOAA (198). Lo anterior, muestra que los sedimentos del río Cerrito, no cumplen la mínima norma establecida, cabe resaltar que en Colombia no existen normas de control, que permitan proteger los ecosistemas de estos impactos negativos. Es importante mencionar, que el sitio 1: Balneario Las Brisas, registró una alta concentración de cromo (346 mg/kg) en sedimentos; resultando preocupante, teniendo en cuenta que este sitio, es un destino turístico para el municipio de El Cerrito, que permite la recreación de contacto directo.

Por otro lado, los resultados revelados en el estudio de mutagenicidad con las cepas de *Salmonella typhimurium* TA97 y TA100, con activación metabólica (presencia de fracción S9) y sin activación (ausencia de fracción S9), indican que los sedimentos del río Cerrito, en general desarrollan actividad mutagénica, con un *nivel mutagenicidad leve* (Tabla 15 y 16). Sin embargo, únicamente se presentaron mutaciones puntuales *frameshift* con la cepa TA97 (sin activador metabólico), por inserción, delección o duplicación de pares de bases en el ADN.

El resultado de esta investigación, es consecuente con el hallado en sedimentos provenientes del estuario del río Yangtze (China), donde la mayoría de las muestras fueron mutagénicas con la cepa TA98 sin activación metabólica, presentando mutaciones *frameshift*. Sin embargo, ninguna de las muestras fue mutagénica con la cepa TA100 (Liu et al. 2015). La actividad mutagénica que se evidenció en los sedimentos del río Cerrito, puede ser causada por las sales de cromo y otras sustancias químicas generadas por las distintas actividades antrópicas, que se convierten en fuentes de contaminación. Como son las descargas de efluentes de curtiembres, aguas residuales domésticas e industriales; se debe tener en cuenta que las sustancias contaminantes y los metales, se acumulan en las partículas activas del sedimento y que, además, algunas curtiembres continúan realizando descargas directas al río. De igual manera, se presenta un aporte de las actividades industriales, que manipulan productos a base de cromo. Como también, son partícipes de esta contaminación, la

escorrentía de agroquímicos y la naturaleza misma de la cuenca, por su formación rocosa (Formación de Amaime), que aporta iones metálicos al río Cerrito.

En el sitio 1, Balneario Las Brisas (antes de la descarga) la TA97-S9 mostró un IM de 1.9 en dos ocasiones, en el primer muestreo cercano al Nivel Mutagénico, evidenciando en el tercer muestreo un nivel *mutagénico* con un IM de 2.0, 2.4 y 2.0. Lo anterior indica, que la matriz de sedimento, contiene sustancias contaminantes capaces de causar mutaciones por cambio en el marco lectura, asimismo, que dichas sustancias actúan como mutágenos directos, o sea que no requieren una activación metabólica para activar su potencial mutagénico. Este resultado, evidencia que las sustancias que están contaminando al río en este punto, afectan tanto el agua superficial como los sedimentos, pues ambas matrices, presentaron el mismo comportamiento en la evaluación actividad mutagénica, con la cepa TA97 en ausencia de la mezcla S9. Este resultado también revela, que la presencia de los contaminantes en este punto, se mantiene constante y que los contaminantes fluctúan entre la matriz del sedimento y la columna de agua.

De una forma u otra, se puede afirmar, que el metal (cromo), disponible en las partículas sedimentos es una fuente de contaminación constante para la columna de agua, y que las perturbaciones naturales que se presentan como, por ejemplo, en épocas de lluvia condicionan las características fisicoquímicas del medio, permitiendo que el cromo se transfiera a la columna de agua en su forma soluble (cromo hexavalente). Cabe resaltar, que el nivel mutagénico que se determinó en las aguas superficiales, coincide con una época lluvia en el primer semestre del año 2015. Por otro lado, con la cepa TA100 no se obtuvo respuesta mutagénica, con y sin el activador enzimático. Sin embargo, presentó un nivel mutagénico *leve* con un IM de 1.2 a 1.6. con y sin S9.

Con respecto al sitio (2) Puente vía principal Cali-Buga (después de la descarga), se evidenció que la actividad mutagénica continúa con la cepa TA97-S9, presenta niveles de mutagenicidad *leve* con un IM de 1.8 en dos ocasiones. Pero también, se registró un IM de 2.0, indicando un *mutagenicidad*. Cabe mencionar, que la actividad mutagénica presentada en este punto, coincide también con la época de lluvia del primer semestre del año 2015. Por lo anterior, se puede afirmar que: primero la época de lluvia origina perturbaciones naturales, que causan el intercambio de las sustancias contaminantes del sedimento a la columna de agua y también, que probablemente las sustancias contaminantes presentes en ambas matrices (agua-sedimento) por los movimientos de las corrientes y el aumento del caudal, se trasladen de un sitio a otro, a lo largo del cauce del río Cerrito. De igual manera, con la cepa TA100 con activación metabólica (+S9), mostró un nivel mutagénico *leve*, con un IM de 1.9, como también, con un IM: 1.8, en dos oportunidades; índices de mutagenicidad muy próximos al Nivel Mutagénico. Lo cual indica, que en este sitio también se encuentran

sustancias con potencial mutagénico, solamente que requieren un activador enzimático para alcanzar dicho potencial, teniendo en cuenta los valores del IM. Además, que la leve mutación que se presentó, es una mutación puntual por sustitución de pares de bases.

Finalmente, en el sitio (3) Antes de la desembocadura al río Cauca-Puente Callejón San Fernando, la cepa TA97 no mostró una respuesta mutagénica en presencia o ausencia de la mezcla S9. Se evidencia un nivel *levemente mutagénico*, con un IM que va desde 1.0 a 1.4 y desde 1.1 a 1.7 respectivamente. Con respecto a la cepa TA100, se observó una mejor respuesta. Se evidencio un IM de 1.8, muy cercano al Nivel Mutagénico con el activador enzimático (S9), y sin S9, se registraron IM en un rango de 1.2 a 1.6, que indican un nivel *levemente mutagénico*. Del mismo modo, la respuesta de la actividad mutagénica en este sitio coincide con la obtenida en las aguas superficiales. En este punto precisamente, la cepa TA100+S9, mostró una mejor respuesta, tanto en la matriz de sedimento como en la matriz de agua, revelando la presencia de sustancias promutagénicas en la zona abajo, antes de la desembocadura al río Cauca.

Es evidente, que los sedimentos del río Cerrito conservan sustancias contaminantes que tienen la capacidad de inducir desde una leve mutación hasta originar una mutación puntual. Sin embargo, se presenta una mayor oportunidad para que se desencadenen mutaciones por cambio en el marco de lectura (cepa TA97), y en segundo lugar mutaciones leves por sustitución de pares de bases (cepa TA100). Se observa el mismo comportamiento de la actividad mutagénica que se registró en la matriz de agua superficial; la interacción de la cepa, activador enzimático y sitio de muestreo (Anexo 4), influyen directamente en la respuesta mutagénica (154)(199). La respuesta radica, en el tipo de sustancia contaminante que se encuentra en las partículas de sedimento de acuerdo a cada sitio. Relacionando igualmente, los causantes de la contaminación a los cuerpos de agua, que repercuten consecuentemente en la matriz del sedimento, la cual le favorece la acumulación del metal por el incremento de la contaminación de la materia orgánica presente en el río Cerrito en las zonas de estudio. Finalmente, se observa que los sedimentos del río Cerrito no se depuran naturalmente, debido a que la carga contaminante es tan alta que se ha acumulado en el tiempo, además el cromo es un elemento no biodegradable, convirtiéndose en una fuente de contaminación que perdurará o aumentará, y que por causa antropogénicas expone a una contaminación constante a los cuerpos de agua del río Cerrito.

Considerando que, la concentración de cromo en los sedimentos estuvo en el rango de 111 a 545 mg/kg, valores muy altos con los encontrado en el agua (<0.294 mg/L), se esperaría un IM igualmente mayor. Sin embargo, los IM en ambas matrices, fueron muy similares. Este resultado se relaciona, con el método de extracción utilizado para los sedimentos en este estudio. Es factible, que, al realizar la extracción (solución ácida) y la posterior,

neutralización (hidróxido de sodio) de dichos extractos, se halla presentado una pérdida de cromo y de otros mutágenos, en la fase líquida finalmente obtenida, la cual fue sometida a la prueba de Ames. Además, se presentaron mutaciones únicamente con la cepa TA97 con activación enzimática, pero no se evidenció mutación alguna, con la cepa TA100.

Los resultados de esta investigación, son comparables con lo reportado por Biruk y sus colaboradores en el 2016, quienes evaluaron la mutagenicidad con las cepas TA98 y TA100 en extractos de sedimentos de la cuenca baja del río Matanza-Riachuelo en Argentina, revelando que la respuesta genotóxica, estaba relacionada con el método de extracción utilizado en los sedimentos. Los extractos obtenidos por tratamiento con diclorometano (DCM) fueron más genotóxicos que los obtenidos por la extracción con metanol en la prueba de Ames. Además, sólo los extractos obtenidos en DCM resultaron genotóxicos con la cepa TA100, con activador enzimático, mientras que los extractos con la solución ácida, no evidenciaron mutagenicidad.

De la misma manera, la evaluación mutagénica realizada con la prueba de Ames, a suelos contaminados con residuos de curtiembres, en la zona industrial de Jajmau en India, demostró que la respuesta mutagénica estaba relacionada con el método de extracción, donde el mayor potencial mutagénico se observó, en los extractos de suelo con diclorometano en comparación con los extractos de hexano para cada cepa (TA97, TA98, TA100, TA102 y TA104) de *Salmonella typhimurium* (199).

Por otra parte, el análisis estadístico reveló, que la variación en los IM en la matriz de sedimentos del río Cerrito, está siendo explicada por efectos aleatorios que, por los efectos controlados en la investigación; siendo el efecto de la interacción cepa*activador enzimático siendo significativa a un nivel de 0.000 (valor-P), quien aporta más al total. Esta variación puede ser soportada, en el tipo de sustancia contaminante que esté presente en la matriz de sedimento, las cuales pueden causar una respuesta diferente; si el contaminante es una sustancia promutagénica, requiere una acción enzimática (S9) para su activación. Por el contrario, si la sustancia contaminante actúa como un mutágeno directo, no necesita activación metabólica. Por otro lado, las sustancias contaminantes pueden causar diferentes tipos de mutaciones, es por ello que la prueba de Ames, permite utilizar una variedad de cepas, para que se puedan identificar los tipos de mutaciones originan los contaminantes. En esta investigación, la cepa TA97 permitió identificar sustancias que causaron mutación por cambio en el marco de lectura, y por su parte, la cepa TA100 permitió evidenciar la presencia de sustancias que causaron mutación por sustitución de pares de bases, tanto en la matriz de agua superficial como en la de sedimentos.

5. CONSIDERACIONES FINALES

En este capítulo se presentan las conclusiones y recomendaciones, que surgen a luz de los principales resultados obtenidos en esta investigación, presentados a lo largo de los capítulos que componen el documento.

CONCLUSIONES

De acuerdo a los Índices de Calidad Agua (ICA) (CESTESB, DINIUS E ICOMO) se evidencia que la descarga de efluentes en el río Cerrito, deteriora la calidad del agua a su paso por el municipio, y que el sitio es un factor preponderante, que define su destinación y el posible riesgo que conlleva su uso, bien sea para consumo humano, riego agrícola, y recreación, entre otros.

En el sitio 1, el agua se clasifica de *buena calidad*, óptima para ser utilizada con fines de potabilización para consumo humano, *aceptable*, como agua para riego con *baja contaminación*, por materia orgánica. La destinación del agua para recreación, se ve comprometida por la carga de Coliformes totales y fecales, la cual, se encuentra por encima del valor límite permisible. En el sitio 2, el agua es clasificada de *regular calidad*, para ser destinada para consumo humano, *levemente contaminada* para uso agrícola, pero aún, se considera utilizable para el riego de la mayoría de los cultivos. Se incrementa la contaminación por materia orgánica de forma progresiva, pasando de una *baja contaminación* a una *alta contaminación*. La máxima contaminación se presenta en el sitio 3 (zona abajo), antes de la desembocadura al río Cauca, el agua es clasificada de *mala calidad*, no deber ser destinada para consumo humano, como tampoco para uso agrícola, este sitio presenta *Muy alta contaminación* por materia orgánica.

La determinación de la actividad mutagénica en las aguas superficiales del río Cerrito, con las cepas de *Salmonella typhimurium* TA97 y TA100, con y sin activación metabólica, presentaron un nivel mutagénico *leve*, generando mutaciones puntuales *frameshift* (cepa TA97) por inserción o supresión de pares de bases Guanina-Citocina (G-C), como también, *sustitución de pares de bases G-C* (cepa TA100). El sitio 1 presentó actividad mutagénica con un IM de 2.3 (cepa TA97-S9) y el sitio 3 alcanzó un nivel *mutagénico* con un IM de 2.3 y 2.0 (cepa TA100+S9). Los dos tipos de mutaciones que se presentaron en este sitio, conducen a mutaciones tanto por cambio en el marco de lectura como por sustitución de pares de bases.

La actividad mutagénica en los sedimentos del río Cerrito a través de la prueba de Ames, con las cepas de *Salmonella typhimurium* TA97 y TA100, con y sin activación metabólica, presentaron un *nivel mutagenicidad leve*. Sin embargo, se revelaron mutaciones puntuales

frameshift con la cepa TA97 con activación metabólica, para el sitio (1) antes de la descarga, se presentó un nivel *mutagénico* con un IM de 2.0 a 2.4 (cepa TA97-S9). Los resultados evidencian que la matriz de sedimento en este sitio, conserva sustancias contaminantes que causan mutaciones puntuales, por cambio en el marco lectura, asimismo, que dichas sustancias son mutágenos directos. En el sitio 2, la actividad mutagénica continúa, presentando un nivel *mutagénico* con un IM 2.0 (cepa TA97-S9). En el sitio 3, con la cepa TA100+S9, se encontró un IM de 1.8 a 1.9 con un nivel *levemente mutagénico*.

El nivel mutagénico determinado en los sedimentos, coincide con las respuestas mutagénicas, evidenciadas en el agua superficial, mostrando que hay una relación recíproca con las sustancias contaminantes presentes y que, estas fluctúan en ambas matrices, de acuerdo a las condiciones fisicoquímicas del medio.

La incorporación del activador enzimático para la simulación del sistema de los mamíferos en la prueba Ames, mostró que los mutágenos ambientales presentes en el río Cerrito, generan un riesgo por su capacidad de causar una mutación en el ADN.

El Índice de Mutagenicidad (IM) presentado en el agua superficial y en los sedimentos del río Cerrito, estuvo determinado por la interacción entre los factores: Sitio de muestreo, activador enzimático y cepa.

PERSPECTIVAS

Realizar investigaciones sobre el efecto del cromo en flora y fauna del río Cerrito, de tal manera que se pueda determinar la posible bioconcentración y bioacumulación de genotóxicos.

Efectuar investigaciones interdisciplinarias que permitan realizar un estudio integral de la calidad del agua del río Cerrito y su posible efecto, de acuerdo a su uso.

Implementar estrategias de investigación, aplicadas a determinar la posible actividad mutagénica, asociada a los residuos de agroquímicos en el río Cerrito.

Generar nuevos lineamientos normativos relacionados con la evaluación de la actividad mutagénica, que complemente los ya existentes para los ecosistemas acuáticos, de manera que se asegure la calidad ambiental y la salud de los seres humanos.

Realizar estudios que evalúen la efectividad de los métodos de extracción, para la posterior evaluación de la mutagenicidad de los extractos de sedimentos aplicando la prueba de Ames.

Finalmente, cual sea la línea de investigación el objetivo es salvaguardar la vida del ecosistema natural y la salud de los seres humanos en el entorno del río Cerrito, conociendo

el grado de peligrosidad y toxicidad que tiene el cromo; para que de una forma u otra se puedan mitigar las causas de contaminación, por medio de la adopción de nuevos comportamientos por parte de los actores sociales y de normativas que se implementen, para asegurar estas acciones.

REFERENCIAS

1. Tapia J, Freer J, Mansilla H, Villaseñor J, Bruhn C, Basualto S. Estudio de reducción fotocatalizada de cromo hexavalente. *Bol Soc Chil Quím.* 2002;47(4).
2. Bello O. S., Atoyebi O. M., Adegoke K. A., Fehintola E. O. & Ojo AO. The Removal of Toxicant Chromium (VI) from Aqueous Solution Using Different Adsorbents. 2015;37(Vi):190–207.
3. De Paiva Magalhães D, Da Costa Marques MR, Baptista DF, Buss DF. Metal bioavailability and toxicity in freshwaters. *Environ Chem Lett.* 2015 Mar;13(1):69–87.
4. Gall J. E., Boyd R. S. & Rajakaruna N. Transfer of heavy metals through terrestrial food webs : A review. *Environ Monit Assess.* 2015;187(201):1–21.
5. ATSDR. Toxic substances portal [Internet]. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 2011 [cited 2018 Jun 10]. Available from: <https://www.atsdr.cdc.gov/substances/toxsubstance.asp?toxid=17>
6. Wilburg S., Ingerman L., Citra M., Osier M., & Wohlers D. Toxicological Profile for Chromium. Public Health. Atlanta, USA: Agency for Toxic Substances and Disease Registro (ATSDR); 2012. 502 p.
7. Unidad de Residuos de CONAMA RM. Guía para el control y prevención de la contaminación industrial, Curtiembres. Comisión Nacional del Medio Ambiente - Región Metropolitana. Santiago de Chile; 1999. p. 5–73.
8. Pure Earth & Green Cross. The World's Worst Pollution Problems 2016: The Toxics Beneath Our Feet [Internet]. Switzerland. 2016 [cited 2018 Jun 27]. Available from: <http://www.worstpolluted.org/>
9. Benítez-campo N. Realidad social, económica y ambiental de las curtiembres de Cerrito. Cali-Colombia: Programa Editorial Universidad del Valle; 2017. 71 p.
10. Alzate A. M. Proyecto de Gestión ambiental en la industria de Curtiembres en Colombia. Bogotá D.C.- Colombia: Centro Nacional de Producción Más Limpia, (CNPML).; 2004. 16-31 p.
11. Benítez-Campo, N. & Perafán A. Las curtiembres de El Cerrito (Valle del Cauca): Una mirada en torno a su realidad socioeconómica y ambiental. *Rev UDCA Actual Divulg Científica.* 2016;19(2):457–66.
12. Benítez-Campo N. Diseño de un modelo para la reducción de la contaminación por cromo en el agua del curtido del cuero estudio de caso: Curtiembres de El Cerrito (Valle del Cauca). [Tesis doctoral]. Universidad del Valle; 2015.
13. Jaramillo A., Vásquez P. & Tarquino L. Potencial de mejoramiento ambiental a través de la implementación de producción mas limpia en las curtiembres de El Cerrito.

Conferencia Internacional Usos Múltiples del Agua: Para la Vida y el Desarrollo Sostenible. 2003.

14. Hernández E. F. Evaluación económica de la implementación del sistema de producción más limpia en las curtimbres de El Cerrito. Universidad del Valle; 2009.
15. Bosnic M, Buljan J, Daniels R. Pollutants in tannery effluents. Asia: United Nations Industrial Development Organization; 2000. p. 3–26.
16. Chávez A. Descripción de la nocividad del cromo proveniente de la industria de curtiembres y de las posibles formas de removerlo. *Rev Ing Univ Medellín*. 2010;9(17):41–9.
17. Committee on Drinking Water (The Federal-Provincial-Territorial). Chromium in Drinking Water. Canada: The Federal-Provincial-Territorial; 2015. p. 1–82.
18. Tapia, J. (1997). Evaluación de la contaminación por cromo en un sistema fluvial de Chile Central: Una propuesta para la disminución en su origen. Universidad de Concepción. Escuela de Graduados. In: Tapia J, Freer J, Mansilla H, Villaseñor J, Bruhn C, Basualto S Estudio de reducción fotocatalizada de cromo hexavalente *Bol Soc Chil Quím* 2002;47(4).
19. Mejía G. Aproximación teórica a la biosorción de metales pesados por medio de microorganismos. *CES Med Vet y Zootec*. 2006;1(1):77–99.
20. García I. & Dorronsoro C. Contaminación de Suelos [Internet]. *Edafología*. 2005 [cited 2018 Feb 22]. Available from: <http://www.edafologia.net/conta/tema00/home.htm>
21. Navarro-Aviñó J. P., Aguilar-Alonso I. & López-Moya JR. Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas. *Ecosistemas*. 2007;16(2):10–25.
22. Agrawal A., Pandey R. S. & Sharma B. Water Pollution with Special Reference to Pesticide Contamination in India. *J Water Resour Prot*. 2010;2:432–48.
23. Bautista F. Introducción al estudio de la contaminación del suelo por metales pesados. Yucatán - México: Edición Universidad Autónoma de Yucatán de Mérida, Yucatán, México.; 1999. p. 35–52.
24. Rudolf H. Metales de transición III. Los grupos secundarios IIIa a VIIa. In: *Fundamentos de la química general e inorgánica*. Barcelona-España: Editorial Reverté S.A.; 1986. p. 715–34.
25. Herbello P. Especiación de metales pesados mediante la formación de Quelatos, distribución de las especies inorgánicas de As y Cr en la ría Arousa. Chile: Univ Santiago de Compostela; 2007. 301 p.
26. Albert L. A. Cromo. In: *Introducción a la toxicología ambiental*. México DF: Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud; 1997. p. 227–46.

27. Hsu L. C., Liu Y. T. & Tzou YM. Comparison of the spectroscopic speciation and chemical fractionation of chromium in contaminated paddy soils. *J Hazard Mater.* 2015;296:230–8.
28. Occupational Safety and Health Administration (OSHA). Chromium [Internet]. United States Department of labor. USA; 2018 [cited 2018 Jun 26]. Available from: <https://www.osha.gov/SLTC/chromium/index.html>
29. Amin A. S. & Kassem M. A. Chromium speciation in environmental samples using a solid phase spectrophotometric method. *Spectrochim ACTA PART A Mol Biomol Spectrosc.* 2012;96:541–7.
30. Dias-ferreira C., Kirkelund G. M. & Ottosen L. M. Ammonium citrate as enhancement for electrodialytic soil remediation and investigation of soil solution during the process. *Chemosphere.* 2015;119:889–95.
31. Draszawka-Bolzan B. & Cyraniak E. Influence factors in soil-fertilizer accumulation of heavy metals in plants. *World Sci News.* 2014;3:26–34.
32. Puzon G. J., Huang Y., Dohnalkova A. & Xun L. Isolation and characterization of an NAD⁺-degrading bacterium PTX1 and its role in chromium biogeochemical cycle. *Biodegradation.* 2008;19:417–24.
33. Nriagu J. O. Production and uses Of Chromium. In: *Chromium in the natural & Human Environments.* USA: John Wiley & Sons, Inc.; 1988. p. 81–103.
34. Jacobs J. A. & Testa S. M. Overview of Chromium (VI) in the Environment: Background and History. In: *Chromium (VI) Handbook.* USA: CRC Press; 2004. p. 1–21.
35. Soto H. J. Potencial contaminación por cromo en el proceso de refinación del petróleo. Trabajo monográfico. [Lima, Perú]: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2006.
36. Arauzo M., Rivera M., Valladolid M., Noreña C. & Cedenilla O. Contaminación por cromo en el agua intersticial, en el agua del cauce y en los sedimentos del río Jarama. *Limnetica.* 2003;22:85–98.
37. Hernández M. Recomendaciones nutricionales para el ser humano: Actualización. *Rev Cuba Invest Biomed.* 2004;23(4):266–92.
38. Doisy R. J., Streeten D. H. P. Freiberg J. M. & Schneider A. J. Chromium Metabolism in Man and Biochemical Effects. In: *Essential and Toxic Element* [Internet]. Elsevier; 1976 [cited 2018 Jun 16]. p. 79–104. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012564202650010X>
39. Zafra-Stone S, Bagchi M, Preuss HG, Bagchi D, Bagchi D. Benefits of chromium(III) complexes in animal and human health. In: *The Nutritional Biochemistry of Chromium (III).* Elsevier; 2007. p. 183–206.

40. Albert G.J. Tacon. The Nutrition and feeding of farmed fish and shrimp - A training manual. [Internet]. Brasilia, Brazil: Food and Agriculture organization of the United Nations; 1987 [cited 2018 May 25]. Available from: <http://www.fao.org/docrep/field/003/ab470e/ab470e06.htm>
41. Marcus J. B. Vitamin and Mineral Basics: The ABCs of Healthy Foods and Beverages, Including Phytonutrients and Functional Foods. In: Culinary Nutrition [Internet]. Elsevier; 2013 [cited 2018 Jun 16]. p. 279–331. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123918826000078>
42. Rahnama-Moghadam S., Hillis L. D. & Lange R. A. Environmental Toxins and the Heart. In: Heart and Toxins [Internet]. Elsevier; 2015 [cited 2018 Jun 16]. p. 75–132. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124165953000037>
43. Davidson T., Ke Q. & Costa M. Selected Molecular Mechanisms of Metal Toxicity and Carcinogenicity. In: Handbook on the Toxicology of Metals [Internet]. Elsevier; 2007 [cited 2018 Jun 17]. p. 79–100. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123694133500604>
44. García-García N., Pedraza-Garciga J., Montalvo J. F., Martínez M. & Leyva J. Evaluación preliminar de riesgos para la salud humana por metales pesados en las bahías de Buenavista y San Juan de los Remedios, Villa Clara, Cuba. *Rev Cuba Química*. 2012;XXIV:126–35.
45. Dhal B., Thatoi H. N., Das N. N. & Pandey B. D. Chemical and microbial remediation of hexavalent chromium from contaminated soil and mining/metallurgical solid waste: A review. *J Hazard Mater*. 2013;250–251:272–91.
46. Departamento de salud y servicios humanos (DHHS). Resumen de Salud pública Cromo. In: *Reseña toxicológica para el cromo*. Estados Unidos: Agencia para Sustancias Tóxicas y Registro de Enfermedades; 2000. p. 1–13.
47. Rodríguez C. A. La salud de los trabajadores: contribuciones para una asignatura pendiente [Internet]. FERROGRAF. Buenos Aires: Superintendencia de Riesgos del Trabajo; 2005. 450 p. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15003161>
48. Cuberos E., Rodriguez A. & Prieto E. Niveles de Cromo y Alteraciones de Salud en una Población Expuesta a las Actividades de Curtiembres en Bogotá, Colombia. *Rev Salud Pública*. 2009;11(2):278–89.
49. Ocoró J., Ceballos C. A. & Hincapié N. Evaluación del conocimiento sobre los efectos nocivos de aleaciones con base en cromo, cobalto y níquel, en la manipulación realizada por tecnólogos en mecánica dental. *Rev Univ Santiago Chile*. 2013;2(5):23–31.
50. Organización Iberoamericana de seguridad Social (OISS). Estrategia Iberoamericana de Seguridad Social: Decreto 658/96, listado de enfermedades profesionales. [Internet]. Buenos Aires, Argentina: Ministerio de Trabajo y Seguridad Social; 1996

[cited 2017 Feb 15]. Available from: <http://www.oiss.org/estrategia/Decreto-658-Listado-de.html>

51. Trabajo M de. Decreto 1477 de 2014. Bogotá D.C., Colombia: Ministerio de Trabajo; 2014. p. 1–109.
52. Sala L. F., Rizzotto M. A., Frascaroli M. I., Palopoli, C. M. & Signorella S. R. Contaminación ambiental por el metal de transición cromo, estamos frente a un serio problema ecológico? *Quim Nova*. 1995;18(5):468–74.
53. Germillac M. Curtiembre. Vol. 62, Industria del cuero y las curtiembres. *Revista virtual pro*; 2007.
54. Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (ATSDR). Cromo Resumen de Salud Pública Cromo. Estados Unidos; 2012.
55. The National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH). Niosh Pocket Guide to chemical Hazards [Internet]. Vol. 2005. Columbia; 2007 [cited 2018 Jun 26]. Available from: <https://www.cdc.gov/niosh/docs/2005-149/default.html>
56. Beyersmann D, Hartwig A. Carcinogenic metal compounds: Recent insight into molecular and cellular mechanisms. *Arch Toxicol*. 2008;82(November 2015):493–512.
57. Ramírez-Díaz M. I., Díaz-Pérez C., Vargas E., Riveros-Rosas H., Campos-García J. & Cervantes C. Mechanisms of bacterial resistance to chromium compounds. *BioMetals*. 2008;21:321–32.
58. Shahid M., Shamshad S., Rafiq M., Khalid S., Bibi I., Niazi N. K, Dumat C. & Rashid M. I. Chromium speciation, bioavailability, uptake, toxicity and detoxification in soil-plant system: A review. *Chemosphere*. 2017;178:513–33.
59. De La Rosa M. E. & Ruiz L. Mutagenesis y carcinogenesis ambiental. BVSDE-Biblioteca virtual de desarrollo sostenible y salud ambiental. México; 1997. p. 12.
60. Quintero L. A., Agudelo E. A., Quintana Y. A., Cardona S. A. & Osorio A. F. Determinación de indicadores para la calidad de agua , sedimentos y suelos , marinos y costeros en puertos colombianos. *Rev Gestión y Ambient*. 2010;13(3):51–64.
61. Naciones Unidas. Carcinogenicidad. In: Sistema globalmente armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos (SGA). Nueva York y Ginebra: Naciones Unidas; 2003. p. 169–76.
62. Sellamuthu R., Umbright C., Chapman R., Leonard S. & Li S. Transcriptomics Evaluation of Hexavalent Chromium Toxicity in Human Dermal Fibroblasts. *J Carcinog Mutagen*. 2011;02(1):1–8.
63. Sonta S, Nakagawa C, Mutoh N, Ono T, Sugiura M, Sukumoni K. Investigation on the storage of heavy metals in human fetuses and mother. *Congenit Anom (Kyoto)*. 2001;41(3):265–6.

64. Organización Mundial de la Salud (OMS). Guías para la calidad del agua de consumo humano: cuarta edición que incorpora la primera adenda. Ginebra: Organización Mundial de la Salud; 2018. p. 636.
65. Acosta V., Lodeiros C., Senior W. & Martínez G. Niveles de metales pesados en sedimentos superficiales en tres zonas litorales de Venezuela. *Interciencia*. 2002;27(12):686–90.
66. Vernier J. El agua. In: El medio ambiente [Internet]. México: Publicaciones Cruzó.,S.A.; 1992. p. 5–20. Available from: https://books.google.com.co/books?id=rJ-AqO35p8EC&printsec=frontcover&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
67. Fu J, Zhao C, Luo Y, Liu C, Kyzas GZ, Luo Y, et al. Heavy metals in surface sediments of the Jialu River, China: Their relations to environmental factors. *J Hazard Mater*. 2014;270(APRIL):102–9.
68. Pachon J. E. & Sarmiento H. Heavy metal determination and source emission identification in an industrial location of Bogotá-Colombia. *Rev Fac Ing Antioquia*. 2008;120–33.
69. Environmental Protection Agency (EPA). Emisiones de Toxics en el Aire: Estrategia de la EPA Para Reducir Riesgos de Salud en Las Areas Urbanas. 1999; Available from: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2014-08/documents/urban-air-toxics-brochure-esp-1999.pdf>
70. Environmental Protection Agency (EPA). Efectos en la salud y el medio ambiente de los contaminantes atmosféricos peligrosos [Internet]. 2017 [cited 2018 Jun 26]. Available from: <https://www.epa.gov/haps/health-and-environmental-effects-hazardous-air-pollutants-consultado>
71. Yan J, He Y, Huang H. Characteristics of Heavy Metals and Their Evaluation in Sediments from Middle and Lower Reaches of the Huaihe River. *J China Univ Min Technol*. 2007;17(3):414–7.
72. Lin C, He M, Zhou Y, Guo W, Yang Z. Distribution and contamination assessment of heavy metals in sediment of the Second Songhua River. *Enviromen monit Asses*. 2008;137:329–42.
73. Pawlikowski M., Szalińska E., Wardas M. & Dominik J. Chromium originating from tanneries in river sediments: A preliminary investigation from the upper Dunajec River (Poland). *Polish J Environ Stud*. 2006;15(6):885–94.
74. Di Marzio W., Sáenz M. E. & Alberdi J. L. Evaluación de la ecotoxicidad de efluentes industriales y municipales. *Eng Sanit Ambient*. 2005;88:1–9.
75. Loaiza E. Boletín electrónico informativo sobre productos y residuos químicos, estudio de investigación: Gestión integral de residuos peligrosos. Lima, Perú; 2006.

76. Peña E. J., Cantera J. R. & Muñoz E (Compiladores). Evaluación de la contaminación en ecosistemas acuáticos. Estudios de caso en la Laguna de Sonso, Cuenca Alta del Río Cauca. Cali, Colombia: Colección Ciencias Naturales y Exactas Biología; 2012. 311 p.
77. Soto-jiménez, M. F. Transferencia de elementos traza en tramas tróficas acuáticas. Hidrobiológica. 2011;21(3):239–48.
78. Md. Islam S., Md. Ahmed K., Md. Habibullah-Al-Mamun & Raknuzzaman M. The concentration, source and potential human health risk of heavy metals in the commonly consumed foods in Bangladesh. Ecotoxicol Environ Saf. 2015;122:462–9.
79. Espinosa S. E. Citotoxicidad por cromo en encéfalo, médula espinal, tubo digestivo, riñón e hígado de *Betta splendens* según concentración determinada en la Cuenca Baja de Río Tunjuelo (Sector Curtiembres), Bogotá D.C., Colombia. Universidad Distrital Francisco José de Caldas; 2016.
80. Agarwal S. K. Heavy Metal Pollution. New Delhi: A.P.H. Publishing Corporation; 2009. 259 p.
81. Udiba U., Diya'uddeen B. ., Inuwa B., Ashade N.O., Anyanwu S.E., Meka J. & Odeke, E. H. Industrial pollution and its implications for the water quality of River Galma : A case study of Dakace industrial layout , Zaria , Nigeria. J Environ Sci Toxicol (ISSN. 2014;2(8):167–75.
82. Arbeláez P. A. Contaminantes emergentes en aguas residuales y de río y fangos de depuradora. 2015;450.
83. Escobar J. La contaminación de los ríos y sus efectos en las áreas costeras y el mar. Vol. 17, Naciones Unidas. Santiago de Chile, Chile; 2002.
84. Zeraatkar A., Ahmadzadeh H., Talebi A. F., Moheimani N. R. & McHenry M. P. Potential use of algae for heavy metal bioremediation, a critical review. J Environ Manage. 2016;181:817–31.
85. Mirauda D. & Ostoich M. Assessment of Pressure Sources and Water Body Resilience : An Integrated Approach for Action Planning in a Polluted River Basin. Int J Environ Res Public Health. 2018;15:390.
86. Oficina de Análisis Económico del (Ministerio de Medio Ambiente). Aguas limpias para Colombia al menor costo. Implementación de las tasas retributivas por contaminación hídrica. Palmas. 1997;18(3):69–79.
87. Kraemer RA, Choudhury K, Kampa E. Protecting water resources: Pollution prevention. Secretaria. Internacional Conference on Freshwater Boon 2001; 2001.
88. Ministerio de Ambiente, Vivienda y DT. Guía ambiental para la industria del curtido y preparado de cueros. 2nd ed. Bogotá D.C.: Dirección de Desarrollo Sectorial; 2006. 7-138 p.

89. Escuela de Organización Industrial (EOI). Aplicaciones del Manual Media a Sectores Industriales. Sector Curtido de Pielles Animales. Madrid, España: Artes Graficas Mañas, S.L.; 1997. 1-122 p.
90. Grupo Investigador (IDEXUD). Guía para la gestión y manejo integral de residuos industria de Curtiembres y Tenerías. Bogotá D.C., Colombia: Universidad Distrital Francisco José de Cladas; 2010. 132 p.
91. Rojas A., Concha A. & Gutiérrez D. Ejercicio de vigilancia tecnológica cuero y medio ambiente. Bogotá: Centro tecnológico para las industrias del calzado, cuero y afines; 2010. 30 p.
92. Chen H., Arocena J. M., Li J., Thring R. W. & Zhou J. Assessments of chromium (and other metals) in vegetables and potential bio-accumulations in humans living in areas affected by tannery wastes. *Chemosphere*. 2014;112:412–9.
93. Da Conceição M. A., Hauser-Davis R. A. Suzuki M. S. & Vitória A. P. Plant chromium uptake and transport, physiological effects and recent advances in molecular investigations. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2017;140(October 2016):55–64.
94. Chen H., Arocena J. M., Li J. & Thring W. Environmental Monitoring Mobility and storage sinks for chromium and other metals in soils impacted by leather tannery wastes. *J Environ Monit*. 2012;14:3240–8.
95. Kumari V., Yadav A., Haq I., Kumar S., Naresh R., Kumar S. & Raj A. Genotoxicity evaluation of tannery effluent treated with newly isolated hexavalent chromium reducing *Bacillus cereus*. *J Environ Manage*. 2016;183:204–11.
96. Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible. Resolución 0631 [Internet]. 17 De Marzo. 2015. p. 62. Available from: http://www.fenavi.org/images/stories/estadisticas/article/3167/Resolucion_0631_17_marzo_2015.pdf
97. Nagpure N. S., Srivastava R., Kumar R. & Dabas A. Potentials of tannery effluents in freshwater fishes of River Ganga. *Hum Ecol Risk Assess An Int Journal*. 2016;23(1):98–111.
98. Corporación Autónoma Regional del Valle del Cauca, CVC. 2008. In: Corporación Autónoma Regional del Valle del Cauca, CVC. Plan de ordenación y manejo de la cuenca hidrográfica del Río Cerrito Primera ed Santiago de Cali, Valle del Cauca Colombia: CVC-Fundación Universidad del Valle; 2013 234 p.
99. Sayers & Langlais, 1977. In: Valdés D, A Diseño preliminar de un sistema de tratamiento de aguas residuales a escala industrial para los efluentes del procesamiento de pieles [Tesis de grado] Universidad San Francisco de Quito; 2012.
100. Trossero C, Caffarena G, Hure E, Rizzotto M. Detección de Mutagenicidad en Compuestos N-Nitroso con el Test de Ames. *Acta Farm Bonaer*. 2006;25(1):139–44.
101. Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales (IDEAM). El impacto

- ambiental del sector industrial en Colombia. Bogotá D.C.; 1998.
102. Gischler C. Pathways of heavy metals and implications for stakeholders, Sonso Lagoon, Colombia. Royal Institute of Technology, LWR; 2005.
 103. IDEAM. Calidad Del Agua Superficial En Colombia, Cap 6. In: Estudio Nacional del Agua. Bogotá D.C., Colombia; 2010. p. 409.
 104. Jaramillo A., Vásquez P. & Restrepo I. Aplicación de producción más limpia para disminuir el impacto al recurso hídrico provocado por una comunidad industrial de curtidores ubicada en una zona urbana. In: Avances en investigación y desarrollo en aguas y saneamiento para el cumplimiento de las metas del milenio. Cali, Colombia: Universidad del Valle; 2003. p. 78–86.
 105. Corporación Autónoma Regional del Valle del Cauca C. Plan de ordenación y manejo de la cuenca hidrográfica del Río Cerrito. Primera ed. Santiago de Cali, Valle del Cauca. Colombia; 2013. 234 p.
 106. Baena L. M. Línea Base Ambiental de la Calidad de los Recursos Hídricos Superficiales en el Valle del Cauca. Corporación Autónoma Regional del Valle del Cauca (CVC). Cali, Colombia; 2006.
 107. Baena L. M. Comunicación personal. Resultados del programa de monitoreo de la calidad del agua del río Cerrito de 1996 al 2013. Cali, Colombia: Laboratorio Ambiental-Corporación Autónoma Regional del Valle del Cauca (CVC); 2014.
 108. Ministerio Ambiental y de desarrollo Sostenible. Decreto 1076 de 2015. 2015 p. 653.
 109. Concejo Municipal, Municipio de El Cerrito. Acuerdo No.015 de 2016. El Cerrito; 2016. p. 1–107.
 110. García R. Resolución 0539. Entrega de PTAR CVC a Municipio de Cerrito. El cerrito; 2010. p. 16.
 111. Corporación Autónoma Regional del Valle del Cauca C. Resolución N° 000028 del 2004. Por la cual se imponen unas obligaciones a las curtiembres ubicadas en el Municipio de El Cerrito. El Cerrito: Subdirección de intervenciones territoriales para la sostenibilidad, oficina de gestión ambiental territorial Suroriente.; 2004. p. 12.
 112. Węgrzyn G, Czyz A. Detection of mutagenic pollution of natural environment using microbiological assays. *J Appl Microbiol.* 2003;95(6):1175–81.
 113. Gupta PK. Genotoxicity. *Fundam Toxicol.* 2016;151–64.
 114. Giebner S, Ostermann S, Straskraba S, Oetken M, Oehlmann J, Wagner M. Effectivity of advanced wastewater treatment: reduction of in vitro endocrine activity and mutagenicity but not of in vivo reproductive toxicity. *Environ Sci Pollut Res.* 2018;25(5):3965–76.
 115. Makhuvele R, Matshoga RG, Antonissen R, Pieters L, Verschaeve L, Elgorashi EE.

- Genotoxicity and Antigenotoxicity of selected South African indigenous plants. *South African J Bot* [Internet]. 2018;114(January):89–99. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2017.10.016>
116. Shi P, Zhou S, Xiao H, Qiu J, Li A, Zhou Q, et al. Toxicological and chemical insights into representative source and drinking water in eastern China. *Environ Pollut* [Internet]. 2018;233:35–44. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.10.033>
 117. Vivas AH, Arboleda MA, Sánchez R, Benítez-campo N, Bravo E, Soto A, et al. Mutagenicity evaluation caused by heavy metals found in Cauca river water in the city of Cali , Colombia Avaliação de mutagenicidade. *Rev Colomb Química*. 2014;43(2):18–24.
 118. Guan Y, Wang X, Wong M, Sun G, An T, Guo J, et al. Evaluation of genotoxic and mutagenic activity of organic extracts from drinking water sources. *PLoS One*. 2017;12(1):1–15.
 119. Hilario Garcia AL, Matzenbacher CA, Santos MS, Prado L, Picada JN, Premoli SM, et al. Genotoxicity induced by water and sediment samples from a river under the influence of brewery effluent. *Chemosphere*. 2017;169:239–48.
 120. Vivas A. E. Variación espacio-temporal del efecto mutagénico por metales pesados en el Río Cauca, año 2013. [Trabajo de grado]. Universidad del Valle; 2014.
 121. Liu L, Chen L, Floehr T, Xiao H, Bluhm K, Hollert H, et al. Assessment of the mutagenicity of sediments from yangtze river estuary using salmonella typhimurium/microsome assay. *PLoS One*. 2015;10(11):1–12.
 122. Lv X, Lu Y, Yang X, Dong X, Ma K, Xiao S, et al. Mutagenicity of drinking water sampled from the Yangtze River and Hanshui River (Wuhan section) and correlations with water quality parameters. *Sci Rep*. 2015;5:1–8.
 123. Okunola AA, Babatunde EE, Chinwe D, Pelumi O, Ramatu SG. Mutagenicity of automobile workshop soil leachate and tobacco industry wastewater using the Ames Salmonella fluctuation and the SOS chromotests. *Toxicol Ind Health*. 2014;32(6):1086–96.
 124. Warren SH, Claxton LD, Diliberto J, Hughes TJ, Swank A, Kusnierz DH, et al. Survey of the mutagenicity of surface water, sediments, and drinking water from the Penobscot Indian Nation. *Chemosphere* [Internet]. 2015;120:690–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.10.002>
 125. Sánchez R. Determinación De La Contaminación Por Metales Pesados (Plomo, Cromo, Cadmio y Mercurio) En Aguas Del Río Cauca, En La Zona Urbana De La Ciudad De Cali y Evaluacion De La Mutagenicidad Utilizando El Test De Ames. Universidad del Valle; 2014.
 126. Resende FA, Vilegas W, Dos Santos LC, Varanda EA. Mutagenicity of flavonoids

- assayed by bacterial reverse mutation (Ames) test. *Molecules*. 2012;17(5):5255–68.
127. Sierra JC, Benítez-Campo N, Bravo-Montaña E, Soto-Duque A, Larmat FE. Evaluation of the mutagenic activity of water collected from the Cauca river in the city of Cali, Colombia by using the Salmonella/Microsome assay. *Rev Ciencias Fac Ciencias Nat y Exactas Univ del Val*. 2012;16:131–41.
 128. Delgado MAT. Evaluacion de la mutagenicidad en aguas del río Cauca en La ciudad ce Cali utilizando el test de ames. [Trabajo de grado]. Universidad del Valle; 2011.
 129. Pan X, Redding JE, Wiley PA, Wen L, McConnell JS, Zhang B. Mutagenicity evaluation of metal oxide nanoparticles by the bacterial reverse mutation assay. *Chemosphere* [Internet]. 2010;79(1):113–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.12.056>
 130. Zubair M., Ahmad S. & Malik A. Genotoxic and Mutagenic Potential of Agricultural Soil Irrigated with Tannery Effluents at Jajmau (Kanpur), India. *Arch Env Contam Toxicol*. 2009;57:463–76.
 131. Ansari MI, Malik A. Genotoxicity of agricultural soils in the vicinity of industrial area. *Mutat Res Toxicol Environ Mutagen* [Internet]. 2009;673(2):124–32. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1383571809000023>
 132. Kutlu M, Aydoğan G, Susuz F, Özata A. The Salmonella mutagenicity of water and sediments from the Porsuk River in Turkey. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2004;17(2):111–6.
 133. Mathur N, Bhatnagar P, Nagar P, Bijarnia MK. Mutagenicity assessment of effluents from textile/dye industries of Sanganer, Jaipur (India): A case study. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2004;61(1):105–13.
 134. Nagai A, Kano Y, Funasaka R, Nakamuro K. Mutagenic Characteristics and Contribution of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons to Mutagenicity of Concentrates from Municipal River Water by Blue Chitin Column. *J Heal Sci* [Internet]. 2002;48(3):232–41. Available from: <http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.JSTAGE/jhs/48.232?from=CrossRef>
 135. Ferrão V. M., Migliavacca S. B. Cássia A., Horn R. C., Guidobono R. R., Fernandes I. C. & Degrazia M. H. Genotoxicity assessment in aquatic environments under the influence of heavy metals and organic contaminants. *Mutat Res - Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2001;490(2):141–58.
 136. López LC, Bassi MD, Moreton J. Influence of river water in the detection of Cr (VI) mutagenicity by the ames test. *Bull Environ Contam Toxicol*. 1999;63:438–43.
 137. Schweikl H, Schmalz G, Rackebrandt K. The mutagenic activity of unpolymerized resin monomers in Salmonella typhimurium and V79 cells. *Mutat Res - Genet Toxicol Environ Mutagen*. 1998;415(1–2):119–30.
 138. Sakai M, Yoshida D, Mizusaki S. Mutagenicity of polycyclic aromatic hydrocarbons

- and quinones on *Salmonella typhimurium* TA97. *Mutat Res Toxicol.* 1985;156(1-2):61-7.
139. Levin DE, Yamasaki E, Ames BN. A new *Salmonella* tester strain, TA97, for the detection of frameshift mutagens. A run of cytosines as a mutational hot-spot. *Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen.* 1982;94(2):315-30.
 140. Ames B. N. Identifying Environmental Chemicals Causing Mutations and Cancer. *Science* (80-). 1979;204(4393):587-93.
 141. Mortelmans K. & Zeiger E. The Ames *Salmonella* / microsome mutagenicity assay. *Mutat Res.* 2000;455(1-2):29-60.
 142. Bello J. & López A. Mutagénesis. In: *Fundamentos de ciencias toxicológicas*. Díaz Santo. Madrid, España: Edigrafos S.A.; 2001. p. 127-54.
 143. Ames B. A. Combined bacterial and liver test system for detection and classification of carcinogens as mutagens. *Genetics.* 1974;78:91-5.
 144. Maron D. M. & Ames B. N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat Res.* 1983;113(3-4):173-215.
 145. Arencibia D. F., Rosario L. A. Morffi J. & Curveco D. L. Strategies in the genotoxic evaluation. *Retel - Rev toxicológica en línea* [Internet]. 2009;23-40. Available from: <http://www.sertox.com.ar/retel/default.com>
 146. Mastandrea C., Chichizola C., Ludueña B., Sánchez H., Álvarez H. & Gutiérrez A. Hidrocarburos aromáticos policíclicos. Riesgos para la salud y marcadores biológicos. *Acta bioquímica Clínica Latinoam.* 2005;39(1):27-36.
 147. Gupta PK. Genotoxicity. *Fundam Toxicol.* 2016;151-64.
 148. Organización Mundial de la salud (OMS). Acrylamide in drinking-water. Documento de referencia para la elaboración de las Guías de la OMS para la calidad del agua potable. Ginebra, Suiza; 2003.
 149. Restrepo MT, Hurtado MPR, Camacho MLB, García AA, Osorio MV, Camargo JML. *Manual De Agentes Carcinógenos*. Bogotá, D.C.: Panamericana; 2006. 95 p.
 150. Garzón L. E., Borda E., Díaz M. E. & Torres A. Colombia Carex 2012 Población asegurada. Bogotá, D.C.: Ministerio de Trabajo - Instituto Nacional de Cancerología.; 2016. 1-96 p.
 151. Junk G. Use of macroreticular resins in the analysis of water for trace organic contaminant. *J Chrom.* 1974;99:745-62.
 152. Rice E. W., Baird R. B. Eaton A. D. & Clesceri L. S, editor. *Standard Methods for the examination of water and wastewater*. 22nd ed. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation; 2012. 1496 p.
 153. Mccann J., Spingarn N. E., Kobori J. & Ames B. N. Detection of Carcinogens as

- Mutagens: Bacterial Tester Strains with R Factor Plasmids. *Proc Nat Acad Sci USA*. 1975;72(3):979–83.
154. Sierra J. C. Determinación de la actividad mutagénica de las aguas del río Cauca en el Tramo Puente El Hormiguero y la Desembocadura del río Cali en temporada de lluvia, por medio del test de ames. [Tesis de grado]. Universidad del Valle; 2009.
 155. Albaladejo R, Villanueva R, Ortega P, Astasio P, Gil A, Granados B, Calle ME D V. Evaluación De La Actividad Mutagenica De Aguas De Consumo Publicopor Medio Del Test De Ames. *Rev Esp Salud Publica*. 1995;69:393–408.
 156. Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales, (IDEAM). Estudio Nacional del Agua. Estudio Nacional del Agua 2014. Bogotá D.C., Colombia: Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales (IDEAM); 2014. 496 p.
 157. Ministerio de Protección Social. Resolución 2115. 2007;1–23.
 158. Westman WE. Measuring the Inertia and Resilience of Ecosystems. *Bioscience* [Internet]. 1978;28(11):705–10. Available from: <https://academic.oup.com/bioscience/article-lookup/doi/10.2307/1307321>
 159. WWAP (Programa Mundial de Evaluación de los Recursos Hídricos de las Naciones Unidas). Informe Mundial de las Naciones Unidas sobre el Desarrollo de los Recursos Hídricos 2017. Aguas Residuales. El recurso desaprovechado. París: UNESCO; 2017. 202 p.
 160. CVC. Índices de Calidad del río Cerrito (2016-2017), Corporación Autónoma Regional del Valle del Cauca (CVC). Calidad de agua superficial. Cali, Colombia: Laboratorio Ambiental - CVC; 2018. Available from [Internet] <https://www.cvc.gov.co/tematicas/recurso-hidrico/agua-superficial/calidad-de-agua>
 161. OPS y OMS. Informe Técnico sobre la Minimización de Residuos en una Curtiembre. Cepis Publicaciones;
 162. Escobar A. F., García C. A. & Vaca ML. Identificación y evaluación de la contaminación del agua por curtiembres en el municipio de Villapinzón. *Tenura*. 2012;16:185–93.
 163. Díaz-Martínez J. A. & Granada-torres C. A. Efecto de las actividades antrópicas sobre las características fisicoquímicas y microbiológicas del río Bogotá a lo largo del municipio de Villapinzón, Colombia. *Rev Fac Med*. 2018;66(1):45–52.
 164. Cuesta-parra D. M., Velazco-rincón C. L. & Castro-pardo J. C. Evaluación ambiental asociada a los vertimientos de aguas residuales generados por una empresa de curtiembres en la cuenca del río Aburrá. *Rev UIS Ing*. 2018;17(2):141–51.
 165. Ramos R. M. Plan de Ordenamiento del Río Pasto. Pasto, Colombia; 2011. 382 p.
 166. Toro M, Robles S, Avilés J, Nuño C, Vivas S, Bonada N, et al. Calidad de las aguas

- de los ríos mediterráneos del proyecto GUADALMED. Características físico-químicas. *Limnetica*. 2002;21(3-4):63-75.
167. Vaishali P, Punita P. Assessment of seasonal variation in water quality of River Mini , at Sindhrot, Vadodara. *Int J Environ Sci*. 2013;3(5):1424-36.
 168. Fontalvo FA, Tamaris-Turizo C. Calidad del agua de la parte baja del río Córdoba (Magdalena-Colombia), usando el ICA-NSF. *Intropica*. 2018;13(2).
 169. Gil JA. Determinación de la calidad del agua mediante variables físicoquímicas y la comunidad de macroinvertebrados como bioindicadores de calidad del agua en la cuenca del Río GaragoaGil [Internet]. Universidades de Manizales; 2014. Available from: <http://ridum.umanizales.edu.co:8080/xmlui/handle/6789/1803>
 170. Saputro S., Yoshimura K., Matsuoka S., Takehara K., Narsito; Aizawa J. & Tennichi Y. Speciation of dissolved chromium and the mechanisms controlling its concentration in natural water. *Chem Geol*. 2014 Jan 22;364:33-41.
 171. Romero R, Enrique J, Ramírez R, Elí J. Toxicidad y bioacumulación de Cromo (Cr + 6) en la almeja *Polymesoda solida* del sistema estuarino Lago de Maracaibo. 2015;(December).
 172. Environmental Protection Agency (EPA). National Primary Drinking Water Regulation Table [Internet]. 2009 [cited 2018 Jun 28]. Available from: <https://www.epa.gov/ground-water-and-drinking-water/national-primary-drinking-water-regulation-table>
 173. Zubair M., Ahmad S., Malik A. & Ahmad M. Mutagenicity and genotoxicity of tannery effluents used for irrigation at Kanpur, India. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2010;73(7):1620-8.
 174. Matsumoto S. T., Mantovani M. S., Ariza M. I. DAL, Fonseca I. C. & Marin-Morales M. A. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. *Genet Mol Biol*. 2006;29(1):148-58.
 175. Prego R. & Caetano M. Impacto biogeoquímico de cabo Ortegal en su entorno costero. ¿Puede ocurrir una contaminación natural por cromo y níquel? *Investig Cult Cienc y Tecnol*. 2015;7(14):40-6.
 176. Atafar Z., Mesdaghinia A., Nouri J., Homae M., Yunesian M., Ahmadimoghaddam M. & Hossein A. Effect of fertilizer application on soil heavy metal concentration. *J Env Monit Assess*. 2010;160:83-9.
 177. Akagi I. & Chishaki N. Heavy Metal Comparisons and Efect of Phosphate Fertilizer Application in Greenhouse Soil Samples. *J Environ Chemistry*. 2015;25(4):199-206.
 178. Universidad de Barcelona. Estudio químico de los fertilizantes sintéticos [Internet]. Universia, España. 2006 [cited 2018 Jun 15]. Available from:

<http://noticias.universia.es/ciencia-nn-tt/noticia/2006/02/10/603051/estudio-quimico-fertilizantes-sinteticos.html>

179. Cárdenas G, Cárdenas J. Urbanización Y Agua. San José, Costa Rica: Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura - IICA; 2009. 46 p.
180. Wu Y, Chen J. Investigating the effects of point source and nonpoint source pollution on the water quality of the East River (Dongjiang) in South China. *Ecol Indic.* 2013;32:294–304.
181. García A. Tema 2: Naturaleza de las rocas de contrucción y ornamentación. [Internet]. Universidad de Granada. 2007 [cited 2018 Jun 15]. Available from: <http://www.ugr.es/~agcasco/personal/restauracion/teoria/TEMA02.htm>
182. Rodríguez R. Procesos de mineragenésis. Metalognia & Ore Deposits [Internet]. UNAL: Minas. Universidad Nacional de Colombia, Medellín. [cited 2018 Jun 26]. Available from: <http://www.medellin.unal.edu.co/~rrodriguez/>
183. Vacchi F. I., De Souza J. A., Ferreira B., Boldrin M. V. & de Aragão G. Quantifying the contribution of dyes to the mutagenicity of waters under the influence of textile activities. *Sci Total Environ.* 2017;601–602:230–6.
184. Mahecha-pulido J. D., Trujillo-gonzález J. M. & Torres-mora M. A. Contenido de metales pesados en suelos agrícolas de la región del Ariari , Departamento del Meta. *Univ los Llanos - Villavicencio, Meta Colomb.* 2015;19(1):118–22.
185. Environmental Protection Agency (EPA). Method 3050B: Acid Digestion of Sediments, Sludges, And Solis. Revision 2. Washington, DC. USA: Environmental Protection Agency, (EPA); 1996.
186. Anjum R. & Malik A. Mutagenicity assessment of contaminated soil in the vicinity of industrial area. *Env Monit Assess.* 2012;184:3013–26.
187. 11466 I (International O for S. Soil quality, Extraction of Trace Elements Soluble in Aqua Regia. ISO. 1995;03:22.
188. Canadian Council of Ministers of the Environment, (CCME). Canadian Environmental Quality Guidelines (CEQG) [Internet]. 1998 [cited 2018 Jun 10]. Available from: <http://st-ts.ccme.ca/en/index.html?searchbox=cromo>
189. Murcia, F. J. Zornoza R., Acosta J. A., Faz A., Martínez-Martínez S., González S., Rosales R. M. & Gómez M. Caracterización del contenido de cromo, su disponibilidad y sus interacciones con las propiedades del suelo para evaluar el potencial uso de la fitoextracción. *CONAMA - Congr Nac del Medio Ambient.* 2014;13.
190. Srinivasa S. M., Ramakrishna & Govil P. K. Assessment of heavy metal contamination in soils at Jajmau (Kanpur) and Unnao industrial areas of the Ganga Plain, Uttar Pradesh, India. *J Hazard Mater.* 2010 Feb 15;174(1–3):113–21.
191. Choppala G., Bolan N. & Park J. H. Chromiun contamination and its risk management

- in complex environmental settings. In: Sparks DL, editor. *Advances in agronomy*. Estados Unidos: Elsevier; 2013. p. 129–53.
192. Alcaldia de El cerrito. *Economia* [Internet]. 2018 [cited 2018 Jul 14]. Available from: <http://www.elcerrito-valle.gov.co/MiMunicipio/Paginas/Economia.aspx>
 193. Machado K. S., Al Ferreira, P., Rizzi J., Figueira R. & Froehner S. Spatial and Temporal Variation of Heavy Metals Contamination in Recent Sediments from Barigui River Basin , South Brazil. *Env pollut Clim Chang*. 2017;1(1):108.
 194. Roig B. Evaluación de las tecnologías de tratamiento de aguas subterráneas contaminadas con Cromo. 2006 [cited 2018 Jun 16]; Available from: <https://upcommons.upc.edu/handle/2099.1/3153#.W1u5RlMqNz4.mendeley>
 195. Bernández P., Prego R., Giralt S., Esteve J., Caetano M., Parra S. & Francés G. geochemical and mineralogical charaterization of surficial sediments from the Northern Rias: Implications for sediment provenance and impact of the source rocks. *J Mar Geol*. 2012;291–294:63–72.
 196. Hansel C. M., Wielinga B. W. & Fendorf S. Structural and compositional evolution of Cr/Fe solids after indirect chromate reduction by dissimilatory iron-reducing bacteria. *Geochim Cosmochim Acta*. 2003 Feb 1;67(3):401–12.
 197. Ma X., Zuo H., Tian M., Zhang L., Meng J., Zhou X., Min N., Chang X. & Liu Y. Assessment of heavy metals contamination in sediments from three adjacent regions of the Yellow River using metal chemical fractions and multivariate analysis techniques. *Chemosphere*. 2016 Feb 1;144:264–72.
 198. Buchman MF. Screening Quick Reference Table for Inorganics in Sediment. Freshwater sediment de la National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA). United States; 2008.
 199. Masood F. & Malik A. Cytotoxic and genotoxic potential of tannery waste contaminated soils. *Sci Total Environ*. 2013;444:153–60.

ANEXOS

Anexo 1. Modelo Estadístico

Tanto para los experimentos con la matriz agua y la matriz de sedimento, se aplica un Diseño de Parcelas divididas bajo un diseño de bloques (Figura 10). El modelo que describe este tipo de experimentos es:

$$y_{ijk} = \mu + \tau_i + \beta_j + (\tau\beta)_{ij} + \gamma_k + \alpha_l + (\tau\gamma)_{ik} + (\tau\alpha)_{il} + (\gamma\alpha)_{kl} + (\tau\gamma\alpha)_{ikl} + \varepsilon_{ijkl}$$

$i = 1,2,3$ (sitios) $j=1,2,3$ (repetición/bloque) $k,l=1,2$ (cepa-activación metabólica)

Donde:

μ es la media general, τ_i representa el factor sitio de muestreo, β_j representa el efecto bloque/repetición y $(\tau\beta)_{ij}$ representa el error de la parcela grande, γ_k representa el factor cepa, α_l representa la activación metabólica. Luego siguen las interacciones entre los factores de segundo orden $(\tau\gamma)$, $(\tau\alpha)$, $(\gamma\alpha)$. Por último, está la interacción de tercer orden $(\tau\gamma\alpha)_{ikl}$ que representa el error de la parcela pequeña.

Los supuestos del modelo son:

$$\varepsilon_{ijkl} \sim N(0, \sigma^2), \text{ con } \sigma^2 \text{ constante}$$

$$\text{Cov}(\varepsilon_{ijk}, \varepsilon_{i'j'k'}) = 0 \quad \forall i \neq i'; j \neq j'; k \neq k'$$

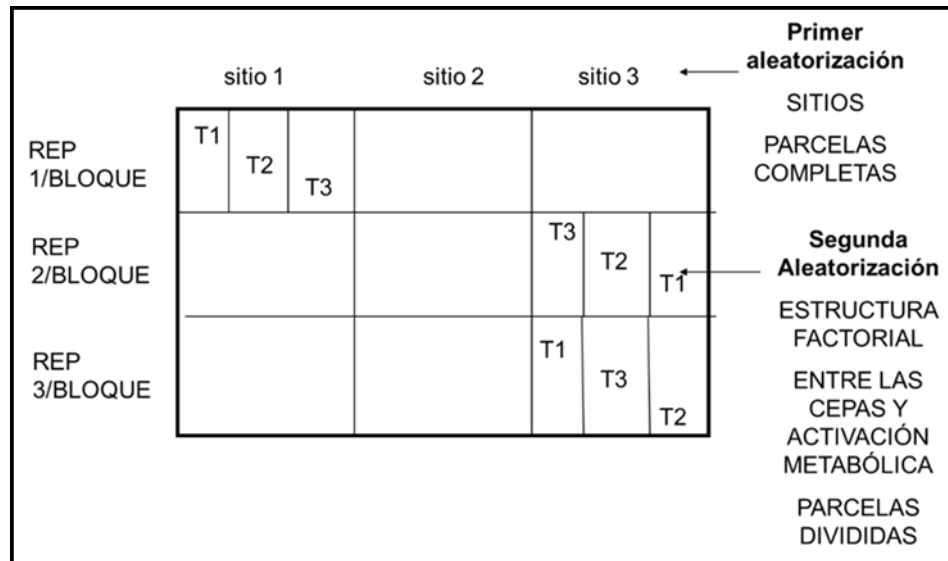


Figura 14. Diseño de Parcelas divididas bajo un diseño de bloques

Anexo 2. Anova con Covariable

Tabla 18. Anova de IM con covariable matriz agua

Fuente de Variación	GL	SC	CM	F-Valor	P-Valor
x:Dosis	1	0.0109	0.0109	0.19	0.668
Rep/Bloque	2	0.23685	0.11842	2.02	0.139
Sitio de muestreo	2	0.09126	0.04563	1.37	0.352
Rep*Punto	4	0.13328	0.03332		
Cepa	1	0.06423	0.06423	1.09	0.298
Activador	1	0.10685	0.10685	1.82	0.181
Sitio muestreo*Cepa	2	0.18074	0.09037	1.54	0.22
Punto muestreo*Activador	2	0.38734	0.19367	3.3	0.042
Cepa*Activador	1	0.50663	0.50663	8.63	0.004
Sitio muestreo*cepa*activador	2	0.04008	0.02004	0.34	0.712
Error	89	522.632	0.05872		
Total	107	697.852			

Tabla 19. Anova de IM con covariable matriz sedimento

Fuente de Variación	GL	SC	CM	F-Valor	P-Valor
x:Dosis	1	0.01053	0.01053	0.23	0.632
Rep/Bloque	2	0.67326	0.33663	7.38	0.001
Punto de muestreo	2	0.02054	0.01027	0.56	0.610
Rep*Punto	4	0.07367	0.01842		
Cepa	1	0.18668	0.18968	4.16	0.044
Activador	1	0.08121	0.08121	1.78	0.185
Punto muestreo*Cepa	2	0.29351	0.14675	3.22	0.045
Punto muestreo*Activador	2	0.58306	0.29153	6.39	0.003
Cepa*Activador	1	150.249	150.249	32.95	0
Punto	2	0.18189	0.09094	1.99	0.142
Error	89	405.891	0.04561		
Total	107	768.667			

Anexo 3. Validación de Supuestos de Normalidad

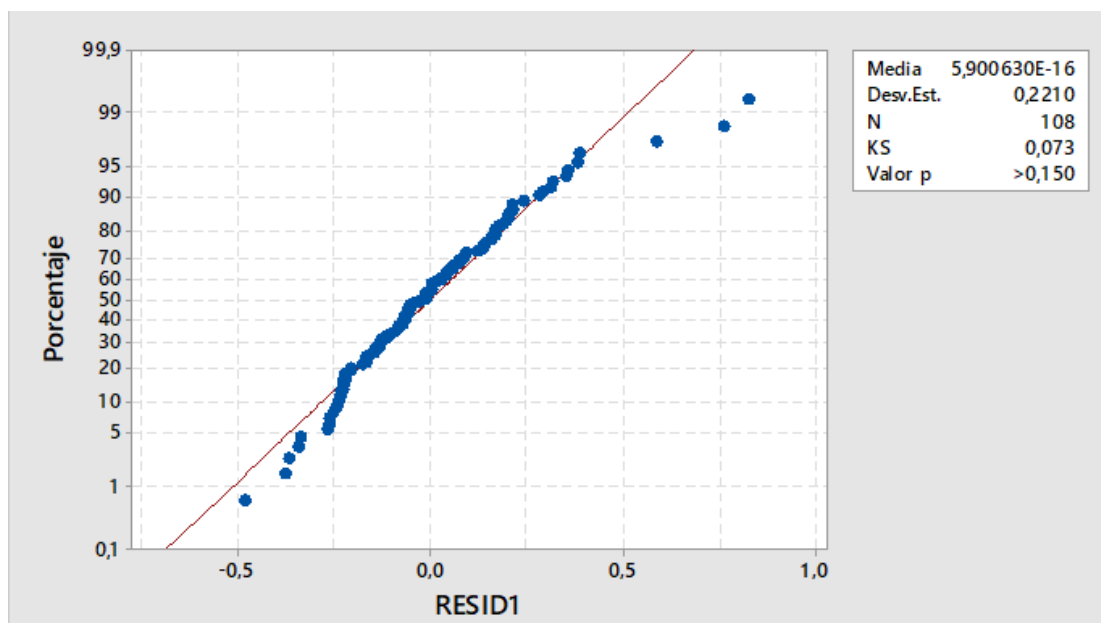


Figura 15. Validación del supuesto de normalidad en la variable Índice de Mutagenicidad (IM) en la matriz agua

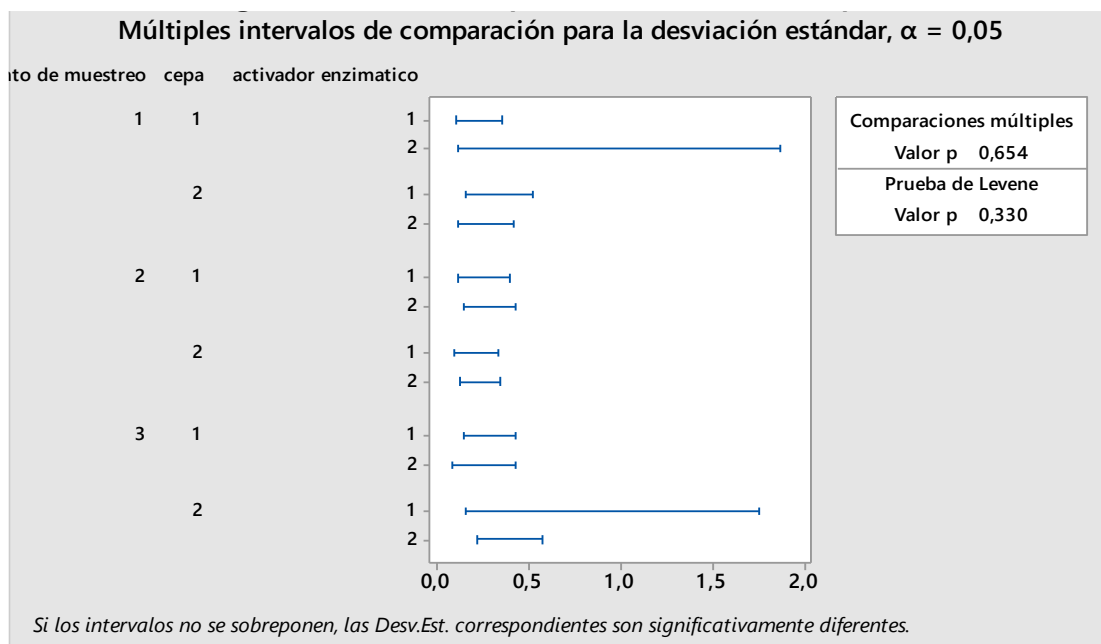


Figura 16. Homogeneidad de varianzas entre la variable IM y las fuentes de variación (punto de muestreo, cepa y activador enzimático) en la matriz agua

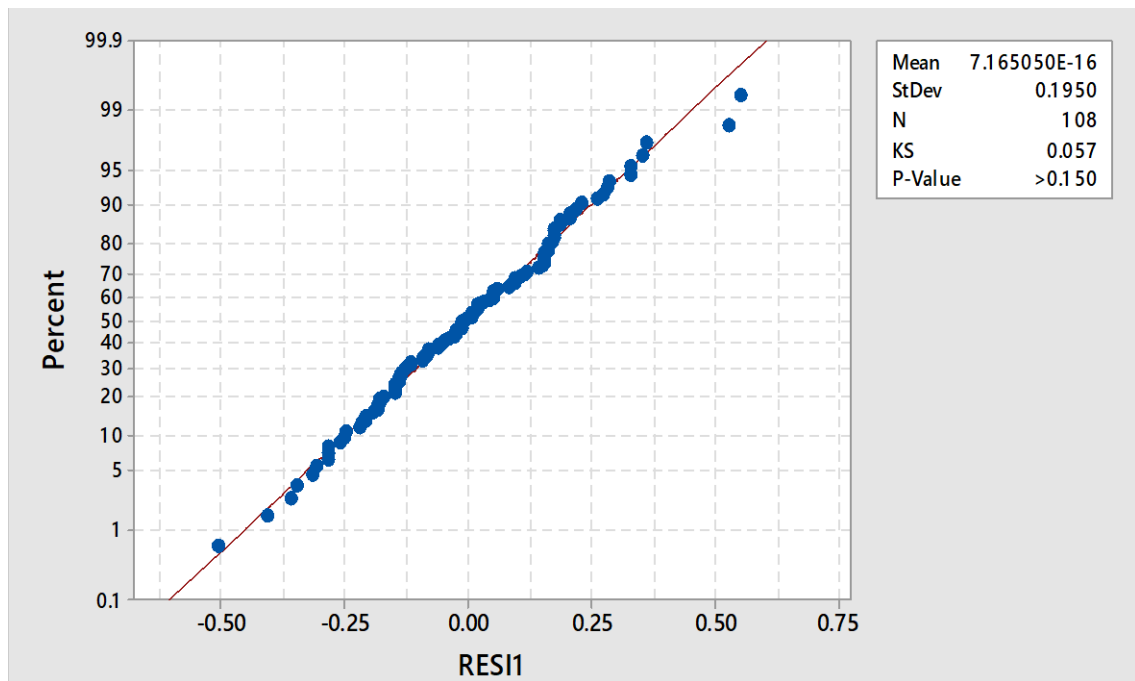


Figura 17. Validación del supuesto de normalidad en la variable Índice de Mutagenicidad en el matriz sedimento

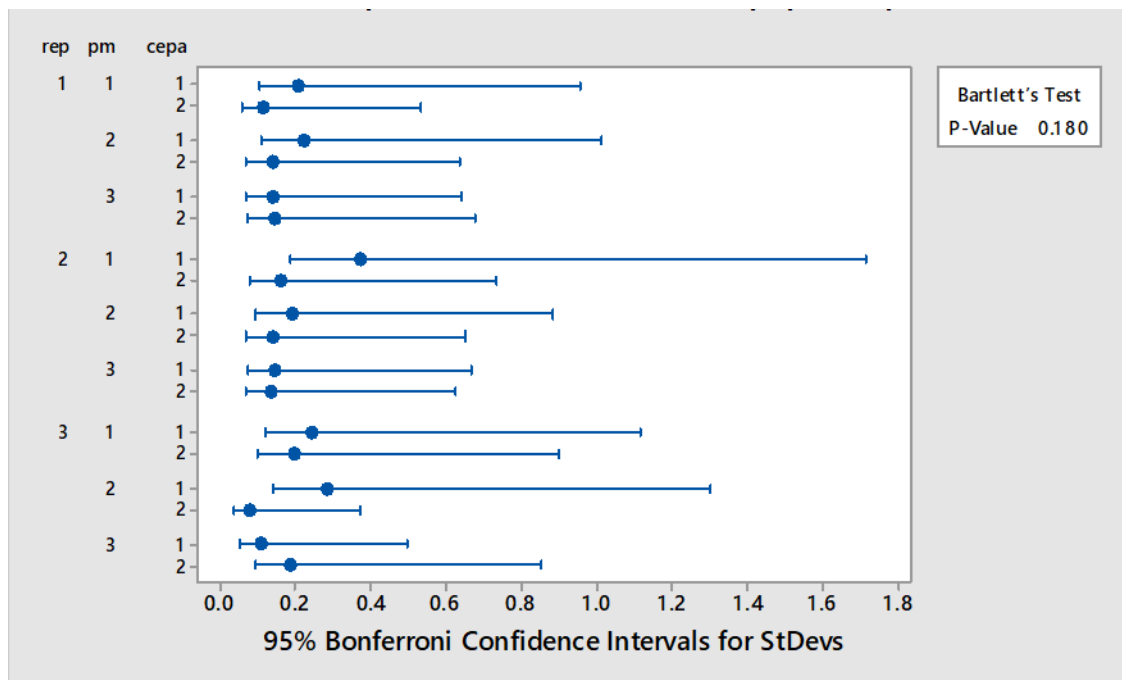


Figura 18. Homogeneidad de varianzas entre la variable IM y las fuentes de variación (repeticiones, punto de muestreo y cepa) en la matriz de sedimento

Anexo 4. Efecto de La Interacción entre los Factores en los Sedimentos

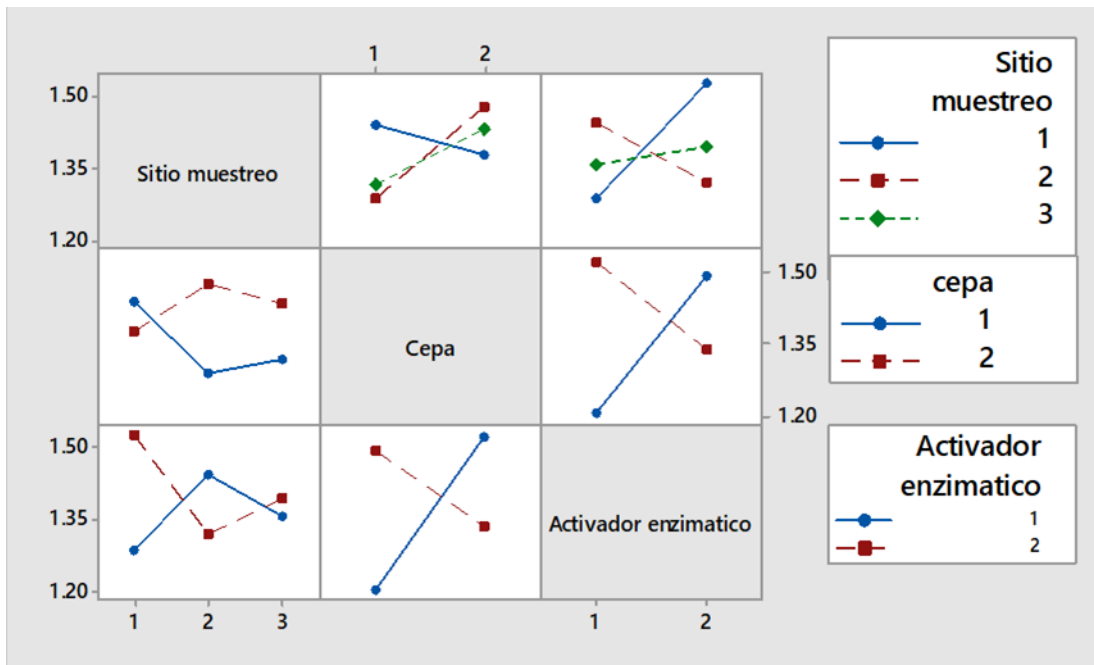


Figura 19. Interacción entre el sitio de muestreo, cepa y activador enzimático.

