



Nivel genocontaminante de las aguas de la cuenca baja del río Moche mediante el ciclo nucleolar de *Allium cepa*

Genopollutant level of the waters of the Moche River basin by nucleolar cycle of *Allium cepa*

Raúl Beltrán Orbegoso

Laboratorio de Biología Celular, Departamento de Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de Trujillo

RESUMEN

Es poco conocido el nivel de genocontaminación que las sustancias químicas usadas en la minería inducen en los recursos naturales asociados a la cuenca baja de los ríos, por la carencia de instrumentos de monitoreo ambiental. De allí que el objetivo de la investigación fue evaluar el nivel genocontaminante de las aguas de la cuenca baja del río Moche (La Libertad, Perú) mediante el ciclo nucleolar de los meristemos del biomonitor *Allium cepa* L. Las aguas fueron recolectadas en la cuenca baja del río, en las localidades de Samne, Poroto y Quirihuac. La investigación se realizó en el laboratorio de Biología Celular, se usó el diseño experimental de estímulo creciente en bloques aleatorios. Los bulbos de *A. cepa* fueron primero mantenidas en agua fresca; luego, las raicillas de los bulbos se colocaron en recipientes con las aguas de las localidades mencionadas durante 15, 20 y 35 minutos. Después se sometieron a la técnica de la impregnación argéntica. El nivel genocontaminante se determinó mediante la variación cuantitativa y cualitativa de las fases del ciclo del nucléolo en 300 células meristemáticas de *A. cepa*. Las aguas del río Moche de Samne tienen un nivel genocontaminante alto al inducir índices de 54,3%; 20,3%; 14,4% y 11,0% de células con nucléolo organizado, en desorganización, ausente y en reorganización, respectivamente. Los resultados hallados han permitido conocer el nivel genocontaminante de las aguas del río Moche por acción de la actividad minera y han evidenciado la posibilidad de usar el protocolo del ciclo nucleolar de *A. cepa* como un instrumento válido para investigaciones orientadas a evaluar la contaminación de nuestros ecosistemas.

Palabras clave: genocontaminante, *Allium cepa*, ciclo nucleolar, biomonitor

ABSTRACT

It is little known the level of genopollutant-inducing chemicals used in mining natural resources associated with the lower basin of the rivers, due to the lack of instruments for environmental monitoring. The aim of this research was to assess the level genopollutant of the waters of the basin of the Moche River (La Libertad, Peru) using the meristems of the *Allium cepa* L. biomonitor nucleolar cycle low strain. The waters were collected in the lower basin of the Moche River, in the towns of Samne, Poroto y Quirihuac. The research was carried out in the laboratory of Cell Biology, the increased stimulation in randomized blocks experimental design was used. Bulbs of *A. cepa* were first kept in fresh water; then, the rootlets of the bulbs were placed in containers with the waters of the towns mentioned for 15, 20 and 35 minutes. Then, they were subjected to the silver impregnation technique. Genopollutant level was determined by quantitative and qualitative variation of phases of the cycle of the nucleolus in 300 cells meristematic of *A. cepa*. The waters of the Moche River of Samne have a high genopollutant level to induce 54.3% indices; 20.3%; 14.4% and 11.0% of cells with nucleolus organized disorganization, absent and reorganization, respectively. Results founded have allowed knowing the level of the waters of the Moche river genopollutant by action of the mining activity and have shown the possibility of using the cycle nucleolar protocol of *A. cepa* as a valid instrument for oriented research to evaluate the contamination of our ecosystems.

Keywords: genopollutant, *Allium cepa*, nucleolar cycle, biomonitor

INTRODUCCIÓN

La actividad minera representa para el país un importante agente dinamizador de la economía, toda vez que contribuye de manera significativa al aumento de las exportaciones, así como al incremento de la inversión privada y a la recaudación nacional. Sin embargo, la actividad constituye también una fuente importante de contaminación. Lo cierto es que desde que la actividad minera se ha intensificado en el país, los costos directos para reducir los efectos generados por la contaminación ambiental minera han aumentado. Ya, a inicios del 2000 el valor de los pasivos ambientales mineros (definido como el monto requerido para mitigar los efectos de la contaminación ambiental minera) superaba los US\$ 1,000 millones, y en la actualidad, aun cuando se desconoce el valor de dichos pasivos, estos debieran ser más elevados considerando que su número ha aumentado de 611 a 5,551 entre los años 2003-2010¹. La mayor parte de estos pasivos mineros ha sido generada por las empresas de la gran y mediana minería (el 95.5% de estos pasivos), las cuales producen aproximadamente el 99.0% del total de minerales del país.

Ahora, los recursos hídricos han sido tradicionalmente los más afectados por la contaminación de las actividades mineras en el país. Esto, debido a que el agua es un insumo indispensable en el proceso productivo minero, el cual es combinado con reactivos químicos como cianuro y arsénico para separar el metal de la roca y así obtener el mineral con valor comercial. Como resultado de este proceso, se generan desechos de roca triturada, agua y reactivos químicos residuales, denominados “relaves mineros, los cuales debido a un inadecuado tratamiento, frecuentemente alcanzan a las fuentes hídricas aledañas a las operaciones mineras (ríos, lagos y/o lagunas) generándose así la contaminación ambiental en los recursos hídricos.

La contaminación hídrica ocurre debido a la existencia de fallas de mercado como externalidades, información asimétrica, ausencia de derechos de propiedad, ausencia de un sistema de precios, etc., lo cual conduce a que las empresas maximicen sus beneficios considerando únicamente sus costos privados de producción y omitiendo aquellos sociales y ambientales.

Existen 139 fuentes contaminantes de aguas residuales domésticas e industriales que se vierten al río sin ningún tratamiento. Estos pasivos ambientales mineros están en la cuenca del río Santa, en la región Áncash, con 1,500 pasivos mineros; en la región Cajamarca hay 1,200 pasivos mineros; en la cuenca de Vilcanota son menos, pero existen, tanto como en el Rímac y el Mantaro, entre otros. Todos nuestros ríos están contaminados por pasivos ambientales mineros. La otra fuente de contaminación de nuestros ríos son las aguas residuales, pues no existe un tratamiento de esas aguas².

Ante esta realidad, es prioritario formular aproximaciones metodológicas que aporten en la solución de la problemática. En ese sentido, el estudio se orientó a establecer las fases del ciclo del nucléolo como un “instrumento” para medir el nivel de genocontaminación de las sustancias químicas que actualmente se usan en la actividad minera de la región La Libertad.

El ciclo del nucléolo, convencionalmente, ha sido secuenciado en cuatro fases: **a)** la del nucléolo visible u organizado, asociado a las fases G₁, S y G₂ de la interfase, en donde se evidencia una intensa actividad transcripcional de los genes mencionados; **b)** la del nucléolo en desorganización, asociado al momento final de la fase G₂, en donde el proceso transcripcional disminuye; **c)** del nucléolo ausente, relacionado con la etapa de la división celular, en donde la transcripción es escasa; y, **d)** la del nucléolo en reorganización, relacionado con el momento terminal de la telofase, en donde la actividad transcripcional se reanuda³.

Así mismo, se han aperturado estudios de las regiones argirófilas del nucléolo, regiones con afinidad a los reactivos argénticos como la plata, como indicadores o “instrumentos” para identificar en forma temprana cuadros celulares malignos en tejidos linfoides humanos y de animales^{4,5}, de su transcriptoma y proteoma^{6,7} y de su organización estructural como biosensor para evaluar el efecto de los productos químicos en la arquitectura del ADN nuclear interfásico de los organismos⁸.

La idea de usar el ciclo del nucléolo como una “ventana de observación” del efecto de las sustancias químicas generadas por la actividad minera, se enmarca también en la tendencia actual de la Ecología de encarar el problema ambiental de la contaminación química desde un nuevo enfoque denominado pluralista o de solución de conflicto basado en el uso de un conjunto de aproximaciones metodológicas que involucran considerar a los componentes naturales, sociales y culturales del objeto de estudio^{9,10,11,12,13,14}. En esta nueva visión se enmarcan la planificación y ejecución de diversos Programas Ambientales en nuestro continente denominados de monitoreo, asistencia, desarrollo, evaluación, saneamiento, recuperación, mejoramiento; como una de las formas sistemáticas más

eficientes para encarar integralmente, en el mediano y largo plazo, la problemática ambiental de ecosistemas costeros o continentales, asociados en este caso a la contaminación de las aguas de la cuenca baja del río Moche (La Libertad, Perú).

Por tanto, el objetivo de la investigación fue evaluar el nivel genocontaminante de las aguas de la cuenca baja del río Moche (La Libertad, Perú) mediante el ciclo nucleolar de los meristemos del biomonitor *Allium cepa*. El trabajo ha determinado la eficacia del protocolo del ciclo nucleolar como un instrumento válido para planificar futuras investigaciones orientadas a evaluar la contaminación de nuestros recursos naturales; así como generar un marco metodológico para sistematizar una Prueba Ecotoxicológica integral de nuestro ecosistema.

MATERIAL Y MÉTODOS

Agua usada en el trabajo.

Las aguas fueron recolectadas en la cuenca baja del río, en las localidades de Samne, Poroto y Quirihuac, La Libertad (Perú).

Sistema biológico de pruebas.

Formado por un sistema de bulbos de *A. cepa*. “var. roja arequipeña”, los cuales fueron mantenidos en agua fresca hasta que las raicillas alcancen los 3 cm de longitud. Luego, los bulbos se colocaron en recipientes con las aguas con sustancias procedentes de la actividad minera de las localidades mencionadas, durante 15, 20 y 35 minutos, se trabajó también con un grupo testigo. Los sistemas estuvieron bajo aireación permanente. Después, las raicillas se sometieron a la técnica de la impregnación argéntica.

Determinación de los índices de fases del ciclo nucleolar de *A. cepa*

Las muestras fueron observadas en un microscopio óptico Olympus con los objetivos de 4X, 10X, 40X y 100X. Algunas vistas microscópicas se fotografiaron con una cámara Kodak. Los índices de las cuatro fases del ciclo nucleolar de *A. cepa* se determinaron mediante el recuento de 300 células mononucleadas. Se determinaron también cualitativamente las anomalías estructurales de las diversas fases nucleolares.

Tratamiento de datos y análisis de confiabilidad.

Los datos fueron sometidos a las medidas de tendencia central (media) y de dispersión (varianza y error standard) previa transformación arco-sen de los porcentajes originales.

RESULTADOS

Los índices promedio de las cuatro fases del ciclo nucleolar determinados en el grupo testigo de *A. cepa* después de contar 300 células mononucleadas, muestra la presencia mayormente de nucléolo organizado (Tabla 1, Fig. 1), resultado mayor que cuando se somete al mismo fenómeno pero con aguas de la cuenca baja del río Moche (Tabla 2, Fig. 2).

En la tabla 2 se presentan los resultados de los índices promedio de las cuatro fases del ciclo nucleolar

Tabla 1. Índices promedio de las cuatro fases del ciclo nucleolar de la población mononucleada de *Allium cepa* L. testigo.

Células mononucleadas testigo de <i>A. cepa</i> L. con					
	nucléolo organizado	nucléolo en desorganización	nucléolo ausente	nucléolo en reorganización	
Promedios	84,1%	4,7%	3,8%	7,4%	100,0 %
S ²	4,10	0,28	0,12	2,82	
S	2,03	0,52	0,35	1,68	

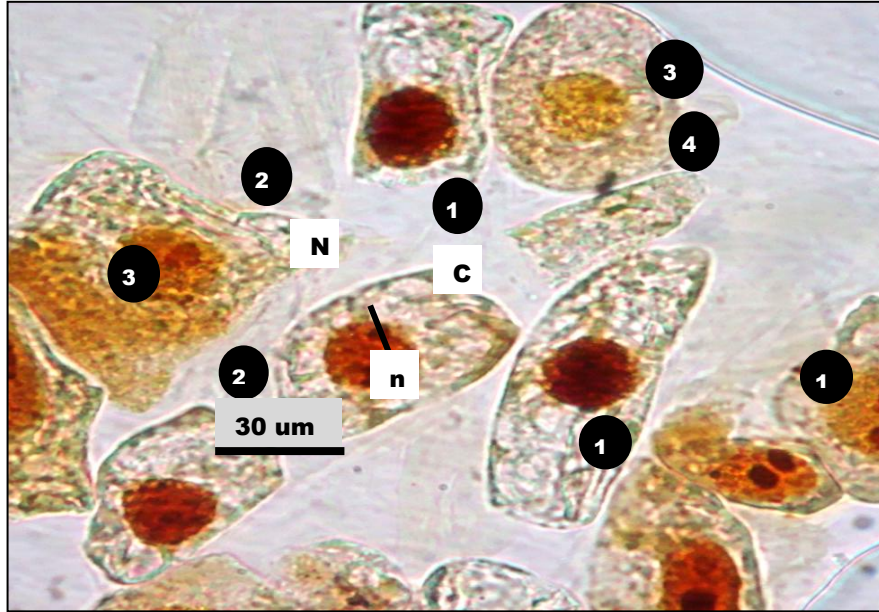


Fig. 1: Células meristemáticas mononucleadas del grupo testigo de *Allium cepa* L. mostrando las cuatro fases del ciclo nucleolar: ❶ fase del nucléolo organizado, ❷ fase del nucléolo en desorganización, ❸ fase del nucléolo ausente y ❹ fase del nucléolo en reorganización, normales. (c=citoplasma, N=núcleo, n=nucléolo). 1000X.

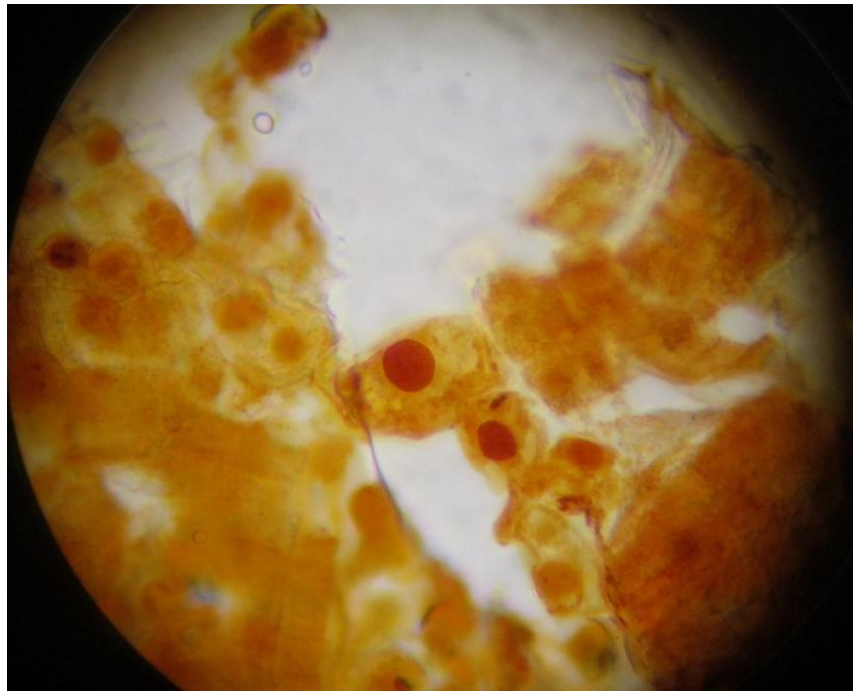


Fig. 2: Células meristemáticas mononucleadas del grupo experimental de *Allium cepa* L. sometido a las aguas del río Moche, localidad de Samne, mostrando las cuatro fases del ciclo nucleolar completamente alteradas. 1000X.

Tabla 2. Índices promedio de las cuatro fases del ciclo nucleolar de la población mononucleada de *Allium cepa* L. sometida a las aguas de la cuenca baja del río Moche de la localidad de Samne (La Libertad, Perú).

Células mononucleadas testigo de <i>A. cepa</i> L. con					
	nucléolo organizado	nucléolo en desorganización	nucléolo ausente	nucléolo en reorganización	
Promedios	54,3%	20,3%	14,4%	11,0%	100,0 %
S ²	3,4	1,13	2,2	3,78	
S	2,03	0,52	0,35	1,68	

DISCUSIÓN

En la Tabla 1 se presentan los índices promedio de las cuatro fases del ciclo nucleolar de la población mononucleada de *A. cepa* testigo tomado como base para realizar el presente trabajo después del recuento de 300 células mononucleadas meristemáticas. En la figura 1 se observa una microfotografía de los meristemos de *A. cepa* con las cuatro fases del ciclo nucleolar: nucléolo organizado, nucléolo en desorganización, nucléolo ausente y nucléolo en reorganización.

Las células meristemáticas de *Allium cepa* L. (2n=16) presentan dos nucléolos de gran tamaño, hecho que lo convierte en un material idóneo para el estudio del nucléolo. Así mismo, la población meristemática de *A. cepa* L. tiene también otra cualidad citológica, la de estar formada por una población asincrónica, que permite observar en un solo campo microscópico todas las etapas y fases del ciclo celular, este hecho lo convierte también en un material ideal para el estudio del ciclo nucleolar^{13,14,15}.

Los valores de 84,1%, 4,7%, 3,8% y 7,4% de células mononucleadas testigo de *A. cepa* L. con nucléolo organizado, nucléolo en desorganización, nucléolo ausente y nucléolo en reorganización, proporcionan una visión de las proporciones del ciclo nucleolar. En la figura 1, se puede apreciar la característica de las poblaciones meristemáticas como es la asincronía. En la figura se observa que en un campo microscópico se pueden visualizar todas las fases del ciclo nucleolar^{11,15,16}.

En el caso, por ejemplo, del alto índice de 84,1% de células con el nucléolo organizado que se ha encontrado, se explica porque, dicha fase está asociada con la etapa de presencia del núcleo y con el período interfásico, que son las etapas de mayor duración en los ciclos nuclear y celular, respectivamente. Situación contraria ocurre con el índice de fase del nucléolo ausente de 3,8%, asociado con la etapa de ausencia de núcleo y con las fases mitóticas de metafase, anafase y telofase temprana, que son las etapas de menor duración en los ciclos nuclear y celular, respectivamente. Por tanto, el mayor o menor índice real de la fase nucleolar está relacionado con la mayor o menor duración de la fase en el ciclo. Los índices de las fases nucleolares hallados en el presente trabajo son similares a los determinados en investigaciones sobre el nucléolo, lo cual indica que la proporcionalidad de las fases es constante a la temperatura en la cual se trabaje, siendo la duración del ciclo lo variable^{16,17,18}.

El nucléolo es la estructura diferenciada del núcleo eucariota, generado por la actividad transcripcional de grandes bucles de ADN denominados regiones organizadoras del nucléolo (NORs)^{1,2}. Las células animales presentan un solo nucléolo; sin embargo, en los vegetales las células pueden presentar dos y tres nucléolos en condiciones normales^{18,19,20}.

Los nucléolos, en la fase organizada, son esféricos y bien definidos; los nucléolos en desorganización y reorganización son pequeños y de forma irregular; y los nucléolos ausentes, como es lógico, no se visualizan^{3,4,5,6}. Estas formas diversas reflejan intensidades distintas del fenómeno molecular de la transcripción, en donde la célula forma ARN a partir del ADN, con lo cual se deduce que un nucléolo organizado, evidencia una intensa transcripción y un nucléolo ausente, la ausencia o escasa presencia del fenómeno^{1,5,6}.

En la tabla 2 se presentan los resultados de los índices promedio de las cuatro fases del ciclo nucleolar determinados en *A. cepa* L. sometida a las aguas de la cuenca baja del río Moche de la localidad de Samne, después del conteo de 300 células mononucleadas. Se puede observar que la población meristemática presenta proporciones de 54,3%20,3%14,4%11,0%.

En la tabla 2, se presentan los índices promedio reales de las cuatro fases del ciclo nucleolar hallados en la población meristemática sometida a las aguas de la cuenca baja del río Moche. Al comparar los valores de la tabla 2 con los del grupo testigo, se evidencia un importante incremento de

la fase del nucléolo en desorganización y una disminución de la fase del nucléolo en reorganización, lo cual nos indica que el agroquímico ha afectado la dinámica celular de los meristemos. El efecto se agudiza en la población celular sometida a las aguas de la cuenca baja del río Moche se evidencia un fuerte efecto citostático, al detener el ciclo celular en las fases nucleolares de organización y desorganización, pues no se hallaron células en las fases de nucléolo ausente ni del nucléolo en reorganización. Por tanto, el efecto citostático se podría constituir en un primer criterio de evaluación para determinar la citotoxicidad de los productos químicos, tomando como referencia el ciclo nucleolar.

En los últimos años el sector minero ha experimentado un crecimiento exorbitante. De un crecimiento de 2.4% en el año 2000, pasó a 7.6% en el año 2008, y aun cuando la tasa de crecimiento promedio para los años 2009-2010 fue de 1.3%, se espera para el quinquenio 2011-2015, una tasa de crecimiento promedio de 8.5%, basada en la ejecución de un conjunto de inversiones mineras ascendentes a US\$ 25,346 millones (MEF, 2011).

Se ha realizado una aproximación del costo económico de la contaminación ambiental minera sobre los recursos hídricos para los años 2008 y 2009 a partir del marco conceptual de la Eficiencia Medioambiental propuesto por Pittman; Färe et al.; Rao, quienes interpretan dichos costos como el trade-off de los empresarios mineros entre incrementar su producción que es vendible a precios de mercado (output deseable) y reducir la contaminación ambiental que se desprende de su proceso productivo (output no deseable)¹. Dichos costos económicos fueron calculados a partir de fronteras de posibilidades de producción paramétricas y no paramétricas para 28 y 37 unidades mineras para los años 2008 y 2009 respectivamente, las cuales estuvieron bajo el ámbito de la Campaña Nacional de Monitoreo Ambiental de Efluentes y Recursos Hídricos que realizó el Organismo Supervisor de Inversión Energía y Minería (OSINERGMIN) en dichos años¹.

La presente investigación fusiona las disciplinas de la Biología Molecular y la Ecología Ambiental, pues apertura el conocimiento del ciclo nucleolar de *A. cepa* como uno de los instrumento para identificar los perfiles toxicológicos de la innumerable cantidad de productos químicos que hoy se usan masivamente en las diversas actividades de nuestra sociedad, en la perspectiva de proponer las bases científicas y metodológicas para establecer un sistema de evaluación integral de citotoxicidad, adecuado a nuestra realidad, de bajo costo, rápido y de fácil manejo, que permita ayudar efectivamente en la conservación del medio ambiente y en la mejora de la salud humana individual y colectiva^{20,21,22}.

CONCLUSIONES

- Las aguas del río Moche de Samne tienen un nivel genocontaminante alto al inducir índices de 54,3%; 20,3%; 14,4% y 11,0% de células con nucléolo organizado, en desorganización, ausente y en reorganización, respectivamente.
- Los criterios de evaluación, para determinar el nivel de genocontaminación de los aguas de los ríos con productos de la actividad minera, tomando como base el ciclo nucleolar de *Allium cepa* L. serían el efecto citostático sobre la población meristemática, el número de las regiones AgNORs y la alteración de los índices de fases nucleolares.
- Los resultados hallados en este trabajo han permitido tener una base objetiva del nivel genocontaminante de nuestro ambiente lótico por acción de la actividad minera y ha evidenciado el uso del protocolo del ciclo nucleolar de *A. cepa* L. como un instrumento válido para futuras investigaciones orientadas a evaluar la contaminación de nuestros recursos hídricos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. <http://cies.org.pe/investigaciones/medioambiente/Cual-es-el-costode-la-contaminacion-ambiental>
2. <http://www.horizonteminero.com/aentrevistas/entrevista-2/1670-todos-nuestros-rios-estan-contaminados-por-pasivos-mineros.html>
3. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular biology of the cell. 2^a ed. New York: Garland Science; 2002.
4. Paniagua R, Nistal M, Sesma P, Álvarez-Uría M, Fraile B, Anadón R, Sáez FJ. Biología Celular. 3^a ed. Madrid: McGraw-Hill-Interamericana de España S.A.; 2007.

5. Berkaloff A, Borget J, Favard P, Guinebault M. *Biología y Fisiología celular*. 2a ed. Barcelona: Edic. Omega. S.A.; 1996.
6. Freidelder D. *Fundamentos de Biología Molecular*. México: Edit Acribia S.A.; 1998.
7. Lodish H, Baltimore D, Berk S, Ziopursky SL, Matsudaira P, Darnell J. *Molecular Cell Biology*. New York: Edit. Scientific American Books. INC; 1999.
8. Smith CA, Wood EJ. *Biología Molecular y Biotecnología*. E.U.A.: Addison- Wesley Iberoamericana; 1995.
9. Rosete M, Padros M, Vindrola O. El nucléolo como un regulador del envejecimiento celular. *Buenos Aires: Medicina* 2007; 67: 183-194.
10. Alvarez M, Quezada C, Navarro C, Molina A, Bouvet P, Krauskopf M, Vera M.I. An increased expression of nucleolin is associated with physiological nucleolar segregation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003; 301: 152–158.
11. Alvarez M, Molina A, Quezada C, Pinto R, Krauskopf M, Vera M.I. Eurythermal fish acclimatization and nucleolar function: a review. *J. Therm. Biol.* 2004; 29: 663–667.
12. Pich A, Chiusa L, Margaria E. Role of the Argyrophilic Nucleolar Organizer Regions in tumor detection and prognosis. *Cancer Detect and Prevent* 1995; 19(3): 282-291.
13. Kawasaki F, Onoda N, Ishikawa T, Ogawa Y, Ikelda K, Sugamo S, Kato Y, Chung KH. Evaluation of argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNORs) in differentiated thyroid carcinoma as an indicator for disease recurrence. *Oncol Rep* 2000; 7(4): 853-857.
14. Andersen JS, Lyon CE, Fox AH, Leung AK, Lam YW, Steen H, Mann M, Lamond AI. Directed proteomic analysis of the human nucleolus. *Curr. Biol.* 2002; 8(3): 1–11
15. Andersen JS, Lam YW, Leung AK, Ong SE, Lyon CE, Lamond AI, Mann M. Nucleolar proteome dynamics. *Nature (London)* 2005; 433, 77–83
16. Gracey AY, Fraser EJ, Li W, Fang Y, Taylor RR, Rogers J, Brass A, Cossins AR. Coping with cold: an integrative, multitissue analysis of the transcriptome of a poikilothermic vertebrate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2004; 101, 16970–16975
17. Hernandez-Verdun D, Roussel P, Gebrane-Younes J. Emerging concepts of nucleolar assembly. *J. Cell Sci.* 2002; 115, 2265–2270 [Medline](#) [Crossref](#) (fecha de acceso 14 julio de 2010).
18. D. Liu, W. Jiang, W. Wang, F. Zhio, C. Lu, Effect of lead on root growth, cell division and nucleolus of *Allium Cepa*, *Environ. Poll.* 1994; 86: 1-4.
19. Liu DH, Jiang WS. Effects of Al³⁺ on the nucleolus of *Allium cepa* root-tip cells. *Hereditas* 1991; 115: 213-219.
20. Liu DH, Jiang WS, Lu C, Zhao FM, Hao YQ, Guo L Effects of copper sulfate on the nucleolus of *Allium cepa* root-tip cells. *Hereditas* 1994; 120: 87-90.
21. Ianaconne J, Alvariano L. La Ecotoxicología acuática en el Perú. Libro de resúmenes del Congreso Internacional de Ecología y Medio Ambiente. 2009: pp 33.
22. Rodriguez E. MR. Bioacumulación del cobre en *Chondracanthus chamissoi* procedente del Puerto Malabrigo, Rázuri, Ascope, La Libertad. Libro de resúmenes del Congreso Internacional de Ecología y Medio Ambiente. 2009: pp 141.