

INFLUENCIA DE FACTORES ABIÓTICOS PRESENTES EN EL RÍO DE LA PLATA SOBRE LA GENOTOXICIDAD DEL CROMO

Laura Christina LÓPEZ y Juan MORETTON

Cátedra de Higiene y Sanidad, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. Junín 956, 4° piso, (1113) Buenos Aires, Argentina. Fax: (54-1) 964-8274 ó (54-1) 962-5341. E-mail lchlopez@cefyb.ffyb.uba.ar

(Recibido junio 1996, aceptado mayo 1997)

Palabras clave: genotoxicidad, cromo, ensayo Rec, ríos, aguas de superficie

RESUMEN

Se estudiaron las alteraciones que sufre un agente genotóxico de origen ambiental muy difundido en Argentina, las sales de Cr(VI), al entrar en contacto con las aguas de un curso receptor de efluentes como es el Río de la Plata. La influencia de factores abióticos presentes en las aguas se evaluó utilizando el ensayo Rec con *Bacillus subtilis*. Los resultados mostraron la existencia de una fracción soluble capaz de producir un efecto genotóxico sinérgico con Cr(VI). Este grupo de sustancias es sensible al calor de esterilización y a la radiación UV y su actividad disminuye con la presencia de material particulado en suspensión. La detección de la genotoxicidad no fue afectada por las concentraciones habitualmente altas de dichas partículas en suspensión en el Río de la Plata. Cuando se disolvieron las sales de cromo en muestras de agua cruda se pudieron determinar interferencias de origen abiótico generadas por los procesos de esterilización usualmente utilizados en estos ensayos. Así, se encontró una disminución de la actividad genotóxica después de filtrar a través de membranas inorgánicas de 0.22 µm y un incremento de la misma después de la exposición a la radiación UV.

ABSTRACT

The alterations suffered by the well-known environmental genotoxic agent, Cr(VI), were studied. Cr(VI) salts were dissolved in water effluent river receptors waters such as from the Río de la Plata. The influence of abiotic factors present in this kind of water was evaluated using the Rec assay in *Bacillus subtilis*. The results detected a soluble fraction that potentiated Cr(VI) genotoxicity. This substance (or group of substances) is sensible to sterilization by heat and UV radiation, and its activity seems to decrease with particulate matter. Its genotoxicity was not affected by high concentrations of particulate matter in the Río de la Plata water. In samples where chromium salts were added to raw river water, abiotic interference due to sterilization processes occurred. A decrease in genotoxicity was found after filtration through inorganic filters (0.22 µm) and an increase was noticed after exposure to UV radiation.

INTRODUCCIÓN

Los ríos han sido utilizados por el hombre, más que cualquier otro ecosistema, como vía de eliminación de aguas residuales y de desechos sólidos tanto de origen industrial como urbano. Esta actividad ha llevado a alteraciones de distinta magnitud en la biota de los cursos con efectos que recientemente han comenzado a evaluarse (Rizzoni et al. 1995).

En Argentina, el Río de la Plata constituye el mayor curso receptor de efluentes (Fig. 1). Este estuario tiene 35,000 km² de superficie, 320 km de longitud y su ancho oscila entre un mínimo de 2 km y un máximo de 222 km en la desembocadura. En sus nacientes se encuentra la confluencia de dos grandes ríos,

el Paraná y el Uruguay, que reciben en su recorrido los aportes de decenas de ríos de llanura de escaso caudal y, en general, sumamente contaminados (Moretton et al. 1990). También se eliminan en el Río de la Plata los efluentes cloacales no tratados generados por 12 millones de habitantes del área de Buenos Aires. Todos estos aportes llevan a una elevada contaminación del curso a pesar de su notable capacidad de biodepuración (García Arguijo 1994).

Entre los contaminantes de aguas de superficie, las sales de cromo, tienen un importante papel en Argentina debido a su producción y amplio uso en el curtido de cueros. El cromo, al igual que otros metales pesados, puede encontrarse en sedimentos arrastrados al fondo de los ríos disueltos o asociados

a partículas en suspensión (García Arguijo 1994). En los ambientes naturales, una pequeña proporción de este metal aparece como cromo metálico mientras que las sales de Cr(III) y Cr(VI) son más comunes. En su forma trivalente es un elemento esencial para muchos seres vivos ya que está involucrado en el metabolismo de la glucosa y de los ácidos nucleicos. En altas concentraciones es tóxico. En cambio, el Cr(VI) no presenta carácter esencial para procesos biológicos, atraviesa fácilmente las membranas biológicas y su actividad como agente genotóxico en bajas concentraciones ha sido estudiada por numerosos autores (Nishioka 1975, Petrilli y De Flora 1978, Léonard y Lauwerys 1980, Gómez-Arroyo *et al.* 1981, Bianchi *et al.* 1983). Se considera que el efecto mutagénico del Cr(VI) se debe a la formación de un complejo intermedio Cr(V)-ADN cuya posterior reducción a Cr(III) lleva a generar cambios irreversibles en la molécula del ADN (Nusko y Heumann 1994).

El reconocimiento de la actividad genotóxica en cursos de agua es de particular interés por las consecuencias que las alteraciones en el material genético pueden tener en la biota presente en los mismos (De Flora *et al.* 1991). Si bien esta detección se realiza con sistemas biológicos simples en lo referente al manejo (Auletta 1994), la presencia de factores bióticos y abióticos en los ecosistemas puede interferir con la interpretación de los resultados obtenidos en muestras de origen natural (López y Moretton 1996). Procesos como adsorción a partículas en suspensión, dilución con aguas crudas y reacciones físico-químicas entre diferentes compuestos, modifican la actividad biológica de las muestras (Kowalska *et al.* 1994). Estas variaciones pueden corresponder a efectos de suma, sinérgicos o antagónicos, distintos para cada curso receptor (Matsui 1980) y cuyo estudio es de importancia para el establecimiento de normas legales que limiten los vertidos. Desafortunadamente, la influencia de los factores abióticos en los ensayos de ecotoxicidad no ha sido evaluada adecuadamente en Argentina.

En el presente trabajo se han estudiado las modificaciones que sufre la actividad mutagénica de un agente genotóxico ambiental, el Cr(VI), al entrar en contacto con las aguas de un curso receptor, el Río de la Plata. El objetivo fue evaluar los límites de detección de la genotoxicidad en un sistema biológico ampliamente utilizado para estos fines, el ensayo Rec de *Bacillus subtilis* (Mazza y Galizzi 1980, Mazza 1982). Debido a la sensibilidad de las cepas microbianas empleadas en dicho ensayo, el estudio puede considerarse también para la determinación del límite de los efectos genotóxicos en la biota del ecosistema.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras de agua del Río de la Plata fueron tomadas a una distancia de 5 metros de la costa del río en distintos puntos, entre las localidades de Martínez y San Isidro (Fig. 1), durante mayo y diciembre de 1995, en frascos de vidrio de un litro y refrigeradas inmediatamente a 4°C hasta la realización de

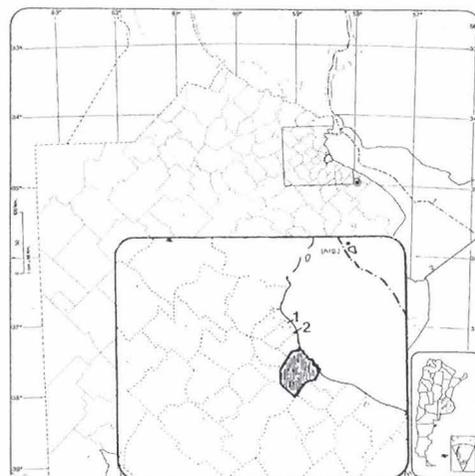


Fig. 1. Localización de los sitios de muestreo. San Isidro (1) y Martínez (2) se encuentran al norte de la ciudad de Buenos Aires que aparece sombreada

los diferentes experimentos. La zona seleccionada para este estudio no presenta un grado de contaminación que interfiera con las determinaciones. El mutágeno utilizado para análisis fue cromato de potasio (Mallinckrodt).

Las muestras de agua de río fueron esterilizadas antes o después de agregado el mutágeno y previo a la realización del ensayo microbiológico. Los métodos de esterilización empleados fueron: exposición a la radiación ultravioleta, tratamiento en autoclave y filtración. La irradiación con luz ultravioleta consistió en filtrar 100 ml del agua de río por papel Whatman N°2 y luego colocar 40 ml en cajas de Petri estériles de 15 cm de diámetro a 30 cm de una lámpara General Electric UV germicida de 15 Watts por 30 minutos con agitación. En el autoclave se colocaron 100 ml de la muestra en frascos de vidrio y se esterilizaron durante 15 minutos a 1 atm. Finalmente, para la filtración, se usaron filtros Whatman de membrana inorgánica 0.22 µm. Los ensayos realizados con sales de cromo disueltas en agua destilada permitieron determinar que el paso a través de estos filtros no produjo una disminución importante de la actividad biológica del Cr(VI). El agua destilada más partículas se obtuvo al centrifugar a 5000 g durante 10 min, 20 ml de agua de río esterilizada con autoclave y resuspender el sedimento en el mismo volumen de agua destilada estéril.

La genotoxicidad se determinó mediante el ensayo Rec de *Bacillus subtilis* de acuerdo con el método cuantitativo descrito previamente por Mazza (1982). Las cepas usadas de *Bacillus subtilis* PB 1791 y PB 1652 fueron donadas gentilmente por el Dr. Mazza. Cada determinación de genotoxicidad se hizo por triplicado y el criterio utilizado para considerar un resultado positivo fue cuando la relación de eficiencia de placa [EP = unidades formadoras de colonias de la cepa tratada (N)/unidades formadoras de colonias de la cepa no tratada (N₀)] de la cepa PB 1791, decreció con respecto a la de la cepa progenitora PB 1652 y dicha disminución guardó una relación con la concentración de la sustancia ensayada (Mazza y Galizzi 1980).

Con el fin de cuantificar adecuadamente la positividad de los resultados obtenidos se calcularon las rectas de regresión para cada experimento. La diferencia entre los valores de las pendientes de las rectas correspondientes a la cepa PB 1652 y la cepa PB 1791 indicó la potencia genotóxica. La presencia o ausencia de interacción en los tratamientos de esterilización de agua previo y posterior al agregado de cromo se determinó sometiendo los datos obtenidos a un análisis de varianza de dos factores (tratamiento-tipo de agua) con un nivel de significación del 5% (Finney 1978). En la **figura 2** se muestra un esquema de las experiencias realizadas en el presente trabajo.

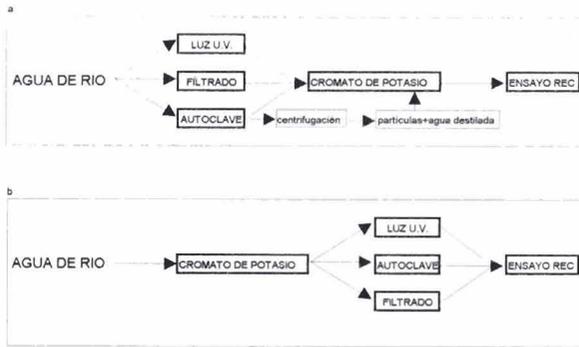


Fig. 2. Esquema de las experiencias realizadas. Grupos de experimentos donde el cromato de potasio fue agregado a) después y b) antes de esterilizar la muestra

RESULTADOS

Las muestras de agua de río esterilizadas por autoclave, luz UV ó filtración no mostraron efectos genotóxicos en el ensayo Rec con *Bacillus subtilis* (**Fig. 3**). Con el fin de verificar el efecto del cromato de potasio en este ensayo se elaboraron

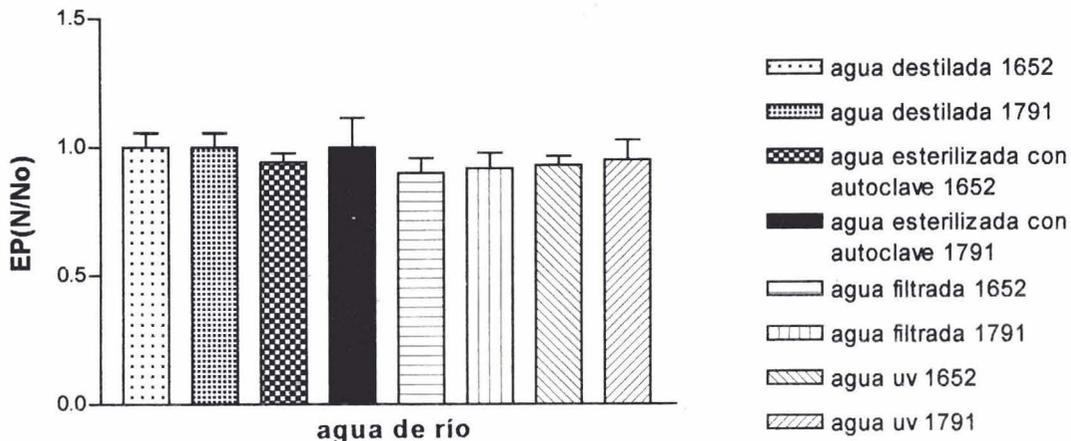


Fig. 3. Comparación de los efectos en el ensayo Rec de *Bacillus subtilis* de agua de río sometida a distintos tratamientos

curvas de concentración-respuesta utilizando agua destilada como disolvente. Esta curva testigo se muestra en la **figura 4** y es similar a la obtenida por Mazza y Galizzi (1980) en experiencias de este tipo.

Para eliminar los factores bióticos presentes en las muestras se procedió a esterilizar las aguas de río con diferentes técnicas previo al agregado de las sales de Cr(VI) (**Fig. 2a**). En el agua esterilizada con autoclave, la genotoxicidad, fue algo menor que la detectada en la curva testigo de agua destilada (**Fig. 5**). Un resultado similar se obtuvo al ensayar el agua esterilizada por UV (**Fig. 6**). En la **tabla 1** se muestran las pendientes correspondientes a las rectas de regresión y la diferencia entre las mismas que fue considerada como la potencia genotóxica (PG). La muestra sometida a filtración resultó tóxica para la cepa progenitora PB 1652. Los datos correspondientes a la cepa PB 1791 no pudieron ajustarse a una recta (**Fig. 7**), al unir los puntos que representan los valores de EP promedio aparecieron pendientes diversas para concentraciones altas y bajas de Cr(VI). En otra experiencia se agregó un concentrado de partículas provenientes de agua esterilizada con autoclave a un volumen equivalente de agua destilada estéril previo a la adición de sales de Cr(VI). Los resultados aparecen en la **figura 8**. En este caso, la potencia genotóxica fue similar a la hallada en la curva testigo de agua destilada (**Tabla 1**).

En otro grupo de experimentos cuyos resultados se muestran en la **figura 9**, se estudió el efecto que los distintos procesos de esterilización tienen en la detección de sales de Cr(VI) presentes en agua cruda de río (ver esquema b de la **Fig. 2**). En todos los casos se empleó una concentración de cromato de potasio de 10 mg/ml. En la comparación de los valores obtenidos con los correspondientes a agua destilada solamente con el agua filtrada se encontró diferencia significativa ($p < 0.05$) para ambas cepas. Tanto el agua esterilizada por autoclave como la irradiada con UV mostraron una leve toxicidad inespecífica con la cepa PB 1652, pero mientras que en la primera la genotoxicidad disminuyó en la segunda fue mayor que en el testigo con agua destilada.

En la **figura 9**, también se compararon los resultados logrados en los grupos de experimentos **a** y **b** de la (**Fig. 2**), observándose que únicamente en los procesos de irradiación con luz UV y filtración aparecen diferencias significativas ($p < 0.05$) para la cepa PB 1791 entre la esterilización previa y la posterior al agregado de Cr(VI) al agua de río cruda. Debe notarse que en las muestras filtradas disminuyó la toxicidad no específica cuando el cromato de potasio fue agregado al agua cruda luego de la esterilización, aún así la disminución del efecto sobre la cepa PB 1791 hizo que la relación EP rec-/ EP rec+ fuese similar en ambos casos.

TABLA I. POTENCIA GENOTÓXICA (PG) DE SALES DE CROMO EN DISTINTAS MUESTRAS DE AGUA

MUESTRA DE AGUA	PB 1652	PB 1791	PG
destilada	0.0113	-0.0392	0.0506
destilda + partículas	0.0012	-0.0390	0.0402
esterilizada por:			
autoclave	-0.0035	-0.0346	0.0311
filtración	NC		
radiación UV	-0.0085	-0.0411	0.0326

NC = no calculado

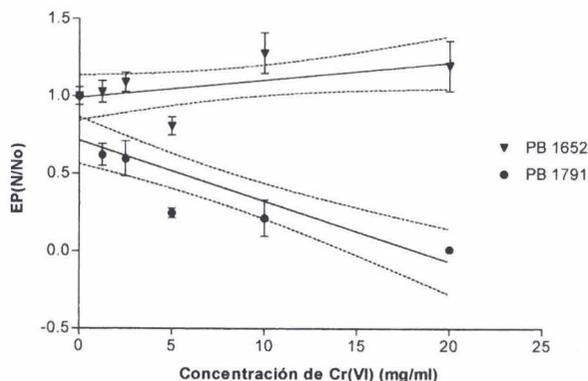


Fig. 4. Efecto de distintas concentraciones de cromato de potasio en agua destilada sobre las cepas PB 1652 y PB 1791 de *Bacillus subtilis*. Ep (N/No) = número de colonias promedio por placa de células tratadas/ número de colonias promedio por placa de células sin tratar. Los resultados se expresan como el promedio entre experiencias independientes \pm DE
 ————— recta de regresión lineal
 - - - - - intervalo de confianza del 95%

DISCUSIÓN

El conjunto de experiencias esquematizadas en la **figura 2** **a**, tuvo como objetivo determinar la interferencia de agentes abióticos contenidos en agua de río en la detección de genotoxicidad del Cr(VI) con el sistema Rec de *Bacillus subtilis*. Con las técnicas utilizadas para la esterilización de agua se pudo notar la influencia de las partículas sólidas sedimentables y en suspensión presentes en las muestras sobre la actividad

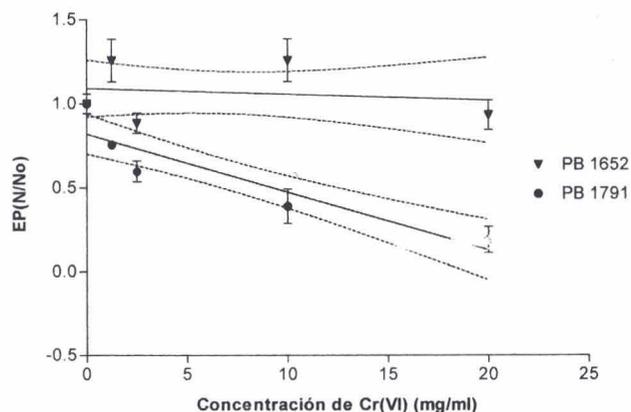


Fig. 5. Efecto de distintas concentraciones de cromato de potasio en agua esterilizada con autoclave, sobre las cepas PB 1652 y PB 1791 de *Bacillus subtilis*. Ver pie de la figura 4

mutagénica del cromato de potasio.

En el proceso de filtrado se eliminaron en forma mecánica todas las partículas y se lograron por una parte efectos tóxicos inespecíficos representados por la pendiente negativa de la recta obtenida con la cepa PB 1652. La genotoxicidad, considerada como diferencia entre las pendientes de las rectas correspondientes a las cepas PB 1652 y PB 1791, fue alta para concentraciones bajas de cromato y se mantuvo más disminuida y constante con concentraciones elevadas de Cr (VI). Este tipo de efectos fue observado por otros autores (Mazza 1982) y llevó a suponer la existencia de sustancias solubles que actuaron en forma sinérgica con el Cr(VI). Desafortunadamente tanto la toxicidad de esta mezcla como las características del ensayo Rec con *Bacillus subtilis* no permitieron realizar determinaciones con concentraciones de cromo entre 0 a 0.25 mg/ml que hubiesen definido adecuadamente la relación concentración-respuesta en esta zona de genotoxicidad sinérgica.

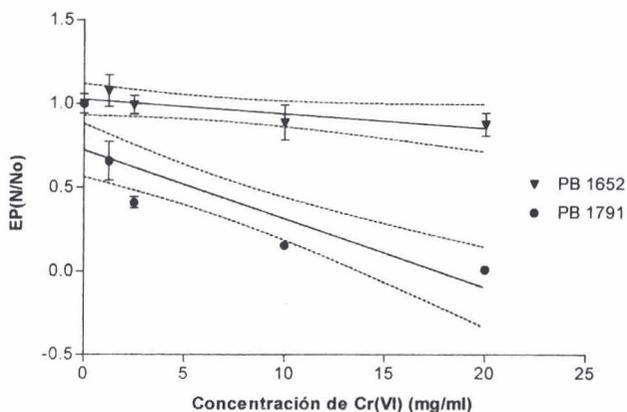


Fig. 6. Efecto de distintas concentraciones de cromato de potasio en agua esterilizada por luz UV, sobre las cepas PB 1652 y PB 1791 de *Bacillus subtilis*. Ver pie de la figura 4

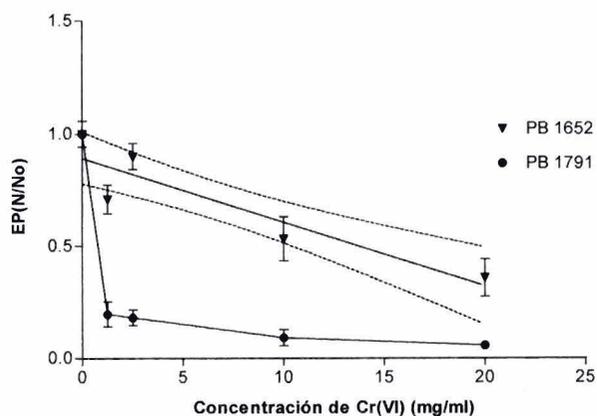


Fig. 7. Efecto de distintas concentraciones de cromato de potasio en agua filtrada, sobre las cepas PB 1652 y PB 1791 de *Bacillus subtilis*. Ver pie de la figura 4 para la cepa PB 1652
 ————— unión de puntos promedio, cepa PB 1791

Tanto en las aguas sometidas a esterilización por autoclave como a irradiación UV se mantuvieron las partículas en suspensión, en las primeras no apareció toxicidad y la potencia genotóxica pudo considerarse similar a la hallada en agua destilada. No se detectó aquí el efecto de las sustancias solubles sinérgicas, probablemente porque fueron adsorbidas por las partículas o se destruyeron con el tratamiento térmico. En el caso de las muestras irradiadas con UV pudo apreciarse que las partículas presentes no modificaron la detección ni se manifestó una actividad sinérgica con Cr(VI) como la observada con agua filtrada. En conclusión, la presencia de partículas en suspensión en agua no afectó la potencia genotóxica del cromo en el ensayo Rec de *Bacillus subtilis*. Estos resultados se confirmaron al agregar las partículas al agua destilada (Fig. 2 a), donde se obtuvieron respuestas similares al testigo.

Cuando se requiere la determinación de la actividad genotóxica de compuestos presentes en muestras de agua utilizando ensayos microbianos, dichas muestras deben ser sometidas a esterilización. Salvo en el caso de la esterilización por filtración, los procesos para destruir microorganismos emplean distintas formas de energía lo que puede llevar a la alteración de las características biológicas o químicas de los compuestos, dificultando o impidiendo su detección como genotóxicos. La influencia de estos procesos en la actividad mutagénica del Cr(VI) se estudió con los experimentos esquematizados en la figura 2 b. En el agua esterilizada por filtración el efecto resultante fue similar al de disminuir la concentración de cromato de potasio. Esto dificultó su detección ya que se está subestimando la concentración del agente genotóxico. No se observó en este caso un sinergismo similar al del filtrado previo al agregado del Cr(VI). Ambos resultados podrían explicarse por una retención de complejos Cr(VI)-partículas en el filtro. Dado que la presencia de partículas no influyó en la detección de la genotoxicidad en forma notable, se

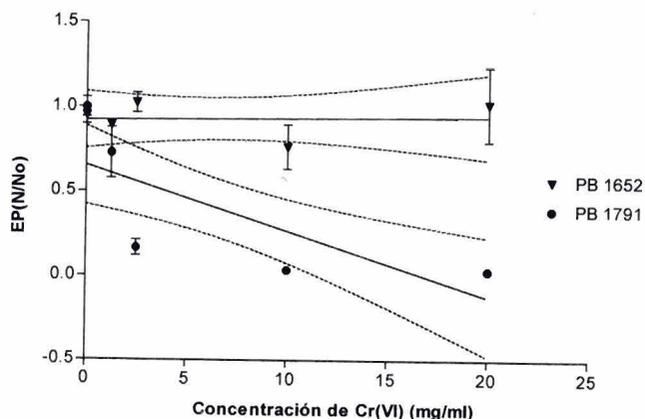


Fig. 8. Efecto de distintas concentraciones de cromato de potasio en agua destilada más partículas, sobre las cepas PB 1652 y PB 1791 de *Bacillus subtilis*. Ver pie de la figura 4

puede considerar que la unión Cr(VI)-partículas fue del tipo que no afecta la biodisponibilidad del ión (unión electrostática débil). La retención en los poros del filtro esterilizante se debería a efectos electrostáticos o al tamaño de partículas formadas (Perry 1950, Vian y Ocón 1957). Al igual que en los experimentos del grupo a (Fig. 2), el agua esterilizada con autoclave con Cr(VI) no mostró variaciones en la detección, indicando la escasa influencia de las partículas presentes en el agua cruda durante este proceso.

Un caso distinto se observó al irradiar con UV la muestra de agua cruda-cromato de potasio, donde se incrementó la eficiencia de detección. Si bien resultó difícil con los datos disponibles explicar la razón de este sinergismo, no observado cuando la muestra de agua se irradió previo al agregado de cromo, puede considerarse que se debió a la disponibilidad de otras formas genotóxicas. Con relación a este punto, Achterberg y Van den Berg (1994), sugirieron que al irradiar con UV aguas que contienen sustancias orgánicas se forman radicales libres poco estables.

Los contaminantes presentes en el agua de un río son muchos y es muy difícil separarlos para realizar estudios de genotoxicidad individuales. Los resultados de esta investigación, mostraron por una parte, que la fracción soluble del agua del Río de la Plata sería responsable de incrementar los efectos tóxicos no específicos y los genotóxicos de un metal pesado. Dicha actividad sinérgica se perdió fácilmente durante la esterilización con autoclave o el tratamiento con radiación ultravioleta. Por otra parte, existe la posibilidad de que las partículas arcillosas con cargas negativas permitan la adsorción de diferentes iones, entre ellos, metales pesados que se encuentran en equilibrio dinámico con los de la fracción soluble (API 1982). Una serie de experiencias en curso en nuestro laboratorio permitirán estimar la influencia del proceso de adsorción en la expresión de la genotoxicidad. El tratamiento

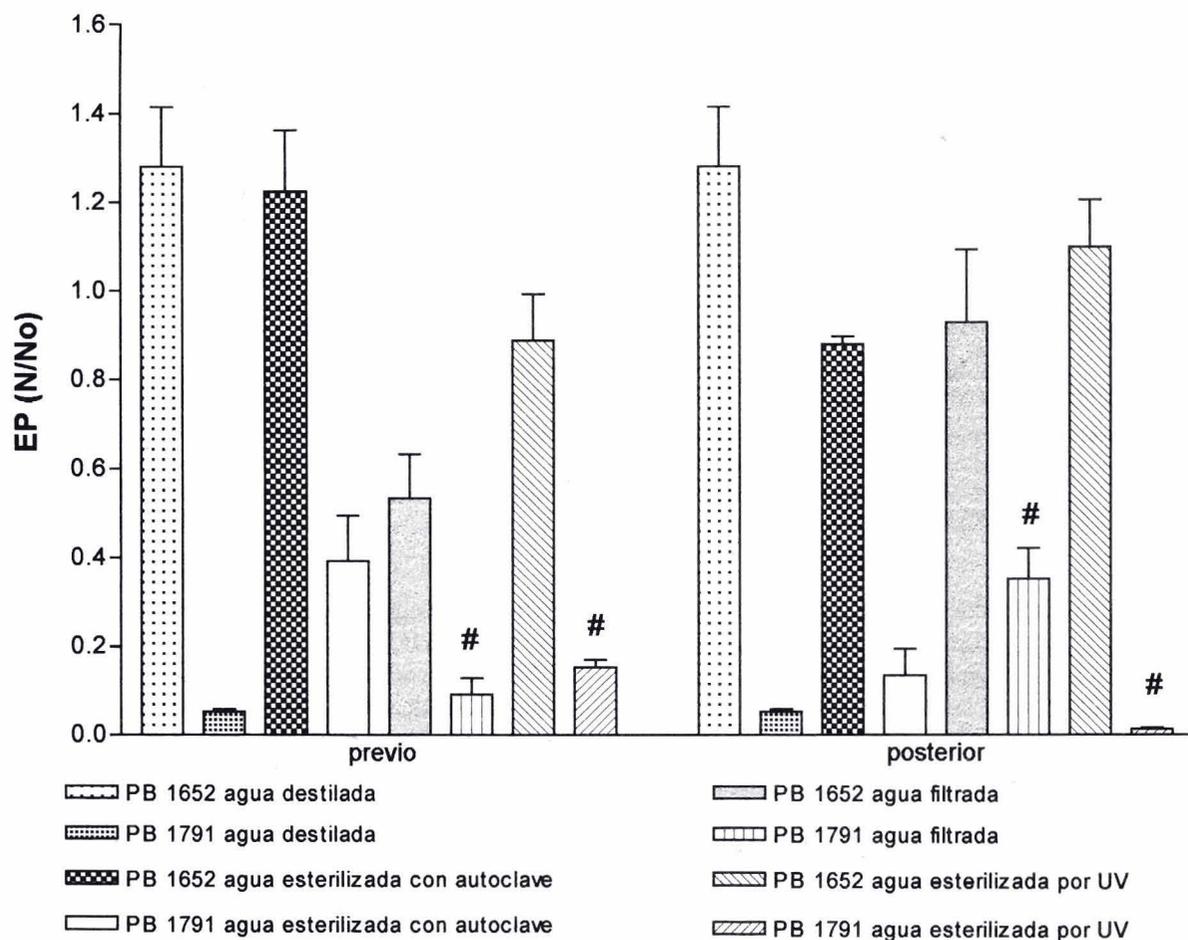


Fig. 9. Comparación de los efectos de cromato de potasio disuelto en agua de río previo o posterior a la esterilización en el ensayo Rec de *Bacillus subtilis*. La concentración de cromato de potasio utilizada fue de 10 mg/ml. EP: (N/No) = número de colonias promedio por placa de células sin tratar. # diferencia significativa entre tratamientos ($p < 0.05$)

de las muestras debe tenerse en cuenta al trabajar agua cruda. En las técnicas descritas por varios autores (De Flora *et al.* 1991, Rizzoni *et al.* 1995) se procede a esterilizar únicamente por filtración antes del ensayo biológico. En este estudio, particularmente en las experiencias donde se agregó el cromato de potasio previo a la esterilización de la muestra, la genotoxicidad del Cr(VI) se conservó mejor cuando se esterilizó con autoclave que en el filtrado donde la mutagenicidad fue mucho menor que en el testigo de agua destilada.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el programa de subsidios para la investigación de la Universidad de Buenos Aires (Subsidio FA 092 1994-1997).

REFERENCIAS

- Achterberg E. P. y Van den Berg C. M. G. (1994). In-line ultra-violet-digestion of natural water samples for trace metal determination using an automated voltammetric system. *Anal. Chim. Acta* 257, 213-232.
- API (American Petroleum Institute) (1982). *The sources chemistry, fate, and effects of chromium in aquatic environments*. Ecological Analysts, Inc., Washington D. C., 200 p.
- Auletta A. (1994). Overview of *in vitro* tests for genotoxic agents. En: *Handbook of carcinogen testing*. Noyes Publications, Nueva Jersey, pp. 58-82.
- Bianchi V., Celotti L., Lanfranchi G., Majone F., Marin G., Montaldi A., Sponza G., Tamino G., Vernier P., Zantedeschi A. y Levis A. G. (1983). Genetic effects of chromium compounds. *Mutat. Res.* 117, 279-300.

- De Flora S., Bagnasco M. y Zanachi P. (1991). Genotoxic, carcinogenic and teratogenic hazards in the marine environment, with special reference to the Mediterranean Sea. *Mutat. Res.* 258, 285-320.
- Finney J. D. (1978). *Statistical method in biological assay*. Charles Griffin, Londres, 508 p.
- García Arguijo A. R. (1994). *Contaminación del medio ambiente acuático: introducción a los ecosistemas hidricos y evaluación de las aguas del Rio de la Plata*. Ediciones Poligrafik Proamar, Buenos Aires, 158 p.
- Gómez-Arroyo S., Altamirano M. y Villalobos-Pietrini R. (1981). Sister-chromatid exchanges induced by some chromium compounds in human lymphocytes *in vitro*. *Mutat. Res.* 90, 425-431.
- Kowalska M., Güler H. y Cocke D. L. (1994). Interaction of clay minerals with organic pollutants. *Sci. Total Environ.* 141, 223-240.
- Léonard A. y Lauwerys R. R. (1980). Carcinogenicity and mutagenicity of chromium. *Mutat. Res.* 76, 227-239.
- López L. y Moretton J. (1996). Estudio de la genotoxicidad resultante de una mezcla compleja de origen ambiental mediante dos sistemas bacterianos. *Rev. Arg. Microbiol.* 28, 1-8.
- Matsui S. (1980). Evaluation of a *Bacillus subtilis* Rec-assay for the detection of mutagenesis which may occur in water environments. *Water Res.* 14, 1631-1619.
- Mazza G. y Galizzi A. (1980). Test di danno e riparazione del DNA (*rec-assay*) in *Bacillus subtilis*. En: *Mutagenesi ambientale metodiche di analisi. Test in vivo*. ETS, Roma, Vol 2, pp. 159-178.
- Mazza G. (1982). Evaluation of *Bacillus subtilis* "rec-assay" test with isogenic strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 43, 177-184.
- Moretton J., Baro P., Zelazny A., Nuccetelli M. A. y D'Aquino M. (1990). Estudio de genotoxicidad de las muestras de lodo de un río contaminado por efluentes industriales. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 6, 55-68.
- Nishioka H. (1975). Mutagenic activities of metal compounds in bacteria. *Mutat. Res.* 31, 185-189.
- Nusko R. y Heumann K. G. (1994). Chromium speciation with isotope dilution mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 286, 283-300.
- Perry J. H. (1950). *Chemical Engineers' Handbook third edition*. Mc Graw-Hill, Nueva York, 1942 p.
- Petrilli F. L. y De Flora S. (1978). Oxidation of inactive trivalent chromium to the mutagenic hexavalent form. *Mutat. Res.* 58, 167-173.
- Rizzoni M., Gustavino B., Ferrair C., Gatti L. G. y Fanno E. A. (1995). An integrated approach to the assessment of the environmental quality of the Tiber river in the urban area of Rome: a mutagenesis assay (micronucleus-test) and analysis of macrobenthic community structure. *Sci. Total Environ.* 162, 127-137.
- Vian A. y Ocón J. (1957). *Elementos de ingeniería química (operaciones básicas)*. Aguilar, Madrid, 2a. Ed., 812 p.