

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES**

**"CUAUTITLAN"**

**MONITOREO DE MUTAGENOS EN  
AGUAS RESIDUALES**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:**

**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

**P R E S E N T A**

**EDITH CIENFUEGOS ALVARADO**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**Q. F. B. J. JAVIER ESPINOSA AGUIRRE**

**Cuautitlán Izcalli, Estado de México**

**1985**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **INDICE.**

	<b>Pag.</b>
<b>INTRODUCCION</b>	<b>1</b>
- Riesgos para la salud asociadas a las aguas de riego	<b>3</b>
- Objetivos del estudio.	<b>6</b>
<b>DETECCION DE MUTAGENOS Y CARCINOGENOS EN AGUA.</b>	<b>10</b>
<b>DESCRIPCION DEL METODO DE AMES.</b>	<b>25</b>
<b>DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD MUTAGENICA DE UN LOTE DE MUESTRAS DE AGUA RESIDUAL Y RENOVADA.</b>	<b>41</b>
- Método para la determinación de mutágenos en agua residual y renovada en Ciudad Universitaria.	
I. SELECCION DE LOS PUNTOS DE MUESTREO.	<b>42</b>
II. ETAPAS DEL ENSAYO DE MUTAGENESIS.	<b>43</b>
<b>RESULTADOS.</b>	<b>58</b>
<b>DISCUSION.</b>	<b>69</b>
<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.</b>	<b>82</b>
<b>APENDICE.</b>	<b>86</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.</b>	<b>94</b>

## INTRODUCCION.

En los últimos años, se ha manifestado en el mundo una inquietud cada vez mayor por el peligro que representa -- para la humanidad, las mutaciones génicas y aberraciones cromosómicas que pueden ser causadas por la exposición a mezclas de compuestos químicos presentes en el ambiente. Para estimar el riesgo que representan estas sustancias para las poblaciones expuestas, se ha hecho por lo tanto necesario establecer en que medida estos agentes químicos son capaces de dañar el material genético y cuales son las manifestaciones de dicho efecto. Ahora bien, ya que difícilmente se pueden hacer investigaciones directamente en humanos a través de estudios epidemiológicos, costosos y tardados, se han desarrollado diversos sistemas biológicos de prueba para la identificación de mutágenos, como los que se muestran en la Tabla I.

La presencia de mutágenos en el ambiente preocupa tanto por la posibilidad de que se incrementen los padecimientos de tipo hereditario, como porque aumente el número de casos de cáncer, ya que se ha encontrado que un gran número de los agentes que producen cáncer también inducen mutaciones.

Es importante mencionar que los carcinógenos ambientes

T A B L A    1

CARACTERISTICAS DE LOS SISTEMAS  
BIOLOGICOS PARA IDENTIFICAR MUTAGENOS.  
(6).

S I S T E M A .	ALTERACION IDENTIFICADA.	DURACION APROX. DE UNA PRUEBA.	FACTORES LIMITANTES.
ADN	CAMBIOS DE LA MOLECULA	2 a 3 DIAS	COSTO DEL EQUIPO.
VIRUS	MUTACIONES GENICAS INDUCCION DE PROFAGOS.	2 a 3 DIAS	MINIMOS.
BACTERIAS	MUTACIONES GENICAS	3 a 5 DIAS	MINIMOS.
HONGOS	MUTACIONES GENICAS SEGREGACION CROMOSOMICA DEFECTUOSA.	1 a 3 SEMANAS	MINIMOS.
ENSAYO VIA HOSPEDERO CON BACTERIAS, HONGOS Y CULTIVO DE CEL. DE MAMIFERO.	LAS CITADAS EN CADA UNO DE LOS ANTERIORES.	1 a 5 SEMANAS	REQUERIMIENTO DE BIOTERIO.
PLANTAS	MUTACIONES GENICAS, ALTERACIONES CROMOSOMICAS, NUMERICAS Y ESTRUCTURALES.	1 a 5 SEMANAS	MINIMOS.
INSECTOS	MUTACIONES GENICAS, ALTERACIONES CROMOSOMICAS, NUMERICAS Y ESTRUCTURALES.	2 a 7 SEMANAS	MINIMOS.
CULTIVO DE CELULAS DE MAMIFERO.	MUTACIONES GENICAS, ALTERACIONES CROMOSOMICAS, NUMERICAS Y ESTRUCTURALES.	2 a 5 SEMANAS	COSTO ALTO DE MATERIAL Y DEL EQUIPO. USO DE TECNICAS LABORIOSAS. (MUTACIONES GENICAS), INTERPRETACION CITOGENETICA.
MAMIFEROS	MUTACIONES GENICAS, ALTERACIONES CROMOSOMICAS, NUMERICAS Y ESTRUCTURALES. TRANSMISION DE MUTACIONES A LOS DESCENDIENTES.	2 a 7 MESES	COSTO ALTO DE INVESTIGACION EN ALGUNAS PRUEBAS, REQUERIMIENTO DE BIOTERIO.
HUMANOS	C E SOMATICAS L U L GERMINALES A S ALTERACIONES CROMOSOMICAS NUMERICAS Y ESTRUCTURALES. CROMOSOMA "Y" EN EXCESO. TRANSMISION DE MUTACIONES A LOS DESCENDIENTES.	6 SEMANAS    1 a 2 AÑOS	CONTROL DE OTRAS VARIABLES OBTENCION DE DONADORES, PROBLEMAS ETICOS.   NECESIDAD DE ESTUDIOS EPIDEMIOLOGICOS.

tales, sobre todo de tipo químico, parecen ser los responsables del 50-90% de los casos de cáncer en humanos. A la fecha han sido reconocidos alrededor de 70 000 compuestos químicos diferentes de uso común (solventes, plaguicidas, pesticidas, aditivos, colorantes, tintes, saborizantes, fármacos, etc.) y aproximadamente otros 1 000 compuestos nuevos son sintetizados anualmente; muchos de los cuales posiblemente pueden tener directa o indirectamente efectos genotóxicos, carcinogénicos o teratogénicos. Dichos compuestos representan un riesgo para la población puesto que se difunden en el ambiente y contaminan el agua, aire, suelos y alimentos (9).

La literatura abunda en trabajos en los que se reporta la capacidad de agentes químicos de inducir los efectos tóxicos anteriormente mencionados, cuando se expone a ellos a organismos de prueba separadamente; en forma controlada y a altas dosis.

Pocos estudios refieren sin embargo los efectos provocados por bajas concentraciones de compuestos químicos que se encuentran en mezclas complejas, a pesar de que esta es la forma en que se dá la contaminación ambiental en nuestros días.

En la actualidad es hacia la evaluación de los ries

gos derivados de la exposición a múltiples contaminantes en bajas concentraciones, a donde se orienta la investigación en este campo. Aunque, por el momento, los trabajos publicados son totalmente heterogéneos en su diseño y metodología. Esto es particularmente cierto en lo que respecta a la evaluación de la genotoxicidad de compuestos químicos presentes en el agua de consumo humano.

#### **RIESGOS PARA LA SALUD ASOCIADOS A LAS AGUAS DE RIEGO.**

Las aguas que se emplean en la actualidad para la irrigación de los campos agrícolas, se encuentran en su mayoría contaminadas, sobre todo si se trata de aguas superficiales. Contribuyen a contaminarlas los efluentes industriales, las aguas de desecho municipal y los mismos productos químicos empleados en exceso en los cultivos, como son los plaguicidas y fertilizantes. A lo anterior se suman además, agentes patógenos causantes de enfermedades infecciosas que se transmiten por el agua. De ahí que la salud humana se encuentre en peligro de sufrir daños, por la ingesta de agua o alimentos contaminados con productos potencialmente tóxicos o con gérmenes.

En las zonas urbanas el agua que se emplea en el -

riego de áreas verdes no está exenta de riesgos, ya que además de las fuentes de contaminación descritas, la adición de cloro constituye una fuente generadora de productos peligrosos, que se forman al reaccionar éste con los compuestos orgánicos presentes en el agua.

En virtud de lo expuesto son numerosos los trabajos publicados y los que se desarrollan en la actualidad, para valorar los riesgos para la salud, los suelos, los productos agrícolas y otros elementos de los ecosistemas, derivados de la presencia de contaminantes químicos en el agua de riego.

Cabe señalar que las perspectivas de abastecimiento de agua para el año 2 000, involucran el reuso de las aguas residuales, que una vez tratadas servirán para la agricultura, industria e inclusive si es necesario como agua potable; por lo que esta agua deberá cubrir ciertos requisitos de calidad: física, química y biológica con el fin de prevenir daños a la salud de la población.

Por su parte, el acelerado crecimiento demográfico de la población en México y la formación de grandes centros industriales; han venido a acrecentar en gran medida el problema de la calidad y cantidad del agua potable disponible pa

ra consumo humano y usos municipales. Asimismo la distribución geográfica de los recursos acuíferos, determina que la localización de las fuentes de abastecimiento no coincidan con los centros de mayor demanda para uso doméstico, agrícola o industrial. Por lo anterior, es necesario tomar medidas en cuanto al reuso de aguas residuales mediante el apoyo de métodos de tratamiento adecuados para satisfacer ciertas necesidades como lo es el riego de áreas verdes.

En este momento en la Ciudad de México se cuenta con 10 plantas de tratamiento que opera de Departamento del Distrito Federal (D.D.F.) en las cuales son tratados  $4.36 \text{ m}^3/\text{seg}$  de aguas residuales, de los cuales  $0.04 \text{ m}^3/\text{seg}$  corresponden a la producción de la planta de Ciudad Universitaria. -- Las aguas provenientes de ésta última son utilizadas para el riego de 12.421 hectáreas de áreas verdes; teniéndose programada una segunda etapa de 15.1204 hectáreas para riego; y -- una tercera con la cual se estaría regando casi la totalidad de áreas verdes de Ciudad Universitaria.

Las aguas residuales de Ciudad Universitaria se -- pueden considerar como una mezcla de desecho de tipo doméstico y de tipo industrial. Esto se debe a que una parte proviene de los servicios sanitarios y otra parte de los laborato-

rios de Ciudad Universitaria. Mientras que las aguas de desecho provenientes de la zona de Copilco el Alto se consideran exclusivamente de tipo doméstico ya que no existe ninguna industria en esa zona.

La planta de tratamiento de Ciudad Universitaria - cuenta con tres procesos de tratamiento: lodos activados, filtro rociador o percolador y biodisco. El agua residual tras- de pasar por uno u otro de esos procesos es clorada antes de su distribución. La calidad del agua renovada que se obtiene debe de llenar los criterios establecidos en México para su- uso en irrigación de áreas verdes. Por lo anterior, se controlan diversos parámetros físico-químicos y su calidad micro- biológica.

#### **OBJETIVOS DEL ESTUDIO.**

El presente estudio tiene como propósito establecer las bases para el empleo de una prueba adicional a las cita- das, que determine la presencia en el agua renovada de agen- tes capaces de inducir mutaciones y cáncer. Se ha selecciona- do para ello la prueba desarrollada por el Dr. Bruce Ames, pa- ra detectar mutágenos mediante el empleo del sistema bacteria no de *Salmonella typhimurium*. Esta prueba ha sido ampliamente

utilizada para la evaluación mutagénica de una gran variedad de compuestos químicos y en particular, en el monitoreo de mutágenos en agua.

Este trabajo pretende también contribuir a identificar los métodos alternativos adecuados para la concentración y extracción de los compuestos químicos mutagénicos presentes en el agua. Por lo tanto se ha considerado conveniente realizar una revisión de la literatura para identificar los métodos y técnicas empleados en el monitoreo de mutágenos y carcinógenos en agua.

Dado lo anterior, pueden definirse como los objetivos específicos del estudio:

1. Referir los trabajos publicados sobre la detección de mutágenos y carcinógenos en agua.
2. Describir el Método de Ames y sus alcances y limitaciones para la detección de mutágenos y carcinógenos en agua.
3. Determinar la actividad mutagénica en un lote de muestras de agua residual y renovada proveniente de la Planta de Tratamiento de Ciudad Universitaria.

4. Proponer con base en la revisión de la literatura y los resultados de la valoración mutagénica del agua de la Planta de Tratamiento de Ciudad Universitaria, un protocolo para el monitoreo de mutágenos en agua y la investigación de aspectos críticos.

## DETECCION DE MUTAGENOS Y CARCINOGENOS EN AGUA.

En lo que se refiere a los contaminantes del agua, el descubrimiento de hidrocarburos halogenados y otros compuestos potencialmente carcinogénicos en agua potable ha causado también una gran preocupación tanto en los grupos científicos como en los responsables del suministro de este elemento a la población. Habiéndose identificado como uno de los problemas para realizar las pruebas de mutagenicidad y carcinogenicidad de las sustancias orgánicas presentes en el agua, el que éstas se encuentren en bajas concentraciones, y ciertos sistemas de prueba como los bacterianos no tienen suficiente sensibilidad para detectarlas si no se les concentran previamente. Por ello se ha visto la necesidad de recurrir a métodos de concentración y extracción de compuestos orgánicos, como lo muestra la Tabla 2.

Bull (3) cita por ejemplo, que Heuper y Rucchoft (1954) probaron extractos obtenidos mediante la técnica de carbón-cloroformo, a partir de aguas negras de canal que contenían desechos de una refinería de petróleo. Dichos autores hicieron un ensayo de carcinogenicidad utilizando ratones negros machos de la cepa C<sub>57</sub> aplicando los extractos por vía tóptica, y después de un año los resultados obtenidos muestra-

T A B L A 2

MUTAGENICIDAD Y CARCINOGENICIDAD DE MEZCLAS COMPLEJAS DE SUSTANCIAS QUIMICAS PRESENTES EN EL AGUA.

TIPO DE AGUA	VOLUMEN DE LA MUESTRA.	METODOS DE CONCENTRACION Y/O EXTRACCION.	MAGNITUD DE LA CONCENTRACION O DEL RESIDUO.	EFECTO ESTUDIADO Y/O ENSAYO.	RESULTADO	REFERENCIA
Potable (superficial y subterránea).	-	-	-	Transformación celular BALB/3T3 Mutagénesis (Ames).	+	3
Potable (cloro vs ozono).	-	Osmosis inversa.	-	Iniciación-Promoción de tumores en ratón.	+	3
Potable (pipa)	60 litros.	Columnas de espuma de poliuretano flexible.	0.1 ml de extracto equivalente a 100 ml de agua.	Mutagenicidad (Ames).	+	32,19
Potable	-	-	-	Toxicidad y Carcinogenicidad de Trihalometanos. Estudio Epidemiológico en humanos	+	2
Potable	50 000 - 100 000 galones.	Carbón-cloroformo y resinas XAD.	125 g a partir de 50 000 galones.	Ensayo <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> con <u>ma</u> míferos (Carcinogénesis). Mutagénesis (Ames)	+	20
Potable	250 000 galones	Carbón activado	150 - 170 gramos.	Promoción <i>in vivo</i> de tumores en ratón.	+	19
Potable	-	Ninguno	-	Mutagénesis (fluctuación Ames)	+	10
Potable	200 litros.	Resinas Amberlite XAD-2, 4, 7 y 8.	Extractos equivalentes a 0.5 lt de agua.	Mutagénesis (Ames)	+	19
Potable	5-25 litros	XAD-4 y XAD-8	Extractos equivalentes a 50 ml de agua.	Mutagénesis (Ames)	+	19
Potable	20 litros	Resinas Amberlite - XAD-2.	3 000 veces, se probó como mínimo lo equivalente a 12 ml.	Mutagénesis (Ames)	+	19
Potable (superficial y subterránea) de 5 ciudades.	2 000 - 12 600 litros.	Osmosis inversa XAD-2 Osmosis inversa XAD-2	0.4 g 3.0 g 1.0 g 9.0 g	Mutagénesis (Ames) Carcinogénesis (Transformación-- <i>in vitro</i> de fibroblastos de ratón clones 1-13)	+	17,19

TABLA 2 (continuación).

TIPO DE AGUA	VOLUMEN DE LA MUESTRA	MÉTODOS DE CONCENTRACION Y/O EXTRACCION.	MAGNITUD DE LA CONCENTRACION O DEL RESIDUO.	EFEECTO ESTUDIADO Y/O ENSAYO.	RESULTADO	REFERENCIA
Potable	200 litros	Cromatografía líquida de alta resolución usando resinas XAD-2, XAD-7.	Extractos equivalentes a 20-100 litros de agua.	Mutagénesis (Ames)	+	21
Potable (subterráneas).	200 litros	Osmosis inversa, líquido líquido (cloruro de metileno-pentano) y XAD-2.	Se probaron: 100 - 500 µg de extracto.	Iniciación-Promoción de tumores en ratones Senecar machos.	+	27
Sin Tratamiento Cruda	30 litros. 1, 10 y 20 ml.	Columnas de espuma de poliuretano flexible. Ninguno.	0.1 ml de extracto equivalente a 100 ml de agua.	Mutagénesis (Ames)	+	32.19
Sin Tratamiento	250 000 galones	Carbón activado	150-170 gramos	Promoción <i>in vivo</i> de tumores en ratón	+	19
Sin Tratamiento	200 litros	Resinas Amberlite XAD-2 + Carbón activado 300.	Extractos equivalentes a 0.5 litros.	Mutagénesis (Ames)	+	19
De río	160 litros	-	7 000 veces	Mutagénesis (Ames) Cáncer- Estudio Epidemiológico	+	13
Río Mississippi y Louisiana.	-	Ninguno.	-	Mutagénesis (Ames)	+	19
Río Rhin	5-25 litros	Resinas Amberlite XAD-4 y XAD-8.	Extractos equivalentes a 50 ml de agua.	Mutagénesis (Ames)	+	19
Río Cincinnati	400 galones	Osmosis inversa y liofilización.	1:10	Mutagénesis (Difusión/Ames)	+	19
De lago	20 litros	Resinas Amberlite XAD-2.	3 000 veces, probaron como mínimo extractos equivalentes a 12 ml de agua.	Mutagénesis (Ames)	+	19
Residual (Refinería)	-	Carbón-cloroformo	-	Carcinogénesis ( Ratones negros machos cepa C <sub>57</sub> ).	+	3

TABLA 2 (continuación).

TIPO DE AGUA	VOLUMEN DE LA MUESTRA.	MÉTODOS DE CONCENTRACION Y/O EXTRACCION.	MAGNITUD DE LA CONCENTRACION O DEL RESIDUO.	EFECTO ESTUDIADO Y/O ENSAYO.	RESULTADO REFERENCIA
Residual (Municipal)	-	Ninguno	-	Mutagénesis (Ames)	+ 19
Residual	100 litros	Resinas de intercambio iónico, catiónico y XAD-2 o XAD-7.	-	Mutagénesis (Ames)	+ 19
Con desechos industriales.	2 litros y 20 galones	Benceno/isopropanol	Extractos equivalentes a: 100, 200 y -- 400 ml de agua.	Mutagénesis (Ames)	+ 5
Con desechos industriales.	3 litros	Osmosis inversa Resinas Amberlite XAD-2 Liofilización	200 mililitros 600 veces 300 veces	Mutagénesis (Ames)	- + + 30
Con desechos industriales, agrícolas y municipales.	200 litros	Osmosis inversa, seguida de extracción líquido-líquido con cloruro de metileno y pentano y Resinas Amberlite XAD-2.	100 y 500 µg	Iniciación y Promoción de tumores en piel de ratón Senecar macho.	+ 27

ron ser positivos (aparición de tumores malignos). Este estudio no dió evidencia de la existencia de carcinógenos en agua potable. De 1 152 compuestos químicos que se han identificado en E.U.A. en extractos provenientes de agua potable, algunos de ellos se sabe producen tumores en humanos o en animales de experimentación (3). La cloración de agua rica en compuestos orgánicos genera a su vez productos halogenados conocidos por su capacidad de inducir cáncer en animales de experimentación (3). Existen estudios que sugieren una correlación entre altas concentraciones de esos compuestos en agua potable clorada y una elevada incidencia por cáncer gastrointestinal y del tracto urinario en humanos (3).

Extractos de compuestos químicos provenientes de muestras de agua han mostrado transformar células BALB/3T3 y otros han sido mutagénicos en la prueba de Ames. Asimismo se ha dado a conocer, el riesgo que implican altas concentraciones de agentes químicos orgánicos sintéticos en agua superficial y subterránea, y de compuestos naturales como son los ácidos fúlvico y húmico cuyos productos de reacción con el cloro son mutagénicos. Sustancias desprendidas de las tuberías de la red hidráulica como son el plomo, asbestos e hidrocarburos policíclicos aromáticos, o bien generadas por el tratamiento químico del agua como polielectrolitos, coagulan

tes, o anticorrosivos se sabe que contribuyen también al desarrollo de enfermedades en humanos (3).

Por su parte, extractos orgánicos de agua desinfectada con cloro u ozono, obtenidos por ósmosis inversa y libres de trihalometanos (THM's), han mostrado actividad como promotores e iniciadores de papilomas en piel de ratón.

Diversos estudios con cloro y ozono sugieren un peligro potencial asociado a la presencia de los compuestos citados, por lo que es necesario evitar su formación o reducir la exposición a los mismos (14).

Asimismo, un estudio efectuado en 20 ciudades de Holanda mediante el uso de pruebas de mutagenicidad con las cepas de *Salmonella typhimurium* TA 98 y TA 100 reveló que los extractos orgánicos obtenidos a partir de 160 litros de agua de río tras una concentración de 7 000 veces, mostraron ser mutagénicos. En este estudio se encontró que los niveles de Trihalometanos en agua potable correlacionan con elevados índices de mortalidad por cáncer de esófago y estómago en humanos (hombres), pero no de vejiga. Los autores concluyen que los alquilbencenos dan una mejor correlación con cáncer de esófago, estómago e hígado que la presencia de Trihalometanos

y que esto no es igual en mujeres que en hombres. Sin embargo, en este estudio no se tomaron en cuenta otros factores de interferencia como son los alimentos, industrialización, urbanización, migración, etc. La correlación con cáncer de pulmón, solo se encontró en donde el agua provenía de una zona de elevada industrialización (13).

Experimentos en animales han dado a conocer la toxicidad y carcinogenicidad de los Trihalometanos, en particular del bromoformo. Estudios epidemiológicos parecen indicar una alta correlación entre concentraciones elevadas de Trihalometanos en agua potable y cáncer en humanos, específicamente -- con respecto a Trihalometanos bromados y determinados tipos -- de cáncer (2).

Se han realizado también estudios en los cuales no se ha recurrido a concentrar los compuestos presentes en el agua, sino que se han usado pruebas de fluctuación utilizando las cepas de *Salmonella typhimurium* TA 98, TA 100 y TA -- 1535, habiéndose encontrado una leve mutagenicidad para la -- cepa TA 100 usando agua de la llave. Pruebas preliminares -- con bacterias, han mostrado que los hidrocarburos alifáticos clorinados aislados de agua potable, son mutagénicos (10).

En estudios realizados sobre la generación de mutágenos en el proceso de distribución del agua (pipas), en 1974 Kopfler utilizó columnas de espuma de poliuretano flexible y concentró los compuestos orgánicos pasando a través de las columnas 30 litros de agua cruda o 60 litros de agua tratada, eluyendo sucesivamente con 20 ml de acetona y 75 ml de benceno, encontrando mutagenicidad positiva en el sistema de Ames para la cepa TA 98 acoplada a un sistema enzimático<sup>1</sup> (S9). -- Probó también agua sin tratamiento previo ( no concentrada ) en ensayos de mutagenicidad en las cepas TA 98 y TA 100 † S9 de *Salmonella typhimurium*, incorporando en cada caja de Petri cantidades de 1, 10 y 20 ml. de agua; encontrando mutagenicidad para la cepa TA 100 -S9 cuando se agregaron 20 ml de agua esta mutagenicidad era leve y solo se duplicaba la reversión espontánea de la cepa. Los resultados revelan que en la red de distribución de agua (pipas) se introducen mutágenos (32, 19).

La revisión efectuada por Loper (19) cita a su vez los siguientes trabajos: Pelon y colaboradores (1977, 1978), utilizando agua sin ningún procesamiento previo en 5 cepas de *Salmonella typhimurium* observaron un bajo nivel de mutagenicidad, la mayoría tenía un incremento de colonias revertantes mucho menor de dos veces la frecuencia de reversión ob--

servada en el control. Además las respuestas eran variables, se tenía una respuesta no lineal a la dosis, dificultad para encontrar una significancia estadística por la prueba de t y los efectos de las trazas de histidina en los valores dados - hacía imposible interpretar los resultados (19).

Por lo expuesto anteriormente, para llevar a cabo las pruebas de genotoxicidad en bacterias, ha sido una práctica común concentrar los agentes químicos contenidos en el agua, utilizando diferentes técnicas de concentración de los compuestos orgánicos, partiendo de muestras con diferentes volúmenes de agua.

En los años 1950-1960 por ejemplo se recuperaban los compuestos orgánicos mediante la técnica de carbón-cloroforno y resinas XAD empleando para ello muestras de 100 000 o 50 000 galones de agua potable. Por lo general se lograban extraer 125 g de residuos orgánicos partiendo de 50 000 galones de agua potable en subfracciones con los cuales se obtuvieron resultados positivos, usando ensayos *in vitro* e *in vivo* en mamíferos y se observó una leve mutagenicidad en el ensayo de Ames (20). Sin embargo, usando carbón activado para concentrar los compuestos orgánicos, se ha visto que algunos compuestos no son recuperables por medio de esta técnica. No obstante se

ha utilizado el carbón activado en los sistemas de tratamiento de aguas para retener contaminantes con buenos resultados.

Se han descrito en los últimos años estrategias con el fin de tener una buena recuperación de los compuestos orgánicos al ser extraídos y concentrados, algunos de ellos se mencionan a continuación:

Midleton (1962) usó carbón activado, eluyendo con cloroformo y alcohol etílico, haciendo pasar 250 000 galones, obteniendo 150-1 700 g de residuos orgánicos. Rosen (1976) usando esta técnica de extracción probando agua cruda y potable en estudios *in vivo* encontró formación de tumores malignos en ratón (19).

Junk (1974); Pietrz y Chu (1977) usaron resinas Amberlite XAD-2, XAD-4, XAD-7 y XAD-8 resinas no iónicas para concentrar los compuestos orgánicos a partir de 200 litros de agua potable. Glatz (1978), usó resinas XAD-2 combinado con carbón activado 300 eluyendo con éter etílico a partir de 200 litros de agua cruda y probando extractos correspondientes a 15 litros de agua cruda por caja de Petri, usando para ello 5 cepas de *Salmonella typhimurium*; de 14 muestreos de agua cruda efectuados 4 fueron positivos para una o más cepas; a la -

vez que extractos de 4 fuentes de agua terminada fueron positivos (19).

Johnston y Hemen (1979) usaron tres columnas consecutivas para concentrar orgánicos a partir de 8 litros de agua superficial que contenían: silica gel, resinas de intercambio catiónico y resinas de intercambio aniónico; las columnas se eluyeron separadamente y reportan que el material recuperado fué positivo en la prueba de Ames (19).

Paired (1980) concentró 20 litros de agua cruda de lago y agua potable tratada usando resinas XAD-2 eluyendo con 20 ml de acetona hasta obtener un concentrado 3 000X que se disolvió en DMSO para ser probado y se encontraron bajos niveles de mutagenicidad usando el ensayo de Ames con las cepas TA 98 y TA 100 con y sin activación metabólica. En los meses de mayo a octubre realizaron distintos muestreos, detectándose una alta mutagenicidad en los del mes de mayo con un mínimo de extracto orgánico correspondiente a 12 ml de agua potable (19).

Kreijl (1980) probó extractos orgánicos obtenidos a partir de 5-25 litros de agua del río Rhin en resinas XAD-4 y XAD-8 eluyendo con acetona o dimetilsulfóxido (DMSO) y obser

vó una mutagenicidad significativa con la cepa de *Salmonella typhimurium* TA 98 + S9 probando extractos orgánicos correspondientes a 50 ml de agua. Y se observó mutagenicidad probando extractos de agua del río Rhin usando cloro como desinfectante en las cepas TA 98 y TA 100 - S9 (19).

Por su parte, Baird (1980) empleó resinas de intercambio iónico y catiónico, XAD-2 o XAD-7 para concentrar los compuestos contenidos en 100 litros de agua residual encontrando mutagenicidad en las cepas de *Salmonella typhimurium* TA 98 y TA 100 sin activación metabólica (19).

Kopfler (1977) concentró a su vez las sustancias -- presentes en 400 galones de agua del río Cincinnati por el método de ósmosis inversa 1/10, los extractos se recuperaron usando éter de petróleo, dietil éter y acetona, se liofilizaron y se resuspendieron en DMSO para ser probados en las cepas de *Salmonella typhimurium* TA 98 y TA 100 + S9 por difusión en agar; encontrándose mutagenicidad en la cepa TA 100 - S9 (19).

Loper (1978) y Lang (1980) concentraron las sustancias orgánicas contenidas en 12 600 a 2 000 litros de agua potable superficial y subterránea por el método de ósmosis -

inversa tomando muestras durante 3 meses y fraccionando con extracciones en las que se usó éter de petróleo, dietil éter y acetona. Dichas fracciones se concentraron y fueron disueltas en DMSO para ser probadas en volúmenes de 0.01 - 0.3 ml/caja, además usaron también resinas XAD-2 obteniendo fracciones con hexano, etil éter y acetona. Paralelamente, se realizó la cuantificación química de los compuestos presentes en los extractos. Los extractos obtenidos de agua de 5 ciudades se probaron en *Salmonella typhimurium* cepas TA 98, TA 100, TA 1538 y TA 1535 con y sin activación metabólica; y en ensayos de transformación *in vitro*, de fibroblastos de ratón BALB/3T3 clonas 1-13 de Kakanuga(1973). Las pruebas de transformación *in vitro* resultaron muy complicadas debido a la toxicidad celular de los concentrados, sin embargo, se obtuvo una mayor correlación entre un efecto positivo en esta prueba y la técnica de ósmosis inversa. Lo anterior puede resultar sorprendente si se toma en cuenta que la mayor recuperación de sustancias orgánicas se logró con el método de resinas XAD. En cuanto a la prueba de Ames se encontró mutagenicidad para las cepas TA 98 y TA 100 -S9 y en algunos casos para la TA 1538. Los extractos de resinas XAD-2 mostraron toxicidad o efectos antagónicos. Los resultados obtenidos del estudio comparativo de mutagenicidad y transformación maligna no mostraron una correlación entre las dos pruebas (17 y 19).

Loper y Tabor (1983) utilizaron un método de concentración el cual tiene la ventaja de poder aislar residuos con un gran rendimiento, utilizando cromatografía líquida de alta resolución, con columnas empacadas con resinas XAD-2 y XAD-7, usando cloruro de etileno como eluyente. Obtuvieron extractos orgánicos a partir de 70-500 litros de agua potable y fueron disueltos en DMSO para ser probados en el ensayo de Ames (cepas TA 98 y TA 100  $\pm$  S9) extractos equivalentes a 20 a 100 litros de agua. Dichos autores aislaron una sustancia mutagénica para las cepas TA 100 y TA 98 de *Salmonella typhimurium* dependiente de activación metabólica, la cual era un hidrocarburo alifático insaturado policlorinado. Observaron, que las concentraciones de extractos orgánicos en las que se detectó una mutagenicidad significativa eran aquellas equivalentes a 10-20 litros de agua potable (21).

Commoner y colaboradores (1978) analizaron 24 muestras de agua colectada de 16 diferentes plantas industriales, inicialmente obtuvieron extractos a partir de 2 litros de agua con el método de extracción benceno/isopropanol a pH 2.5 y pH 11. Los extractos se probaron disueltos en DMSO en *Salmonella typhimurium* TA 1538  $\pm$  S9.

De 31 extractos ácidos, (pH 2.5, equivalentes a 100-250 ml de agua/caja), 8 fueron positivos con activación

metabólica, y su actividad mutagénica se tradujo en incrementos comprendidos entre 2.5 y 24.6 veces la frecuencia de mutación espontánea.

De una planta de tratamiento de agua Industrial se concentraron a su vez 20 galones y se probaron extractos equivalentes a 400 ml de agua/caja en la cepa TA 1538 +S9, los resultados fueron positivos en las fracciones: ácida (pH 2.5), neutra (pH 7) y alcalina (pH 11), obteniéndose incrementos de 37.1, 95.5 y 3 en la frecuencia de mutantes con las fracciones respectivas (5).

Robinson y colaboradores (1980), probaron la capacidad iniciadora y promotora de muestras de agua de 5 ciudades: Miami (agua subterránea no contaminada), New Orleans (agua superficial con desechos industriales), Ottumwa (agua superficial con desechos agrícolas), Philadelphia (agua superficial con desechos minicipales) y Seattle (agua superficial no contaminada). Obtuvieron para ello extractos a partir de 200 litros de agua por el método de ósmosis inversa (OR); mediante el uso de : membranas de acetato de celulosa (CA) y membranas de nylon, se extrajeron los compuestos orgánicos con pentano y cloruro de metileno. La parte acuosa se ajustó a  $\text{pH} < 2$  con HCl y se extrajo con cloruro de metileno. Los residuos acuo--

sos se pasaron a través de resinas XAD-2 y se eluyeron con etanol al 95%.

Se realizaron estudios de promoción e iniciación de tumores en piel de ratones *Senecar* machos de 8-10 semanas de edad a los cuales se les administraron los extractos en un período de 2 semanas a razón de 6 inyecciones (vía intraperitoneal) equivalentes a 150 mg de extracto/Kg de peso. Se utilizaron 60 ratones por muestra, después de 1 año los animales se sacrificaron para una evaluación histopatológica. También probaron en otro grupo de ratones *Senecar* extractos de OR (20 ratones) y XAD (30 ratones) aplicándoles tópicamente en el lomo una dosis equivalente a 100 µg/ ratón del extracto de OR - tres veces por semana durante 18 semanas y del extracto de XAD 500 µg/ratón 3 veces por semana durante 18 semanas. Los ratones se sacrificaron después de 1 año para observar la incidencia de tumores.

Los autores realizaron un tercer estudio en las mismas condiciones que el segundo pero aplicaron tópicamente los extractos 3 veces por semana durante 20 semanas.

Los resultados indican que un número significativo de ratones presentaron papilomas con extractos de OR (Ottumwa)

y XAD (New Orleans). Una respuesta marginal se obtuvo con extractos de XAD (Ottumwa) y XAD (Philadelphia). Se observó una respuesta baja probando extractos de XAD (Miami), OR (New Orleans) y XAD (Seattle). Las demás muestras fueron negativas - (27).

Ross y colaboradores (1980) estudiaron los compuestos orgánicos de efluentes industriales para lo cual usaron 3 métodos de concentración: Resinas XAD-2, ósmosis inversa y -- liofilización: los extractos fueron probados en el ensayo de Ames por incorporación en agar con las cepas TA 98 y TA 100 † S9. Dichos extractos fueron obtenidos partiendo de 3 litros - de agua y el factor de concentración para cada método fué de: 600 veces para las resinas de XAD-2; 300 veces para la liofilización y se obtuvieron 200 ml de 3 litros empleando ósmosis inversa.

Los extractos orgánicos provenientes de resinas -- XAD-2 y liofilización mostraron una respuesta positiva para la cepa TA 98 -S9 mientras que en el caso de la OR los resultados fueron negativos. También se concentraron mutágenos conocidos (naranja de acridina, Benzo(a)pireno y 2-Nitrofluoreno) en los 3 métodos de concentración con un factor de 200 - veces y resultaron ser positivos sin activación metabólica - en los 3 sistemas (30).

Pereira y colaboradores (1980) han recomendado una batería de pruebas para el monitoreo de mutágenos y carcinógenos en mezclas complejas ambientales como lo es el agua, - entre ellas sobresalen 2 bioensayos: el Método de Ames y la prueba de promoción e iniciación de papilomas en piel de ratón (prueba sensible a hidrocarburos policíclicos aromáticos y nitrosaminas). Las cuales a pesar de tener discrepancias - muestran una correlación positiva del 58% (25).

#### CARCINOGENICIDAD Y MUTAGENICIDAD DE ALGUNOS DE LOS COMPUESTOS QUIMICOS QUE SE DETECTAN EN AGUA, EVALUADOS SEPARADAMENTE.

En la Tabla 3 se resúmen los hallazgos de los estudios de mutagenicidad y carcinogenicidad realizados en relación a algunos de los compuestos químicos, cuya concentración en agua de consumo humano está reglamentada.

TABLE 3

CARCINOGENICIDAD Y MUTAGENICIDAD DE COMPUESTOS QUIMICOS  
DETECTADOS EN AGUA EN LOS EXTRACTOS OBTENIDOS EN LA FRACCION  
ACIDA (35).

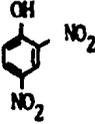
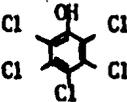
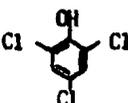
COMP	FOR	Carcinogenicidad		Mutagenicidad					
		A N I M	I V T	A M E S	M C	U D S	C I V V	C I V T	P R O S
<u>Nitrocompuestos Aromáticos</u>									
4 Nitrofenol		I	-	-	-	-	-	-	-
2,4 Dinitrofenol		-	-	-	-	-	+	-	-
<u>Fenoles</u>									
Fenol		-	-	-	-	-	-	-	-
<u>Fenoles clorados</u>									
Pentaclorofenol		I	-	-	-	-	-	P	-
2,4,6 Triclorofenol		B	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 3 (continuación).

CARCINOGENICIDAD Y MUTAGENICIDAD DE COMPUESTOS QUIMICOS  
DETECTADOS EN AGUA EN LOS EXTRACTOS OBTENIDOS EN LA FRAÇ  
CION ALCALINA (35).

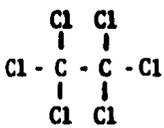
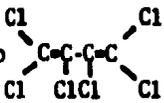
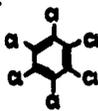
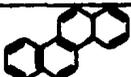
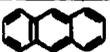
COM	FOR	Carcinogenicidad		Mutagenicidad					
		A N I M	I V T	A M E S	M C	U D S	C I V V	C I V T	P R O S
<b>Hidrocarburos Alifáticos</b>									
Hexacloroetano		M		-					
-----									
Hexaclorobutadieno		R		?					
<b>Hidrocarburos Aromáticos Halogenados</b>									
1,2 Diclorobenceno		I		-					
1,4 Diclorobenceno		I		-					
<b>Hidrocarburos Aromáticos</b>									
Hexaclorobenceno		M		-					
<b>Hidrocarburos Poliaromáticos</b>									
Naftaleno		-	-	-					
Fluoreno		-	-	-					
Criseno		M	P	+	-	-			
Pireno		-	?	-	-	?	-	N	-
Fenantreno		-	N	-	-	N		N	-
Antraceno		-	?	-	-	-		N	-

TABLA 3 (continuación).

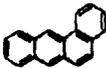
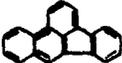
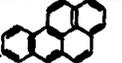
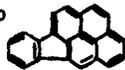
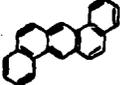
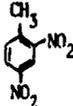
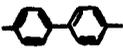
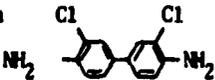
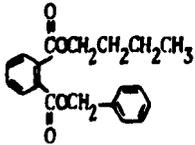
COM	FOR		Carcinogenicidad		Mutagenicidad					
			A N I M	I V T	A M E S	M C	U D S	C I V V	C I V T	D R O S
Benzo (a) Antraceno			M	P	+	+	-	-	?	
Benzo (b) Fluoranteno			M		-					
Benzo (a) Pireno			B	P	+	+	P	+	?	
Indeno(1,2,3,c,d) Pireno			M		-					
Dibenzo (a,h) Antraceno			B	P	+	+	?		+	
<b><u>Esteres Halogenados</u></b>										
bis (2-cloroetil) éter		$\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$	M		+					
<b><u>Nitrocompuestos Alifáticos</u></b>										
N-Nitrosodimetilamina		$\text{CH}_3\text{N}(\text{CH}_3)\text{NO}$	B	P	+	+	+	+	+	
N-Nitrosodi-N-propilamina		$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3)\text{NO}$	R		+	+	+	+		
<b><u>Nitrocompuestos Aromáticos</u></b>										
Nitrobenzeno			-	-	-					
2,4 Dinitrotolueno			R		+					

TABLA 3 (continuación).

COM	FOR	Carcinogenicidad		Mutagenicidad					
		A N I M	I V T	A M E S	M C	U D S	C I V T	C I V T	D R O S
Bencidina	H <sub>2</sub> N  NH <sub>2</sub>	B	P	+	P	+	P	-	
3,3'Diclorobencidina	 NH <sub>2</sub>	R	P	+		+			
Esteres del Acido Ftálico									
N Butil Bencilftalato		S		+					

### ABREVIATURAS DE LA TABLA 3.

ANIM	Descubrimiento de carcinogenicidad en animales <i>in vivo</i> .
IVT	Ensayo de transformación <i>in vitro</i> .
AMES	Ensayo de mutaciones puntuales en <i>Salmonella typhi murium</i> /Ames,
MC	Ensayo de mutaciones puntuales de células de mamífero en cultivo.
UDS	Ensayo de síntesis de ADN no programada para ver actividad reparadora de ADN.
CIVV	Prueba de citogenética <i>in vivo</i> para ver aberraciones cromosómicas.
CIVT	Prueba de citogenética <i>in vitro</i> para ver aberraciones cromosómicas.
DROS	Prueba de dominantes letales ligados al sexo en -- <i>Drosophila</i> .
B	Compuesto que es carcinogénico tanto en rata como ratón.
I	Dato insuficiente para ser evaluado.
M	Compuesto que es carcinogénico en ratón.
N	Compuesto negativo; compuesto que no es activado-metabólicamente.
P	Compuesto positivo; compuesto que no es activado-metabólicamente.
R	Compuesto que es carcinogénico en rata.
S	Compuesto que muestra una sugestiva evidencia de cáncer.
+	Mutagenicidad; ensayo positivo; el compuesto es metabólicamente activado. Carcinogenicidad/animales; el compuesto es positivo.
-	Mutagenicidad; ensayo negativo; el compuesto es metabólicamente activado. Carcinogenicidad/animales; el compuesto es negativo.
?	El resultado es cuestionable.

## DESCRIPCION DEL METODO DE AMES.

El método desarrollado por el Dr. Bruce N. Ames en la Universidad de California para detectar el efecto mutagénico de sustancias químicas, utiliza bacterias de *Salmonella typhimurium* y enzimas microsomales provenientes de tejidos de mamíferos particularmente del hígado (1, 22, 28, 29).

En el ensayo de Ames se emplean cepas de bacterias mutantes que fueron aisladas a partir de cepas silvestres de *Salmonella typhimurium*. Las bacterias mutantes (auxótrofas,  $his^-$ ) en contraste con las cepas silvestres (protótrofas,  $his^+$ ) requieren de histidina para crecer y la base de la prueba consiste en "revertir" el fenotipo mediante la inducción de mutaciones en el locus para histidina, lo que da nuevamente a las "revertantes" la capacidad de crecer en medios carentes del aminoácido o con cantidades limitadas de él.

La importancia de esta prueba, además de la fácil manipulación, economía y rapidez de ejecución, deriva del conocimiento de los cambios moleculares efectuados en el locus de histidina como consecuencia de las mutaciones originales, lo que nos permite conocer no tan solo si un compuesto químico es mutagénico, sino a través de que mecanismo induce la mutación.

Las cepas utilizadas se originan a través de sustituciones de base o por desfasamiento de la secuencia nucleotídica, lo que implica que su "reversión" generalmente requiere de los mismos mecanismos de mutación para restablecer el código genético ya sea, por una sustitución de bases adecuada en el primer caso o de una inserción o pérdida de bases en el segundo, para correr la secuencia y restablecer el código genético.

En *Salmonella typhimurium*, el operón de histidina - está compuesto por un agrupamiento de nueve genes íntimamente ligados, convierte al ATP y al 5'fosforribosil 1'pirofosfato - en histidina, a través de una secuencia de diez etapas. Cada gene produce una sola enzima y cada enzima con excepción del gene B controla una sola de estas etapas. El gene B controla las etapas siete y nueve de la secuencia. Las etapas bioquímicas no ocurren en el mismo orden en que aparecen los genes en el mapa de ligamiento, pero sí obedecen a una secuencia - en que cada reacción produce el precursor de la siguiente etapa. Todo el agrupamiento lo controla un solo sitio operador (Fig. I) (8, 39).

La cantidad de histidina disponible es la que controla el proceso sintético; cuando la célula puede obtener - histidina del medio ambiente que la rodea, la síntesis se --

# FIGURA 1

MAPA DE LOS NUEVE  
GENES DEL OPERON  
HIS.

## ETAPAS DE LA SINTESIS ENZIMATICA DE HISTIDINA



TA 100  
(his G 46)  
-GGG- → -GAG-  
-CCC- → -CTC-  
(prolina) (leucina)

N<sup>5</sup>-(5'-FOSFORRIBOSIL) 1-PIROFOSFATO

G  $\xrightarrow{ATP}$  ATP fosforribosiltransferasa

N<sup>5</sup>-(5'-FOSFORRIBOSIL)ATP

E  $\xrightarrow{PPi}$  Fosforribosil ATP pirifosforilasa

N<sup>5</sup>-(5'-FOSFORRIBOSIL)AMP

I  $\xrightarrow{H_2O}$  Fosforribosil AMP ciclohidrolasa

N<sup>5</sup>-(5'-FOSFORRIBOSIL)FORMININO-AMINOIMIDAZOL-4-CARBOXAMIDO-RIBONUCLEOTIDO

A Fosforribosil forminino-aminoimidazol-carboxamido-ribonucleotido isomerasa

N<sup>5</sup>-(5'-FOSFORRIBOSIL)FORMININO-AMINOIMIDAZOL-4-CARBOXAMIDO-RIBONUCLEOTIDO

H  $\xrightarrow{Glutamina}$  Glutaminamidtransferasa

S AMINOIMIDAZOL-4-CARBOXAMIDO-RIBONUCLEOTIDO

F  $\xrightarrow{H_2O}$  Ciclaza

IMIDAZOL-GLICEROL-FOSFATO (IGP)

B  $\xrightarrow{H_2O}$  Imidazol-glicerol-fosfato deshidratasa

IMIDAZOL-ACETOL-FOSFATO (IAP)

C  $\xrightarrow{Glutamina}$  L-Histidinol-fosfato transaminasa

L-HISTIDINOL-FOSFATO (HP)

B  $\xrightarrow{H_2O}$  L-Histidinol-fosfato fosfatasa

L-HISTIDINOL

D  $\xrightarrow{2NAD^+ + H_2O}$  L-Histidinol deshidrogenasa

L-HISTIDINA

TA 98  
(his D3052)  
-GCGCGGC-  
-CGCGCGG-  
delección de un  
par de bases.

PPi = pirofosfato

Pi = ortofosfato

atenúa; cuando la célula utiliza a esta última y se agota su provisión en el medio externo, se activa el proceso sintético. Experimentalmente todo el proceso se puede interrumpir - añadiendo histidina al medio externo. Sin embargo el verdadero represor del operón his se ha identificado como el histidinil-tRNA<sub>His</sub>. (8).

El operón de histidina en *Salmonella typhimurium* - incluye aproximadamente 13 000 nucleótidos, con la información en clave correspondiente a las enzimas implicadas en -- las etapas del patrón biosintético aparentemente transcrita- en un solo largo filamento de RNA<sub>m</sub>.

Se han identificado más de 1 000 mutantes, algunas de ellas con delección en el segmento de ADN correspondiente al operón de histidina. Todos los cistrones de este operón - policistrónico intervinieron en las mutaciones. Se demostró- que aproximadamente la mitad de las mutaciones locales tie- nen efectos duales: a) la eliminación de la actividad de una enzima y b) la disminución de la actividad de todas las enzi- mas situadas posteriormente en la secuencia del gen mutante- 5' - 3'. Esta polaridad de las mutaciones tal vez implica -- cambios simples de bases. Amplios estudios de mutantes pola- res revelaron que el mensaje de su RNA<sub>m</sub> se inicia en un si--

tio (operador en este caso) y prosigue paso a paso a lo largo de toda la secuencia. Todos los pasos posteriores en la secuencia se pueden afectar por el cambio mutacional, mientras que los anteriores permanecen intactos. Por tanto, el mensaje se inicia a partir del extremo en que se encuentra el operador y prosigue linealmente a lo largo de toda la síntesis, a no ser que sea interrumpido por una alteración mutacional que bloquee a las etapas enzimáticas situadas más adelante del punto de bloqueo.

Es necesaria toda la secuencia en la producción de histidina (8).

En cuanto a las cepas utilizadas la TA 98 tiene -- una mutación en el gen his D3052 que codifica para histidinol deshidrogenasa, la TA 98 detecta mutaciones por corrimiento de bases.

Los mutágenos que actúan por corrimiento de bases pueden estabilizar un cambio que ocurre en secuencias repetidas o sitios sensibles del ADN, resultando una mutación por corrimiento de bases la cual restablece el código genético para la síntesis de histidina. El gen his D3052 tiene una mutación en la secuencia de ocho pares de bases -GCGCGCGC- con -CGCGCGCG-

residuos de -GC- que se repiten cerca del sitio de la mutación por corrimiento de bases debido a la deleción de 1 par de bases en el gen his D.

La cepa TA 100 tiene una mutación en el gen his - G46 que codifica para la primera enzima de la biosíntesis de histidina, la ATP- $\gamma$ -fosforribosil-transferasa. Esta mutación substituye la tripleta  $\begin{matrix} \text{-GGG-} \\ \text{-CCC-} \end{matrix}$  (prolina) por  $\begin{matrix} \text{-GAG-} \\ \text{-CTC-} \end{matrix}$  (leucina) o sea G-A o C-T lo que implica una substitución de bases por transición (22).

Se ha incrementado la sensibilidad de las cepas - mediante modificaciones adicionales, como se describe a continuación:

a) Alteración de la permeabilidad. Como la pared celular de *Salmonella typhimurium* no es permeable a moléculas de gran tamaño, se seleccionaron mutantes ( $rfa$ ) que presentan un defecto en la capa de polisacáridos que recubre su superficie, con lo que se facilita el acceso de los compuestos (22).

Esta mutación se logró en dos pasos:

Paso 1: Se aislaron mutantes en condiciones anaeróbicas resistentes a 2 deoxi-galactosa y a cloratos debido a una dele

ción en el operón de galactosa (*gal*) y biotina (*bio*).

Paso 2: Posteriormente se aislaron cepas mutantes resistentes al bacteriófago C-21, dichas mutantes poseen una elevada sensibilidad al cristal violeta y su morfología colonial es rugosa (*λ(a)*(22).

b) Reparación deficiente de ADN. Las cepas son deficientes en el sistema de reparación por escisión, como resultado de la pérdida de un segmento del cromosoma en la región *uvrB*, lo que permite la detección de mutaciones que normalmente son reparadas por dicho sistema. Esta delección se extiende hasta el gene *bio*, como consecuencia esta bacteria requiere biotina para su crecimiento (22).

c) Introducción de plásmidos. Con la introducción de moléculas de ADN con replicación autónoma (plásmidos), portadoras de información que confiere resistencia a antibióticos, se ha visto incrementada la sensibilidad de las bacterias para detectar mutágenos por una variedad de agentes que también incrementan su resistencia a la luz UV, y esta habilidad es debida a que el plásmido que contienen las cepas TA 98 y TA 100 el pKM101 contiene un análogo del gene *umuC*. La región *umuC* del ADN en el plásmido pKM101 está flanqueada por repeticiones in

vertidas que incrementan la posibilidad de que el gen requerido para la mutagénesis, sea transponible, además el gene *umuC* es inducible por el sistema de reparación SOS, por lo que este plásmido incrementa la sensibilidad de los mutágenos químicos para producir una mutación por sustitución de bases o por corrimiento de la secuencia nucleotídica adecuadamente (38).

Las cepas TA 98 y TA 100 que contienen el factor  $R_1$  plásmido pKM101 les confiere resistencia a ampicilina (22).

La introducción del plásmido pKM101 incrementa el número de reversión espontánea de las cepas TA 98 y TA 100 con respecto a sus cepas homólogas TA 1538 y TA 1535 que no contienen el plásmido, sin embargo las cepas que contienen el plásmido son más sensibles (12).

El efecto primario del plásmido pKM101 en el ensayo con *Salmonella typhimurium* es el incremento cuantitativo en mutagénesis por algunos agentes químicos. Inman (12) cita que Ma. Cann y su grupo también observaron una aparente alteración cualitativa en mutagénesis por el plásmido para un número dado de compuestos. Se observó que las cepas con plásmido y deficientes en el sistema de reparación por escisión --

son más efectivas para detectar mutágenos que las cepas que tienen el plásmido y un sistema de reparación por escisión-intacto (12).

d) Biotransformación de agentes químicos (fracción microsomal S9). En el mamífero *in vivo* existen sistemas enzimáticos responsables de la transformación metabólica de los compuestos que tienen acceso al organismo y que están ausentes en *Salmonella typhimurium*. Por ello, la prueba ha sido complementada mediante la adición de homogenados de órganos de roedores o humanos que contienen las enzimas correspondientes.

Un aspecto importante que se debe tomar en cuenta en la interpretación de los resultados obtenidos con sistemas de activación metabólica *in vitro*, es que *in vivo*, los organismos cuentan con mecanismos de excreción como son el respiratorio, renal y biliar que evitan el contacto prolongado de los compuestos con los órganos susceptibles a su acción. *In vitro*, estos mecanismos no funcionan y los compuestos mutagénicos permanecen en contacto con los organismos de prueba por períodos prolongados. Esto puede conducir a la obtención de resultados positivos que no puedan ser corroborados *in vivo*.

Es importante hacer notar que los sistemas de activación metabólica varían entre especies, sexo y tejidos de orígen y la fracción S9 puede obtenerse a partir de órganos-diferentes como son: hígado, pulmón y riñón principalmente. Diferentes estudios previos han mostrado que el hígado de ratas macho de la cepa Sprague-Dawley es el más indicado en ensayos de mutagenicidad (29).

Se sabe que muchos carcinógenos y mutágenos necesitan ser metabolizados por el citocromo P-450, sistema dependiente de monooxigenasas, antes de tener actividad mutagénica. Los microsomas hepáticos de mamíferos obtenidos en el sobrenadante de homogenados a 9 000g/30 min. (llamado fracción S9), contiene este sistema que es usado para la activación de promutágenos para obtener metabolitos mutagénicos.

El tratamiento de animales con fenobarbital, 3 metilcolantreno,  $\beta$ -naftoflavona o Aroclor 1254, se conoce que incrementan la concentración de citocromo P-450 dependiente de la actividad de monooxigenasas, y esta inducción incrementa la sensibilidad de los ensayos de mutagénesis. Sin embargo en estudios previos se ha visto que la mejor inducción se obtiene con Aroclor 1254 (3.7 veces mayor que sin inducción); a pesar de que el Aroclor 1254 es un conocido carcinógeno, -

tóxico y químicamente estable no interfiere con las pruebas de mutagenicidad (36).

Cuando se homogeniza el tejido hepático, el retículo endoplásmico existente se fragmenta en pequeñas vesículas llamadas microsomas que contienen muchas de las enzimas causantes de la biotransformación de compuestos químicos. Estos microsomas catalizan una variedad muy amplia de reacciones - como son: desaminación; O-, N- y S- desalquilación; hidroxilación de hidrocarburos alquílicos y arílicos; epoxidación; formación de derivados de alquilo; N-hidroxilación; N- y S- oxidación y deshalogenación; formación de óxidos de arena, - así como las reducciones azo y nitro. Además las enzimas microsomales participan en la síntesis de glucurónidos a través de la acción de la uridín difosfato glucoronil transferasa.

En un sistema *in vitro* que contenga microsomas hepáticos, pueden ser oxidados varios compuestos siempre y --- cuando los siguientes cofactores estén presentes: NADPH, O<sub>2</sub> y Mg<sup>2+</sup>. El requerir NADPH y oxígeno, clasifica a este sistema enzimático como un sistema de oxidasas de función mixta, también llamadas monooxigenasas.

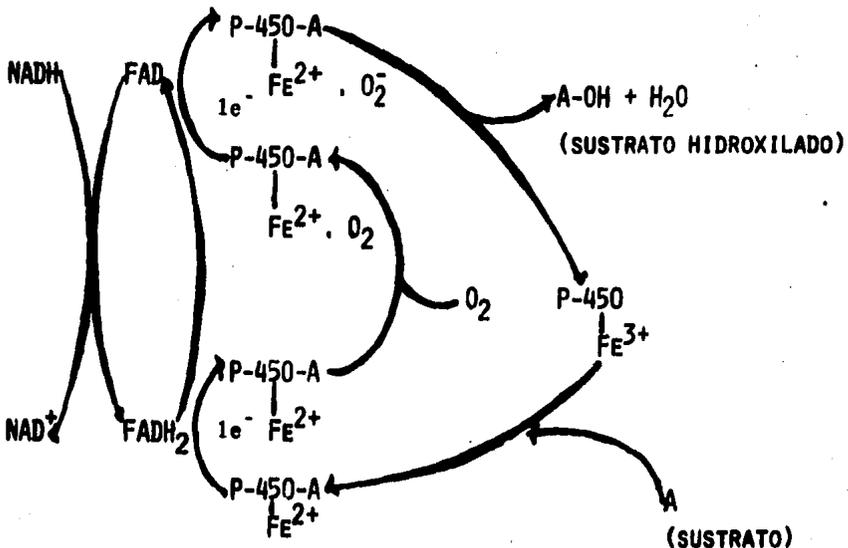
La especificidad para el sustrato parece residir -

en las múltiples formas del citocromo P-450 dentro de cualquier tejido. Existen 8 isoenzimas del citocromo P-450 y difieren en peso molecular 48 000 - 50 000 d, en algunos aminoácidos, y en su especificidad para metabolizar diferentes sustratos.

El citocromo P-450 es una proteína que consiste en una simple cadena polipeptídica de aproximadamente 50 000 -- daltons, con una protoporfirina IX como grupo prostético (33).

Un mecanismo postulado, para la hidroxilación de - sustratos orgánicos por el sistema P-450 microsómico del hígado es el que se muestra en la Fig. 2 (15).

FIG 2



El sustrato A se combina primero con la forma  $Fe^{3+}$  de P-450, que se reduce entonces por un electrón del NADH a la forma  $Fe^{2+}$ .

Esta última se oxigena, y un segundo electrón del NADH convierte el oxígeno unido en el radical  $O_2^-$ . Se produce una oxidorreducción interna con formación del sustrato - hidroxilado y agua, que contiene átomos de oxígeno que se - introdujeron como  $O_2$ . Por último se regenera el citocromo - P-450 libre en su forma  $Fe^{3+}$ .

Las principales enzimas de este sistema son el -- NADPH citocromo c reductasa; la flavina, enzima involucrada en la oxidación de NADPH, el citocromo P-450 y la NADPH citocromo P-450 reductasa, la cual funciona en la reducción - del citocromo P-450 oxidado.

Para llevar a cabo una oxidación mediante este mecanismo se requieren cantidades equivalentes de NADPH, oxígeno y del sustrato utilizado en el proceso ( 15, 33 ).

**FACTORES QUE DEBEN CONTROLARSE EN LAS PRUEBAS DE MUTAGENESIS CON EL SISTEMA DE AMES.**

Se ha reportado que la luz visible causa mutaciones por sustitución de bases, por lo que se recomienda que al efectuar un experimento, las cajas se protejan de la luz antes de ponerlas en el incubador, así como las soluciones de mutágenos y compuestos problema, deben protegerse también para evitar su posible inactivación debido a la acción de la luz. (22).

El óxido de etileno utilizado para esterilizar las cajas de Petri desechables es también mutagénico para la cepa TA 100. Si se tienen problemas en la frecuencia de reversión espontánea de esta cepa, los cuales desaparecen al usar cajas de vidrio, es posible suponer que el óxido de etileno está interfiriendo con el experimento. Las cajas desechables contaminadas con óxido de etileno se pueden colocar en una campana de flujo laminar por varios días hasta que éste se disipe o se puedan adquirir cajas desechables especiales para ensayos de mutagénesis ( "Muta Assay dishes", Falcon Labs., 1950 Williams Drive, Oxnard, California, 93030, U.S.A.) (22).

El caldo nutritivo utilizado generalmente para crecer las cepas ( Nutrient broth, Difco ) causa mutaciones en la cepa TA 100 por lo que el Dr. Ames recomienda el uso de un medio de cultivo inocuo llamado "Oxoid Media No. 2", ----

(Oxoid Canada Ltd., 145 Bentley Ave., Ottawa, Canada K2 # 6T7, y K.C. Biological P.O. Box 5441, Lexena, Kansas 66215, U.S.A.) (22).

#### ALCANCES Y LIMITACIONES DE LA PRUEBA DE AMES PARA LA DETECCION DE MUTAGENOS EN AGUA.

El método de Ames para detectar mutágenos tiene como ventajas sobre otros sistemas de prueba, el haber sido ampliamente validado a través del estudio de un gran número de compuestos, realizados en una multitud de laboratorios del mundo. Ya se señaló además su relativo bajo costo, facilidad de manejo, rapidez en la obtención de datos y posibilidad de caracterizar el mecanismo a través del cual los mutágenos inducen mutaciones.

A la vez, se ha encontrado que entre el 63 y el 92% de los agentes que producen cáncer son a la vez capaces de inducir mutaciones en este sistema de prueba (26). Se sabe por lo tanto que la prueba no es infalible y que cientos de compuestos a pesar de ser carcinógenos no son detectados como mutágenos en la prueba de Ames. Mas aún algunas sustancias que producen mutaciones en otros sistemas no dan resultados positivos en *Salmonella typhimurium*.

Entre los agentes químicos que no inducen mutaciones en el ensayo de Ames, o existen dificultades para su detección como mutágenos, se encuentran: azonaftoles; carbamilos y tiocarbamilos; fenoles; benzodioxoles; compuestos aromáticos policlorinados, cíclicos y alifáticos; esteroides; anti metabolitos; hidrazinas simétricas; bactericidas volátiles; metales pesados; asbestos (26). Se sospecha que la falta de un sistema metabólico adecuado para transformar premutágenos, así como las características propias de los medios de cultivo y condiciones en que se realiza el ensayo pueden influir en la obtención de resultados falsos negativos y falsos positivos.

Este sistema tampoco detecta compuestos que produzcan entrecruzamientos de ADN o compuestos que dañen microtúbulos o proteínas asociadas funcionalmente con el aparato mitótico, ni algunos agentes clastogénicos que causen daño en la estructura cromosómica. Lo que deriva del hecho de que las bacterias son organismos procariotes en los que el ADN no está asociado con proteínas básicas conformando cromatina y cromosomas complejos como en los eucariotes. Además de que no poseen un sistema mitótico para la distribución del material genético durante la división celular. De ahí que no sean vulnerables a los agentes que actúen a nivel de esas es

estructuras o interfieren con esos procesos.

En el caso de la detección de mutágenos en agua, - un factor limitante en el empleo de esta prueba lo constituye la necesidad de concentrar los compuestos químicos presentes en ella; sin lo cual la sensibilidad del sistema no es suficiente para obtener resultados confiables.

**DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD MUTAGENICA DE UN LOTE DE MUESTRAS DE AGUA RESIDUAL Y RENOVADA PROVENIENTE DE LA PLANTA DE TRATAMIENTO DE CIUDAD UNIVERSITARIA.**

El estudio al que se hace referencia a continuación constituye un trabajo piloto para identificar la operatividad de los ensayos para la detección de mutágenos en agua residual y renovada, tanto cruda como sometida a procesos de concentración y extracción de sustancias tóxicas.

Por ello más que realizar un estudio centrado en el agua renovada que determinará la actividad mutagénica a lo largo del tiempo, se pensó en valorar en un número reducido de muestreos, los problemas a los que se puede enfrentar un programa sistemático de monitoreo de mutágenos.

## **METODO PARA LA DETERMINACION DE MUTAGENOS EN AGUA RESIDUAL Y RENOVADA EN CIUDAD UNIVERSITARIA.**

### **I. SELECCION DE LOS PUNTOS DE MUESTREO Y CALENDARIZACION.**

Fueron seleccionados 5 sitios de muestreo en la -- planta de tratamiento de Ciudad Universitaria y uno en la red de distribución de aguas tratadas, los cuales se muestran en la Fig. 3. Dichos puntos corresponden al influente de aguas negras que llegan al cárcamo después de haber pasado por un desarenador, a las aguas renovadas que salen de los sedimentadores continuos a los procesos de tratamiento por filtrorociador, biodisco y lodos activados. Por último se incluyeron dos puntos más que corresponden al efluente final en el que aparecen mezcladas las aguas provenientes de los tres - procesos una vez que han pasado a través de filtros de arena y a la cisterna en la que el agua renovada contiene cloro.

La planta de tratamiento de aguas negras se encuentra situada en la parte noroeste de Ciudad Universitaria. En esta parte se unen los colectores del área de Humanidades -- (parte noroeste de Ciudad Universitaria), el colector del -- área de Ciencias (parte central) y el colector de la zona de

Copilco el Alto.

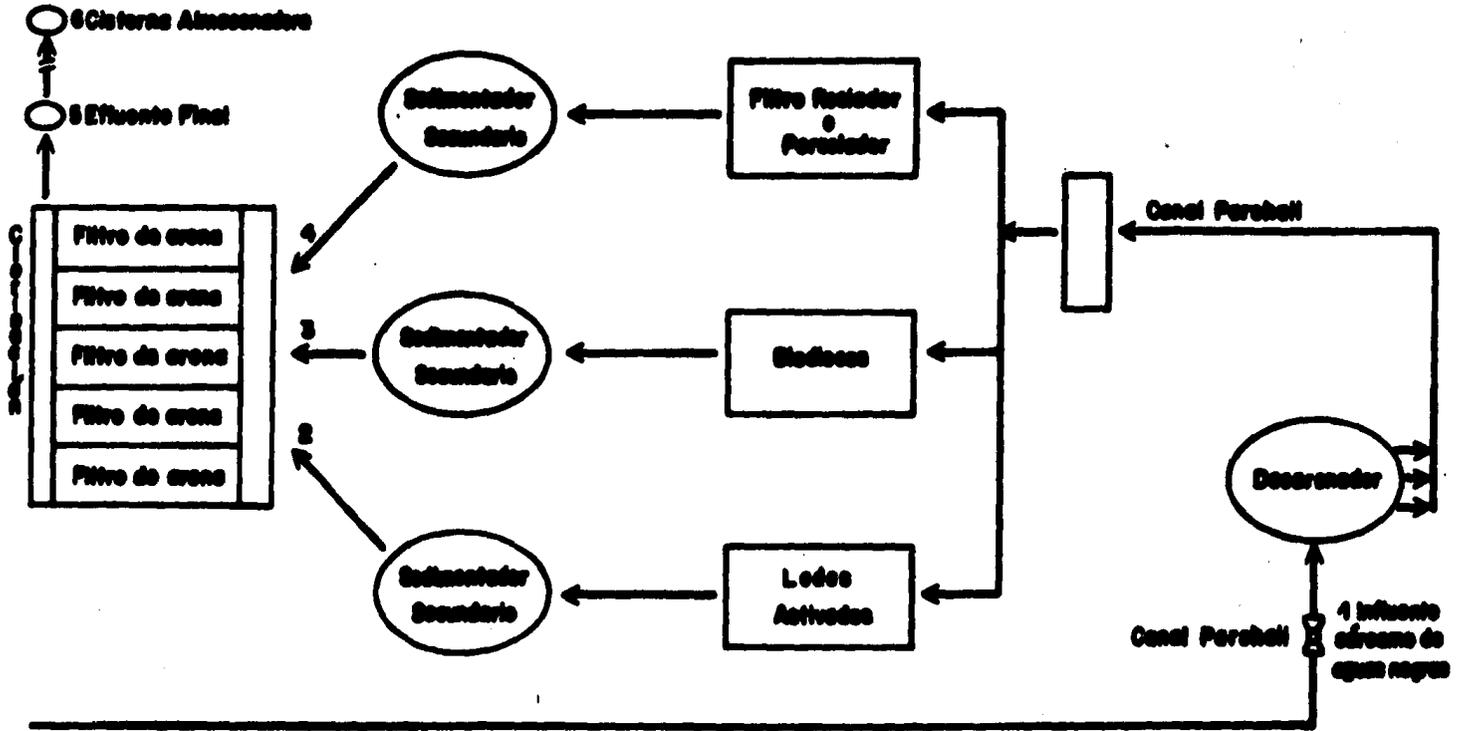
Los muestreos se realizaron a las 3, 9, 15 y 21 horas del día, en cada uno de los puntos citados y se conformó una muestra compuesta, a partir de la cual se obtuvieron los extractos ácidos y alcalinos que fueron sometidos a las pruebas de mutagenicidad. Dichos muestreos se efectuaron durante los meses de octubre a enero con intervalos de una semana para el análisis de agua cruda y de dos semanas para las aguas que fueron sometidas a los procesos de extracción, salvo en el caso de la primera muestra de agua procesada para extraer las sustancias tóxicas, en las cinco restantes se valoró actividad mutagénica de las sustancias contenidas en ella tanto concentradas como sin concentrar (agua cruda).

## II. ETAPAS DEL ENSAYO DE MUTAGENESIS PARA DETECTAR MUTAGENOS EN AGUA.

### A. PREPARATIVOS PREVIOS.

#### 1) ORIGEN Y MANTENIMIENTO DE LAS CEPAS DE PRUEBA.

Las cepas bacterianas utilizadas en la prueba de -



mutagénesis fueron donadas por el Dr. Bruce N. Ames; (Department of Biochemistry, University of California, Berkeley. Cal 94720, U.S.A.), el genotipo de las cepas TA de *Salmonella typhimurium* utilizadas en este trabajo es el siguiente:

Mutaciones en el operón de Histidina		Mutaciones Adicionales		
his D3052	his G46	Lipopoli sacárido.	Sistema de Reparación.	Plásmido.
TA 98		" <i>hja</i> "	$\Delta uvrB$	+R
	TA 100	" <i>hja</i> "	$\Delta uvrB$	+R

"*hja*". Carácter rugoso de la pared celular.

$\Delta uvrB$ . Deleción que incluye el gene del sistema de reparación por escisión (*uvrB*) y los genes de nitrato reductasa (*chl*) y biotina (*bio*).

R. plásmido pKM101 con resistencia a ampicilina (22).

La preparación de medios y soluciones se encuentran en el Apéndice.

Las bacterias obtenidas por conducto del Dr. Ames vienen en discos de papel filtro impregnados con cultivos recientes de cada cepa dentro de bolsitas de plástico con agar blando para evitar su desecación. Los discos se colocan con pinzas estériles en 5 ml de caldo nutritivo Oxoid Media No. 2 incubándose durante 16 hrs a 37°C con agitación de 200 rpm.

Los cultivos así obtenidos, se sometieron a las pruebas que se describen mas adelante para verificar la presencia de los marcadores genéticos, evaluar la frecuencia de reversión espontánea y determinar su sensibilidad a mutágenos conocidos.

## 2) CULTIVOS DE RESERVA.

Se preparan colocando 0.8 ml de la suspensión bacteriana de 16 hrs en fase estacionaria más 0.7 ml de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma), en viales estériles con tapón de -- rosca, se congelan rápidamente sobre hielo seco manteniéndose posteriormente a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## 3) CULTIVOS DE RESERVA SECUNDARIA.

Estos se preparan con el objeto de evitar que los cultivos que se encuentran a  $-80^{\circ}\text{C}$  se descongelen por el continuo uso que se les dá. Estos cultivos se preparan en cajas de Petri y se guardan a  $4^{\circ}\text{C}$  en obscuridad y pueden ser utilizados hasta por 1-2 meses sin que las cepas pierdan sus propiedades.

Los cultivos se preparan de la siguiente manera: Se toma con un aplicador de madera estéril una muestra del cultivo de reserva sin descongelarlo, se siembra en 5 ml de caldo nutritivo Oxoid Media No.2 y se incuba durante 16 hrs.

a 37°C con agitación, comprobar marcadores genéticos, reversión espontánea y sensibilidad a mutágenos conocidos. Sembrar por medio de estrías en cajas de Petri complementadas con un exceso de histidina y con ampicilina, e incubar 24 hrs. a 37°C en obscuridad con las cajas invertidas, posteriormente se guardan a 4°C.

Los cultivos utilizados en las pruebas de mutagénesis, se preparan tomando con un aplicador de madera estéril una muestra de las cajas de reserva secundaria y se siembra en 5 ml de caldo Oxoid Media No.2 o en un mayor volumen dependiendo del número de muestras que se trabajen, se incuban a 37°C durante 16 hrs. con agitación 200 rpm. Cada vez que se trabaje con la cepa, se realizarán las pruebas correspondientes a marcadores genéticos, determinación de la frecuencia de reversión espontánea y sensibilidad a mutágenos conocidos.

a) Requerimiento de Histidina. Se siembra por medio de estrías alícuotas de un cultivo de 16 hrs. en fase estacionaria sobre cajas conteniendo medio mínimo de Vogel-Bonner, y en medio mínimo complementado con exceso de histidina y biotina. Solamente se debe observar crecimiento en las cajas de medio mínimo-complementadas con histidina-biotina.

b) Comprobación de la deficiencia de lipopolisacárido en la pared celular, mutación "λga". Para ello se determina la sensibilidad de la cepa al cristal violeta, inoculando 0.1 ml. de cultivo de 16 hrs. en fase estacionaria de *Salmonella typhimurium* ( $1-2 \times 10^9$  cel/ml.) en 2 ml. de agar de superficie completo, se agita suavemente y se siembra en cajas de Petri que contengan medio completo. Después de dejar solidificar las cajas, se coloca un disco de papel filtro estéril (0.5 cm de diámetro) en el centro de la caja y con una pipeta estéril se agrega sobre el disco 10 µl de una solución de cristal violeta (1 mg/ml.) y se incuban las cajas invertidas a 37°C durante 24 hrs. en obscuridad.

Una zona clara de inhibición alrededor del disco indica la presencia de una mutación "λga".

c) Comprobación de la presencia del plásmido pKM101. La presencia del plásmido se verifica comprobando la resistencia de las cepas a la ampicilina. Esta prueba se lleva a cabo -- igual que la anterior, con la diferencia que se agregan 10 µl de una solución de ampicilina de 8mg/ml en hidróxido de sodio 0.02 N sobre el disco de papel filtro estéril. Las cepas que contienen el plásmido no deben mostrar inhibición del -- crecimiento, como es en el caso de las cepas TA 98 y TA 100.

Frecuentemente los cultivos obtenidos de las cepas TA 98 y TA 100 contienen un elevado porcentaje de bacterias que han perdido el plásmido y el método para checar este marcador no es suficientemente sensible para detectarlo. Se puede realizar una prueba cuantitativa haciendo diluciones del cultivo hasta llegar a una densidad de  $1 \times 10^3$  bacterias por mililitro y sembrar 0.1 ml. de esta última dilución en medio mínimo con exceso de histidina, así como, en medio mínimo en el cual además contenga 0.1 ml. de una solución de ampicilina (8 mg/ml.). Incubar 12-24 hrs. a 37°C y contar las colonias resultantes. El número de colonias presentes en los dos tipos de medio debe ser igual o muy cercano.

Si es necesario obtener un nuevo cultivo, se pueden tomar 4-5 colonias de los medios de ampicilina, crecerlos toda la noche en caldo nutritivo Oxoid Media No. 2, checar la reversión espontánea, marcadores genéticos y propiedades de reversión con mutágenos conocidos y seleccionar el cultivo que cumpla con las condiciones necesarias.

d) Verificación de la mutación que altera las enzimas encargadas de la reparación del daño causado por la luz ultravioleta. En una caja de Petri con medio mínimo complementado con exceso de histidina-biotina, se siembra una estría de -

cada una de las cepas que se probarán. Se tapa la mitad de la caja con papel aluminio y se irradia con una lámpara germicida de luz U.V. de 15 w a una distancia de 33-35 cm. durante 8 segundos. Después de incubar 12-24 hrs. a 37°C las cepas que contienen el marcador  $\Delta uvaB$  solamente crecerán en la porción de la caja que no fué irradiada como lo es el caso de las cepas TA 98 y TA 100.

e) Frecuencia de reversión espontánea. En un tubo con tapón de rosca conteniendo 2 ml. de agar de superficie mínimo complementado con trazas de histidina-biotina 0.5 mM a 45°C se agrega 0.1 ml. del cultivo a probar de 16 hrs. de incubación en fase estacionaria ( $1-2 \times 10^9$  cel/ml.), se agita suavemente con ayuda de un agitador vortex y se distribuye uniformemente sobre medio mínimo de Vogel-Bonner contenido en cajas de Petri. Se deja solidificar el agar de superficie y las cajas se incuban a 37°C durante 48 hrs. invertidas. Se cuentan las revertantes espontáneas que resulten (macrocolonias) y se verifica la presencia de una densa capa de microcolonias conocidas como crecimiento de fondo (con ayuda de un microscopio de disección), que resultan como consecuencia de las trazas de histidina y biotina presentes en el agar de superficie. Esta capa de microcolonias tiende a disminuir y hasta desaparecer cuando el compuesto que se está probando es tóxico. Esta prueba

ba se realiza por triplicado. El número de colonias revertantes espontáneas reportadas por el Dr. Bruce N. Ames para cada una de las cepas probadas, es: para la TA 98 de 30-50 colonias revertantes y para la cepa TA 100 es de 120-200 colonias revertantes (22).

#### 4) PREPARACION DE HOMOGENADO HEPATICO.

Primeramente se inducen las enzimas microsomales de hígado de rata de la manera siguiente: Se utilizan ratas macho de la cepa Sprague Dawley con un peso aproximado de 200 grs., a las cuales se les administra por vía intraperitoneal 500 mg/Kg de peso de Aroclor 1254 diluido en aceite de maíz a una concentración de 200 mg/ml. Los animales se mantienen al libitum y se les suministra alimento suficiente, el cual se les retira 12 hrs. antes de sacrificarlos. El quinto día después de la inyección, las ratas se sacrifican por dislocación cervical. Para la obtención de la fracción S9, el material de disección y de vidrio, así como las soluciones que se usarán, deberán estar estériles.

Los hígados se extraen asépticamente y se colocan en vasos tarados que contienen 15 ml. de una solución fría de KCl 0.15 M y se determina el peso del hígado por diferencia. El procedimiento se debe realizar a 4°C para conservar

la actividad enzimática. Los hígados deberán ser lavados con KCl 0.15 M y son colocados en recipientes agregando 3 ml. de KCl 0.15 M por gramo de hígado. El hígado es cortado en pequeños pedazos con tijeras estériles y es homogenizado con un aparato Potten-Elvehjem.

El homogenado se centrifuga a 9 000 g durante 10 minutos, y el sobrenadante obtenido (fracción S9) es distribuido en viales estériles con tapón de rosca en porciones de 3, 2 y 1 mililitro. Los viales se congelan rápidamente sobre hielo seco y se mantienen a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Es importante señalar que la cantidad de fracción S9 que se agrega por caja en cada experimento es determinante en la respuesta que se obtenga, en el laboratorio esta cantidad se ha estandarizado utilizando 0.1 ml de fracción S9 por mililitro de mezcla S9, lo cual corresponde a 50  $\mu\text{l}$  de fracción S9 por caja, comprobándose su actividad utilizando un mutágeno conocido como lo es el 2 -- aminoantraceno.

##### 5) PREPARACION DE LA MEZCLA S9.

La mezcla S9 contiene por mililitro:

Fracción S9	0.1	ml.
Glucosa-6-fosfato	0.0013	gr.

NADP	0.0030 gr.
Solución de $MgCl_2$ 0.4 M/KCl 1.65 M	0.02 ml.
Amortiguador de fosfatos 0.2 M pH 7.4	0.9 ml.

En la preparación de mezcla S9 es necesario realizar el proceso manteniendo las soluciones a 4°C, con el objeto de conservar la actividad enzimática.

Se pesa la cantidad necesaria de NADP y glucosa-6-fosfato, los cuales son disueltos en el amortiguador de fosfatos y la solución salina  $Mg_2Cl/KCl$ . Posteriormente se filtra con una unidad swinex (Millipore Corp, Bedford Mass) equipada con una membrana de 0.45  $\mu m$  de poro en condiciones estériles y por último es agregada la fracción S9 estérilmente. La mezcla S9 se mantiene en hielo durante todo el experimento.

#### B. DETERMINACION DE LA MUTAGENICIDAD EN MUESTRAS DE AGUA RESIDUAL Y RENOVADA.

Se utilizó el método de preincubación (22, 16) empleando las cepas TA 98 y TA 100 de *Salmonella typhimurium* - tanto para valorar los compuestos químicos concentrados a partir de muestras de agua como los provenientes de las muestras de agua cruda sin concentrar.

Los concentrados de las muestras de agua fueron realizados por un método de extracción líquido-líquido para obtener los compuestos orgánicos presentes en un litro de agua. Se empleó para la extracción cloruro de metileno y las fracciones ácidas o alcalinas obtenidas se sometieron posteriormente a evaporación para eliminarlo, siendo resuspendidas en 0.5 ml de DMSO en viales de vidrio y guardados en oscuridad a  $-20^{\circ}\text{C}$ , (se calcula que los compuestos orgánicos fueron concentrados 2 000 veces). Durante el proceso sin embargo se pierden los compuestos orgánicos volátiles. El día en que se realizó el ensayo de mutagénesis se descongelaron y se prepararon diluciones 1:10 y 1:100 con DMSO en condiciones estériles.

#### EQUIVALENCIA DE LOS EXTRACTOS:

Siguiendo en método citado, 10  $\mu\text{l}$  del extracto obtenido de una muestra de agua a partir de 1 litro corresponde a los compuestos orgánicos presentes en 20 ml. de agua cruda, 10  $\mu\text{l}$  de una dilución 1:10 corresponde a los compuestos orgánicos presentes en 2 ml de agua cruda y 10  $\mu\text{l}$  de una dilución 1:100 corresponden a los compuestos orgánicos presentes en 0.2 ml de agua cruda.

Las diluciones de los extractos se realizaron con el objeto de prevenir la posible toxicidad de las sustancias concentradas

en ellos. De cada muestra de agua se sometieron a las pruebas de mutagénesis los agentes extraídos en medio ácido y los extraídos en medio alcalino.

Las muestras de agua cruda fueron previamente esterilizadas por filtración utilizando una unidad swinex (Millipore Corp, Bedford Mass.) equipada con una membrana de 0.45  $\mu\text{m}$  de poro y un prefiltro, y mantenidas en hielo durante el experimento.

El método de preincubación se realizó de la siguiente manera: Se colocó en un tubo estéril de 13 X 100 con tapón de rosca:

a) 100  $\mu\text{l}$  de un cultivo bacteriano de *Salmonella typhimurium*  $1-2 \times 10^9$  cel/ml ( cepas TA 98 o TA 100) en fase estacionaria de 16 hrs. de incubación a 37°C con agitación.

b) 200  $\mu\text{l}$  de agua cruda, 10  $\mu\text{l}$  de concentrado o 10  $\mu\text{l}$  de las diluciones del concentrado según fué el caso.

c) 500  $\mu\text{l}$  de mezcla S9 a los tubos que así lo requirieron. Se incubó durante 30 minutos a 37°C.

d) Se agregaron 2 ml de agar de superficie mínimo complementado con trazas de histidina ( Solución histidina-biotina - 0.5 mM).

e) Se agitó suavemente y se distribuyó uniformemente en cajas de Petri conteniendo medio mínimo Vogel-Bonner y se dejaron solidificar.

f) Posteriormente las cajas fueron incubadas durante 48 hrs. a 37°C, después de lo cual se contó el número de colonias revertantes presentes en cada caja y observándose el crecimiento de fondo. (Fig 4).

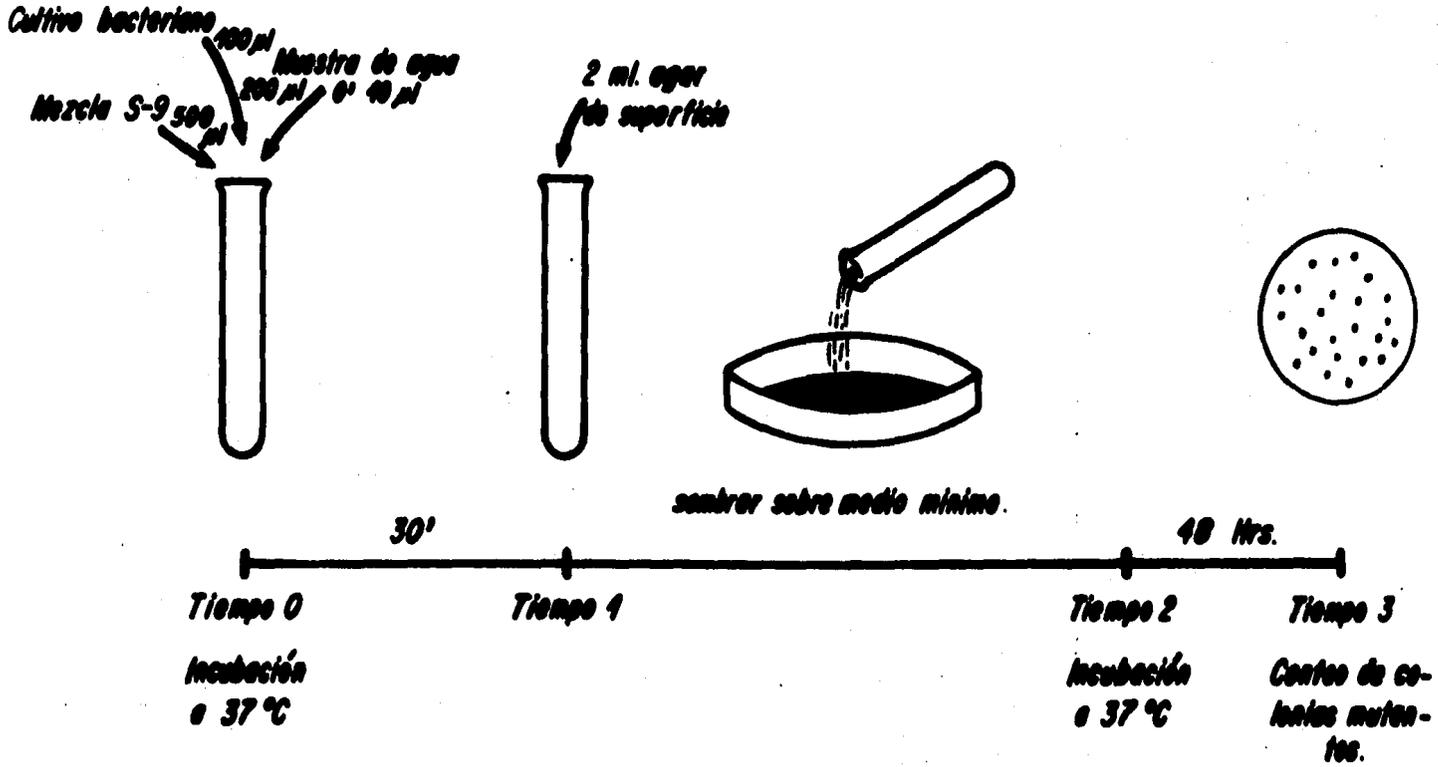
El ensayo de mutagenicidad se realizó por triplicado para cada muestra de agua.

Para asegurar que las cepas utilizadas tuvieran los marcadores genéticos correspondientes se realizaron las pruebas anteriormente descritas, como son: i) sensibilidad al cristal violeta; ii) resistencia a la ampicilina; además se comprobó la frecuencia de reversión espontánea de cada cepa y la sensibilidad a mutágenos utilizando controles positivos (ac. picrolónico, N-metilnitrosoguanidina y 2 aminoantraceno).

#### DEFINICION DE EFECTOS MUTAGENICOS:

Se consideró como resultado positivo, cuando la adición de la muestra de agua incrementó cuando menos al doble el número de revertantes presentes en el control. En la práctica se recomienda además, obtener una relación dosis -

**METODO DE PREINCUBACION PARA DETECCION DE MUTAGENOS.**



respuesta; ya sea incrementando la concentración de los compuestos mutagénicos o disminuyéndola mediante dilución de las muestras.

#### DEFINICION DE EFECTOS TOXICOS.

Se consideró como efecto tóxico cuando la muestra de agua disminuyó a la mitad el número de colonias revertantes -- presentes en el control, aunado a un decremento de microcolonias usualmente presentes en el crecimiento de fondo o la desaparición de las mismas. Es fácil determinar los efectos tóxicos por este medio ya que la diferencia entre el crecimiento de -- fondo de las cajas control y el de aquellas que contienen la muestra tóxica es evidente, sin embargo hay que señalar que se trata de un parámetro meramente cualitativo que no informa sobre los mecanismos que afectan el crecimiento bacteriano.

## RESUMEN DEL PROTOCOLO QUE SE SIGUIÓ PARA CADA MUESTRA DE AGUA.

No. de Tubo.	BACTERIA (100 µl)	MEZCLA S9 (500 µl)	T R A T A M I E N T O µl	A G E N T E
1	TA 98	-	10	DMSO
2	TA 98	+	10	DMSO
3	TA 100	-	10	DMSO
4	TA 100	+	10	DMSO
5	TA 98	-	10	Ac. picrolónico ( 100 µg/caja)
6	TA 100	-	10	N-metilnitrosoguanidina (1 µg/caja)
7	TA 98	+	10	2 aminoantraceno (0.8 µg/caja)
8	TA 100	+	10	2 aminoantraceno (0.8 µg/caja)
9	TA 98	-	10	extracto
10	TA 98	+	10	extracto
11	TA 100	-	10	extracto
12	TA 100	+	10	extracto
13	TA 98	-	10	Dil. 1:10 del extracto
14	TA 98	+	10	Dil. 1:10 del extracto
15	TA 100	-	10	Dil. 1:10 del extracto
16	TA 100	+	10	Dil. 1:10 del extracto
17	TA 98	-	10	Dil. 1:100 del extracto
18	TA 98	+	10	Dil. 1:100 del extracto
19	TA 100	-	10	Dil. 1:100 del extracto
20	TA 100	+	10	Dil. 1:100 del extracto
21	TA 98	-	200	Agua cruda
22	TA 98	+	200	Agua cruda
23	TA 100	-	200	Agua cruda
24	TA 100	+	200	Agua cruda

Cada uno se realizó por triplicado.

## RESULTADOS DE LA EVALUACION MUTAGENICA DEL AGUA RESIDUAL Y-- RENOVADA DE LA PLANTA DE TRATAMIENTO DE CIUDAD UNIVERSITARIA.

### A. MUESTRAS DE AGUA SIN CONCENTRAR.

Se determinó la actividad mutagénica de 10 muestras de agua de los distintos puntos de la planta de tratamiento - sin que mediara ningún proceso para concentrar los compuestos orgánicos contenidos en ellas, sin que se obtuvieran resultados positivos. Cinco de esas muestras de agua también fueron procesadas para extraer y probar la mutagenicidad de las subtancias presentes en ellas.

### B. VALORACION DE EXTRACTOS.

En 3 de los seis muestreos que se realizaron para - extraer los compuestos orgánicos en agua, se detectó la presencia de mutágenos o se observó muerte en las bacterias expues--tas a las fracciones ácidas o alcalinas provenientes tanto de las aguas residuales como de los 3 procesos de tratamiento y - de las aguas renovadas. Mientras que en los tres primeros muestreos no se observó ningún tipo de actividad.

Los resultados de la actividad mutagénica observada se encuentran resumidos en la Tabla 4, así como aquellos obtenidos con los controles positivos y negativos utilizados en -

paralelo.

En las muestras obtenidas en diciembre, se obtuvieron los siguientes resultados: (Fig. 5 y Tabla 5).

**INFLUENTE:**

- a) Fracción ácida. La muestra concentrada produjo muerte en las bacterias de la cepa TA 100. Dicho efecto desapareció al diluir la muestra o al agregar el sistema de transformación metabólica S9.
- b) Fracción alcalina. Se observó toxicidad en las cepas TA 98 y TA 100 la cual desapareció en la dilución 1:100. No se observó ninguna toxicidad al agregar el sistema de activación metabólica S9.

**LODOS ACTIVADOS:**

- a) Fracción ácida: Tanto la muestra concentrada como las diluciones 1:10 y 1:100 tuvieron efectos tóxicos en las cepas TA 98 y TA 100 que no se redujeron al agregar el sistema metabólico S9.
- b) Fracción alcalina: En la muestra concentrada se encontró mutagenicidad en la cepa TA 98, en presencia de las enzimas metabólicas, y se observó una leve mutagenicidad con la dilución 1:10, la cual desapareció al diluir la muestra 1:100.

**FILTRO ROCIADOR:**

a) Fracción ácida. Se observó una leve mutagenicidad de la muestra concentrada, sobre la cepa TA 98 en presencia de enzimas metabólicas S9.

b) Fracción alcalina. Se encontró mutagenicidad de la muestra concentrada con la cepa TA 98 en presencia de enzimas metabólicas S9 y en ausencia de estas la muestra fué tóxica para dicha cepa.

**EFLUENTE FINAL:**

a) Fracción ácida. No se observó efecto alguno.

b) Fracción alcalina. La muestra concentrada fué tóxica para las cepas TA 98 y TA 100 en ausencia de la fracción S9, la cual desapareció al diluir la muestra. Al adicionar la fracción S9 se observó mutagenicidad para la cepa TA 98.

**CISTERNA:**

a) Fracción ácida. No hubo efecto.

b) Fracción alcalina. La muestra concentrada fué tóxica para las cepas TA 98 y TA 100 en ausencia de la fracción S9. Al adicionar la fracción S9 ésta fué mutagénica para la cepa TA 98 y levemente mutagénica para la cepa TA 100, las diluciones 1:10 y 1:100 mostraron una leve mutagenicidad. La dilución 1:10 mostró una leve mutagenicidad para la cepa TA 98 en ausencia de la fracción S9.

T A B L A 4

COMPARACION DE LA ACTIVIDAD MUTAGENICA DE LOS EXTRACTOS DE MUESTRAS DE AGUA RESIDUAL CON RESPECTO A LA DE MUTAGENOS CONOCIDOS.

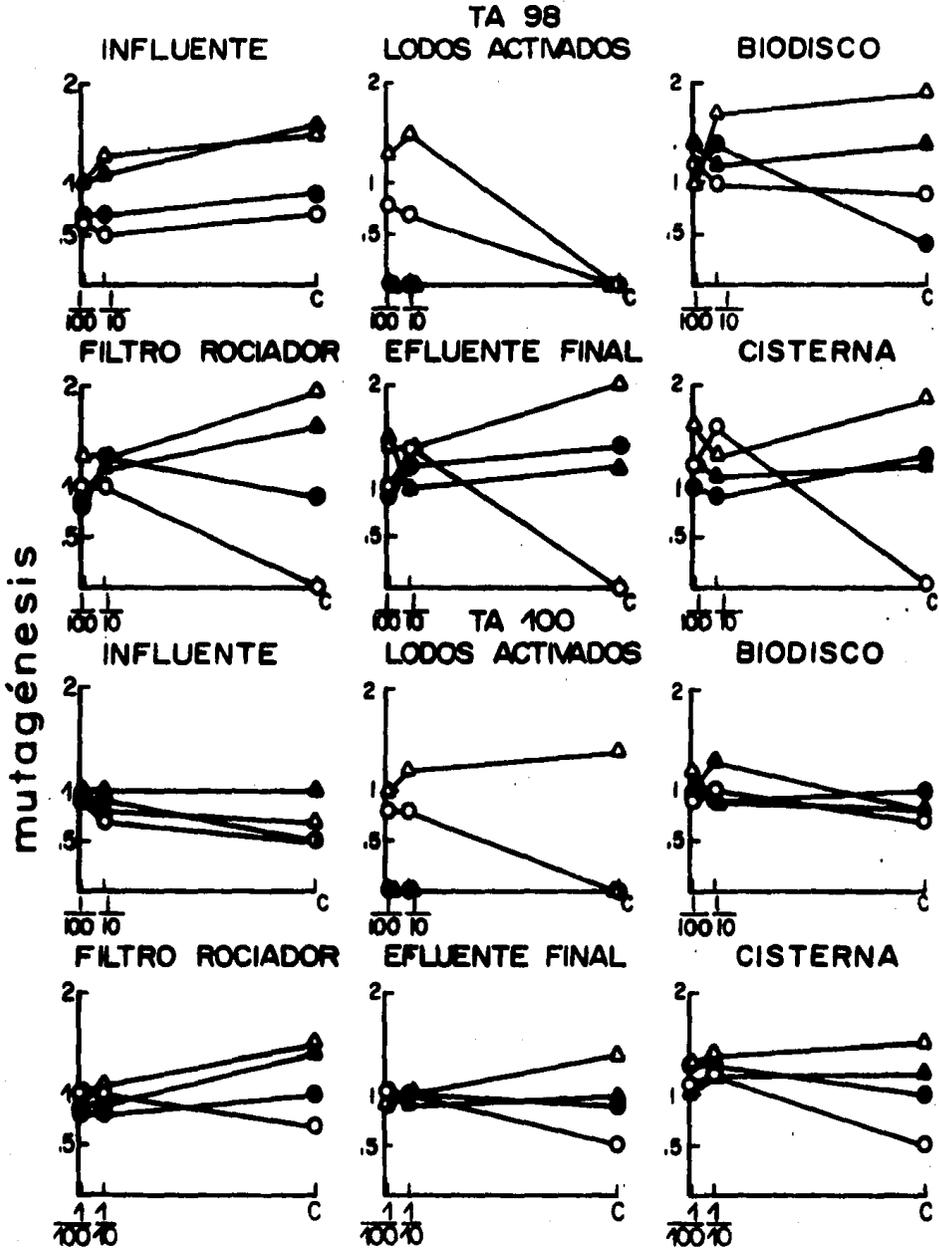
Número de Muestra	Lugar	Fracción	Dilución de la Muestra	M U T A G E N I C I D A D			
				Cepa TA 98 S9-	S9+	Cepa TA 100 S9-	S9+
4	Biodisco	Alcalina	C	-	$\bar{X}=74.3$ $S=10.2$ $I=1.9$	-	-
4	Filtro Rociador	Alcalina	C	-	$\bar{X}=74.3$ $S=10.0$ $I=1.95$	-	-
4	Efluente	Alcalina	C	-	$\bar{X}=77.6$ $S=3.06$ $I=2.04$	-	-
4	Cisterna	Alcalina	C	-	$\bar{X}=71.0$ $S=7.00$ $I=1.87$	-	-
5	Influente	Acida	C	-	-	$\bar{X}=272.3$ $S=33.85$ $I=1.750$	$\bar{X}=429.6$ $S=52.78$ $I=2.800$
5	Influente	Alcalina	C	-	$\bar{X}=97.6$ $S=4.50$ $I=2.40$	-	-
5	Lodos Activados	Acida	C	-	$\bar{X}=77.6$ $S=2.80$ $I=1.90$	-	-
5	Efluente	Acida	C	-	$\bar{X}=59.0$ $S=9.00$ $I=1.97$	-	-
5	Efluente	Alcalina	C	-	$\bar{X}=58.3$ $S=9.00$ $I=1.95$	-	-
5	Cisterna	Acida	C	-	$\bar{X}=46.3$ $S=10.2$ $I=2.43$	-	-
5	Cisterna	Alcalina	C	-	$\bar{X}=125.3$ $S=7.02$ $I=4.60$	-	-
6	Lodos Activados	Acida	C	-	$\bar{X}=78.6$ $S=8.86$ $I=2.80$	-	-
6	Lodos Activados	Alcalina	1:10	-	$\bar{X}=56.3$ $S=5.50$ $I=2.06$	-	-
6	Biodisco	Acida	C	-	$\bar{X}=45.6$ $S=14.6$ $I=2.04$	-	-
6	Biodisco	Acida	1:10	-	$\bar{X}=45.3$ $S=12.7$ $I=2.02$	-	-
6	Filtro Rociador	Acida	C	-	$\bar{X}=46.6$ $S=8.00$ $I=2.08$	-	-
6	Filtro Rociador	Acida	1:10	-	$\bar{X}=48.0$ $S=9.16$ $I=2.15$	-	-
Control + DMSO	(promedio general)	-	-	$\bar{X}=38.2$ $S=10.5$	$\bar{X}=36.1$ $S=10.7$	$\bar{X}=131.6$ $S=30.90$	$\bar{X}=123.9$ $S=32.00$
Ac. Picrolónico	(100 µg/caja) (promedio general)	-	-	$\bar{X}=152.15$ $S=47.5$ $I=4.00$	-	-	-
N-Metil-N nitrosouanidina	(1 µg/caja) (promedio general)	-	-	-	-	$\bar{X}=637.4$ $S=1657.6$ $I= 50.0$	-
2 aminoantraceno	(0.8 µg/caja) (promedio general)	-	-	-	$\bar{X}=280.5$ $S=164.9$ $I= 8.0$	-	$\bar{X}=451.4$ $S=172.1$ $I= 4.0$
Reversión Espontánea experimental	(promedio general)	-	-	$\bar{X}=35.3$ $S=12.64$	-	$\bar{X}=127.99$ $S= 23.44$	-

$\bar{X}$  = Promedio; S = Desviación estándar; DMSO = Dimetilsulfóxido; S9 = Sistema de activación metabólico

I =  $\frac{\text{Reversión Inducida}}{\text{Reversión Espontánea}}$

EFFECTO DE LA DILUCION DE LA MUESTRA EN LA MUTAGENICIDAD.

MUESTRA 4



FRACCION ACIDA 99- ● — FRACCION ALCALINA 99- ○ — C = 20 ML. DE AGUA  
 99+ ▲ — 99+ ▲ — 1/10 = 2 ML. DE AGUA  
 1/100 = 0.2ML. DE AGUA

T A B L A 5

MUTAGENICIDAD Y TOXICIDAD\* DE LAS MUESTRAS DE AGUA COLECTADAS EN DICIEMBRE.

M U E S T R A	(C O N C .)	O R G A N I S M O				I N D I C A D O R			
		C E P A T A 9 8				C E P A T A 1 0 0			
		F R A C C I O N A C I D A		F R A C C I O N A L C A L I N A		F R A C C I O N A C I D A		F R A C C I O N A L C A L I N A	
S9 <sup>-</sup>	S9 <sup>+</sup>	S9 <sup>-</sup>	S9 <sup>+</sup>	S9 <sup>-</sup>	S9 <sup>+</sup>	S9 <sup>-</sup>	S9 <sup>+</sup>		
1. INFLUENTE	C	-	-	-	-	T(0.5)	-	T(0.5)	-
2. LODOS ACTIVADOS	C °	T(0.0)	T(0.0)	T(0.0)	T(0.0)	T(0.0)	T(0.0)	T(0.0)	-
3. BIODISCO	C	T(0.4)	-	-	M(1.9)	-	-	-	-
4. FILTRO ROCIADOR	C	-	-	T(0.0)	M(1.95)	-	-	-	-
5. EFLUENTE	C	-	-	T(0.0)	M(2.04)	-	-	T(0.5)	-
6. CISTERNA	C	-	-	T(0.2)	M(1.87)	-	-	T(0.5)	-

\* Expresada como muerte de las bacterias de las cepas de *Salmonella typhimurium*.

S9 Sistema de transformación metabólica.

- Negativo.

T Toxicidad (0.0) Decremento en el número de colonias revertantes con respecto al control.

M Mutagenicidad (2.0) Incremento en el número de colonias revertantes con respecto al control.

° Las diluciones de las muestras de agua 1:10 y 1:100 también fueron tóxicas T(0.0).

Muestreo número 5 en Dic. A continuación se resumen los datos obtenidos. (Fig. 6 y Tabla 6).

**INFLUENTE:**

a) Fracción ácida. La muestra concentrada y la dilución 1:10 fueron tóxicas en presencia de la fracción S9 para la cepa TA 98. La muestra concentrada mostró efectos mutagénicos en la cepa TA 100, dicho efecto se incrementó en presencia de las enzimas metabólicas, la dilución 1:10 mostró una leve mutagenicidad en ausencia de fracción S9 para la cepa TA 100.

b) Fracción alcalina. La muestra concentrada tuvo efecto mutagénico en la cepa TA 98, tal efecto desapareció al adicionar el sistema de activación metabólica.

**LODOS ACTIVADOS:**

a) Fracción ácida. Se detectó mutagenicidad para la cepa TA 98 en la muestra concentrada. La mutagenicidad desapareció al diluir y adicionar las enzimas metabólicas.

b) Fracción alcalina. La muestra concentrada fué tóxica para ambas cepas en presencia y ausencia del sistema metabólico S9 y en la dilución 1:10 para la cepa TA 100 en presencia de fracción S9.

**BIODISCO:**

a) Fracción ácida. La muestra concentrada y la dilución 1:10-

fueron tóxicas para las cepas TA 98 y TA 100 tanto en presencia como en ausencia de fracción S9, dicha toxicidad desapareció en la dilución 1:100.

b) Fracción alcalina. No se observó ningún efecto.

#### **FILTRO ROCIADOR:**

a) Fracción ácida. La muestra concentrada y la dilución 1:10 fueron tóxicas para la cepa TA 100 en presencia y ausencia -- del sistema de activación metabólico.

b) Fracción alcalina. La muestra concentrada fué tóxica para la cepa TA 100 en presencia y ausencia de la fracción S9.

#### **EFLUENTE FINAL:**

a) Fracción ácida. La muestra concentrada fué mutagénica para la cepa TA 98 en ausencia de la fracción S9, y tuvo efectos - tóxicos para las cepas TA 98 y TA 100 en presencia de la fracción microsomal S9, asimismo fué tóxica para la cepa TA 100 - en ausencia de S9.

La dilución 1:10 fué tóxica para la cepa TA 100 en presencia de S9.

b) Fracción alcalina. La muestra concentrada fué mutagénica - para la cepa TA 98 en ausencia del sistema de activación metabólica, fué levemente mutagénico en presencia de S9 y mostró ser tóxica para la cepa TA 100 en presencia y ausencia del --

sistema de activación metabólico.

Dichos efectos desaparecieron al diluir la muestra.

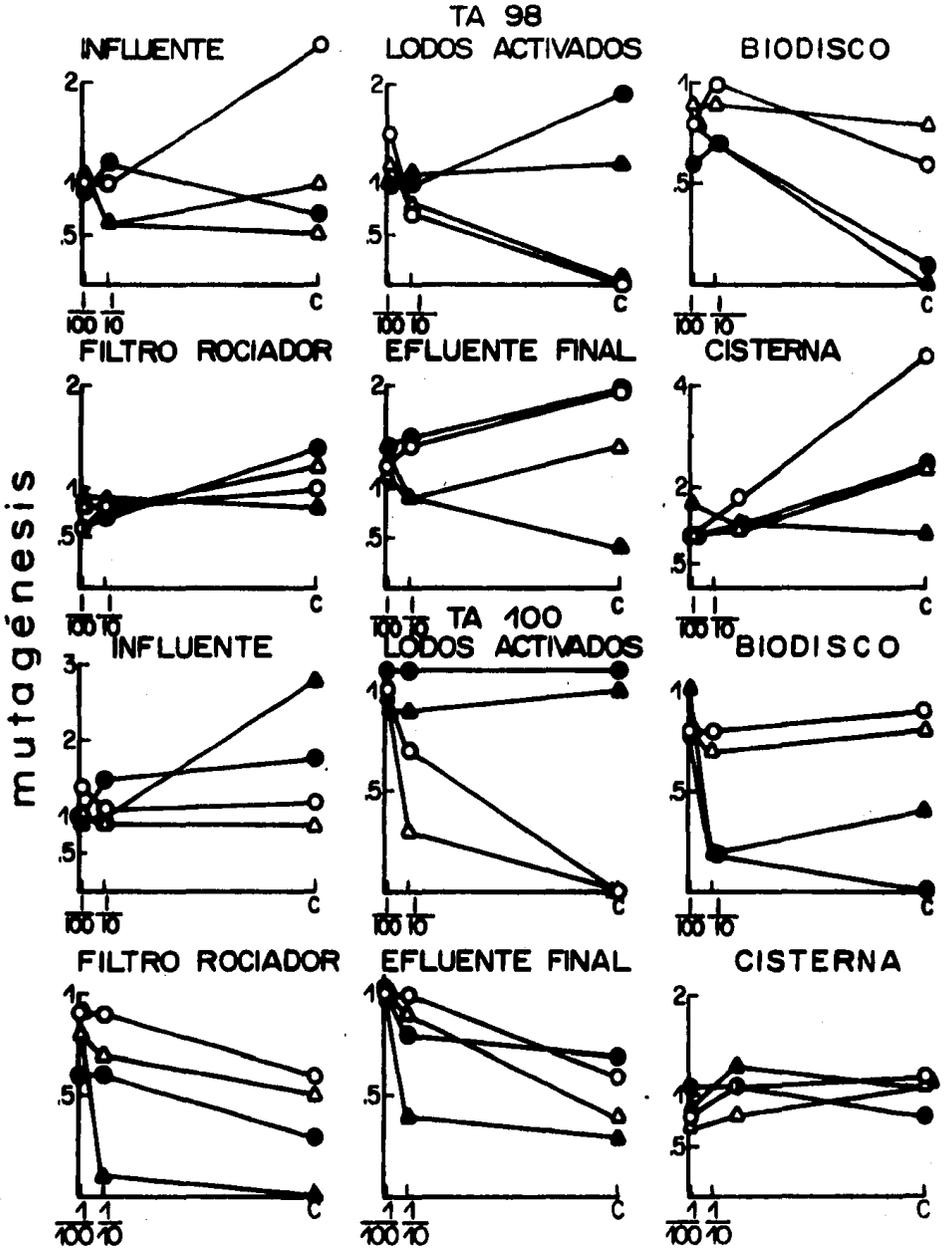
**CISTERNA:**

a) Fracción ácida. La muestra concentrada fué mutagénica para la cepa TA 98 en ausencia de la fracción S9.

b) Fracción alcalina. La muestra concentrada y la dilución -- 1:10 mostraron efectos mutagénicos en la cepa TA 98 en ausencia del sistema de activación metabólico.

EFFECTO DE LA DILUCION DE LA MUESTRA EN LA MUTAGENICIDAD.

MUESTRA 5



FRACCION ACIDA

99- ● —  
99+ ▲ —

FRACCION ALCALINA

99- ○ —  
99+ △ —

C = 20 ML. DE AGUA  
1/10 = 2 ML. DE AGUA  
1/100 = 0.2 ML. DE AGUA

T A B L A 6

MUTAGENICIDAD Y TOXICIDAD\* DE LAS MUESTRAS DE AGUA COLECTADAS EN DICIEMBRE.

MUESTRA	(CONC.)	ORGANISMO				INDICADOR			
		CEPA TA 98				CEPA TA 100			
		FRACCION ACIDA		FRACCION ALCALINA		FRACCION ACIDA		FRACCION ALCALINA	
S9 <sup>-</sup>	S9 <sup>+</sup>	S9 <sup>-</sup>	S9 <sup>+</sup>	S9 <sup>-</sup>	S9 <sup>+</sup>	S9 <sup>-</sup>	S9 <sup>+</sup>		
1. INFLUENTE	C 1:10	-	T(0.5) T(0.6)	M(2.4)	-	M(1.75)	M(2.8)	-	-
2. LODOS ACTIVADOS	C 1:10	M(1.9)	-	T(0.0)	T(0.0)	-	-	T(0.0)	T(0.0) T(0.3)
3. BIODISCO	C 1:10	T(0.1)	T(0.0)	-	-	T(0.0) T(0.2)	T(0.4) T(0.2)	-	-
4. FILTRO ROCIADOR	C 1:10 1:100	-	-	-	-	T(0.3) T(0.6)	T(0.1) T(0.1) T(0.6)	T(0.6)	T(0.5) -
5. EFLUENTE	C	M(1.97)	T(0.4)	M(1.95)	-	-	T(0.3)	T(0.6)	T(0.4)
6. CISTERNA	C	M(2.43)	-	M(4.6)	-	-	-	-	-

\* Expresada como muerte de las bacterias de las cepas de *Salmonella typhimurium*

S9 Sistema de transformación metabólica.

- Negativo.

T Toxicidad (0.0) Decremento en el número de colonias revertantes con respecto al control.

M Mutagenicidad (2.0) Incremento en el número de colonias revertantes con respecto al control.

Muestreo número 4 en Dic. Se describen a continuación los resultados obtenidos en las diferentes muestras. (Fig. 7 y Tabla 7).

**INFLUENTE:**

a) Fracción ácida. La muestra concentrada fué tóxica para la cepa TA 100 en ausencia de S9 y fué levemente mutagénica para la cepa TA 98 en presencia de la mezcla de activación metabólica.

b) Fracción alcalina. La muestra concentrada fué tóxica para las cepas TA 98 y TA 100 en ausencia de las enzimas metabólicas, dicha toxicidad desapareció al diluir la muestra, con la cepa TA 98 en presencia de las enzimas metabólicas mostró una leve mutagenicidad, lo cual se observó nuevamente en la dilución 1:10 en presencia y ausencia de S9.

**LODOS ACTIVADOS:**

a) Fracción ácida. La muestra concentrada fué mutagénica para la cepa TA 98. La mutagenicidad desapareció al diluir la muestra y disminuyó al adicionar las enzimas metabólicas.

b) Fracción alcalina. La muestra concentrada fué tóxica para la cepa TA 98 y mostró una leve mutagenicidad en presencia de la mezcla de activación metabólica S9. La dilución 1:10 fué mutagénica para la cepa TA 98 en ausencia del sistema de activación metabólico.

**BIODISCO:**

a) Fracción ácida. La muestra concentrada y la dilución 1:10 fueron mutagénicas para la cepa TA 98 en presencia de las enzimas metabólicas. La muestra concentrada fué levemente mutagénica para la cepa TA 98 en ausencia de las enzimas metabólicas.

b) Fracción alcalina. Las diluciones 1:10 y 1:100 fueron levemente mutagénicas para la cepa TA 98 en presencia de las enzimas metabólicas.

**FILTRO ROCIADOR:**

a) Fracción ácida. La muestra concentrada y la dilución 1:10 fueron mutagénicas para la cepa TA 98 en presencia de la fracción S9. La mutagenicidad disminuyó ligeramente en la dilución 1:100. La muestra concentrada mostró una leve mutagenicidad para la cepa TA 98 en ausencia de las enzimas metabólicas.

b) Fracción alcalina. La muestra concentrada fué tóxica para las cepas TA 98 y TA 100 en presencia y ausencia de las enzimas metabólicas, así mismo en la dilución 1:10 para la cepa TA 100.

La dilución 1:10 mostró una leve mutagenicidad para la cepa TA 98 en presencia de las enzimas metabólicas.

**EFLUENTE FINAL:**

a) Fracción ácida. La muestra concentrada y la dilución 1:10 fueron tóxicas para las cepas TA 98 y TA 100, en presencia y ausencia de las enzimas metabólicas, dicha toxicidad desapareció al diluir la muestra.

b) Fracción alcalina. La muestra concentrada fué tóxica para la cepa TA 100, en presencia y ausencia de S9 y en la cepa TA 100, en presencia y ausencia de S9 y en la cepa TA 98 solo en presencia de S9 hubo toxicidad. La dilución 1:100 fué tóxica únicamente para la cepa TA 100 en presencia de las enzimas metabólicas S9, y la dilución 1:100 fué levemente mutagénica para la cepa TA 98 en ausencia de S9.

**CISTERNA:**

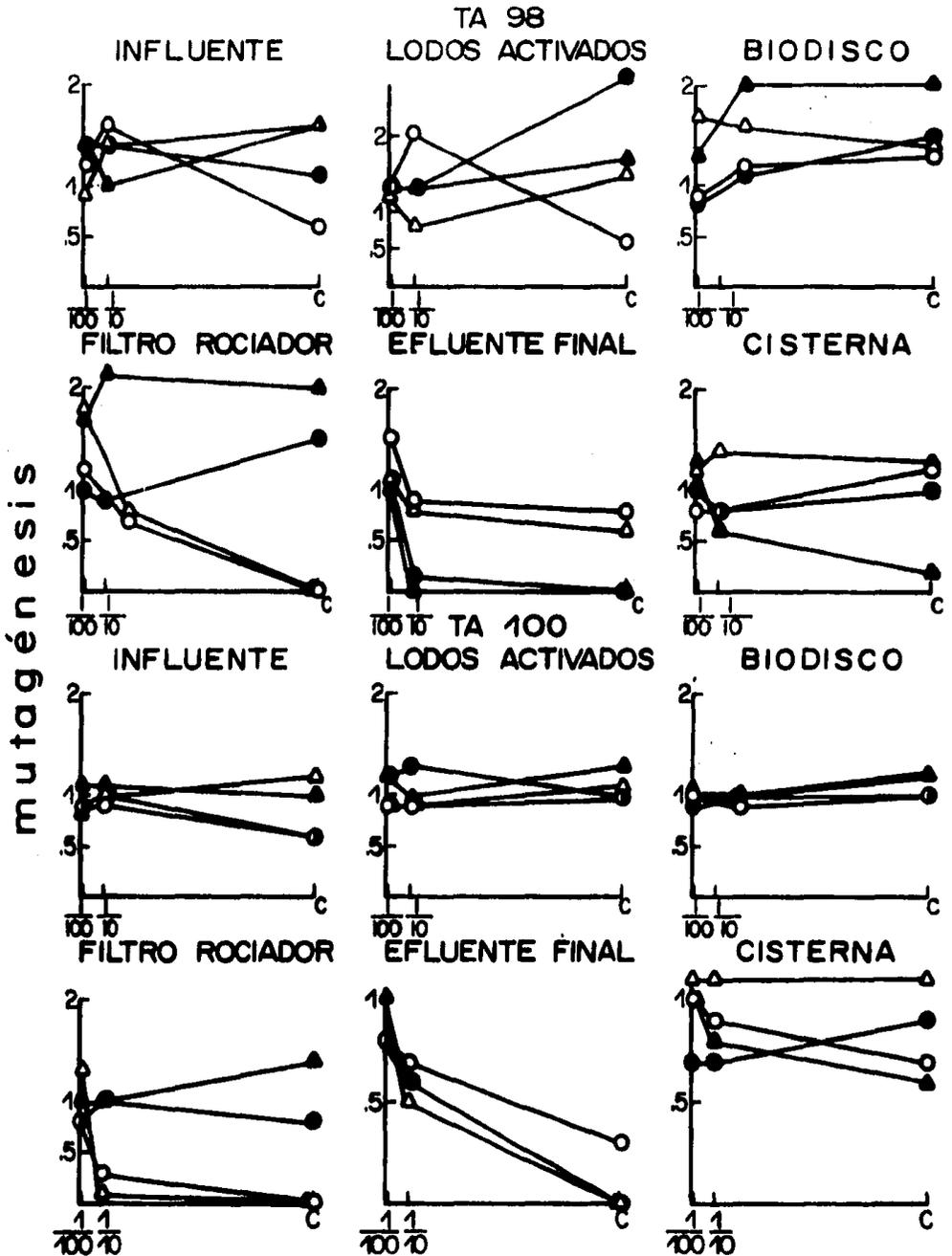
a) Fracción ácida. La muestra concentrada y la dilución 1:10 mostraron toxicidad para la cepa TA 98 en presencia del sistema de activación metabólico S9. La muestra concentrada fué tóxica para la cepa TA 100 en presencia de S9.

b) Fracción alcalina. No se observó ningún efecto.

- FIGURA 7 -

EFFECTO DE LA DILUCION DE LA MUESTRA EN LA MUTAGENICIDAD

MUESTRA 6



FRACCION ACIDA 89- ● — FRACCION ALCALINA 89- ○ — C = 20 ML DE AGUA  
 89+ ▲ — 89+ △ — 1/10 = 2 ML DE AGUA  
 1/100 = 0.2 ML DE AGUA

**T A B L A 7**

**MUTAGENICIDAD Y TOXICIDAD\* DE LAS MUESTRAS DE AGUA COLECTADAS EN ENERO.**

M U E S T R A (CONC.)	O R G A N I S M O				I N D I C A D O R			
	C E P A T A 98				C E P A T A 100			
	FRACCION ACIDA S9 <sup>-</sup> S9 <sup>+</sup>		FRACCION ALCALINA S9 <sup>-</sup> S9 <sup>+</sup>		FRACCION ACIDA S9 <sup>-</sup> S9 <sup>+</sup>		FRACCION ALCALINA S9 <sup>-</sup> S9 <sup>+</sup>	
1. INFLUENTE	C	-	-	T(0.6)	-	T(0.6)	-	-
2. LODOS ACTIVADOS	C 1:10	M(2.8)	-	T(0.6) M(2.06)	-	-	-	-
3. BIODISCO	C 1:10	-	M(2.04) M(2.03)	-	-	-	-	-
4. FILTRO ROCIADOR	C 1:10	-	M(2.08) M(2.15)	T(0.0)	-	T(0.0)	-	T(0.0) T(0.1)
5. EFLUENTE	C 1:10	T(0.0) T(0.15)	T(0.0) T(0.0)	-	-	T(0.6)	-	T(0.0) T(0.5)
6. CISTERNA	C 1:10	-	T(0.2) T(0.6)	-	-	-	-	T(0.6) -

\* Expresada como muerte de las bacterias de las cepas de *Salmonella typhimurium*.

S9 Sistema de transformación metabólica.

- Negativo.

T Toxicidad (0.0) Decremento en el número de colonias revertantes con respecto al control.

M Mutagenicidad (2.0) Incremento en el número de colonias revertantes con respecto al control.

En resúmen, la fracción ácida presentó mutagenicidad en 10 de las pruebas, mientras que la fracción alcalina en 8 de ellas. La cepa TA 98 permitió detectar mutagenicidad en 14 de las pruebas y la TA 100 en 2 ocasiones únicamente.

En 9 pruebas la mutagenicidad se manifestó sin la participación del sistema de transformación metabólica y en otras 7 se requirió de activación enzimática.

No se obtuvo una relación clara entre la mutagenicidad y la toxicidad.

Las Tablas 5, 6 y 7 muestran la mutagenicidad (I) y la toxicidad observada en cada sitio de muestreo, la toxicidad fué medida cualitativamente.

Se intentó encontrar una correlación de los resultados de la mutagenicidad con los de la química analítica. Primeramente se obtuvo el porcentaje de compuestos orgánicos que rebasaban los límites permisibles para riego de áreas verdes para cada sitio de muestreo, tanto para la fracción ácida como para la fracción alcalina, esta relación se encuentra en las Figuras 8, 9, 10 y 11 y como se puede observar es imposible asegurar la correlación de esta manera:

Compuestos orgánicos que rebasan los límites permisibles para riego de áreas verdes X 100.

---

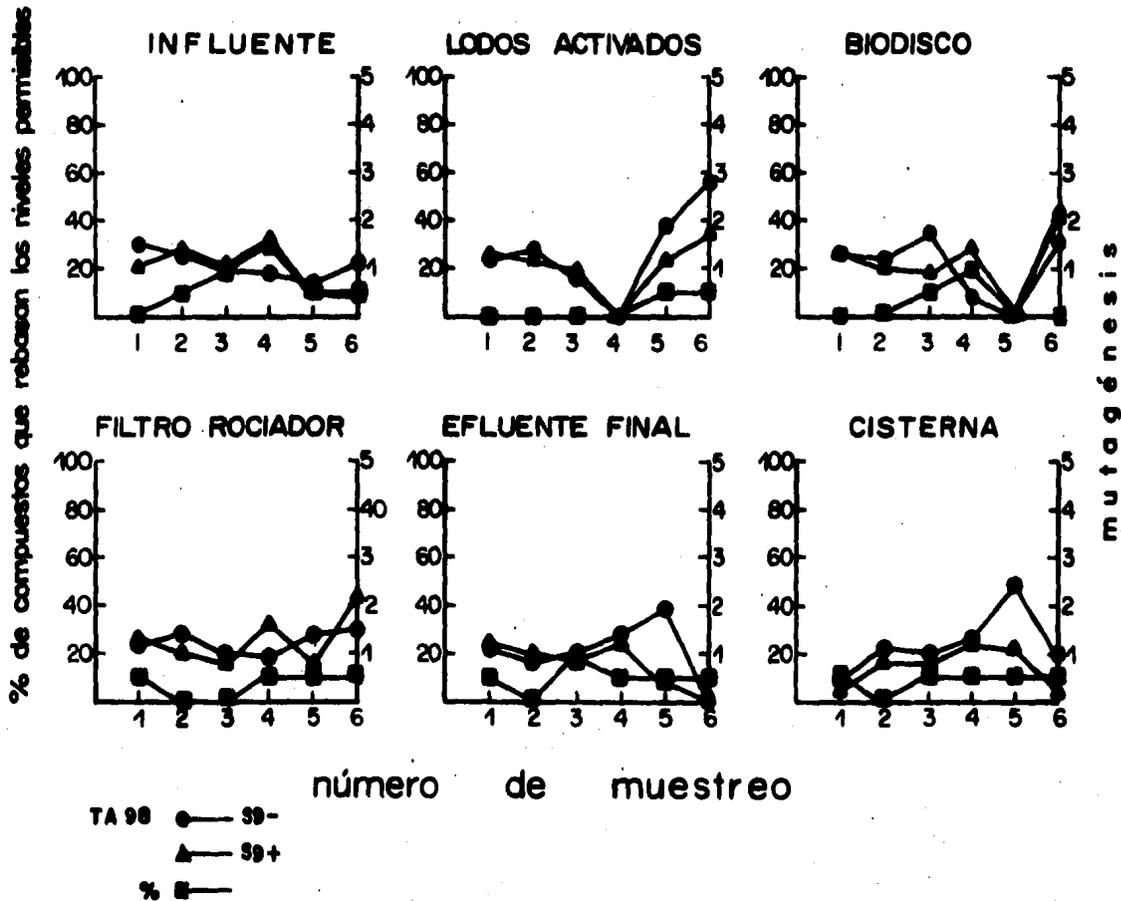
Compuestos orgánicos totales encontrados en la fracción ácida o alcalina.

Posteriormente se determinó el índice de calidad de las aguas (ICA), de la siguiente manera:

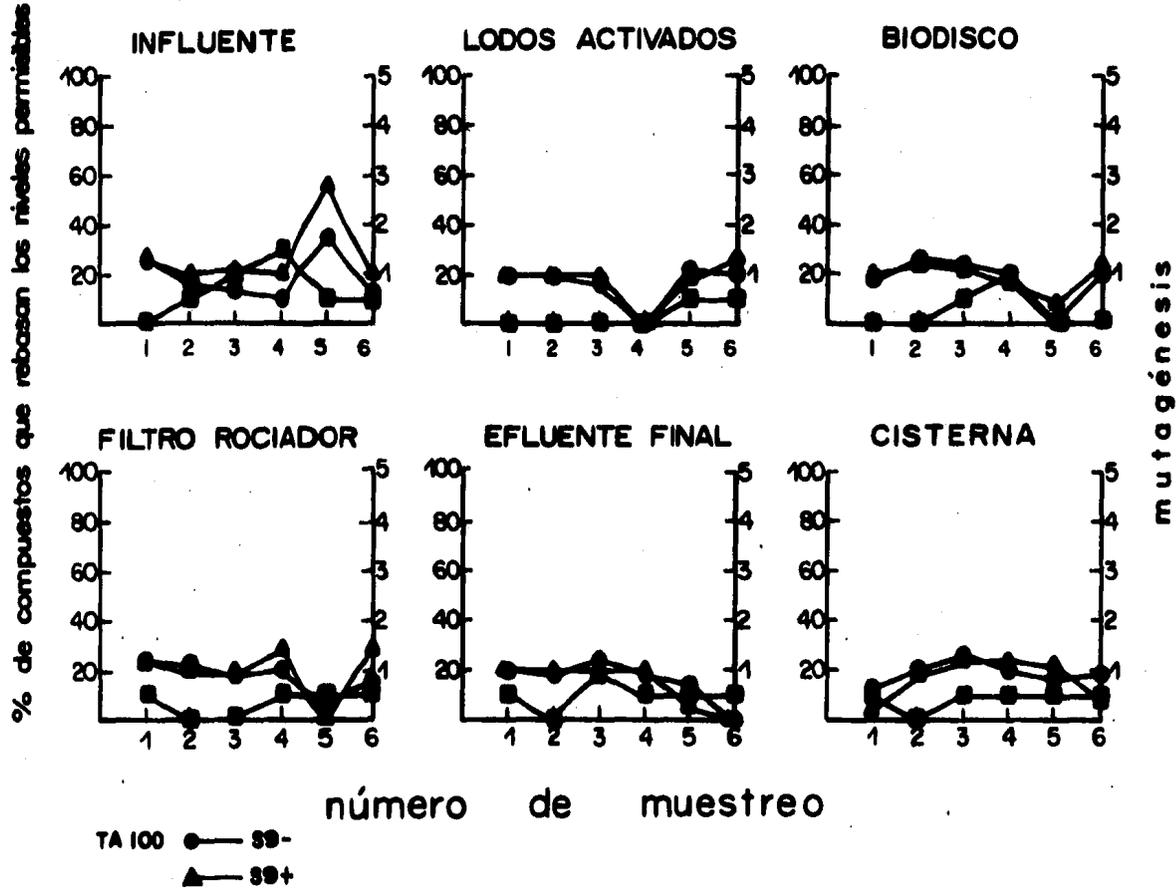
$$\text{ICA} = \frac{\text{mg/l del compuesto orgánico "X" del agua}}{\text{mg/l del compuesto orgánico de acuerdo con los criterios de calidad RQB del agua para riego de áreas verdes (Tabla 8)}}$$

El ICA obtenido para los 6 muestreos se encuentra contenido en las Tablas de la 9 a la 20 para la fracción ácida como alcalina y como se puede observar no se obtuvo ninguna correlación clara de esta manera.

RELACION ENTRE MUTAGENESIS Y PRESENCIA DE AGENTES QUIMICOS EN AGUA RENDADA  
FRACCION ACIDA

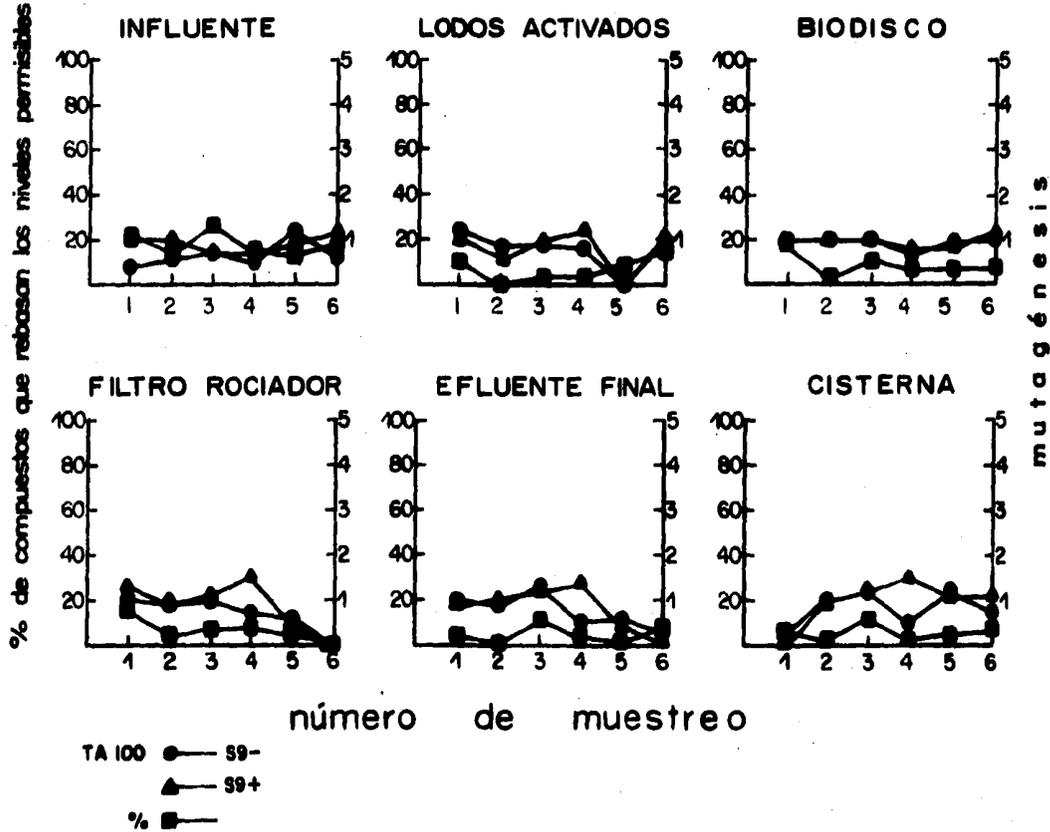


RELACION ENTRE MUTAGENESIS Y PRESENCIA DE AGENTES QUIMICOS EN AGUA RENOVADA  
FRACCION ACIDA



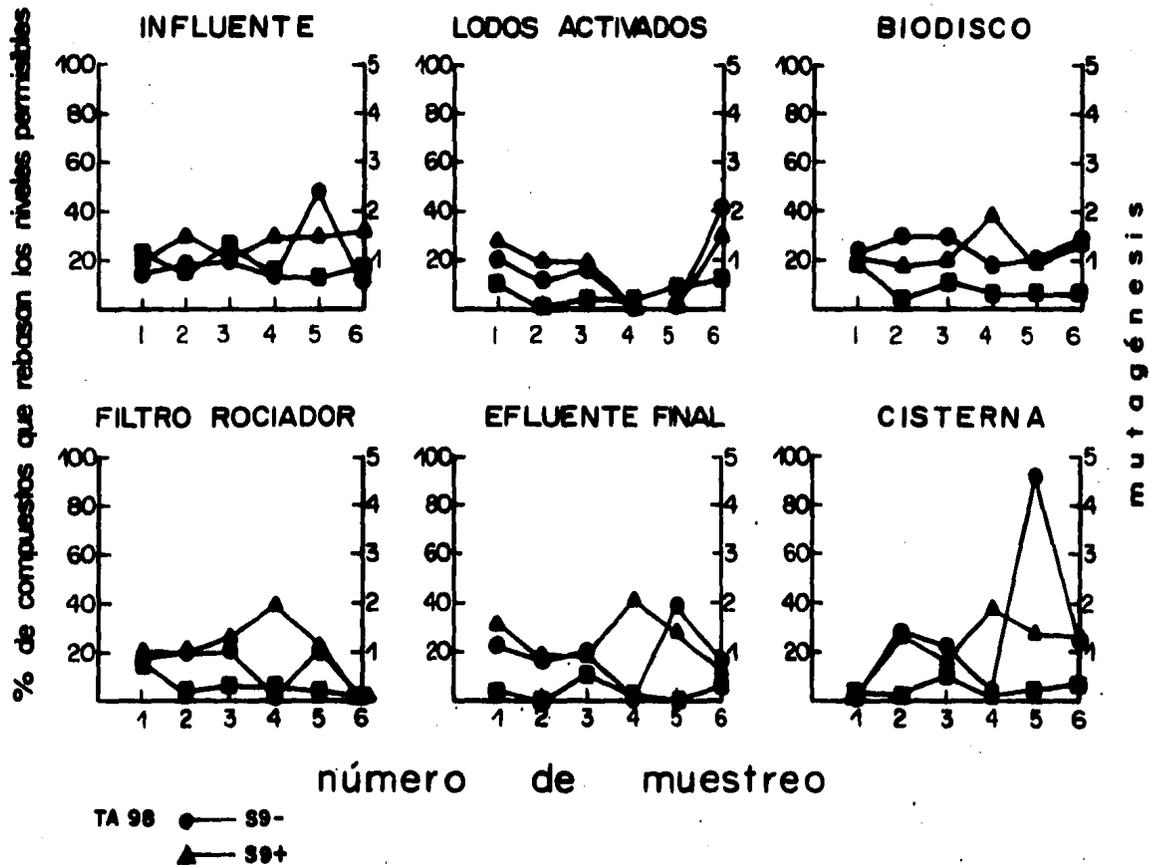
- FIGURA 10 -

RELACION ENTRE MUTAGENESIS Y PRESENCIA DE AGENTES QUIMICOS EN AGUA RENOVADA  
FRACCION ALCALINA



- FIGURA II -

**RELACION ENTRE MUTAGENESIS Y PRESENCIA DE AGENTES QUIMICOS EN AGUA RENOVADA  
FRACCION ALCALINA**



T A B L A 8

## CRITERIOS DE CALIDAD PARA RIEGO DE AREAS VERDES.

Clave	Compuesto	Fórmula	Valor de Criterio(mg/l).
<b>EN LA FRACCION ACIDA.</b>			
<i>Nitrocompuestos Aromáticos</i>			
124	4 Nitrofenol		0.250
125	2,4 Dinitrofenol		14.300
<i>Fenoles</i>			
128	Fenol		2.560
129	2,4 Dimetilfenol		0.800
<i>Fenoles Clorados</i>			
130	Pentaclorofenol		0.150
131	p-Cloro-m-cresol		NS
132	2 Clorofenol		0.060
133	2,4 Diclorofenol		1.5E-4
134	2,4,6 Triclorofenol*		0.036
<b>EN LA FRACCION ALCALINA.</b>			
<i>Hidrocarburos Alifáticos Halogenados</i>			
78	Hexacloroetano*		0.540
79	Hexaclorobutadieno*		0.500
80	Hexaclorociclopentadieno		5.2E-3
<i>Hidrocarburos Aromáticos Halogenados</i>			
82	1,2 Diclorobenceno		0.050
83	1,3 Diclorobenceno		0.050
84	1,4 Diclorobenceno		0.050

TABLA 8 (continuación).

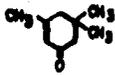
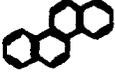
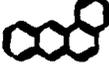
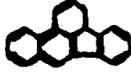
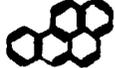
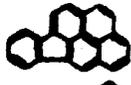
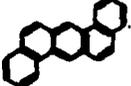
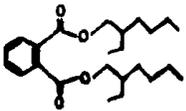
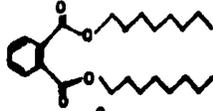
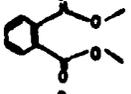
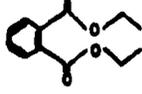
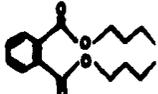
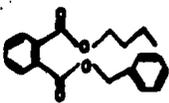
Clave	Compuesto	Fórmula	Valor de Criterio(mg/l)
<i>Hidrocarburos Aromáticos</i>			
88	Hexaclorobenceno		7.4E-6
89	1,2,4 Triclorobenceno		0.060
<i>Hidrocarburos Poliaromáticos</i>			
90	Naftaleno*		2.000
91	Isoforona*		520.000
92	Fluoreno*		NS
93	Fluoranteno*		3.980
94	Criseno*		NS
95	Pireno*		NS
96	Fenantreno*		3.11E-3
97	Antraceno*		3.11E-3
98	Benzo(a)antraceno*		3.11E-3
99	Benzo(k)fluoranteno*		3.11E-3
100	Benzo(b)fluoranteno*		3.11E-3
101	Benzo(a)pireno*		3.11E-3
102	Benzo(g,h,i)perilono*		3.11E-3
103	Indeno(1,2,3,c,d)pireno*		3.11E-3
104	Dibenzo(a,h)antraceno*		3.11E-3

TABLA 8 (continuación).

Clave	Compuesto	Fórmula	Valor de Criterio (mg/l)
105	Acenaftileno*		3.11E-3
106	Acenafteno*		3.11E-3
<i>Hidrocarburos Poliaromáticos Halogenados</i>			
107	2 Cloronaftaleno		1.600
<i>Esteres Halogenados</i>			
110	bis 2 Cloroetoximetano*	$\text{Cl-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-Cl}$	0.122
111	4 Clorofenilfeniléter*		0.546
112	bis 2(Cloroetil)éter*	$\text{Cl-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-Cl}$	0.122
113	4 Bromofenilfenil éter*		0.540
114	bis 2(Cloroisopropil)éter*		0.122
<i>Nitrocompuestos Alifáticos</i>			
115	N-Nitroedimetilamina*		0.585
116	N-Nitrosodi-n-propilamina*	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$	0.500
<i>Nitrocompuestos Aromáticos</i>			
117	Nitrobenzono		0.280
118	2,4 Dinitrotolueno*		0.230
119	2,6 Dinitrotolueno*		0.230
120	Bencidina*		5E-3
121	1,2 Difenilhidracina*		6.13E-3
122	N-Nitrosodifenilamina		0.585
127	3,3' Diclorobencidina*		2E-3

TABLA 8 (continuación).

Clave	Compuesto	Fórmula	Valor de Criterio(mg/l).
<i>Esteres del Acido Ftálico</i>			
147	bis (2 etilhexilftalato)		313.000
148	Di-n-octilftalato		313.000
149	Dimetilftalato		313.000
150	Dietilftalato		313.000
151	Di-n-butilftalato		313.000
152	N-Butilbencilftalato		313.000

Ambient Water Quality, Mc Kee and Wolf (1963)

NS. No sancionado.

E. Exponencial.

\* Implica un riesgo de causar cáncer de 1 caso en 100,000.

T A B L A 9  
 COMPUESTOS ORGANICOS PRESENTES EN EXTRACTOS ACIDOS.

Muestreo: 1

Clave	Compuesto	INFLUENTE		Lodos Activados		BIODISCO		FILTRO ROCIADOR		EFLUENTE		CISTERNA	
		mg/l	ICA	mg/l	ICA	mg/l	ICA	mg/l	ICA	mg/l	ICA	mg/l	ICA
<i>Nitrocompuestos Aromáticos</i>													
124	4 Nitrofenol	0.0480	0.20	ND	-	0.0410	0.20	0.0186	0.07	0.0640	0.30	0.0530	0.20
125	2,4 Dinitrofenol	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
126	2,6 Dinitro-o-cresol	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
<i>Fenoles</i>													
128	Fenol	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
129	2,4 Dimetilfenol	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
<i>Fenoles Clorados</i>													
130	Pentaclorofenol	0.0900	0.60	0.0630	0.60	0.0131	0.09	0.1575	1.05	0.1640	1.09	0.1670	1.10
131	p Cloro-m-cresol	0.0084	NS	ND	NS	ND	NS	ND	NS	ND	NS	ND	NS
132	2 Clorofenol	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
133	2,4 Diclolorofenol	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
134	2,4,6 Triclolorofenol	0.0027	0.08	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
% de compuestos que rebasan los límites permisibles.				0		0		0		10		10	

ICA. Índice de calidad de las aguas.

ND. No detectado.

NS. No sancionado.

T A B L A 1 0  
 COMPUESTOS ORGANICOS PRESENTES EN EXTRACTOS ACIDOS.

Muestreo: 2

Clave	C o m p u e s t o	INFLUENTE		Lodos Activados		BIODISCO		FILTRO ROCIADOR		EFLUENTE		CISTERNA		
		mg/l	ICA	mg/l	ICA	mg/l	ICA	mg/l	ICA	mg/l	ICA	mg/l	ICA	
<i>Nitrocompuestos Aromáticos</i>														
124	4 Nitrofenol	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	
125	2,4 Dinitrofenol	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	
126	2,6 Dinitro-o-cresol	1.5600	1.20	0.0685	0.05	0.0934	0.07	0.0221	0.02	0.0277	0.02	0.0250	0.02	
<i>Fenoles</i>														
128	Fenol	0.0096	4E-3	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	
129	2,4 Dimetilfenol	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	
<i>Fenoles Clorados</i>														
130	Pentaclorofenol	0.0032	0.02	0.0004	5E-3	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	
131	p Cloro-m-cresol	ND	NS	ND	NS	ND	NS	ND	NS	ND	NS	ND	NS	
132	2 Clorofenol	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	
133	2,4 Diclорofenol	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	
134	2,4,6 Triclorofenol	0.0017	0.05	0.0010	0.03	0.0014	0.04	0.0010	0.03	ND	-	ND	-	
1 de compuestos que rebasan los límites permisibles.			10			0			0			0		

ICA. Índice de calidad de las aguas.

ND. No detectado.

NS. No sancionado.

E. Exponencial.

T A B L A 1 1  
 COMPUESTOS ORGANICOS PRESENTES EN EXTRACTOS ACIDOS.

Muestreo: 3

Clave	C o m p u e s t o	INFLUENTE		Lodos Activados		BIODISCO		FILTRO ROCIADOR		EFLUENTE		CISTERNA	
		mg/l	ICA	mg/l	ICA	mg/l	ICA	mg/l	ICA	mg/l	ICA	mg/l	ICA
<i>Nitrocompuestos Aromáticos</i>													
124	4 Nitrofenol	0.0069	0.03	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
125	2,4 Dinitrofenol	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
126	2,6 Dinitro-o-cresol	0.3030	0.20	ND	-	ND	-	ND	-	0.0054	4E-3	0.0035	3E-3
<i>Fenoles</i>													
128	Fenol	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
129	2,4 Dimetilfenol	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
<i>Fenoles Clorados</i>													
130	Pentaclorofenol	0.3723	2.50	ND	-	ND	-	0.0446	0.30	0.1800	1.20	0.2060	1.40
131	p Cloro-m-cresol	0.0016	NS	ND	NS	0.0010	NS	ND	NS	ND	NS	ND	NS
132	2 Clorofenol	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
133	2,4 Diclorofenol	0.0038	25.30	ND	-	0.0030	20.00	ND	-	0.0015	10.00	ND	-
134	2,4,6 Triclorofenol	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
‡ de compuestos que rebasan los límites permisibles.			20		-		10		-		20		10

ICA. Índice de calidad de las aguas.

ND. No detectado.

NS. No sancionado.

E. Exponencial.

T A B L A 1 2  
 COMPUESTOS ORGANICOS PRESENTES EN EXTRACTOS ACIDOS.

Muestreo: 4

Clave	Compuesto	INFLUENTE		Lodos Activados		BIODISCO		FILTRO ROCIADOR		EFLUENTE		CISTERNA	
		mg/l	ICA	mg/l	ICA	mg/l	ICA	mg/l	ICA	mg/l	ICA	mg/l	ICA
<i>Nitrocompuestos Aromáticos</i>													
124	4 Nitrofenol	0.4393	1.00	ND	-	0.0134	0.05	0.0193	0.05	0.0036	0.30	0.0283	0.10
125	2,4 Dinitrofenol	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
126	2,6 Dinitro-o-cresol	0.0542	0.04	ND	-	0.0297	0.23	ND	-	0.0423	0.03	0.0326	0.02
<i>Fenoles</i>													
128	Fenol	0.0234	9E-3	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
129	2,4 Dimetilfenol	0.0014	2E-3	ND	-	0.0016	2E-3	ND	-	ND	-	ND	-
<i>Fenoles Clorados</i>													
130	Pentaclorofenol	0.1893	1.20	ND	-	0.1694	1.10	ND	-	0.1502	1.00	0.1460	1.00
131	p Cloro-m-cresol	0.0038	NS	ND	NS	ND	NS	ND	NS	ND	NS	ND	NS
132	2 Clorofenol	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
133	2,4 Diclolorofenol	0.0183	122.00	ND	-	0.0038	25.00	0.0108	72.00	0.0088	59.00	0.0049	33.00
134	2,4,6 Triclolorofenol	0.0025	0.07	ND	-	ND	-	0.0022	0.06	0.0020	0.06	0.0017	0.05
% de compuestos que rebasan los límites permisibles.			30	-	20	10	10	10					

ICA. Índice de calidad de las aguas.

ND. No detectado.

NS. No sancionado.

E. Exponencial.

T A B L A 13  
 COMPUESTOS ORGANICOS PRESENTES EN EXTRACTOS ACIDOS.

Muestreo: 5

Clave	Compuesto	INFLUENTE		LADOS ACTIVADOS		BIODISCO		FILTRO ROCIADOR		EFLUENTE		CISTERNA	
		mg/l	ICA	mg/l	ICA	mg/l	ICA	mg/l	ICA	mg/l	ICA	mg/l	ICA
<i>Nitrocompuestos Aromaticos</i>													
124	4 Nitrofenol	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
125	2,4 Dinitrofenol	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
126	2,6 Dinitro-o-cresol	0.2577	0.20	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
<i>Fenoles</i>													
128	Fenol	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
129	2,4 Dimetilfenol	0.0019	2E-3	0.0010	1E-3	ND	-	ND	-	0.0010	1E-3	ND	-
<i>Fenoles Clorados</i>													
130	Pentaclorofenol	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
131	p Cloro-m-cresol	ND	NS	ND	NS	ND	NS	ND	NS	ND	NS	ND	NS
132	2 Clorofenol	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
133	2,4 Diclорofenol	0.0436	437.00	0.0018	12.00	ND	-	0.0015	10.00	0.0021	14.00	0.0012	8.00
134	2,4,6 Triclorofenol	0.0142	0.40	0.0016	0.04	0.0069	0.20	ND	-	0.0030	0.08	0.0019	0.05
* de compuestos que rebasan los límites permisibles.			10		10		-		10		10		10

ICA. Indica de calidad de las aguas.

ND. No detectado.

NS. No sancionado.

E. Exponencial.

T A B L A 1 4  
 COMPUESTOS ORGANICOS PRESENTES EN EXTRACTOS ACIDOS.

Muestreo: 6

Clave	C o m p u e s t o	INFLUENTE		Lodos Activados		BIODISCO		FILTRO ROCIADOR		EFLUENTE		CISTERNA	
		mg/l	ICA	mg/l	ICA	mg/l	ICA	mg/l	ICA	mg/l	ICA	mg/l	ICA
<i>Nitrocompuestos Aromaticos</i>													
124	4 Nitrofenol	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
125	2,4 Dinitrofenol	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
126	2,6 Dinitro-o-cresol	1.1930	0.90	ND	-	0.7630	0.60	1.1070	0.80	0.8098	0.60	0.7917	0.60
<i>Fenoles</i>													
128	Fenol	0.0061	3E-3	0.0025	1E-3	0.0026	1E-3	0.0013	4E-3	0.0084	2E-3	0.0028	1E-3
129	2,4 Dimetilfenol	0.0140	0.02	0.0034	4E-3	0.0049	6E-3	0.0045	3E-3	0.0090	0.01	0.0013	2E-3
<i>Fenoles Clorados</i>													
130	Pentaclorofenol	0.0047	0.03	ND	-	ND	-	0.0032	0.02	ND	-	ND	-
131	p Cloro-m-cresol	0.0070	NS	ND	NS	ND	NS	ND	NS	0.0030	NS	0.0024	NS
132	2 Clorofenol	0.0386	0.60	0.0053	0.08	0.0031	0.05	0.0027	0.05	0.0166	0.60	ND	-
133	2,4 Diclrofenol	0.0098	65.00	0.0035	23.00	0.0040	26.00	0.0078	52.00	0.0042	28.00	0.0035	23.00
134	2,4,6 Triclorofenol	0.0055	0.20	0.0033	0.09	0.0034	0.10	0.0048	0.10	0.0031	0.09	0.0024	0.06
4 de compuestos que rebasan los límites permisibles.			10		10		10		10		10		10

ICA. Indices de calidad de las aguas.

ND. No detectado.

NS. No sancionado.

E. Exponencial.



TABLA 15 (continuación)

Clave	Compuesto	INFLUENTE		Lodos Activados		BIODISCO		FILTRO ROCIADOR		EFLUENTE		CISTERNA	
		mg/l	ICA	mg/l	ICA	mg/l	ICA	mg/l	ICA	mg/l	ICA	mg/l	ICA
<i>Esteres Halogenados</i>													
110	bis 2 Cloroacetimidato	0.0330	0.20	0.0039	0.03	ND	-	0.0140	0.10	ND	-	ND	-
111	4 Clorofenilfenil éter	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
112	bis 2(Cloroetil)éter	0.0516	0.40	ND	-	0.0014	0.01	0.0013	0.01	ND	-	ND	-
113	4 Bromofenilfenil éter	0.1692	0.30	0.1609	0.30	0.1029	0.20	0.1660	0.30	0.0119	0.02	0.0300	0.05
114	bis 2(Cloroisopropil)éter	0.0835	0.70	0.0394	0.30	0.0454	0.40	ND	-	0.0089	0.07	0.0140	0.10
<i>Nitrocompuestos Alifáticos</i>													
115	N-Nitrosodimetilamina	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
116	N-Nitrosodi-n-propilamina	0.1873	0.40	0.0080	0.02	ND	-	0.0041	8E-3	ND	-	ND	-
<i>Nitrocompuestos Aromáticos</i>													
117	Nitrobeneno	0.0977	0.30	0.0018	6E-3	0.0044	0.02	0.0017	6E-3	ND	-	ND	-
118	2,4 Dinitrotolueno	0.3523	1.50	0.3020	1.30	0.3155	1.40	0.3475	1.50	0.0987	0.40	0.0835	0.40
119	2,6 Dinitrotolueno	0.1461	0.60	0.0810	0.20	0.0690	0.30	0.0930	0.40	0.0116	0.05	0.0152	0.06
120	Bencidina	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
121	1,2 Difenhidracina	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
122	N-Nitrosodifenilamina	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
127	3,3'Diclorobencidina	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
<i>Esteres del Acido Fólico</i>													
147	bis (2 etilhexilfitalato)	0.0501	2E-4	0.0018	6E-6	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
148	Di-n-octilfitalato	0.2919	9E-4	0.0118	4E-5	0.3317	1E-3	0.0964	2E-4	ND	-	0.0124	4E-5
149	Dimetilfitalato	0.2380	8E-4	0.0670	2E-4	0.1320	4E-4	0.1480	5E-4	0.0127	4E-5	0.0280	6E-5
150	Dicilfitalato	0.0964	3E-4	0.0712	2E-4	0.0864	5E-4	0.0611	2E-4	0.0190	6E-5	0.0292	9E-5
151	Di-n-Butilfitalato	0.0694	2E-4	0.0186	6E-5	0.0249	8E-5	0.0280	9E-5	ND	-	ND	-
152	Butilbencilfitalato	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
<p>4 de compuestos que rebasan los límites permisibles.</p>				21.7		10.8		19.6		15.2		4.3	

ICA. Índice de calidad de las aguas.

ND. No detectado.

NS. No sancionado.

E. Exponencial.



TABLA 16 (continuación).

Clave	INFLUENTE		Lodos Activados		BIODISCO		FILTRO ROCIADOR		EFLUENTE		CISTERNA	
	mg/l	ICA	mg/l	ICA	mg/l	ICA	mg/l	ICA	mg/l	ICA	mg/l	ICA
<i>Esteres Halogenados</i>												
110	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
111	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
112	0.0546	0.40	ND	-	ND	-	ND	-	0.0016	0.01	0.0115	0.09
113	0.0214	0.04	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
114	0.0952	0.80	0.0023	0.02	0.0331	0.30	0.0466	0.40	ND	-	0.0282	0.20
<i>Nitrocompuestos Alifáticos</i>												
115	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
116	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
<i>Nitrocompuestos Aromáticos</i>												
117	0.0217	0.08	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
118	0.0886	0.40	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
119	0.0787	0.30	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
120	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
121	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
122	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
127	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
<i>Esteres del Acido Ftálico</i>												
147	0.0220	7E-5	ND	-	0.0030	9E-6	0.0038	1E-5	ND	-	ND	-
148	0.1301	4E-4	0.0149	5E-5	0.0387	1E-4	0.0434	1E-4	0.01681	5E-5	0.0186	6E-5
149	0.0210	7E-5	0.0140	5E-5	ND	-	ND	-	0.0170	5E-5	0.0152	5E-5
150	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
151	0.0422	1E-4	ND	-	0.0012	4E-6	ND	-	ND	-	ND	-
152	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
4 de compuestos que rebasan los límites permisibles.		15.2		0.0		4.3		4.3		0.0		2.2

4 de compuestos que rebasan los límites permisibles.

ND. No detectado.

NS. No sancionado.

E. Exponencial.



TABLA 17 (continuación)

Clave	Compuesto	INFLUENTE		LODOS ACTIVADOS		BIODISCO		FILTRO ROCIADOR		EFLUENTE		CISTERNA	
		mg/l	ICA	mg/l	ICA	mg/l	ICA	mg/l	ICA	mg/l	ICA	mg/l	ICA
<i>Esteres Halogenados</i>													
110	bis 2 Clorotoximetano	0.9286	7.60	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
111	4 Clorofenilfenil éter	0.0036	7E-3	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
112	bis 2(Clorotil)éter	0.0064	0.70	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
113	4 Bromofenil éter	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
114	bis 2(Cloroisopropil)éter	0.0573	0.10	ND	-	0.0351	0.30	0.0473	0.40	ND	-	ND	-
<i>Nitrocompuestos Alifáticos</i>													
115	N-Nitrodimetilamina	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
116	N-Nitrosodi-n-propilamina	0.0091	0.02	ND	-	0.0022	4E-3	0.0017	3E-3	ND	-	ND	-
<i>Nitrocompuestos Aromáticos</i>													
117	Nitrobenzono	0.0045	0.02	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
118	2,4 Dinitrotolueno	0.0030	0.40	ND	-	ND	-	ND	-	0.0740	0.30	0.0340	0.10
119	2,6 Dinitrotolueno	0.0050	0.02	0.0015	7E-3	0.0038	0.02	0.0029	0.01	0.0035	0.02	0.0039	0.02
120	Bencidina	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
121	1,2 Difetilhidracina	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
122	N-Nitrosodifenilamina	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
127	3,3' Diclorobencidina	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
<i>Esteres del Acido Fólico</i>													
147	bis (2 etilhexilftalato)	0.0440	1E-4	0.0015	5E-6	0.0056	2E-5	ND	-	0.0058	2E-5	0.0043	1E-5
148	Di-n-octilftalato	0.0890	2E-3	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
149	Dimetilftalato	0.0300	1E-4	ND	-	0.0035	1E-5	ND	-	ND	-	ND	-
150	Dietilftalato	0.0110	4E-5	ND	-	0.0100	3E-5	0.0063	2E-5	0.0030	1E-5	0.0033	1E-5
151	Di-n-Butilftalato	0.0029	9E-6	ND	-	ND	-	0.0011	4E-6	ND	-	ND	-
152	Butilbencilftalato	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
% de compuestos que rebasan los límites permisibles.		26.7		4.3		10.8		6.5		10.8		10.8	

ICA. Índice de calidad de las aguas.  
 ND. No detectado.  
 NS. No sancionado.  
 NE. Análisis no efectuado.  
 E. Exponencial.



TABLA 18 (continuación)

Clave	Compuesto	INFLUENTE		Lodos Activados		BIODISCO		FILTRO ROTADOR		EFLUENTE		CISTERNA	
		mg/l	ICA	mg/l	ICA	mg/l	ICA	mg/l	ICA	mg/l	ICA	mg/l	ICA
<i>Esteres Halogenados</i>													
110	bis 2 Cloroximetano	0.2497	2.00	ND	-	0.0022	0.02	ND	-	0.0025	0.02	0.0119	0.10
111	4 Clorofenilfenil éster	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
112	bis 2(Cloroxetil)éster	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
113	4 Bromofenilfenil éster	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
114	bis 2(Cloroxisopropil)éster	0.0363	0.30	0.0013	0.01	0.0307	0.30	0.0196	0.20	0.0140	0.10	0.0235	0.20
<i>Nitrocompuestos Alifáticos</i>													
115	N-Nitrosodimetilamina	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
116	N-Nitrosodi-n-propilamina	0.0171	0.03	ND	-	ND	-	ND	-	0.0107	0.02	0.0160	0.03
<i>Nitrocompuestos Aromáticos</i>													
117	Nitrobeneno	0.0263	0.09	ND	-	0.0043	0.02	ND	-	ND	-	ND	-
118	2,4 Dinitrotolueno	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
119	2,6 Dinitrotolueno	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
120	Bencidina	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
121	1,2 Difenhidracina	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
122	N-Nitrosodifenilamina	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
127	3,3' Diclolorobencidina	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
<i>Esteres del Acido Fólico</i>													
147	bis (2 etilhexilftalato)	0.0510	2E-4	ND	-	0.0470	2E-4	0.0374	1E-4	0.0044	1E-5	0.0069	2E-5
148	Di-n-octilftalato	0.1789	6E-4	0.1000	3E-4	0.0570	2E-4	0.0613	2E-4	ND	-	ND	-
149	Dimetilftalato	0.0091	3E-5	0.0042	1E-5	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
150	Diethylftalato	0.0010	3E-6	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
151	Di-n-Butilftalato	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
152	Butilbencilftalato	0.2392	8E-4	0.1078	3E-4	0.0620	3E-4	0.0433	1E-4	ND	-	ND	-
8 de compuestos que rebasan los límites permisibles.			15.2		4.3		6.5		6.5		2.2		2.2

ICA. Índice de calidad de las aguas.  
 ND. No detectado.  
 NS. No sancionado.  
 E. Exponencial.



TABLA 19 (continuación)

Clave	Compuesto	INFLUENTE		Lodos Activados		BIODISCO		FILTRO ROCIADOR		EFLUENTE		CISTERNA	
		mg/l	ICA	mg/l	ICA	mg/l	ICA	mg/l	ICA	mg/l	ICA	mg/l	ICA
<i>Esteres halogenados</i>													
110	bis 2 Cloroetoximetano	0.0242	0.20	ND	-	0.0013	0.01	0.0010	8E-3	0.0019	0.02	0.0011	9E-3
111	4 Clorofenilfenil éter	0.0390	0.07	0.0369	0.07	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
112	bis 2(Cloroetil)éter	0.0710	0.60	ND	-	0.0017	0.01	ND	-	ND	-	ND	-
113	4 Bromofenil éter	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
114	bis 2(Cloroisopropil)éter	0.0805	0.70	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
<i>Nitrocompuestos Alifáticos</i>													
115	N-Nitrodimetilamina	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
116	N-Nitrosodi-n-propilamina	0.0476	0.10	ND	-	ND	-	0.0354	0.07	0.0300	0.08	ND	-
<i>Nitrocompuestos Aromáticos</i>													
117	Nitrobenzeno	0.0081	0.03	0.0010	4E-3	0.0011	4E-3	0.0035	0.01	ND	-	ND	-
118	2,4 Dinitrotolueno	0.0085	0.04	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
119	2,6 Dinitrotolueno	0.0310	0.10	0.0112	0.05	ND	-	ND	-	0.0160	0.07	0.0266	0.10
120	Bencidina	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
121	1,2 Difenilhidracina	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
122	N-Nitrosodifenilamina	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
127	3,3' Diclorobencidina	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
<i>Esteres del Acido Fólico</i>													
147	bis (2 etilhexilftalato)	0.0167	5E-5	0.0025	8E-6	0.0104	3E-5	0.0067	2E-5	0.0020	9E-6	0.0072	2E-5
148	Di-n-octilftalato	0.0747	2E-4	0.0253	8E-5	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
149	Dimetilftalato	0.0113	4E-6	0.0018	6E-6	0.0023	7E-6	ND	-	0.0024	8E-6	0.0015	5E-6
150	Distilftalato	0.0029	9E-6	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
151	Di-n-butilftalato	0.1666	5E-4	0.1237	4E-4	0.1171	4E-4	ND	-	0.1545	5E-4	0.1164	4E-4
152	Butilbencilftalato	0.0272	9E-5	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
4 de compuestos que rebasan los límites permisibles			13.0		8.7		6.5		4.3		0.0		4.3

ICA. Índice de calidad de las aguas.

ND. No detectado.

NS. No sancionado.

E. Exponencial.



TABLA 20 (continuación)

Clave	Compuesto	INFLUENTE		Lodos Activados		BIODISCO		FILTRO ROCIADOR		EFLUENTE		CISTERNA	
		mg/l	ICA	mg/l	ICA	mg/l	ICA	mg/l	ICA	mg/l	ICA	mg/l	ICA
	<i>Esteres Halogenados</i>												
110	bis 2 Cloroacetoximetano	0.0563	0.50	ND	-	ND	-	0.0419	0.30	0.0381	0.30	0.0195	0.20
111	4 Clorofenilfenil éster	0.2912	0.30	0.0398	0.07	0.0113	0.02	ND	-	0.0570	0.10	0.0192	0.04
112	bis 2(Cloroetil)éster	0.0048	0.04	ND	-	0.0113	0.09	ND	-	0.0030	0.02	ND	-
113	4 Bromofenilfenil éster	0.0119	0.02	ND	-	0.0072	0.01	0.0099	0.02	0.0113	0.02	0.0043	8E-3
114	bis 2(Cloroisopropil)éster	0.0319	0.30	0.0063	0.05	0.0029	0.02	0.0052	0.04	0.0066	0.05	ND	-
	<i>Nitrocompuestos Alifáticos</i>												
115	N-Nitrosodimetilamina	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
116	N-Nitrosodi-n-propilamina	0.0024	5E-3	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
	<i>Nitrocompuestos Aromáticos</i>												
117	Nitrobenzeno	0.0276	0.10	ND	-	0.0014	5E-3	ND	-	0.0014	5E-3	0.0010	4E-3
118	2,4 Dinitrotolueno	0.0763	0.30	ND	-	ND	-	ND	-	0.0158	0.07	0.0063	0.04
119	2,6 Dinitrotolueno	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
120	Bencidina	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
121	1,2 Difenhidracina	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
122	N-Nitrosodifenilamina	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
127	3,3' Diclorobencidina	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
	<i>Esteres del Acido Fólico</i>												
147	bis (2 etilhexilftalato)	0.0057	2E-5	0.0035	1E-5	ND	-	0.0027	9E-6	ND	-	ND	-
148	Di-n-octilftalato	0.1738	6E-4	0.0168	5E-5	0.0322	1E-4	0.1139	4E-4	ND	-	ND	-
149	Dimetilftalato	0.0210	7E-5	ND	-	ND	-	ND	-	0.0096	3E-5	0.0152	5E-5
150	Diethylftalato	0.0378	1E-4	ND	-	ND	-	ND	-	0.0192	6E-5	0.0309	1E-4
151	Di-n-Butilftalato	0.1090	3E-4	0.0910	3E-4	ND	-	ND	-	0.0278	9E-5	0.391	1E-4
152	Butilbencilftalato	0.2112	7E-4	ND	-	ND	-	0.0709	2E-4	0.0664	2E-4	0.0736	2E-4
	<b>% de compuestos que rebasan los límites permisibles.</b>		<b>17.4</b>		<b>13.0</b>		<b>6.5</b>		<b>2.2</b>		<b>6.5</b>		<b>6.5</b>

ICA. Índice de calidad de las aguas.

ND. No detectado.

NS. No sancionado.

E. Exponencial.

## DISCUSION.

A pesar de existir reportes en la literatura, en los que se señala que el Sistema de Ames ha sido capaz de detectar actividad mutagénica en el agua sin que medie proceso alguno de concentración y extracción de compuestos químicos - en este estudio sólo se obtuvieron resultados negativos en las muestras sin concentrar. Sin embargo, como se indica en la Tabla 2 son más numerosos los trabajos en los que se procede a concentrar y extraer las sustancias presentes en el agua a partir de muestras de gran volumen, que aquellos en los que se prueba directamente la actividad mutagénica en agua sin concentrar.

El estudio realizado en la planta de tratamiento de agua residual de Ciudad Universitaria, por el número reducido de muestreos efectuados, no permite generalizar los resultados, sino extraer de ellos una lección para el desarrollo de estudios ulteriores.

Así, por ejemplo, es difícil explicar el porqué en los tres primeros muestreos que se llevaron a cabo en los meses de octubre y noviembre, no se encontró actividad mutagénica en ninguna de las muestras, mientras que en los tres si

güentes, realizados en diciembre y enero, se observó mutagenicidad en unas u otras de las áreas muestreadas aunque es relativamente débil ya que sólo se observó la duplicación de la frecuencia de reversión espontánea y en una muestra un incremento de 4.6 veces.

Es de esperarse que dado que los laboratorios de Ciudad Universitaria vierten al drenaje numerosos compuestos químicos potencialmente mutagénicos la concentración de éstos pueda variar en función de los períodos de mayor o menor actividad de los laboratorios. Para confirmar o descartar lo anterior se requiere por lo tanto, realizar el estudio de la mutagenicidad en el agua de la planta de Ciudad Universitaria a lo largo del año.

Así pues, puede considerarse que en las condiciones del presente estudio solo se encontró una leve mutagenicidad en algunas de las muestras.

Si se analiza la Tabla 5 por ejemplo, se constata que en el muestreo número 4 en el mes de diciembre, sólo se detectó actividad mutagénica débil en la fracción alcalina, con la cepa TA 98 y en presencia del sistema de activación metabólica.

Dicha actividad se observó en las muestras provenientes de todos los puntos de muestreo menos del influente y del sedimentador de lodos activados.

En el muestreo número 5 en el mes de diciembre nuevamente se detectó actividad mutagénica en las muestras de agua con la cepa TA 98, pero en este caso solo en ausencia del sistema de activación metabólica. Dicha actividad se observó tanto en extractos ácidos como alcalinos provenientes del efluente y la cisterna y en la fracción ácida de la muestra del sedimentador de lodos activados, que fueron detectados por la cepa TA 98 sin activación metabólica. Los extractos ácidos del biodisco y filtro rociador, tanto concentrados como diluidos 1:10, presentaron actividad mutagénica en la cepa TA 98 acoplada al sistema de activación metabólica.

No se pudo en ninguno de los casos determinar la relación dosis-respuesta ya que se contó con una pequeña cantidad de extractos ácidos y alcalinos provenientes de muestras de agua de 1 litro, en las que los compuestos se concentraron alrededor de 2 000 veces. Lo único que se logró fué diluir los extractos y como muestran las figuras 5 a 7, en los casos en los que se obtuvo mutagenicidad con los extractos concentrados, ésta disminuyó al diluir éstos en forma proporcional a la

magnitud de la dilución (1:10, 1:100). También se observó - que cuando los extractos concentrados presentaron efectos - tóxicos, al diluirlos desapareció la toxicidad y se hizo evidente la existencia de actividad mutagénica.

Los datos anteriores, así como la consistencia de los resultados y el comportamiento de las cepas en los grupos controles tanto negativos como positivos, permite considerar que aunque débil si se obtuvo una respuesta mutagénica al exponer a las bacterias a algunas de las muestras de --- agua.

Es difícil atribuir a priori la actividad mutagénica observada en un grupo particular de compuestos. En los extractos alcalinos de la muestra 4 en diciembre, parecería por la homogenidad de los resultados, que en todos los puntos de muestreo en los que se detectó mutagenicidad, estuvieron presentes los mismos compuestos mutagénicos. Lo que sorprende es no encontrar actividad mutagénica en las aguas negras del Influyente y sí en las etapas posteriores del proceso de tratamiento. No se puede descartar que en el interior de cada proceso se den condiciones que favorezcan la - interacción de algunos compuestos químicos particulares y - se den fenómenos de sinergismo o antagonismo.

Debe tomarse en consideración también el hecho de que el proceso de renovación del agua residual tiene una duración distinta, en función del tratamiento que se siga, siendo mayor la retención del agua en lodos activados que en los otros dos tratamientos. De lo anterior se desprende que, con un diseño como el empleado en este estudio no es posible hacer un seguimiento del agua que entra en el influente, para determinar la actividad de los compuestos químicos contenidos en ella, a través de todo el proceso. Para ello habría que establecer un protocolo que tomara en consideración la dinámica del agua desde la entrada al cárcamo de aguas negras, hasta su llegada a la cisterna.

Por ahora, puede decirse que los compuestos responsables de la actividad mutagénica detectada en el agua de la planta de tratamiento de Ciudad Universitaria son diversos - ya que unos son extraídos en la fracción ácida y otros en la alcalina, a la vez que unos actúan sin necesidad de la intervención de enzimas y otros requieren de activación metabólica. Para su identificación se necesita del análisis químico de los extractos.

Ahora bien, dado que las aguas renovadas de la ---

planta de tratamiento de Ciudad Universitaria se emplean para el riego de áreas verdes, éstas deben llenar los criterios establecidos para este uso en lo que se refiere a las concentraciones máximas permisibles de la lista de compuestos químicos referidos en la Tabla 8.

En el presente estudio, las muestras en las que se realizaron las pruebas de mutagenicidad, también fueron sometidas al análisis químico, para determinar la concentración de los compuestos citados en la Tabla 8. El análisis químico así como el ICA se encuentran contenidos en las Tablas 9 a la 20.

Debe señalarse, sin embargo que como lo indica la Tabla 3, sólo algunos de esos compuestos producen mutaciones en el sistema de Ames, además de ser carcinogénicos como el Criseno; Benzo(a)pireno; Dibenz(a,h)antraceno; bis(2-cloroetil)éter; N-nitrosodimetilamina; N-nitrosodi-N-propilamina; 2,4 Dinitrotolueno; Bencidina; 3,3' Diclorobencidina y N Butilbencilftalato (35).

Otros de esos compuestos producen efectos genotóxicos en los sistema de prueba, como el 2,4 Dinitrofenol, pentaclorofenol. O bien son carcinogénicos sin haberse encontra

do a la fecha que sean mutagénicos, como el 2,4,6 Triclorofenol; Hexaclorobutadieno; Hexaclorobenceno; Benzo(b) - Fluoranteno y el Indeno (1,2,3,c,d) pireno (35).

Algunos más han sido insuficientemente estudiados o han mostrado resultados negativos, tanto en las pruebas de carcinogenicidad como de mutagenicidad: tal es el caso del- 4 Nitrofenol; Fenol; 1,2 Diclorobenceno; 1,4 Diclorobenceno; Naftaleno; Fluoreno; Pireno; Fenantreno; Antraceno y el Nitrobenceno (35).

Así pues, con base en el análisis químico efectuado en las muestras de agua de la Ciudad Universitaria y a pesar de que éste se limita sólo a un grupo de sustancias, se procedió a intentar establecer una posible relación entre la mutagenicidad de los extractos y los compuestos detectados en ellos. Sólo se retuvieron para éste análisis - aquellos compuestos que rebasaron las concentraciones máximas consideradas permisibles para el uso del agua renovada para irrigación, según la Tabla 8.

En las figuras 8 a 11 aparecen graficados los --

incrementos en la frecuencia de mutación producidos por los extractos de las distintas muestras, en relación al porcentaje de compuestos que rebasan las concentraciones permisibles señaladas en la Tabla 8. Las tendencias de la mutagenicidad y de la proporción de compuestos que alcanzan concentraciones por arriba de las permisibles, no parecen guardar ninguna relación cuando se les compara de esta manera.

En la Tabla 21 aparecen subrayados los compuestos orgánicos que coincidieron siempre en los extractos ácidos -- que presentaron actividad mutagénica, se trata del 2, 4 Diclorofenol y del 2, 4, 6 Triclorofenol; cuando se detectaba solo uno de estos compuestos o con otras combinaciones producía -- toxicidad o no había ningún efecto (Tablas 22 y 23). No se -- puede asegurar que estos compuestos fueran los responsables -- de la respuesta mutagénica observada, ya que ninguno de ellos ha probado ser positivo con la prueba de Ames, sin embargo el 2,4 Diclorofenol es genotóxico en sistemas eucariotes (no mamíferos), y con respecto al 2,4,6 Triclorofenol no se ha detectado ninguna actividad genotóxica en procariotes o eucariotes (23, 24, 29, 35). Otra observación importante es el hecho de que la respuesta bacteriana fué para ambas cepas en presencia y ausencia de homogenado hepático, lo que nos lleva a no poder caracterizar los compuestos químicos que produjeron la-

COMBINACION DE COMPUESTOS ORGANICOS CON LOS QUE SE OBSERVA  
MUTAGENICIDAD EN LA FRACCION ACIDA.

No. Muestra	Lugar (Conc.)	Compuesto	mg/l	MUTAGENICIDAD			
				Cepa TA 98 S9-	S9+	Cepa TA 100 S9-	S9+
5	Influente (C)	2,6 Dinitro-o-cresol	0.2577	I(0.7)	I(0.5)	I(1.75)	I(2.8)
		2,4 Dimetilfenol	0.0019				
		<u>2,4 Diclorofenol</u>	0.0656				
		<u>*2,4,6 Triclorofenol</u>	0.0142				
5	Lodos Activados (C)	2,4 Dimetilfenol	0.0010	I(1.9)	I(1.2)	I(1.1)	I(1.0)
		<u>2,4 Diclorofenol</u>	0.0018				
		<u>*2,4,6 Triclorofenol</u>	0.0016				
5	Efluente Final (C)	2,4 Dimetilfenol	0.0010	I(1.97)	I(0.4)	I(0.7)	I(0.3)
		<u>2,4 Diclorofenol</u>	0.0021				
		<u>*2,4,6 Triclorofenol</u>	0.0030				
5	Cisterna (C)	<u>2,4 Diclorofenol</u>	0.0012	I(2.43)	I(1.1)	I(0.8)	I(1.1)
		<u>*2,4,6 Triclorofenol</u>	0.0019				
6	Lodos Activados (C)	Fenol	0.0025	I(2.8)	I(1.7)	I(1.0)	I(1.3)
		2,4 Dimetilfenol	0.0034				
		2 Clorofenol	0.0053				
		<u>2,4 Diclorofenol</u>	0.0035				
		<u>*2,4,6 Triclorofenol</u>	0.0033				
6	Biodisco (C) (1:10)	2,6 Dinitro-o-cresol	0.7630	I(1.5)	I(2.04)	I(1.0)	I(1.2)
		Fenol	0.0026	I(1.1)	I(2.03)	I(1.0)	I(1.0)
		2,4 Dimetilfenol	0.0049				
		2 Clorofenol	0.0031				
		<u>2,4 Diclorofenol</u>	0.0040				
<u>*2,4,6 Triclorofenol</u>	0.0036						
6	Filtro Rociador (C) (1:10)	2,6 Dinitro-o-cresol	1.1070	I(1.5)	I(2.08)	I(0.8)	I(1.4)
		Fenol	0.0013	I(0.9)	I(2.15)	I(1.0)	I(1.0)
		2,4 Dimetilfenol	0.0065				
		2 Clorofenol	0.0027				
		Pentaclorofenol	0.0032				
		<u>2,4 Diclorofenol</u>	0.0070				
<u>*2,4,6 Triclorofenol</u>	0.0048						

I = Reversión Inducida  
Reversión Espontánea

\* Implica un riesgo de causar cáncer 1 caso en 100 000.

T A B L A 2 2

COMBINACION DE COMPUESTOS ORGANICOS CON LOS QUE SE OBSERVA  
TOXICIDAD EN LA FRACCION ACIDA.

No. Mues treo	Lugar (Conc.)	Compuesto	mg/1	MUTAGENICIDAD			
				Cepa TA 98		Cepa TA 100	
				S9-	S9+	S9-	S9+
4	Influente (C)	4 Nitrofenol	0.4393	I(0.9)	I(1.6)	I(0.5)	I(1.0)
		2,6 Dinitro-o-cresol	0.0542				
		Fenol	0.0234				
		2,4 Dimetilfenol	0.0014				
		Pentaclorofenol	0.1895				
		p Cloro-m-cresol	0.0038				
		2,4 Diclorofenol	0.0183				
		<u>*2,4,6 Triclorofenol</u>	0.0025				
4	Lodos Activados (C)	-	-	I(0.0)	I(0.0)	I(0.0)	I(0.0)
4	Biodisco (C)	4 Nitrofenol	0.0134	I(0.4)	I(1.4)	I(1.0)	I(0.8)
		2,6 Dinitro-o-cresol	0.0297				
		2,4 Dimetilfenol	0.0016				
		Pentaclorofenol	0.1694				
		<u>2,4 Diclorofenol</u>	0.0038				
5	Biodisco (C)	<u>*2,4,6 Triclorofenol</u>	0.0069	I(0.1)	I(0.0)	I(0.0)	I(0.4)
5	Filtro Rociador (C)	<u>2,4 Diclorofenol</u>	0.0015	I(1.4)	I(0.8)	I(0.3)	I(0.01)
6	Influente (C)	2,6 Dinitro-o-cresol	1.1930	I(1.1)	I(1.6)	I(0.6)	I(1.0)
		Fenol	0.0081				
		2,4 Dimetilfenol	0.0140				
		Pentaclorofenol	0.0047				
		p Cloro-m-cresol	0.0070				
		2 Clorofenol	0.0386				
		2,4 Diclorofenol	0.0098				
		<u>*2,4,6 Triclorofenol</u>	0.0055				
6	Efluente Final (C)	2,6 Dinitro-o-cresol	0.8098	I(0.0)	I(0.0)	I(0.06)	I(0.0)
		Fenol	0.0084				
		2,4 Dimetilfenol	0.0090				
		p Cloro-m-cresol	0.0030				
		2 Clorofenol	0.0366				
		2,4 Diclorofenol	0.0042				
		<u>*2,4,6 Triclorofenol</u>	0.0031				
		6	Cisterna (C)	2,6 Dinitro-o-cresol	0.7917	I(1.0)	I(0.2)
Fenol	0.0028						
2,4 Dimetilfenol	0.0013						
p Cloro-m-cresol	0.0024						
2,4 Diclorofenol	0.0035						
<u>*2,4,6 Triclorofenol</u>	0.0024						

I = Reversión Inducida  
Reversión Espontánea

\* Implica un riesgo de causar cáncer 1 caso en 100 000.

T A B L A 2 3

COMBINACION DE COMPUESTOS ORGANICOS EN LOS QUE NO SE  
OBSERVARON EFECTOS EN LA FRACCION ACIDA.

No. Muestra	Lugar (Conc.)	Compuesto	mg/l	MUTAGENICIDAD			
				Cepa TA 98 S9-	S9+	Cepa TA 100 S9-	S9+
4	Filtro Rociador (C)	4 Nitrofenol	0.0193	I(0.9)	I(1.6)	I(1.0)	I(1.4)
		<u>2,4 Diclorofenol</u>	0.0108				
		<u>*2,4,6 Triclorofenol</u>	0.0022				
4	Efluente Final (C)	4 Nitrofenol	0.0836	I(1.4)	I(1.2)	I(0.9)	I(1.0)
		2,6 Dinitro-o-cresol	0.0423				
		Pentaclorofenol	0.1502				
		<u>2,4 Diclorofenol</u>	0.0049				
		<u>*2,4,6 Triclorofenol</u>	0.0020				
4	Cisterna (C)	4 Nitrofenol	0.0283	I(1.3)	I(1.2)	I(1.0)	I(1.2)
		2,6 Dinitro-o-cresol	0.0326				
		Pentaclorofenol	0.1460				
		<u>2,4 Diclorofenol</u>	0.0049				
		<u>*2,4,6 Triclorofenol</u>	0.0017				

I = Reversión Inducida  
Reversión Espontánea

\* Implica un riesgo de causar cáncer 1 caso en 100 100.

mutagenicidad. Además debemos recalcar que en el presente -- trabajo se hace mención únicamente a los compuestos orgánicos extraídos y no se toma en cuenta la gran variedad que posiblemente se encontraba en las muestras de agua correspondientes y que no fueron caracterizados analíticamente.

En cuanto a la fracción alcalina (Tabla 24), la -- combinación de compuestos orgánicos es mucho más grande, y -- en este caso si encontramos compuestos orgánicos que han sido positivos en la prueba de Ames, como lo son: Criseno (23); Benzo(a)pireno (23); Benzo(a)antraceno (23); Dibenzo(a,h) antraceno (31); N-nitrosodi-n-propilamina (35); bis 2 (cloroetil)éter (35); y el 1,2,4 Triclorobenceno que es un inductor de enzimas microsomales como el Aroclor 1254 (21).

Por otro lado, algunos de estos compuestos se encontraban en muestras en las que no se observó ningún efecto o había toxicidad, por lo que la respuesta mutagénica pudo deberse a dichos compuestos o a la mezcla de algunos de ellos.

O bien a otros compuestos que se encontraban también en la muestra y que no fueron caracterizados. No se puede tampoco descartar efectos sinérgicos o antagonísticos--

T A B L A 2 4

COMBINACION DE COMPUESTOS ORGANICOS EN LOS QUE SE OBSERVA  
MUTAGENICIDAD EN LA FRACCION ALCALINA.

No. Muestras	Lugar (Conc.)	Compuesto	mg/1	MUTAGENICIDAD			
				Cepa TA 98 S9-	S9+	Cepa TA 100 S9-	S9+
4	Biodisco (C)	<u>1,2 Diclórobenzeno</u>	0.0043	I(0.9)	I(1.9)	I(0.7)	I(0.8)
		<u>1,2,4 Triclorobenceno</u>	0.0043				
		* <u>Naftaleno</u>	0.0043				
		* <u>Isófurona</u>	0.0034				
		* <u>Crizeno (+)</u>	0.1090				
		* <u>Pireno</u>	0.0019				
		* <u>Benzo(a)antraceno (+)</u>	0.0472				
		* <u>Benzo(k)fluoranteno</u>	0.0276				
		* <u>Benzo(b)fluoranteno</u>	0.0276				
		* <u>Acenafteno</u>	0.0017				
		* <u>bis 2 Cloroetoximetano</u>	0.0022				
		* <u>bis 2(Cloroisopropil)éter</u>	0.0307				
		<u>Nitrobenzeno</u>	0.0043				
		<u>bis (2 etilhexilftalato)</u>	0.0470				
		<u>Di-n-octilftalato</u>	0.0570				
		<u>Butilbencilftalato</u>	0.0820				
4	Filtro Asociador (C)	<u>1,2 Diclórobenzeno</u>	0.0021	I(0.0)	I(1.95)	I(0.7)	I(1.5)
		<u>1,3 Diclórobenzeno</u>	0.0011				
		* <u>Isófurona</u>	0.0028				
		* <u>Crizeno (+)</u>	0.0720				
		* <u>Benzo(a)antraceno (+)</u>	0.0374				
		* <u>Benzo(k)fluoranteno</u>	0.0146				
		* <u>Benzo(b)fluoranteno</u>	0.0146				
		* <u>bis 2(Cloroisopropil)éter</u>	0.0196				
		<u>bis (2 etilhexilftalato)</u>	0.0374				
		<u>Di-n-octilftalato</u>	0.0613				
		<u>Butilbencilftalato</u>	0.0433				
		4	Efluente (C)	<u>1,2 Diclórobenzeno</u>	0.0050	I(0.0)	I(2.04)
<u>1,3 Diclórobenzeno</u>	0.0013						
* <u>Isófurona</u>	0.0077						
* <u>Benzo(a)antraceno (+)</u>	0.0045						
* <u>bis 2 Cloroetoximetano</u>	0.0023						
* <u>bis 2(Cloroisopropil)éter</u>	0.0140						
* <u>N-Nitrosodi-n-propilamina (+)</u>	0.0107						
<u>bis (2 etilhexilftalato)</u>	0.0044						
4	Cisterna (C)			<u>1,2 Diclórobenzeno</u>	0.0010	I(0.2)	I(1.87)
		* <u>Isófurona</u>	0.0096				
		* <u>Benzo(a)antraceno (+)</u>	0.0069				
		* <u>bis 2 cloroetoximetano</u>	0.0119				
		* <u>bis 2 (Cloroisopropil)éter</u>	0.0235				
		* <u>N-Nitrosodi-n-propilamina (+)</u>	0.0160				
		<u>bis (2 etilhexilftalato)</u>	0.0069				

TABLA 24 (continuación)

No. Mue- s Lugar (Conc.) treo	Compuesto	mg/l)	MUTAGENICIDAD				
			Cepa TA 98 S9-	S9+	Cepa TA 100 S9-	S9+	
5 Influyente (C)	Hexaclorocetano	0.0710	I(2.4)	I(1.0)	I(1.2)	I(0.9)	
	<u>1,2 Diclórobenceno</u>	0.0037					
	Hexaclorobenceno	0.0140					
	1,2,4 Triclorobenceno	0.0081					
	*Naftaleno	0.0081					
	*Isofurona	0.0012					
	*Fluoreno	0.0097					
	*Criseno (+)	0.0216					
	*Pireno	0.0083					
	*Fenantreno	0.0085					
	*Antraceno	0.0029					
	*Benzo(a)antraceno (+)	0.0167					
	*Benzo(k)fluoranteno	0.0011					
	*Benzo(b)fluoranteno	0.0011					
	*Benzo(a)pireno (+)	0.0449					
	*Benzo(g,h,i)perileno	0.0057					
	*Dibenzo(a,h)antraceno (+)	0.0257					
	*bis 2 cloroacetoximetano	0.0242					
	*bis 2(cloroetil) éter (+)	0.0710					
	*4 Clorofenilfenil éter	0.0390					
	*bis 2(Cloroisopropil)éter	0.0805					
	*N-Nitrosodi-n-propilamina (+)	0.0476					
	nitrobenzeno	0.0081					
	*2,4 Dinitrotolueno (+)	0.0085					
	*2,6 Dinitrotolueno	0.0310					
	<u>bis (2 etilhexilftalato)</u>	0.0167					
	Di-n-octilftalato	0.0747					
	Dimetilftalato	0.0113					
	Diethylftalato	0.0029					
	Di-n-butilftalato	0.1666					
	Butilbencilftalato	0.0272					
	5 Efluente (C)	<u>1,2 Diclórobenceno</u>	0.0010	I(1.95)	I(1.4)	I(0.6)	I(0.4)
		*Isofurona	0.0025				
*Benzo(a)antraceno (+)		0.0028					
*bis 2 Cloroacetoximetano		0.0019					
*N-Nitrosodi-n-propilamina (+)		0.0380					
*2,6 Dinitrotolueno		0.0160					
<u>bis (2 etilhexilftalato)</u>		0.0028					
Dimetilftalato		0.0024					
Di-n-butilftalato	0.1545						
5 Cisterna (C)	*Benzo(a)antraceno (+)	0.0072	I(4.6)	I(1.4)	I(1.2)	I(1.1)	
	*Benzo(a)pireno (+)	0.0407					
	*bis 2 Cloroacetoximetano	0.0011					
	*2,6 Dinitrotolueno	0.0266					
	<u>bis (2 etilhexilftalato)</u>	0.0072					
	Dimetilftalato	0.0015					
Di-n-butilftalato	0.1164						
6 Lodos Activados (C) (1:10)	Hexaclorobenceno	0.0785	I(0.6)	I(1.5)	I(1.0)	I(1.1)	
	*Isofurona	0.0057	I(2.06)	I(0.8)	I(0.9)	I(0.9)	
	*Fluoranteno	0.0930					
	*Criseno (+)	0.0052					
	*Benzo(a)antraceno (+)	0.0035					
	*Benzo(k)fluoranteno	0.0088					
	*Benzo(b)fluoranteno	0.0088					
	*Benzo(a)pireno (+)	0.0068					
	*Dibenzo(a,h)antraceno (+)	0.0058					
	*4 Clorofenilfenil éter	0.0398					
	*bis 2(Cloroisopropil)éter	0.0063					
	*bis (2 etilhexilftalato)	0.0035					
	Di-n-octilftalato	0.0168					
Di-n-butilftalato	0.0930						

I= Reversión Inducida  
Reversión Espontánea

\* Implica un riesgo de causar cáncer 1 caso en 100 000.

(+)Positivo en el ensayo de Ames. *Salmonella typhimurium*/microsomas hepáticos.

entre los compuestos que coinciden en un mismo extracto.

Ciertos estudios han mostrado que mezclas de compuestos policíclicos aromáticos inhiben la mutagenicidad -- por una inhibición del sistema de activación metabólico (11). Por lo que si la mezcla de compuestos orgánicos probados en el sistema de Ames es no-mutagónica, la muestra puede no ser reportada necesariamente libre de mutágenos, dada la complejidad de la muestra y de los efectos antagónicos que puedan existir.

El método de extracción utilizado en este estudio, tiene la desventaja de que no permite recuperar los compuestos orgánicos volátiles, los cuales representan 1-6 ppm del carbón orgánico total (TOC) (19). Así mismo el volumen de agua del que se partió (1 litro) para concentrar los compuestos orgánicos presentes en el agua, ha sido estandarizado para la realización del análisis químico y no así para la detección de mutágenos por lo que es necesario emprender la búsqueda de métodos de concentración alternativos con miras a la evaluación óptima de la presencia de agentes mutagénicos en agua. Se sabe por ejemplo a través de diferentes estudios, que los residuos orgánicos del agua potable contie-

nen un gran número de compuestos mutagénicos, algunos con una baja mutagenicidad y pocos compuestos que tienen una alta mutagenicidad (21). De ahí que se requiera de la concentración y extracción de los compuestos químicos presentes en el agua, para incrementar las posibilidades de detección de los que poseen actividad mutagénica, por parte de los sistemas bacterianos de prueba.

Entre los métodos mas usados en la concentración de las sustancias contenidas en el agua se encuentran las resinas de Amberlite XAD (2, 4, 7 y 8), la ósmosis inversa, la extracción líquido-líquido (usando cloruro de etileno y pentano), así como el carbón activado (extrayendo con cloroformo) (Tabla 2). Mientras que el volumen más pequeño de las muestras de agua empleadas para el monitoreo de mutágenos, ha sido de 2 litros. Se recomienda por lo tanto incrementar el volumen de las muestras de agua y/o aumentar la capacidad de concentración de los compuestos químicos contenidos en ellas.

Finalmente, puede decirse que en lo que se refiere al agua, se ha detectado actividad mutagénica y/o carcinogénica en prácticamente todos los trabajos que fueron identi-

ficados en la literatura y que aparecen resumidos en la Tabla 2. El hallazgo de estos tipos de actividad en agua potable de diversas ciudades del mundo, llevó a los autores a explorar las fuentes de abastecimiento; ya sea aguas superficiales de ríos o aguas subterráneas, verificándose la presencia en ellas de agentes con capacidad mutagénica y/o carcinogénica. Por lo tanto no sorprende que en este estudio - realizado en un pequeño número de muestras de agua residual y renovada se haya encontrado actividad mutagénica. Esto sin embargo es débil ya que en la mayoría de las muestras sólo se dobló la frecuencia de mutación espontánea y en una de ellas se obtuvo un incremento de más de cuatro veces dicha frecuencia. Mientras que en los estudios de Commoner y col. (5) refieren incrementos de 2.5 a 24.6 veces con concentraciones de sustancias químicas equivalentes a las contenidas en 100 a 250 ml de agua. O bien reportan que a partir de 20 galones de agua, obtuvieron un extracto ácido que incrementó 37 veces la frecuencia de mutación espontánea, un extracto neutro que la elevó más de 95 veces y un extracto alcalino que la aumentó 3 veces.

En este estudio 10  $\mu$ l del extracto obtenido corresponden a los compuestos orgánicos contenidos en 20 ml de agua

y una dilución 1:10 de dicho extracto al equivalente de 2 ml de agua. De ahí que, si se comparan nuestros resultados con los datos de Commoner (5), tomando en cuenta la relación: incremento en la frecuencia de mutación/volumen equivalente de agua, los valores obtenidos en el agua residual y renovada - se encuentran dentro de un rango similar.

El análisis químico deberá incluir la concentración de histidina presente en las muestras que se prueben para eliminar falsos-positivos, ya que la presencia de histidina incrementa el número de colonias de *Salmonella typhimurium* (19).

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

Del análisis de la literatura, así como de los resultados obtenidos de la determinación de la actividad mutagénica de un lote de muestras de agua residual y renovada de la Planta de Tratamiento de Ciudad Universitaria, surgen las conclusiones y recomendaciones que se refieren a continuación.

1. A pesar de que *Salmonella typhimurium*, constituye uno de los sistemas de prueba para la detección de mutágenos más conocido y empleado en la actualidad, tiene sus limitaciones para el monitoreo de mutágenos ambientales que se encuentren en baja concentración. Es así que para determinar la actividad mutagénica de mezclas complejas de sustancias químicas que contaminan el agua, se requiere del uso de métodos de concentración y extracción de las mismas. A la vez es necesario controlar la concentración de histidina en las muestras a evaluar para evitar resultados falsos negativos.

2. De los métodos alternativos para concentrar y extraer las mezclas de sustancias químicas contenidas en el agua:

a) La ósmosis inversa es costosa y requiere de utilizar membranas especiales por los problemas ocasionados por las sa-

les.

b) El método de extracción líquido-líquido, solamente permite concentrar volúmenes pequeños de muestra, además de que se pierden las sustancias volátiles; por ello solo se recomienda como un segundo paso de otras técnicas de concentración.

c) El carbón activado por su parte, tiene como desventaja el que muchas de las sustancias orgánicas no son recuperables.

d) Las resinas XAD constituyen una de las opciones más recomendables y que permiten rendimientos adecuados a menor costo.

En todos debe procurarse evitar la pérdida de compuestos químicos volátiles y obtener la máxima eficiencia en la recuperación de los compuestos químicos. Es recomendable partir de un volumen grande de muestra y/o incrementar la magnitud de la concentración, para contar con suficiente material para determinar la dosis-respuesta.

4. En lo que se refiere a la Planta de Tratamiento de Agua Residual de Ciudad Universitaria es recomendable realizar un muestreo a lo largo del año para determinar la fluctuación de los compuestos con actividad mutagénica, en función de las actividades de los laboratorios y de la precipitación pluvial. Sería útil además, determinar la dinámica de la ac-

tividad mutagénica desde la entrada de las aguas negras al cárcamo, su paso a través de uno u otro sistema de tratamiento y finalmente la cloración del agua renovada.

4. El estandarizar la prueba de mutagénesis, incluyendo la etapa previa de concentración de las mezclas de compuestos químicos, y la expresión de los resultados mediante una unidad convencional, (como cantidad equivalente a un volumen da do de agua), permitirá comparar los resultados de laboratorio a laboratorio y de un estudio a otro. Esto constituye una etapa indispensable, en la búsqueda de criterios para catalogar la calidad del agua en función de la actividad mutagénica de las sustancias contenidas en ella.

5. Es deseable, además, proceder a valorar otros sistemas de prueba que hagan posible la evaluación de la actividad mutagénica de mezclas complejas de sustancias químicas disueltas en el agua sin necesidad de recurrir a concentrarlas. Entre los sistemas recomendables por su facilidad de manejo y bajo costo se encuentran las plantas.

6. Las pruebas de mutagénesis juegan un papel importante en cuanto que indican la presencia en las aguas de agentes que

puedan constituir un riesgo para la salud de quienes consumen el agua o se exponen a ella vía la formación de aerosoles o contacto directo. La magnitud del riesgo depende de:

- a) La concentración que alcancen en el agua los agentes potencialmente tóxicos.
- b) La potencia de esos agentes en cuanto a su efecto mutagénico o carcinogénico.
- c) La magnitud de la exposición (cantidad, tiempo y vía de exposición, entre otros).

7. La identificación de los agentes de riesgo a través del análisis químico constituye un reto y un ejercicio costoso si no se tiene previamente una idea de que agentes pueden contaminar el agua y/o cuales son las fuentes contaminantes.

Este conocimiento previo puede orientar la búsqueda analítica y hacer viable la toma de decisión para el control y prevención de riesgos.

**APENDICE.**

Preparación de las soluciones y medios de cultivo:

**CALDO NUTRITIVOS PARA CULTIVOS:**

Caldo nutritivo Oxoid Media No.2	2.5 g
Agua destilada	100 ml

Los ingredientes se mezclan y se colocan en botellas de dilución con tapón de rosca; y se esteriliza en autoclave - 121°C durante 20 minutos. Una vez esterilizados se guardan a - 4°C o a temperatura ambiente.

**MEDIO MINIMO E. DE VOGEL-BONNER (50 X):**

Solución A. En 600 ml de agua destilada se disuelven en el siguiente orden:

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	10 g
Acido cítrico. $H_2O$	100 g
$K_2HPO_4$ anhidro	500 g
$NaNH_4HPO_4 \cdot 4H_2O$	175 g

La solución A se afora a 1 litro y se agrega 1 ml de cloroformo para evitar contaminaciones y se guarda a tem-

peratura ambiente.

En un matraz de 1 000 ml se colocan 7.5 gr de Bacto Difco agar más 300 ml de agua destilada. Colocar en matraces - de 250 ml por separado. 10 gr de dextrosa y en otro 10 ml de - la solución A, y se agrega a cada matraz respectivamente 100 - ml de agua destilada. Se cubren los matraces con papel alumi- - nio y se esterilizan en autoclave a 121°C durante 20 minutos. Se reúnen las soluciones en el matraz de 1 000 ml, se mezclan - perfectamente y se distribuyen en cajas de Petri estériles de - sechables de 100 X 15 aproximadamente 25-30 ml de medio.

#### **MEDIO MINIMO DE VOGEL-BONNER COMPLEMENTADO CON HISTIDINA 0.1 M BIOTINA 0.5 mM:**

Una vez que se tienen cajas solidificadas de medio - mínimo de Vogel-Bonner se agrega 0.1 ml de una solución estéril de histidina 0.1 M--biotina 0.5 mM en la superficie del medio y se distribuye uniformemente con la ayuda de un triángulo de vi- - drio estéril, dejando secar, y además son complementadas con -- o.2 ml de una solución estéril de ampicilina (8 mg/ml) distribu yéndola de la misma manera. Las cajas así complementadas se de- - jan reposar toda la noche en una incubadora a 37°C para que las soluciones se distribuyan de manera uniforme en el medio.

**AGAR DE SUPERFICIE MINIMO:**

NaCl	0.5 g
Bacto Difco agar	0.6 g
Agua destilada	100 ml

Los ingredientes se colocan en una botella de dilución y se esterilizan en autoclave 121°C durante 20 minutos, cuando se va a usar se adicionan 10 ml de una solución de histidina-biotina 0.5 mM y es mezclada con una rotación suave.

**SOLUCION HISTIDINA-BIOTINA 0.5 mM.**

L Histidina	0.0007 g
D(+) Biotina	0.0122 g
Agua destilada	100 ml

Los ingredientes son colocados en una botella de dilución con tapón de rosca y se esteriliza en autoclave 121°C durante 20 minutos o se filtra con una membrana estéril de 0.45  $\mu$ m, se guarda en obscuridad a 4°C.

**SOLUCION DE HISTIDINA 0.1 M - BIOTINA 0.5 mM:**

L Histidina	1.5516 g
D(+) Biotina	0.0122 g
Agua destilada	100 ml

Los ingredientes se colocan en una botella de dilución con tapón de rosca y se esterilizan en autoclave 121°C - durante 20 minutos o se filtra con una membrana estéril de -- 0.45 µm de tamaño de poro, se guarda en obscuridad a 4°C.

**MEDIO COMPLETO (AGAR NUTRITIVO):**

Oxoid Media No. 2	12.5 g
Bacto Difco agar	7.5 g
Agua destilada	500 ml

Los ingredientes son colocados en un matraz de -- 1 000 ml cubierto con papel aluminio y es esterilizado en autoclave a 121°C durante 20 minutos. Se distribuye en cajas - de Petri estériles desechables de 100 X 15 aproximadamente - 25-30 ml de medio y se deja solidificar.

**AGAR DE SUPERFICIE COMPLETO:**

Oxoid Media No. 2	2.5 g
Bacto Difco agar	0.6 g
Agua destilada	100 ml

Los ingredientes se colocan en una botella de dilución con tapón de rosca y se esteriliza en autoclave 12°C durante 20 minutos y se guarda a 4°C.

**CRISTAL VIOLETA 0.1 %:**

Cristal violeta	0.1 g
Agua destilada	100 ml

Esta solución se guarda a 4°C en recipientes de vidrio con tapón de rosca y se protege de la luz cubriendo el recipiente con papel aluminio.

**SOLUCION DE AMPICILINA (8 mg/ml):**

Ampicilina trihidratada	0.8 g
Hidróxido de sodio (0.02 N)	100 ml

Se disuelve la ampicilina y la solución se filtra con una membrana estéril de 0.45  $\mu$ m. Se guarda en un reci--

piente de vidrio a 4°C.

**SOLUCION DE HIDROXIDO DE SODIO 0.02 N:**

NaOH	0.08 g
Agua destilada	100 ml

Pesar el hidróxido de sodio y aforar en un matraz de 100 ml con agua destilada.

**SOLUCION SALINA (1.65 M DE CLORURO DE POTASIO + 0.4 M DE CLORURO DE MAGNESIO):**

KCl	12.3019 g
MgCl	8.1332 g
Agua destilada	100 ml

Se mezclan los ingredientes y se aforan en un matraz de 100 ml, posteriormente se filtra la solución con papel filtro Watman del número uno, la solución es colocada en una botella de dilución con tapón de rosca, se esteriliza en autoclave 121°C durante 20 minutos y se mantiene a 4°C.

**AMORTIGUADOR DE FOSFATOS 0.2 M pH 7.4:**

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	2.2979 g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.5244 g
Agua destilada	100 ml

Los ingredientes se mezclan perfectamente, se ajusta el pH y se afora en un matraz de 100 ml. La solución amortiguadora se coloca en una botella de dilución con tapón de rosca y se esteriliza en autoclave  $121^\circ\text{C}$  durante 20 minutos. Se guarda a  $4^\circ\text{C}$ .

**SOLUCION DE AROCLOR 1254 200 mg/ml :**

Aroclor 1254	1 g
Aceite de maíz cbp	5 ml

**SOLUCION DE CLORURO DE POTASIO 0.15 M:**

KCl	11.18 g
Agua destilada	1 000 ml

Se mezclan los ingredientes y se aforan en un matraz de 1 000 ml, la solución se distribuye en botellas de dilución con tapón de rosca y se esteriliza en autoclave --  $121^\circ\text{C}$  durante 20 minutos. Se guarda a  $4^\circ\text{C}$ .

**EQUIPO EMPLEADO:**

- a) Plancha de calentamiento para 60 tubos de temperatura regulable.
- b) Mezclador para tubos Super-mixer (Lab-Line Instruments INC).
- c) Plancha de agitación magnética (Laboratory Stirrer).
- d) Potenciómetro (Zeromatic II).
- e) Baño de agua con agitación y temperatura controlada.
- f) Microscopio óptico (American Optical).
- g) Autoclave (Marsh Instruments Company).
- h) Cuantacolonias automático (New Brunswick Scientific).
- i) Refrigerador y congelador de 4°C y 20°C respectivamente (IEM de México).
- j) Ultracongelador de 0 a -100°C (Kelvinator Comercial Products INC).
- k) Balanza analítica (Mettler H35Ar).
- l) Incubadora ajustable y horno para secado de material.
- m) Baño de agua de temperatura ajustable.
- n) Centrífuga Sorvall RC-5 con rotor SS34.

## BIBLIOGRAFIA

1. Ames, B.N. The detection of chemical mutagens with enteric bacteria. En: Chemical mutagens principles and methods of their detection. Hollander, A. Ed. Plenum Press, New York; 1:267-282 (1971).
2. Batjer, K., Gabel, B., Koschorrek, M., Lahl V., Lierse, K. W., Stachel, B. y Thiemann, W. Drinking water in Bremen: trihalomethanes and social cost. A case study of bromoform formation during chlorination of river water highly contaminated with bromide ions. The Science of the Total Environment; 14: 287-281 (1980).
3. Bull, R.J. Is drinking water a significant source of human exposure to chemical carcinogens and mutagens? En: Short-term bioassays un the analysis of complex environmental -- mixtures II. Waters, M.D., Sandhu, S.S., Huising, J.L., -- Claxton, L. y Nesnow, S. Ed. Plenum Press; New York and -- London. Environmental Science Research; 22: 135-139 (1980).
4. Chriswell, C.D., Glatz, B.A., Fritz, J.S. y Svec, H.J. Mutagenic analysis of drinking water. En: Application of short-term bioassays in the fractionation and analysis of complex environmental mixtures. Waters, M.D, Nesnow, S., Huising, J. L., Sandhu, S.S. y Claxton, L. Ed: Plenum Press, New York. Environmental Science Research; 15: 3-42 (1978).
5. Commoner, B., Vithayathil, A.J. y Dolara, P. Mutagenic analysis of complex samples of aqueous effluents, air particulates and foods. En: Application of short-term bioassays in the -

- fractionation and analysis of complex environmental mixtures. Waters, M.D., Nesnow, S., Huisingsh, J.L., Sandhu, S.S. y Claxton, L. Ed: Plenum Press, New York. Environmental -- Science Research: 15: 531-570 (1978).
6. Cortinas de Nava, C., Ostrosky, P. y Galván, S.C. Principios de mutagénesis y su relación con carcinogénesis y teratogénesis. Instituto de Investigaciones Biomédicas U.N.A.M. (1979).
  7. Epler, J.L. The use of short-term tests in the isolation and identification of chemical mutagens in complex mixtures. En: Chemical mutagens. Principles and methods of their detection. De Serres, F.J. y Hollander, A. Ed: Plenum Publishing Corporation 6: 239-270 (1980).
  8. Gardner, E.J. Principios de Genética. Quinta edición. Ed: Limusa, Méx: 271-273 (1980).
  9. Grabow, W.O.K., Denkhaus, R. y Rossum, P.G.V. Detection of - mutagens in wastewater, a polluted river and drinking-water by means of the Ames *Salmonella*/microsome assays. South African Journal of Science: 76: 118-123 (1980).
  10. Harrington, T.R., Nestmann, E.R. y Kobel, D.J. Suitability of the modified fluctuation assay for evaluating the mutagenicity of unconcentrated drinking water. Mutation Research: 120: 97-103 (1983).
  11. Haugen, D.A. y Peak, M.J. Mixtures of polycyclic aromatic - compounds inhibit mutagenesis in the *Salmonella*/microsome - assay by inhibition of metabolic activation. Mutation Research: 116: 257-269 (1983).

12. Inman, M.A., Butler, M.A., Connor, T.H. y Matney, T.S. The effects of excision repair and the plasmid pKM101 on the induction of his<sup>+</sup> revertants by chemical agents in *Salmonella typhimurium*. *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis*: 3: 491-501 (1983).
13. Kool, H.J., Van Kreijl, C.F., Van Kanen, H.J. y De Greff, E. Toxicity Assessment of organic compounds in drinking water in the Netherlands. *The Science of the Environment*: 18: 133-153 (1981).
14. Kraybill, H.F. Evaluation of public health aspect of carcinogenic/mutagenic biorefractories in drinking water. *Preventive Medicine*: 9: 212-218 (1980).
15. Lehninger, A.L. *Bioquímica. Segunda edición. Ediciones Omega S.A. Barcelona: Cap 18: 512-214 (1979).*
16. Levin, E.D., Hollstein, M., Chritman, M.F. y Ames, B.N. Detection of oxidative mutagens with a new *Salmonella* tester strain (TA 102). *A Methods in Enzymology. March* 31: 1-11 (1983).
17. Loper, J.C. y Lang, D.R. Mutagenic, carcinogenic and toxic effect of residual organics in drinking water. En: *Application of short-term bioassays in the fractionation and analysis of complex environmental mixtures. Waters, M.D., Nesnow, S., Huisingh, J.L., Sandhu, S.S. y Claxton, L. Ed. -- Plenum Press, New York. Environmental Science Research*: 15: 515-528 ( 1978).

18. Loper, J.C. Overview of use of short-term biological test in assessment of the health effects of water chlorination. En: Water chlorination environmental impact and health -- effects. Jolley, R.L., Brungs, W.A., Cumming, R.B. y Jacobs, V.A. Ed. Ann Arbor Science, Michigan: 3: Cap 81: 937-945 (1979).
19. Loper, J.C. Mutagenic effects of organic compounds in -- drinking water. Mutation Research: 76: 241-268 (1980).
20. Loper, J.C y Tabor, M.W. Detection of organic mutagens in-water residues. En: Short-term bioassays in the analysis - of complex environmental mixtures II. Waters, M.D., Sandhu S.S., Huisingh, J.L., Claxton, L. y Nesnow, S. Ed: Plenum Press, New York and London. Environmental Science Research: 22: 155-165 (1980).
21. Loper, J.C. y Tabor, M.W. Isolation of mutagens from drinking water, something old, something new. En: Short-term - bioassays in the analysis of complex environmental mixtures III. Waters, M.D., Sandhu, S.S, Lewtas, J., Claxton, L., Chernoff, N. y Nesnow, S. Ed: Plenum Press, New York and - London. Environmental Science Research: 27: 165-181 (1983).
22. Maron, D.M. y Ames, B.N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. Mutation Research: 113: 173-215 (1983).
23. Mc Cann, J., Choi, E., Yamasaki, E. y Ames, B.N. Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella*/microsome test: Assays of 300 chemical. Proc. Nat. Acad. Sci. USA: 72(12):- 5135-5139 (1975).

24. Mc Mahon, R.E, Cline, J.C. y Thompson, C.L. Assay of 855 test chemicals in ten tester strain using a new modification of the Ames test for bacterial mutagens. *Cancer Research*: 39: 682-693 (1979).
25. Pereira, M.A. y Bull, R.J. Short-term methods for assessing *in vivo* carcinogenic activity of complex mixtures. En: *Short-term bioassays in the analysis of complex environmental mixtures II*. Waters, M.D., Sandhu, S.S., Huising, J.L., Claxton, L. y Nesnow, S. Ed: Plenum Press, - New York and London: 22: 167-175 (1980).
26. Rinkus, S.J. y Legator, M.S. Chemical characterization of 465 know or suspected carcinogens and their correlation - with mutagenic activity in the *Salmonella typhimurium* system. *Cancer Research*: 39: 3289-3318 (1979).
27. Robinson, M. y Glass, J.W. The initiating and promoting activity of chemical isolated from drinking water in the *Senecar* mouse: A five-city survey. En: *Short-term bioassays in the analysis of complex environmental mixtures II*. Waters, M.D., Sandhu, S.S., Huising, J.L., Claxton, L. y Nesnow, S. Ed: Plenum Press, New York and London. *Environmental Science Research*: 22: 177-175 (1980).
28. Rosenkrans, H.S., Mc Coy, E.C., Anders M., Speck, W.T. y Bickers, D. The use of microbial assay system in the detection of environmental mutagens in complex mixtures. En: -- *Application of short-term bioassays in the fractionation and analysis of complex environmental mixtures*. Waters, M.D. Nesnow, S., Huisingh, J.L., Sandhu, S.S. y Claxton, L. Ed: Plenum Press, New York. *Environmental Science Research*: 15: 3-42 (1978).

29. Rosenkrans, H.S., Speck, W.T. y Gutter, B. Microbial assay procedures: Experience with two systems. En: *In vitro* metabolic activation in mutagenesis testing. Serres, F.J., --- Fouts, J.R., Bend, J.R y Philpot, R.M. Ed: Elsevier/North-Holland Biomedical Press. Amsterdam: 337-363 (1976).
30. Ross, W.D. e Hillan, W.J. Aqueous effluent concentration - for application to biotest systems. En: Short-term bioassays in the analysis of complex environmental mixtures II. Waters, M.D., Sandhu, S.S., Huisingh, J.L., Claxton, L. y Nesnow, S. Ed: Plenum Press, New York and London. Environmental Science Research: 22: 189-199 (1980).
31. Schoeny, R.S., Smith, C.C. y Loper, J.C. Non-mutagenicity for *Salmonella* of the chlorinated hydrocarbons Aroclor -- 1254, 1,2,4 Trichlorobencene, mirex and kepone. Mutation - Research: 68: 125-132 (1979).
32. Schwartz, D.J., Saxena, J. y Kopfler, F.C. Water distribution system, a new source of mutagens in drinking waters. Environmental Science & technology: 13: 1138-1141 (1979).
33. Sligar, S.G., Kennedy, K.A. y Pearson, D.C. Chemical mechanisms for cytochrome P-450 hydroxylation: Evidence for acylation of heme-bound dioxigen. Proc. Natl. Acad. Sci. USA: 77(3): 1240-1244 (1980).
34. Smith Carl C. Strategy for collection of drinking water concentrates. En: Application of short-term bioassays in the - fractionation and analysis of complex environmental mixtures. Waters, M.D., Nesnow, S., Huising, J.L., Sandhu, S.S.

- Claxton, L. Ed: Plenum Press, New York. Environmental -- Science Research: 15: 227-244 (1978).
35. Soderman Jean V. CRC Handbook of Identified Carcinogens- and Noncarcinogens; Carcinogenicity-Mutagenicity Database. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida Vol I y II (1984).
36. Tong-man Ong, Mukhtar, M., Wolf, C.R. y Zeiger, E. Differential effects of cytochrome P-450-inducers on promutagens activation capabilities and enzymatic activities of S9 from rat liver. Journal of Environmental Pathology and Toxicology: 4: 55-65 (1980).
37. Van Kreijl, C.F., Kool, H.J., De Vries, M., Van Kranen, H. J. y De Greef, E. Mutagenic activity in the river Rhine and Meuse in the Netherlands. The Science of the Total Environment: 15: 137-147 (1980).
38. Walker, G.C., Kenyon, C.J., Bagg, A., Elledge, S.J., Perry, K.L. y Shanabruch, W.G. Regulation and function of *Escherichia coli* genes. Induced by DNA damage. Chapter 2. En: Molecular and cellular mechanisms of mutagenesis. Lemontt, J. F. and Generoso, W.M. Ed: Plenum Press, New York and London. Basic Life Sciences: 20: 43-63 (1981).
39. White, A., Handler, P., Smith, E.L., Hill, R.L., y Lehman, I R. Principles of Biochemistry, Sexta edición. Mc. Graw-Hill-Book Company: Cap. 20: 674-675 (1978).