



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES

"ZARAGOZA"

DETERMINACION DE GENOTOXICIDAD DE OSTIONES  
CONTAMINADOS CON PETROLEO Y SUS DERIVADOS  
EN Salmonella typhimurium y Escherichia coli

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A :

JOSE ALEJANDRO SANTIAGO HERNANDEZ

DIRECTOR DE TESIS :

M. EN C. MATILDE BREÑA VALLE



MEXICO, D. F.

1993

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



## **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.

# I N D I C E

<b>RESUMEN</b>	1
<b>CAP. 1 EL PETROLEO</b>	
1.1 GENESIS	3
1.2 COMPOSICION	4
1.3 REFINACION	5
1.4 DERRAMES	5
1.5 DISPERSION	7
1.6 CUANTIFICACION DE HIDROCARBUROS FOSILES	7
1.7 TOXICIDAD Y FACTORES QUE LA MODULAN	9
1.8 INGESTION Y BIOACUMULACION	12
1.9 GENOTOXICIDAD DE HIDROCARBUROS AROMATICOS	13
<b>CAP. 2 METALES PESADOS</b>	
2.1 OCURRENCIA EN SISTEMAS MARINOS	15
2.2 TOXICIDAD Y GENOTOXICIDAD	17
<b>CAP. 3 ACIDO DESOXIRRIBONUCLEICO</b>	
3.1 GENERALIDADES	19
3.2 MECANISMOS DE REPARACION	23
3.2.1 FOTORREACTIVACION	24
3.2.2 REPARACION POR ESCISION	24
3.2.3 REPARACION POR RECOMBINACION	27
3.2.4 SISTEMA SOS	27
3.3 METODOS PARA EVALUAR GENOTOXICIDAD	31

3.3.1 METODO DE AMES	32
3.3.2 CROMOENSAYO	33
<b>CAP. 4 ANTECEDENTES</b>	<b>35</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>37</b>
<b>MATERIAL Y METODOS</b>	
MATERIAL BIOLÓGICO	38
REACTIVOS	39
METODO DE AMES	39
CROMOENSAYO	41
METODO DE EXTRACCION	43
CROMATOGRAFIA DE GASES	43
ESTADISTICA	44
<b>RESULTADOS</b>	
PRUEBA DE AMES	45
CROMOENSAYO	49
CROMATOGRAFIA DE GASES	51
<b>ANALISIS DE RESULTADOS</b>	<b>56</b>
<b>CONCLUSIONES Y COMENTARIOS</b>	<b>60</b>
<b>ANEXO</b>	<b>61</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>68</b>

## RESUMEN

En zonas costeras, bahías y estuarios existen una gran diversidad de especies de importancia ecológica y comercial (Botello et al., 1992). Es también en estos lugares donde la contaminación por petróleo y sus derivados es más severa. Ya que muchos de estos compuestos son genotóxicos, principalmente algunos hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), se han realizado estudios en especies marinas comestibles para investigar su posible acción mutagénica. El ostión por ser un organismo sésil y filtrador es ideal para este tipo de investigaciones. En 1988 Avila detectó en el ostión *Crassostrea virginica*, colectado en el Canal del Chijol, Ver., ciertas cantidades de metales como vanadio, níquel, fierro y zinc e hidrocarburos alifáticos y aromáticos. Se cree que estos provienen de la industria del petróleo ya que cerca del lugar de colecta se encuentra la refinería de Cd. Madero Tamps.

Pruebas preliminares en *Drosophila* y *Salmonella* mostraron un leve efecto mutagénico (Olvera et al., 1990). En la prueba de Ames en *Salmonella* el efecto sólo se observaba al agregar al bioensayo activación metabólica, lo cual indicaba que el causante de dicho daño parecía ser un mutágeno de tipo indirecto (Frias et al., 1990). Para confirmar la suposición anterior se prepararon extractos acuoso y orgánico del ostión del Chijol y se investigó la presunta actividad mutagénica mediante dos sistemas bacterianos, la prueba de Ames en *Salmonella typhimurium* y el cromosensayo en *Escherichia coli*. En forma paralela se realizaron análisis por cromatografía de gases de dichos extractos en busca de HAP.

Los resultados obtenidos en ambos bioensayos indican que ninguno de los extractos presentaba efecto mutagénico ni directo ni indirecto. Por otra parte, los cromatogramas mostraron la inexistencia, a niveles cuantificables, de los HAP que constituían la muestra patrón.

Es probable entonces que los extractos de ostión no contengan mutágenos que los bioensayos utilizados pudieran detectar. Esto en parte es confirmado por la cromatografía de gases. El leve efecto observado en pruebas anteriores, posiblemente se deba al benceno, ya que este hidrocarburo da resultados positivos en mamíferos, plantas superiores e insectos, sin embargo en bacterias su acción es todavía incierta (Dean, 1985).

## CAPITULO No 1

### EL PETROLEO

#### 1.1 GENESIS.

La materia orgánica sintetizada por los vegetales es el origen común de todos los combustibles fósiles. La preservación de esta sólo puede efectuarse en un medio acuático, donde es presa de microorganismos, los cuales transforman a presión y temperatura muy baja, los constituyentes mayores de los vegetales. El residuo de la actividad microbiana sufre una reorganización química con polimerización y condensación, dando origen a una sustancia llamada kerógeno (Tissot, 1977).

El kerógeno es la forma más abundante de materia orgánica fósil y por lo tanto es la fuente natural de petróleo y gas. Se encuentra formado por un gran número de pequeñas partículas que presentan, en general, aspecto amorfo. Podemos decir que el kerógeno es una mezcla heterogénea de constituyentes en la que la composición química puede variar notablemente. Se puede tener una idea esquemática del tipo de estructuras químicas que existen en el kerógeno, describiéndolas como formadas por núcleos policíclicos (poliaromáticos o heterocíclicos con contenido de nitrógeno o azufre) unidos entre sí por cadenas alifáticas o por enlaces heteroatómicos. Los núcleos o cadenas pueden, además, incluir grupos funcionales (Tissot, 1977).

La formación de hidrocarburos, aceite y gas, a partir del kerógeno, corresponde a la eliminación previa de todos los obstáculos del paralelismo de los núcleos poliaromáticos como son, por ejemplo, las cadenas alifáticas o los ciclos saturados no planos. Por consiguiente, la génesis del petróleo se presenta como consecuencia necesaria de la reorganización progresiva del kerógeno (Tissot, 1977).

## 1.2 COMPOSICION.

El petróleo crudo y los productos de su refinación (gasolina, aceites combustibles residuales, destilados, lubricantes etc.) son mezclas sumamente complejas de compuestos orgánicos, en su mayoría hidrocarburos (90-100%), que abarcan una extensa escala de estructuras y de pesos moleculares (Farrington et al., 1972; Navarrete, 1986).

Estos hidrocarburos se agrupan en cuatro categorías principales, según su punto de ebullición y complejidad estructural en alcanos, cicloalcanos, aromáticos y alquenos.

Además, los crudos contienen, según su origen, diversas cantidades de oxígeno, nitrógeno y azufre (Botello, 1979a). También se encuentran casi todos los metales de la tabla periódica (excepto el rubidio y el niobio). El metal más abundante es el vanadio cuya concentración llega hasta 1000 ppm., seguido por el níquel con más de 100 ppm. y el hierro que es de aproximadamente 30 ppm. (Navarrete, 1986).

En el petróleo crudo se han detectado alcanos que van desde el metano, hasta compuestos con 60 átomos de carbono. Entre los aromáticos, que constituyen el 15% de los hidrocarburos totales, se han detectado: benceno, mono, di, tri y tetrabenceno, tolueno, xileno, naftaleno, benzantraceno, benzopireno, pireno y otros hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) con múltiples sustituciones alquilo



(Botello, 1979b; Avila, 1988).

### 1.3 REFINACION.

El petróleo crudo esta compuesto principalmente por hidrocarburos y abarca compuestos como los gases butano y propano, carburantes líquidos, líquidos volátiles y aceites negros viscosos (Botello, 1979a).

Dado que estos compuestos tienen diferente punto de ebullición se pueden separar mediante una destilación atmosférica. Este es el primer paso y de aquí se obtiene gas seco, gas licuado, gasóleo pesado, gasolina, diesel y un residuo primario. El segundo paso normalmente consiste en transformar el residuo primario en productos volátiles mediante una destilación al alto vacío. En este proceso se obtiene gasolina, gas seco, propano, propileno, butano, butileno, aceite cíclico ligero y aceite clarificado. Entre los métodos más importantes para mejorar la calidad de los productos está el de la eliminación catalítica del azufre (Navarrete, 1986).

De algunos de los compuestos obtenidos en el proceso anterior (naftas ligeras desulfuradas), se obtienen cicloalcanos e hidrocarburos aromáticos como el benceno, etilbenceno, tolueno, xileno, o-xileno, m-xileno, p-xileno e hidrocarburos aromáticos policíclicos y heterocíclicos (Navarrete, 1986).

### 1.4 DERRAMES.

Se ha calculado que los océanos reciben anualmente entre 5 y 10 millones de toneladas métricas de petróleo y sus derivados. Este proviene de las operaciones de limpieza de los depósitos de los buques cisterna, de la descarga de lastre y del bombeo de sentinas, de los desechos de las operaciones de

buques cisterna en las terminales, de la exploración y producción de petróleo en el mar, de rupturas de oleoductos, accidentes sufridos por buques cisterna y desechos industriales y domésticos (Deutsche, 1975). Algunas operaciones ajenas a los mares, tales como la descarga de lubricantes consumidos y la precipitación atmosférica de emanaciones gaseosas, contribuyen en buena parte a la cantidad anual de petróleo que llega a los océanos (National Academy of Sciences, 1975).

Entre los accidentes que han provocado una gran contaminación están, el de los buques cisterna "Torrey Canyon" en 1967, el del "Amoco Cadiz" en 1978 en las costas francesas y el del "Tampico Maru" en territorio mexicano. En cuanto a accidentes ocurridos en pozos petroleros, el más importante, en las costas mexicanas, es el del Ixtoc 1, que tuvo una duración de 281 días (National Academy of Sciences, 1975).

El Golfo de México es sin lugar a dudas uno de los lugares más contaminados por petróleo ya que es la región de mayor importancia en la producción y procesamiento de hidrocarburos de Estados Unidos y México, además de que es el área con el mayor número de perforaciones costafuera en el mundo. La mitad de los pozos que se han perforado en los mares de la Tierra se localizan en esta zona. La zona marina de Campeche, aporta el 80% de la producción petrolera de México y el 90% de las instalaciones para el procesamiento del petróleo crudo y del gas natural, se encuentran en las costas del Golfo de México (Botello et al., 1992).

Por otra parte, se ha determinado que en mar abierto las concentraciones de hidrocarburos son generalmente bajas mientras que en áreas costeras, bahías y estuarios, éstas pueden ser altas relacionándose directamente a efectos por contaminación por petróleo (National Academy of Sciences, 1975).

### 1.5 DISPERSION.

Después de la descarga o derrame petrolero se forma una delgada película en la superficie del mar, la cual se dispersa por acción del oleaje y los vientos. Sobre esta película actúan factores físicos que resultan en, pérdida de petróleo por evaporación (Sivaider y Mikolaj, 1973), emulsificación (Mackay et al., 1973), disolución de fracciones ligeras (Boylan y Tripp, 1971) y adsorción sobre materia orgánica particulada, además de hundimiento de residuos no flotantes (Meyer y Quinn, 1973).

Importantes cambios químicos resultan tanto de la degradación por microorganismos (Erhardt y Blumer, 1972) como de la oxidación fotoquímica en la atmósfera (Berridge et al., 1968), especialmente ante la presencia de rayos ultravioleta. La velocidad con la que se desencadenen depende del tipo de hidrocarburo y de las condiciones ambientales prevalecientes como temperatura, concentración de oxígeno en el agua, amplitud de la actividad fotoquímica y disponibilidad de nutrientes para los microorganismos (Botello et al., 1992).

### 1.6 CUANTIFICACION DE HIDROCARBUROS FOSILES.

Para evaluar adecuadamente los niveles de hidrocarburos del petróleo en las zonas contaminadas por estos productos es necesario analizar tres componentes básicos: agua, sedimentos y organismos (Toledo et al., 1989).

AGUA. Se han reportado concentraciones de 48 ppb. en la Laguna de Términos, Campeche (Botello, 1985), de 18.4 ppb. en la Laguna del Ostión, Ver. (Botello y Páez-Osuna, 1984) y de 15.0 ppb. en el Caribe Mexicano (Botello y Mandelli, 1978), siendo el límite permisible 10.0 ppb. (UNESCO, 1982).

**SEDIMENTOS.** Los sedimentos de los ríos Tonalá y Coatzacoalcos, así como de la Laguna del Ostión son los cuerpos de agua que presentan las mayores concentraciones de hidrocarburos del petróleo, con 1 148, 680 y 120 ppm. respectivamente (Toledo et al., 1989). Las Lagunas de Mecocacán en Tabasco, la de Términos en Campeche y la de Nichupté en Quintana Roo, presentan niveles elevados de componentes del petróleo en sus sedimentos, a concentraciones de 88, 85 y 93 ppm. respectivamente (Botello et al., 1986). Todos estos sistemas rebasan el límite permisible de 70 ppm. para zonas no contaminadas por petróleo (UNESCO, 1982).

**ORGANISMOS.** En una recopilación efectuada por Toledo (1988) a partir de datos obtenidos en una investigación multidisciplinaria, se observa que diversas especies, incluyendo peces, crustáceos y moluscos, destinados al consumo humano, presentaron niveles de hidrocarburos aromáticos policíclicos, con valores promedio de 6.0 ppm. para peces, 1.8 ppm. en crustáceos y 7.5 ppm. para moluscos. Entre los hidrocarburos aromáticos identificados en el ostión había, benceno, tolueno, xileno, naftaleno, fenantreno, dibenzotiofeno, antraceno, metilfenantreno, benzoantraceno, benzo[a]pireno, criseno y pireno (Avila, 1988; Botello y Páez-Osuna, 1984; Toledo, 1982, 1988; Toledo et al., 1989).

Por otra parte, en un estudio realizado en el Edo. de Veracruz, se determinaron los niveles de hidrocarburos saturados (HS) y de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) en diferentes organismos marinos (Tabla 1).

Tabla 1. Concentración de HS y de HAP en animales marinos.

Especie	Nombre comun	Concentracion ppm	
		HS	HAP
<i>Bairdiella ronchs</i>	Ronco blanco	0.88	0.017
<i>Callinectes bocourti</i>	Jaiba	1.78	0.016
<i>Centropomus undecimalis</i>	Robalito	0.53	-
<i>Cichlasoma fenestratum</i>	Mojarra negra	1.17	-
<i>C. meechi</i>	Mojarra	3.00	-
<i>Conodon nobilis</i>	Ronco amarillo	1.84	-
<i>Crassostrea virginica</i>	Ostión	2.05	-
<i>C. rhizophora</i>	Ostión	1.75	-
<i>Diapterus olisthostomus</i>	Mojarra blanca	0.42	-
<i>Eugerres plumieri</i>	Mojarra rayada	0.84	0.011
<i>Gerres cinereus</i>	Pez trompeta	0.37	-
<i>Mercenaria campechensis</i>	Almeja	1.93	-
<i>Macrobrachium acanturus</i>	Mayacaste chico	0.70	0.880
<i>M. carcinus</i>	M. grande	1.55	0.017
<i>Menticirrus americanus</i>	Ratón	0.28	0.002
<i>Mugil curema</i>	Lebrancha	1.52	0.004
<i>Tarpon atlanticus</i>	Sábalo	1.07	0.380
<i>Rangia flexuosa</i>	Almeja grande	5.21	0.123
<i>Polymesoda caroliniana</i>	Almeja chica	2.00	0.127

## 1.7 TOXICIDAD Y FACTORES QUE LA MODULAN.

Muchos de los hidrocarburos y heterocompuestos que se encuentran en el petróleo crudo y en los productos de su refinación son tóxicos. El incremento de la toxicidad se da a lo largo de la serie alcanos, cicloalcanos, alquenos y aromáticos. Dicha toxicidad puede ser alterada a través de la interacción con otros compuestos y con factores como salinidad, pH, temperatura y materiales en suspensión (Baker, 1980).

Las concentraciones bajas de alcanos producen anestesia y narcosis mientras que las altas ocasionan daño celular y muerte. Los cicloalcanos pueden interferir y bloquear los procesos biológicos de la biota marina, dificultando la búsqueda de alimento, el escape a predadores, la selección del habitat y la atracción sexual. Los hidrocarburos aromáticos son los más dañinos, ya que algunos actúan como venenos agudos y/o presentan actividades mutagénica y cancerígena (Botello, 1979a).

Un gran número de factores, que actúan solos o en combinación, determinan los efectos del petróleo o los derivados de éste sobre la vida marina. Así, los daños biológicos dependen principalmente de:

- a) tipo de petróleo, composición y características, en especial el contenido de compuestos aromáticos
- b) concentración a la que se exponen los organismos y el tiempo de exposición
- c) grado de intemperismo del petróleo
- d) forma en la que se halle, ya sea en solución, emulsión, suspensión o bien disperso o adsorbido a materia orgánica
- e) especie o grupo de individuos de que se trate; plancton, necton o bentos.
- f) estadio de vida de las especies, ya sea en forma larvaria, juvenil o adulta
- g) presiones ambientales naturales, impuestas por condiciones climáticas o fluctuaciones en la temperatura, salinidad y pH del agua, corrientes y acción de olas
- h) procedimientos de limpieza del petróleo, principalmente si se emplean dispersantes.

Los efectos e la contaminación por petróleo y sus derivados pueden clasificarse, de manera general en dos tipos.

1. Efectos agudos o letales, que resultan de la introducción masiva del contaminante al medio. La mortandad ocurre casi simultáneamente o poco tiempo después de su aparición en el medio. Estos efectos pueden deberse a factores físicos, como cobertura de los organismos, o químicos como toxicidad. El tipo de daño puede ser ocasionado por componentes volátiles insaturados o por ácidos volátiles formados a partir de compuestos insaturados de bajo punto de ebullición (National Academy of Sciences, 1975).

2. Efectos crónicos o subletales, ocasionados por la liberación del petróleo crudo o sus derivados en forma continua, o con suficiente frecuencia como para impedir que la biota tenga tiempo de recuperarse. Estos efectos ocasionan cambios en las poblaciones al alterar las tasas de nacimientos, mortandad, dispersión, y los patrones de edad y de distribución, lo que a su vez ocasiona cambios en la estructura de la comunidad. Todos estos daños los pueden ocasionar compuestos acíclicos no volátiles formados en destilados de alto punto de ebullición, una vez expuestos a la luz y al aire (National Academy of Sciences, 1975).

En cuanto a los efectos del petróleo y sus derivados en los organismos marinos, existe tal cantidad de literatura que sólo se mencionarán algunos ejemplos:

**PLANKTON.** Las concentraciones inferiores a 0.1 ppb. retardan la división celular y el desarrollo (Mironov, 1970), y mayores de 1.0 ppm producen la muerte de gran cantidad de especies fitoplanctónicas además de reducir hasta en un 90% la fotosíntesis. También interfieren en las migraciones verticales diurnas del zooplankton (Botello, 1979a).

**ALGAS MACROSCÓPICAS.** Concentraciones de 100 a 200  $\mu\text{g./lt.}$  disminuyen la fotosíntesis hasta en un 60%, además de provocar una gran mortandad en diversas especies (National Academy of Sciences, 1975).

Moluscos. En ostras y mejillones el petróleo llega a través de pequeñas partículas en suspensión, que al obturar el sistema respiratorio les producen la muerte por asfixia. También provoca gran mortandad en moluscos gasterópodos (National Academy of Sciences, 1975).

Peces. En peces adultos tiene efecto mecánico, ya que al depositarse sobre las branquias impide el intercambio de gases con lo cual mueren por asfixia (Mironov, 1970). A concentraciones de 0.5 a 10 ppm dañan los órganos de los sentidos produciendo además erosión y destrucción de las células que forman el epitelio branquial. Gardner (1972) detectó varios tipos de anormalidades histológicas, sobre todo en las estructuras quimiorreceptoras y en el miocardio ventricular del pez *Menidia menidia*. Además a concentraciones mayores de 0.1 ppm producen gran mortandad en larvas y huevecillos (Botello, 1979a).

En general, el daño biológico del petróleo o sus componentes, es mucho más severo cuando ocurre en zonas costeras o en estuarios. Aquí la zona intermareal es la más afectada pues en ella hay mayor diversidad y abundancia de especies, así como de estadios juveniles de muchas especies oceánicas (Botello, 1979b).

### 1.8 INGESTION Y BIOACUMULACION.

La introducción de hidrocarburos en animales marinos puede ocurrir por ingestión de alimento contaminado o por absorción directa a través de la columna de agua (Botello, 1979a) siendo esta última la ruta más probable (Kotyk, 1973).

Algunos hidrocarburos se almacenan en los diferentes tejidos de los animales marinos. Quizá por su alto contenido de lípidos, el hígado en los peces y el hepatopáncreas de los invertebrados son los sitios en donde particularmente se



almacenan estos compuestos. Después de que un organismo incorpora hidrocarburos en sus tejidos, éstos pueden ser excretados sin ninguna alteración, o bien metabolizados o almacenados por cierto tiempo. La gran mayoría de los vertebrados y algunos invertebrados poseen sistemas de detoxificación que facilita la eliminación de compuestos extraños através de diversas enzimas encargadas de ejecutar reacciones de hidroxilación y conjugación (Lee et al., 1972).

A pesar de esto, el metabolismo de los hidrocarburos en especies marinas no está totalmente comprendido; se supone tan sólo que los mecanismos involucran oxidasas y otras enzimas altamente específicas, importantes en la degradación y transformación de compuestos aromáticos y parafínicos (Lee et al., 1972).

#### 1.9 GENOTOXICIDAD DE HIDROCARBUROS AROMATICOS.

Cuando algún agente físico, químico o biológico altera la información genética contenida en la molécula de ácido desoxirribonucleico (ADN) se dice que es genotóxico. Algunos hidrocarburos aromáticos, particularmente los policíclicos, constituyentes del petróleo crudo y de los productos de su refinación, presentan dicha actividad, que se puede traducir en mutaciones o cáncer (White et al., 1980).

La genotoxicidad de estos compuestos está relacionada con el número de anillos así como con el tipo y lugar de la sustitución. Para que los hidrocarburos aromáticos manifiesten su actividad mutagénica o cancerígena deben ser previamente metabolizados (Brookes y Lawley, 1964), siendo sus metabolitos (dihidrodiol-epóxidos) los principales responsables del daño (Dipple y Bigger, 1991).

En la Tabla 2 se muestra la actividad genotóxica de algunos hidrocarburos aromáticos evaluados en diferentes sistemas de prueba.

Tabla 2. Genotoxicidad de algunos hidrocarburos aromáticos detectados en el petróleo

Hidrocarburo	Efecto Genotóxico		Referencia
	Procariontes	Eucariontes	
Benceno	*	+	1-8
Fenol	*	+	9-11
Tolueno	-		10,12
Xileno	-	-	13-15
Cresol	-	+	10,12
Perileno	-		17,18
Criseno		+	19
Pireno	+	+	20,21
Naftaceno	+		22
Fenantreno	+		20
Antantreno	+	+	21,23
Colantreno	+		24
Antraceno	+		24
Benzo[a]antraceno	+	+	24,25
Dibenzo[a,c]antraceno	+	+	26,27
Dibenzo[a,h]antraceno	+	+	26,27
Benzo[l]aceantrileno	+	+	28,29
Benzo[c]fenantreno	+		20
Benzoacenaftileno	+		20
Benzo[a]pireno	+	+	24,30-31
Benzo[e]pireno	-	-	17,18

\*, dudoso. +=positivo. -=negativo

1.Shimizu et al., 1983. 2.Kinoshita et al., 1981. 3.Gómez-Arroyo y Villalobos-Pietrini, 1981. 4.Hite et al., 1980. 5.Tice et al., 1981. 6.Styles y Richardson, 1984. 7.Dean, 1985. 8.Vogel, 1985. 9.Gocke et al., 1981. 10.Haworth et al., 1983. 11.Morimoto y Wolff, 1980. 12.McCarroll et al., 1981a. 13.Bos et al., 1981. 14.McCarroll et al., 1981b. 15.Gerner y Friedrich, 1978. 16.Kligermann et al., 1986. 17.De Flora, 1981. 18.De Flora, 1982. 19.Scribner, 1973. 20.Bos et al., 1988. 21.Cavaliere et al, 1977. 22.Pahlman, 1988. 23.Wood et al., 1980. 24.De Flora, 1984. 25.Yoshiaki et al., 1988. 26.Kumar et al., 1990. 27.Diamond et al., 1984. 28.Mohapatra et al., 1987. 29.Nesnow et al., 1984. 30.Cosma et al., 1988. 31.Blakey y Douglas, 1984.

## CAPITULO No 2

### METALES PESADOS

#### 2.1 OCURRENCIA EN SISTEMAS MARINOS.

La contaminación marina por metales pesados es evidente en zonas costeras a consecuencia de las actividades humanas asociadas a las descargas industriales y municipales y a los desechos de la agricultura. También contribuyen a esto el dragado y algunos procesos naturales (Mandelli, 1979).

La mayoría de los metales pesados son particularmente tóxicos para el hombre y muchos otros organismos. Entre los más dañinos están el mercurio, el cadmio y el plomo. Algunos otros como cromo, cobalto y cobre se vuelven peligrosos al cambiar la forma química o al aumentar la concentración. Otros más como el níquel y el vanadio, que presentan efecto tóxico, se relacionan directamente con las actividades petroleras (Berman, 1980).

Los reportes de daños graves a la salud humana, como es el caso de la enfermedad de Minamata, en Japón, han hecho que se intensifiquen los análisis acerca los niveles de metales pesados en zonas costeras, en virtud de que estas áreas son las primeras en resentir los efectos de las descargas continentales, además de recibir lo que proviene del océano abierto a través de la circulación de mareas, viento, etc. (Botello et al., 1992).

En nuestro país, los estudios sobre metales pesados tanto en sedimentos como en organismos, especialmente en el ostión *Crassostrea virginica* se han concentrado en el litoral del Golfo de México. En cambio, la evaluación de metales pesados en la columna de agua se ha rezagado debido a la complejidad de las técnicas que es necesario emplear (Ponce, 1988).

Los datos en cuanto a las concentraciones de algunos metales pesados en sedimento indican que el níquel presenta niveles elevados en la región de Veracruz, principalmente en el río Tonalá (98.4 ppm.) y en la Laguna del Ostión (68.8 ppm.) así como en la Laguna de Bojórquez en Quintana Roo (87.3 ppm.). El cromo y el cadmio se encuentran en el Río Blanco, Veracruz, a concentraciones de 83.0 y 1.6 ppm. respectivamente. También la Laguna de Términos, en Campeche presenta valores altos para níquel, cromo, cadmio y plomo, evidenciándose aquí los efectos de la actividad petrolera en la Sonda de Campeche (Botello et al., 1992).

En moluscos bivalvos, de diversos sistemas lagunares de Tabasco, se observa que los de la Laguna de Mecoaacán contienen un promedio de 0.24 ppm de plomo, los de la Laguna del Carmen 0.26 y los de la Laguna de Machona de 0.23 ppm. En ostiones de la Laguna de Términos, en Campeche, se encontraron niveles de plomo, cromo y cadmio de 10.0, 6.7 y 5.7 ppm respectivamente (Botello et al., 1992).

Por otra parte, en la Laguna de la Mancha, en Veracruz, se encontró que el ostión *Crassostrea virginica* contenía cromo, fierro, níquel, cobre, zinc, plomo, bromo, rubidio, estroncio y zirconio a concentraciones de 8, 1002, 36, 229, 800, 7, 956, 24, 43 y 13 ppm respectivamente. En el canal del Chijol, localizado en esa misma entidad, se determinó en esta especie de molusco, vanadio, cromo, fierro, níquel, cobre, zinc y plomo con las siguientes concentraciones; 10, 20, 876, 14, 280, 3352 y 11 ppm respectivamente (Avila, 1988).

El mercurio presenta, en términos generales, niveles bajos en las lagunas de Tabasco; así, la Laguna de Machona registra una concentración promedio de 0.1 ppm/g. de ostión mientras que en las del Carmen y Mecocacán los valores son de 0.12 ppm/g de muestra. Las concentraciones máximas de este metal se presentan al inicio de la época de nortes como resultado del aporte pluvial y descienden durante la estación de vientos fuertes, y se reducen a sus valores mínimos cuando inicia el estiaje (Botello et al., 1992).

## 2.2 TOXICIDAD Y GENOTOXICIDAD.

La información existente acerca de los efectos de los metales sobre organismos superiores esta bien documentada, sin embargo en procariontes ésta puede ser catalogada como inconsistente. Se sabe que pueden ocasionar mutaciones génicas, aberraciones cromosómicas, transformación morfológica e infidelidad en la duplicación del ADN. En la Tabla 3 se enlistan algunos datos en cuanto a los efectos provocados por los metales asociados a la actividad petrolera, en bacterias y mamíferos (Kada et al., 1980; Berman, 1980).

Tabla 3 Efectos de algunos metales pesados.

METAL	BACTERIAS		MAMIFEROS	
	TOXICO	GENOTOXICO	TOXICO	GENOTOXICO
VANADIO		+	+	
NIQUEL	-	*	+	+
FIERRO	+	+	+	
CROMO	+	+	+	+
PLOMO	-	*	+	*
ZINC	-	-	*	

+= POSITIVO.

-= NEGATIVO.

\*= DUDOSO.

Los metales con efecto genotóxico han sido clasificados como mutágenos directos ya que no necesitan activación metabólica previa para manifestar su efecto. Como se puede observar en la Tabla 3 la mayoría de estos son nocivos para los mamíferos.

## CAPITULO No 3

### ACIDO DESOXIRRIBONUCLEICO

#### 3.1 GENERALIDADES.

El material genético de todos los organismos vivos está formado por ácido desoxirribonucleico (ADN), a excepción de algunos virus que presentan ácido ribonucleico (ARN). Este determina las características de los organismos, se hereda a los descendientes y es el responsable de que estos presenten un gran parecido a sus progenitores (Monroe, 1988).

El ADN esta constituido por una serie de unidades llamadas nucleótidos. Cada nucleótido esta formado por un azúcar, un grupo fosfato y una porción nitrogenada denominada base. El azúcar contiene cinco átomos de carbono y se denomina desoxirribosa. El grupo fosfato se encuentra unido al carbón número cinco del azúcar, mientras que la base se une al carbón número uno de este sacárido. La base nitrogenada puede estar formada por uno o dos anillos con nitrógeno y carbono. Las bases que contienen un anillo son las pirimidinas y las que contienen dos son las purinas. En el ADN, las pirimidinas son citosina y timina y las purinas adenina y guanina (Fig. 1) (Monroe, 1988).

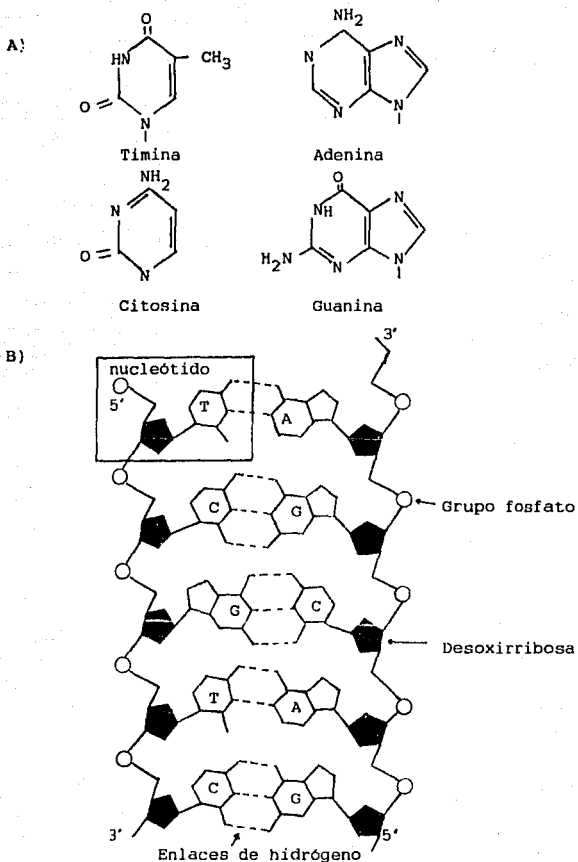


Fig.1 A) Estructura de las bases nitrogenadas presentes en el ADN. B) Segmento de ADN en dos dimensiones, en la cual se representa la forma en la cual se unen el grupo fosfato la azúcar desoxirribosa y las bases nitrogenadas.



Las cuatro bases citadas muestran una notable propiedad de acoplarse de un modo específico dos a dos. La adenina se acopla con la timina y la guanina con la citosina. Esta propiedad hace que las dos cadenas de polinucleótidos puedan aparearse de un modo estable, adoptando entonces, su forma característica de doble hélice (Sánchez y Jouve, 1982).

La estructura de la molécula de ADN en forma de dos hélices complementarias, permite visualizar el mecanismo utilizado para la autoduplicación, es decir, la obtención de dos moléculas hijas iguales a la paterna. Así, cada hélice de dicha molécula sirve de molde sobre el que se va construyendo la hélice complementaria (Monroe, 1988).

En la duplicación del ADN, participan las polimerasas, enzimas que catalizan la síntesis de dicha molécula. Durante este proceso la enzima sólo se une al ADN si este tiene una sección parcialmente monocatenaria, o si hay huecos en una de las dos cadenas. La enzima posee una serie de sitios (*loci*) activos esenciales que le permiten llevar a cabo su función. En uno de los *loci* se coloca una sección del ADN molde, y adyacente a éste, una secuencia de nucleótidos complementarios al molde denominada "primer". En el extremo de crecimiento del primer, la enzima va acoplando los nucleótidos nuevos según el ADN molde. Si el acoplamiento tiene éxito, el nucleótido nuevo se une químicamente mediante un grupo fosfato a la posición 3' del primer, dejando la posición 3' del nucleótido incorporado libre para un alargamiento adicional (Monroe, 1988).

En *Escherichia coli* y otras bacterias, la polimerasa posee actividad exonucleolítica, esto es, que posee la capacidad de eliminar los nucleótidos que se hayan incorporado erróneamente, reemplazándolos por los apropiados. La notable precisión de la duplicación del ADN deriva pues, del acoplamiento exacto de los nucleótidos y de la función correctora o editora que comprueba el apareamiento correcto de las bases en el *locus* terminal, eliminando así apareamientos

erróneos (Monroe, 1988) Este mecanismo de duplicación es muy exacto, ya que la frecuencia de errores es menor a  $10^{-9}$ , es decir, un error por cada diez millones de pares de bases duplicadas (Sánchez y Jouve, 1982).

Según el llamado dogma central de la biología molecular, la información sólo se traduce en una dirección, esto es, ADN  $\longrightarrow$  ARN  $\longrightarrow$  Proteínas (excepto en los virus de ARN), y no al revés. Esto nos sugiere que las bases que conforman al ADN son las cuatro letras implicadas en la clave de la información contenida en dicha molécula. Esta información se lee de tres bases a la vez, con lo cual se tienen 64 posibles combinaciones de bases ( $4^3=64$ ) para codificar sólo 20 aminoácidos. Puesto que en teoría sólo se necesitarían 20 tripletes o codones, se dice que el código es degenerado, ya que un aminoácido puede ser codificado por más de un triplete. Así por ejemplo, tenemos 6 codones para arginina, serina y leucina, 4 para prolina, treonina, valina, alanina y glicina y de 2 a 3 para el resto de los aminoácidos, excepto para la metionina y triptofano que es de uno. Los tripletes UAG, UAA y UGA denominados respectivamente ámbar, ocre y ópalo no codifican para ningún aminoácido y se identifican como señales de terminación o fin del polipéptido (Sánchez y Jouve, 1982).

A medida que transcurre la vida celular pueden ocurrir cambios en la secuencia de bases o en la estructura molecular del ADN. Dichos cambios son conocidos con el nombre de mutaciones y estas pueden ser espontáneas o inducidas (Monroe, 1988).

Entre las lesiones que dan lugar a mutaciones las más comunes son: la alquilación de las bases nitrogenadas debido a la adición de radicales metilo o etilo en distintas posiciones, la formación de dímeros de pirimidina por acción de la luz UV y la alteración en la naturaleza de las bases por ciertos derivados de hidrocarburos y de aminas aromáticas. También se forman productos de adición por la hidratación de

la citosina o de complejos entre el ADN y las proteínas. La desaminación de bases y el rompimiento de los enlaces fosfodiéster en las cadenas de ADN, son también lesiones que pueden producir mutaciones.

Las mutaciones se clasifican de manera muy general en puntuales o génicas, citológicamente invisibles, pero cuyo efecto es observable en el fenotipo de un organismo y en alteraciones en los cromosomas, que son citológicamente observables.

Las mutaciones puntuales se producen mediante dos diferentes mecanismos; sustitución de pares de bases y desplazamiento de mensaje genético (Monroe, 1988).

Las primeras consisten en la sustitución de un par de bases por otro par, lo cual puede, a su vez, conducir a el cambio de un aminoácido por otro diferente. Las repercusiones varían ya que algunas sustituciones no tienen consecuencias con respecto a la funcionalidad del producto químico ni alteran la estructura terciaria de la proteína o sus propiedades fisicoquímicas. De mayor relevancia son las sustituciones que conducen al cambio de aminoácidos con diferentes propiedades. A este tipo pertenece la mutación que da lugar a la hemoglobina S, que poseen los individuos afectados con anemia falciforme, donde se produjo la sustitución del ácido glutámico por valina en la cadena  $\beta$  de la molécula de globulina (Sánchez y Jouve, 1982).

Las mutaciones por desplazamiento del mensaje se deben a la pérdida o adición de bases respecto a la secuencia de un gen. Dado que la lectura se realiza sin pérdida de continuidad, de codón en codón, las variaciones que afectan a la secuencia de éstos conducen a un desfasamiento y traen como consecuencia la alteración del mensaje a partir del punto donde se produjo la variación. El polipéptido resultante posee, a partir de ese punto, una secuencia de aminoácidos y

propiedades funcionales muy diferentes a los originales. La mutación que implica la adición o pérdida de tres, o múltiples de tres nucleótidos, afectan localmente al aminoácido o aminoácidos que se relacionen colinealmente con el gen, pero el resto de la cadena polipeptídica queda inalterado (Sánchez y Jouve, 1982).

Cuando en la molécula de ADN han ocurrido lesiones o daños, la célula posee varios métodos para repararlo o para tolerarlo. Estos mecanismos se dividen en específicos, como la fotoreactivación, e inespecíficos, como la reparación por escisión, recombinación y el sistema SOS.

### 3.2 MECANISMOS DE REPARACION Y TOLERANCIA AL DAÑO

Los primeros organismos que aparecieron sobre la Tierra estaban expuestos a diversos tipos de agentes genotóxicos, como la luz ultravioleta proveniente del Sol y muchos otros. Desde entonces, probablemente, surgieron los mecanismos de protección y reparación de las lesiones provocadas por éstos al ADN, al mismo tiempo que los primeros intentos de vida en el planeta. La presencia de estos mecanismos permitió que algunos organismos, originalmente destinados a morir, no perecieran, con lo cual se incrementó el grado de variabilidad sobre el cual actuaría posteriormente la selección natural. La evolución de estos mecanismos abarcó desde la simple protección de los organismos, hasta la compleja reparación enzimática que presentan actualmente los procariontes y eucariontes, y desde sistemas relativamente exactos, hasta mecanismos mutagénicos que incrementaron la variabilidad, herramienta fundamental de la evolución (Radman et al., 1975). A continuación se describen algunos de los más representativos.

### 3.2.1 FOTORREACTIVACION

Es el mecanismo de reparación más simple que se conoce, se ha detectado en bacterias, hongos, mamíferos etc. Unicamente repara o elimina los dímeros de timina originados por la radiación UV. Es muy exacto y requiere de la intervención de una sola enzima, la fotoliasa, que cataliza el rompimiento de los enlaces covalentes entre dos timinas adyacentes utilizando como fuente de energía luz visible entre 310 y 400 nm. La enzima completa u holoenzima está compuesta por la apoproteína, y un cofactor no proteínico, que puede ser el cromóforo, responsable de la absorción de la luz fotorreactivante. La enzima es capaz de reconocer la distorsión que el dímero genera en la molécula de ADN (Fig. 2) (Sutherland, 1978)

### 3.2.2 REPARACION POR ESCISION.

Aparte de los dímeros de timina hay otros tipos de lesiones que la célula puede reparar por otros mecanismos. Uno de ellos bastante exacto e inespecífico, originalmente descubierto en bacterias pero que al parecer es general para todos los organismos es la llamada reparación oscura o escisión. El proceso requiere de la intervención escalonada de una serie de enzimas.

Los dímeros de timina así como otros muchos tipos de lesiones provocan distorsiones en la molécula de ADN. Tales distorsiones son reconocidas por la enzima endonucleasa *UvrABC*, la cual rompe el enlace fosfodiéster cercano al extremo 5' del dímero de timina. Posteriormente la ADN polimerasa separa el dímero junto con cierto número de nucleótidos adyacentes y el hueco resultante es posteriormente resintetizado por esta misma enzima. Finalmente por acción de una tercera enzima, la polinucleótido-ligasa, el final de la nueva cadena de nucleótidos se une con el extremo preexistente (Fig. 3) (Sánchez y Jouve, 1982)

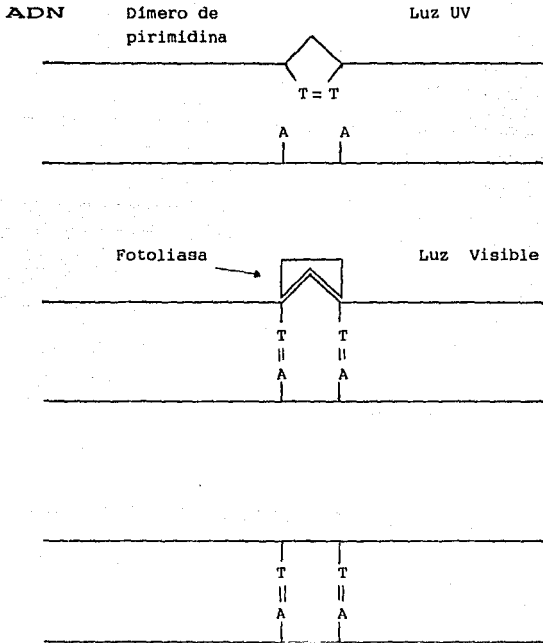


Fig. 2 En la fotorreactivación participa una enzima que rompe los enlaces covalentes formados entre dos timinas adyacentes, originados por la exposición de las células a la radiación UV.

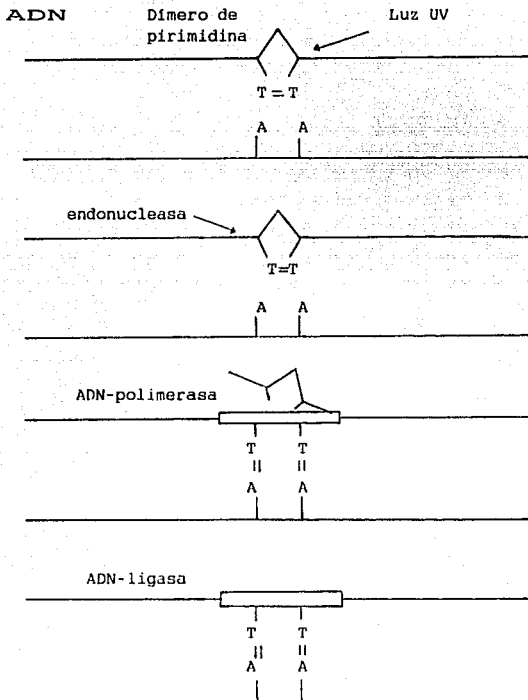


Fig.3 En la reparación por escisión intervienen varias enzimas. La endonucleasa cataliza el rompimiento del enlace fosfodiéster cercano al lugar de la lesión. La ADN-polimerasa quita la región lesionada y repolimeriza el hueco formado. La ADN-ligasa cataliza la formación del enlace fosfodiéster, con lo que restaura la estructura original del ADN.

### 3.2.3 REPARACION POR RECOMBINACION.

La molécula de ADN que contiene alteraciones en su conformación al momento de duplicarse, origina una molécula con discontinuidades o huecos en las regiones correspondientes al sitio de las lesiones. Estos huecos sólo pueden restituirse por mecanismos de combinación (Howard-Flanders, 1968)

La formación de la discontinuidad se debe a la imposibilidad por parte de la polimerasa de copiar la estructura anómala para después reiniciar la replicación cerca del lugar lesionado. La reparación de los huecos se efectúa entonces por medio de un mecanismo de recombinación entre regiones homólogas, así la información genética perdida en una de dichas hélices a consecuencia de la discontinuidad, se recupera por el intercambio de un fragmento con la hélice hermana (Fig. 4) (Howard-Flanders, 1968).

### 3.2.4 SISTEMA SOS

Muchas de las lesiones cuyas consecuencias son discontinuidades o regiones de una sola banda en el ADN, inducen un grupo de genes conocidos en su conjunto como funciones SOS (Walker, 1984). El modelo SOS originalmente propuesto en *E. coli* trata de explicar la presencia de una gran variedad de fenómenos fisiológicos que aparecen después de dañar al ADN. Se les llamo así por que se pensaba que constituía una de las últimas alternativas que tenía la célula para sobrevivir (Walker, 1984).

La expresión de los genes del sistema SOS está regulada por las proteínas LexA y RecA, producto de los genes del mismo nombre. LexA actúa como represor del sistema completo y RecA activa la respuesta SOS al promover la degradación de la primera (Fig. 5) (Walker, 1984).



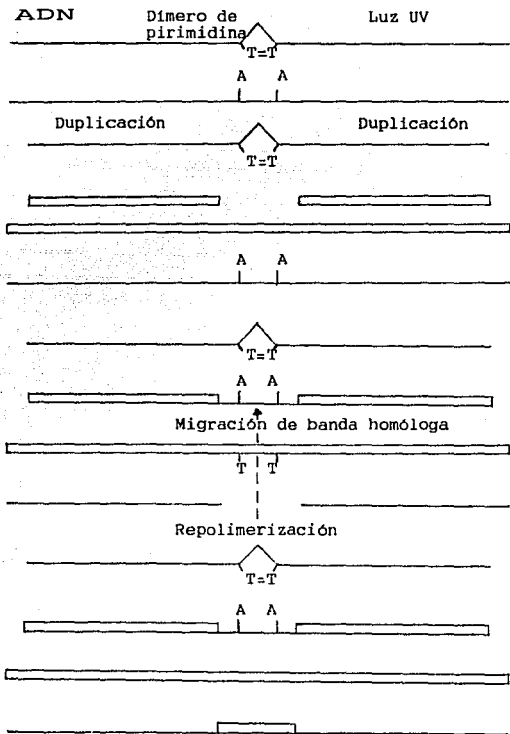


Fig.4 Después de la duplicación del ADN lesionado, quedan huecos enfrente de cada dímero de timina, debido a que no tienen nucleótidos complementarios. Los huecos posduplicativos pueden reconstituirse si opera la reparación por recombinación, en la cual se restituye la estructura original del ADN por medio de procesos de recombinación entre bandas homólogas.

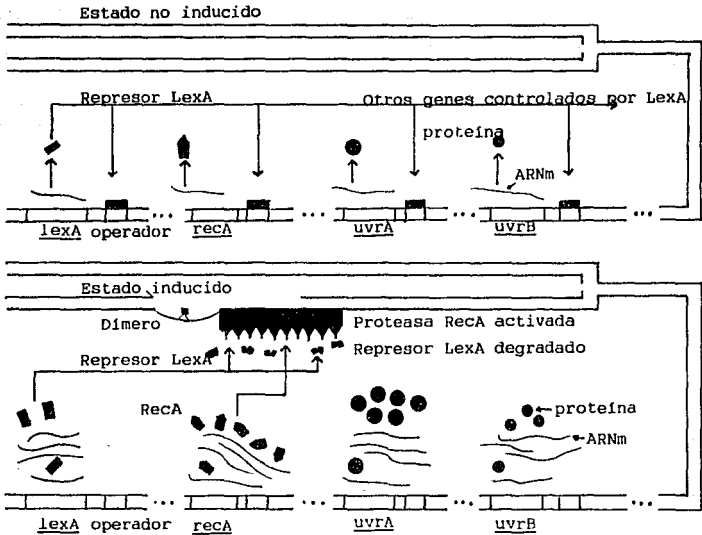


Fig.5 El sistema regulador basado en *lexA* y *recA* está en reposo durante el crecimiento normal en ausencia de daños al ADN (arriba). El represor LexA, unido a los operadores de *lexA*, *recA*, *uvrA*, *uvrB*, mantiene la síntesis del ARNm y proteínas al bajo nivel característico de las células no inducidas. Un daño en el ADN, suficiente para producir un hueco postduplicativo, activa la respuesta SOS (abajo). La proteína RecA se une al ADN uncatenario que queda frente al hueco, se activa su actividad proteasa y de grada al represor LexA. Los genes controlados por LexA se activan y aumenta la síntesis de proteínas.

En una célula no inducida, LexA reprime a todos los genes SOS, incluyendo a *recA* y *lexA* mismos, al unirse a regiones específicas llamadas operadores, que se encuentran junto a cada uno de los genes reprimidos. Estos sitios constan de alrededor de 20 pares de bases para el operador de *recA* y de 40 pares para *lexA*, por lo que *recA* tiene un operador y *lexA* dos. Aun cuando *lexA* se encuentra reprimido, existe una síntesis basal de su producto, suficiente para mantener inactivos a los demás genes que participan en el sistema. Sin embargo algunos genes SOS, se expresan a niveles significativos, probablemente por que sus productos son necesarios para la vida normal de la bacteria (Howard-Flanders, 1981).

La presencia de lesiones en el ADN de *E. coli* impide, en muchos casos, la capacidad de apareamiento con la cadena complementaria, ocasionando que las enzimas participantes en la síntesis de ADN, al no poder insertar los nucleótidos correspondientes, dejen huecos postduplicativos a lo largo de las bandas nuevas de ADN. La proteína RecA tiene gran afinidad por estos huecos de tal modo que al unirse a ellos se induce su actividad proteolítica específica, degradando entonces al represor LexA. Sin embargo, es probable que la sola presencia de huecos postduplicativos o regiones de una sola banda, no sea suficiente para la activación de RecA, ya que durante la duplicación y la recombinación se producen abundantemente tales estructuras (Bridges y Lehman, 1982)

Una vez inducidas las funciones SOS en una célula, hay varios factores que influyen en la magnitud de la respuesta (Walker, 1984):

- a) la magnitud y la persistencia de la señal inductora, que a su vez depende de la cantidad de RecA activada y del tiempo que permanece así
- b) la velocidad a la cual el represor de los genes SOS es degradado
- c) el grado de expresión del gen SOS que se requiera para

que su producto tenga consecuencias fisiológicas manifestables  
d) la afinidad del represor por el operador del gen SOS.

Al final de todo este proceso las posibilidades de supervivencia de una bacteria son mayores con respecto a otra que careciera del sistema SOS. Pero la bacteria tiene que pagar un precio por esto, ya que la frecuencia de mutaciones o alteraciones en el ADN es mayor. Estas podrían ser el resultado de una disminución en la fidelidad enzimática durante la duplicación del ADN, provocada por la incapacidad de corrección por parte de la ADN polimerasa III, que es la encargada de la duplicación del ADN en *E. coli*. El proceso facilitaría la síntesis a través de lesiones no codificadoras con la consecuente generación de mutaciones (Bagg et al., 1981).

### 3.3 METODOS PARA EVALUAR GENOTOXICIDAD

Entre las varias clasificaciones que existen para catalogar las pruebas de genotoxicidad, estan las que se realizan *in vivo* e *in vitro*. La diferencia estriba en que en el segundo es necesario adicionar activación metabólica mediante un liofilizado de hígado que, generalmente es de rata. En las pruebas *in vivo* se utilizan como organismos de experimentación generalmente a mamíferos. Estas pruebas resultan ser muy confiables dadas las similitudes que presentan con el metabolismo de los humanos. Pero no son recomendables para una primera evaluación ya que se requiere de mucho tiempo y de una gran cantidad de recursos.

En este sentido, las pruebas *in vitro* son las más adecuadas ya que se realizan en un período de tiempo corto además de ser relativamente económicas. En esta categoría se encuentran diversos cultivos de células, así como pruebas en microorganismos entre las que estan la prueba de *Salmonella* de Ames (Maron y Ames, 1983) y el cromosoma (Quillardet y

Hofnung, 1985). Ambas efectuadas en bacterias.

### 3.3.1 METODO DE AMES

El método de Ames es una prueba bacteriana para detectar agentes que dañan el ADN (Hollstein y McCann, 1979) y es una de las más validadas en diferentes estudios (Bartsch et al., 1980).

El organismo utilizado es *Salmonella typhimurium* una bacteria patógena del colon, portadora de una mutación que le impide fabricar una de las enzimas que se requieren para la síntesis del aminoácido histidina. A consecuencia de esta mutación, la bacteria no puede crecer en un medio mineral a menos que se le adicione una cantidad suficiente de histidina o que, mediante una mutación hacia atrás (reversión), recupere la capacidad de sintetizar este aminoácido (van der Hoeven et al., 1990).

Las cepas que se utilizan en la prueba tienen mutaciones diferentes en el operon de la histidina, además de otras adicionales como la *rfa* y *uvrB*. También poseen el plásmido pKM101, con lo cual incrementan su sensibilidad para detectar efecto genotóxico (Maron y Ames, 1983).

La mutación *hisG46* en las cepas TA100 y TA1535 se encuentra en el gen *hisG* que codifica para la primera enzima en la biosíntesis de la histidina. Estas cepas tienen el triplete ~~CCC~~ (prolina) en vez del triplete ~~CAC~~ (leucina) que se encuentra en organismos silvestres. Por lo tanto, detectan mutágenos que causan sustituciones de pares de bases, especialmente el par G-C (Ames, 1971).

La mutación *hisD3052* en TA1538 y TA98 se encuentra en el gen *hisD* que codifica para la histidol deshidrogenasa. Tales cepas detectan mutágenos que provocan desplazamiento en el

mensaje genético (Isono y Yourno 1974).

En esta prueba, se considera como mutagénico al agente que por lo menos incrementa en un doble la frecuencia de mutaciones espontáneas (Maron y Ames, 1983).

### 3.3.2 CROMOENSAYO

El cromosensayo es una prueba colorimétrica bacteriana utilizada para detectar agentes que dañan al ADN. Se basa en el sistema SOS de *E. coli* el cual es inducido por agentes genotóxicos (Quillardet y Hofnung, 1985).

El método se puede evaluar mediante la actividad de la enzima  $\beta$ -galactosidasa, cuyo gen fue introducido al sistema SOS por medio del bacteriofago  $\mu$ , por lo cual quedaba así regulada la actividad de dicha enzima en forma similar a la de todo el sistema SOS (Devoret, 1981). Además para determinar si el agente químico probado inhibe la síntesis de proteínas, se cuantifica la actividad de otra enzima, la fosfatasa alcalina (ensayo de toxicidad), que en las cepas indicadoras funciona en forma constitutiva (Quillardet y Hofnung, 1985).

La presencia tanto de la  $\beta$ -galactosidasa como de la fosfatasa alcalina se detecta mediante substratos específicos, que al ser hidrolizados cambian a color amarillo. En el caso de la  $\beta$ -galactosidasa, la intensidad del color así como la rapidez con que aparece dependen de la magnitud del daño. Para la fosfatasa el cambio de color depende de la capacidad de la célula para sintetizar proteínas, independientemente de que se activen las funciones SOS. Los cambios de color se miden por espectrofotometría a 420 nm de longitud de onda, en unidades de absorbancia dentro del rango de 0.1 a 0.4.

La cepa de *E. coli* que más frecuentemente se utiliza para el cromosensayo es la PQ37, que presenta fusión del gen *lacZ*

(gen estructural de la  $\beta$ -galactosidasa) con el gen *sulA* perteneciente a SOS, además de las mutaciones *uvrA* y *rfa* que incrementan su capacidad para detectar agentes que dañan al ADN (Quillardet y Hofnung, 1985).

## CAPITULO No 4

### ANTECEDENTES DE INVESTIGACION

La extracción y refinación de uno de los principales energéticos actuales, el petróleo, ocasiona serios problemas de contaminación. Las pruebas que tienen por objeto cuantificar la bioacumulación de estos contaminantes, frecuentemente utilizan a el ostión y otros bivalvos, ya que son organismos sedentarios con hábitos de alimentación por filtración, por lo que tienden a acumular una gran cantidad de sustancias. Además por ser el ostión una especie comestible, se han realizado diversos estudios para determinar su posible efecto genotóxico.

Los bioensayos bacterianos efectuados con moluscos colectados en aguas contaminadas de las costas españolas, demostraron la existencia de sustancias genotóxicas (Rodríguez-Ariza et al ., 1992). Frezza et al (1982) también detectaron efecto mutagénico en *Salmonella* al probar extractos de bivalvos colectados en zonas contaminadas, al igual que Sparks et al (1981) al estudiar especies provenientes de un estuario contaminado por petróleo.

Por otra parte, en un trabajo de investigación realizado en el Canal del Chijol, Ver. por Avila (1988) se encontró que en el ostión del mangle *Crassostrea virginica*, había ciertas cantidades de metales pesados e hidrocarburos. Se cree que estos provienen de las actividades relacionadas con la industria del petróleo, ya que cerca de este canal, se encuentra la refinería de Cd. Madero, Tamps.



Los metales cuantificados fueron vanadio, cromo, fierro, níquel, cobre, zinc y plomo a concentraciones de 10, 20, 876, 14, 280, 3352 y 11 ppm respectivamente. De estos, el vanadio, el fierro, el níquel y el zinc rebasaban los límites permisibles (Avila, 1988).

Entre los hidrocarburos había tanto alifáticos como aromáticos. Los primeros se encontraron dentro del rango de 11 a 20 carbonos (las concentraciones no se reportan), mientras que los aromáticos consistían de meta y para-xileno, con 250 ppm cada uno, metilcumeno, con 420 ppm y dos compuestos de benceno no identificados, con 340 y 390 ppm respectivamente.

Ya que algunos de estos compuestos son mutagénicos, se empezaron a realizar pruebas en diferentes bioensayos para investigar el posible efecto genotóxico de dichos ostiones. Pruebas preliminares, utilizando el sistema de genes letales recesivos en *Drosophila*, no mostraron efecto genotóxico alguno (Olvera et al., 1990). Sin embargo, al emplear un método más sensible, el SMART, se encontró un leve pero significativo aumento en la frecuencia de mutaciones somáticas (Olvera et al., 1992). Posteriormente, en experimentos realizados en *Salmonella*, mediante el ensayo con preincubación, se obtuvo también respuesta negativa, pero al emplear la prueba tradicional, se observó un leve efecto mutagénico, aun cuando no se pudo observar correlación entre la frecuencia de mutaciones y las concentraciones utilizadas. Como el efecto sólo se presentaba al agregar microsomas hepáticos, se pensó que el causante más probable podría ser algún tipo de hidrocarburo aromático del petróleo (Frias et al., 1990).

Por todo lo anteriormente comentado y por ser el ostión una especie comestible, se procedió a investigar si extractos obtenidos a partir del liofilizado de ostión, presentaba efecto genotóxico en dos sistemas bacterianos; la prueba de Ames en *Salmonella* y el cromosensayo en *E. coli*.

## OBJETIVOS

### 1. OBJETIVO GENERAL

Determinar si extractos obtenidos a partir de liofilizado de ostión colectado en el Canal del Chijol, presentan efecto genotóxico en dos sistemas bacterianos; la prueba de Ames en *Salmonella* y el cromosoma en *E. coli*.

### 2. OBJETIVOS PARTICULARES

2.1 Separar, mediante métodos de extracción, los contaminantes acumulados en el ostión.

2.2 Realizar análisis por cromatografía de gases para identificar HAP del petróleo con acción genotóxica.

2.3 Determinar la naturaleza del mutágeno (directo o indirecto) en caso de manifestarse.

2.4 Evaluar el posible efecto tóxico de los extractos sobre las bacterias.

2.5 Determinar si los extractos obtenidos presentan acción genotóxica en *Salmonella* y *E. coli*.

## MATERIAL Y METODOS

### MATERIAL BIOLÓGICO

Las cepas de *S. typhimurium* que se utilizaron en la prueba de Ames fueron TA98 y TA100. La primera detecta mutaciones por desplazamiento de mensaje genético y la segunda por sustitución de bases. Para el cromosoma se usó la cepa PQ37 de *E. coli*. En la Tabla 4 se enlistan los genes deficientes más importantes de estas cepas.

Tabla 4. Características de las cepas utilizadas en los bioensayos.

Cepa	Genotipo	Procedencia
TA98	<i>rfa, uvrB</i> <i>hisD3052</i> <i>muca</i>	B.N. Ames. USA.
TA100	<i>rfa, uvrB</i> <i>hisG46</i> <i>muca</i>	B.N. Ames. USA.
PQ37	<i>sulA::lacZ,</i> <i>uvrA, rfa</i> <i>phoC</i>	P. Quillardet. Francia

Todas las cepas son deficientes en el sistema de reparación por escisión, ejemplificados por *uvrB* para *Salmonella* y *uvrA* para *E. coli* por lo que las sensibiliza al

daño genético. Poseen mayor permeabilidad a moléculas grandes debido al carácter rfa. Las cepas de *Salmonella* tienen el gen *mucA* de SOS en el plásmido pKM101, lo cual aumenta la frecuencia de mutaciones tanto espontáneas como inducidas. En *E. coli* la fusión de los genes *sulA::lacZ* ocasiona que la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa dependa estrictamente de la expresión de *sulA* y, *phoC* determina la constitutividad de la fosfatasa alcalina (Maron y Ames, 1983).

#### REACTIVOS

De J.T. Baker fueron  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $K_2HPO_4$ ,  $NaH_2PO_4 \cdot 4H_2O$ ,  $KCl$ ,  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ,  $Na_2HPO_4$ , ácido cítrico monohidratado, dimetil sulfóxido (DMSO), acetona, hexano, dicloro metano y un estándar de 16 hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP).

De Sigma fueron: Nicotin adenin dinucleótido fosfato (NADP), glucosa-6-fosfato, D-biotina, L-histidina, 2-aminofluoreno (2-AF), azida de sodio (AS), 4-nitro-o-fenilendiamina (4-NPD), mitomicina C (MMC), benzo[a]pireno (B[a]P),  $NaH_2PO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ , sulfato de sodio dodecilo (SDS),  $\beta$ -mercaptoetanol, Tris (hidroximetil) aminometano, p-nitrofenilfosfato (PNPP) y o-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido (ONPG).

De Bioxon fue: Agar bacteriológico, glucosa, peptona de caseína y extracto de levadura.

De Mol Tox Co., Extracto hepático liofilizado de rata.

#### METODO DE AMES

Una colonia de cada una de las cepas con las que se trabajó (TA98 o TA100) se sembró en un tubo de ensaye con 5 ml de medio de Luria Bertani (LB) y 10  $\mu$ l de ampicilina

(10µg/ml). Los tubos se colocaron en un incubador giratorio a 37°C durante 16 hrs. y para asegurar una buena aereación se agitaron a 210 rpm.

Por otra parte, en 100 ml. de agar blando se diluyeron 10 ml. de una solución de histidina/biotina 0.5 mM. De este se agregaron alícuotas de 2 ml. a tubos de ensaye con tapa ajustable, que se colocaron en un bloque de temperatura a 45°C para luego agregarles en este orden, 0.1 ml. del cultivo bacteriano, 10 µl. del extracto orgánico o acuoso (o de los mutágenos de diagnóstico) y 0.5 ml. de la mezcla enzimática S9 (en experimentos con activación metabólica). El tubo se agitó y se vertió uniformemente sobre cajas de petri con medio mínimo. Una vez solidificado el agar, las cajas de petri se voltearon y se cubrieron para evitar los efectos de la luz sobre sustancias químicas fotosensibles. Las cajas se colocaron en la oscuridad en un incubador a 37°C por dos días. Después de este período las colonias revertantes se cuantificaron. Se incluyeron además controles negativos (con DMSO y sin el extracto) y positivos. Estos últimos contenían mutágenos de diagnóstico específicos para cada cepa. En las pruebas sin activación metabólica se utilizó, para la TA100 la azida de sodio y para la TA98, 4-NPD. Cuando la prueba se realizaba en presencia de la mezcla enzimática S9, se incluía el 2-AF para ambas cepas.

Los extractos disueltos en DMSO se probaron a concentraciones de 100, 50, 25, 12.5 y 6.25 µl/ml. de bacteria. En total se realizaron tres experimentos por cada extracto, con y sin activación metabólica, y en cada experimento hubo tres repeticiones por concentración.

De igual manera se trabajó con el liofilizado de ostión que sirvió como testigo negativo en la prueba. Este fue colectado en Laguna Verde, Veracruz; ya que en este lugar no hay reportes de contaminación por petróleo y sus derivados

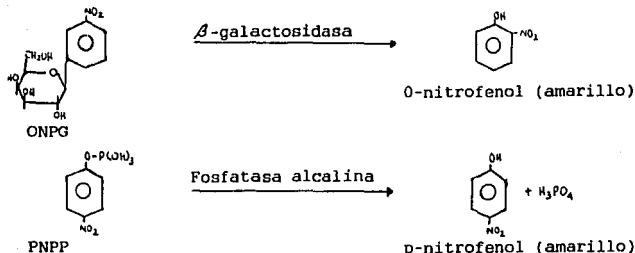
**CROMOENSAYO.**

Una colonia de la cepa PQ37 se colocó en un tubo de ensaye que contenía 5 ml de medio de LB y 10  $\mu$ l de ampicilina (10  $\mu$ l/ml), y se incubó con agitación rotatoria a 37°C durante toda la noche. Una muestra de cultivo se diluyó 50 veces en medio LB y nuevamente se incubó a las condiciones antes descritas hasta alcanzar una densidad de  $2 \times 10^8$  bacterias/ml equivalente a 0.5 unidades de absorbancia a 590 nm. En seguida se diluyó 10 veces, en medio LB para el ensayo sin activación metabólica o en la mezcla enzimática S9 para el ensayo con activación metabólica. De aquí se colocaron fracciones de 0.6 ml en una serie de tubos de ensaye que contenían 20  $\mu$ l del extracto a probar o 10  $\mu$ l de los mutágenos diagnóstico. La mezcla fue incubada, con agitación, durante dos horas. Una vez concluido este periodo, se formaron dos series de tubos, con 0.3 ml en cada tubo. Una serie de tubos se utilizó para el ensayo de la  $\beta$ -galactosidasa ( $\beta$ -gal) y el otro para la fosfatasa alcalina (FA), ambos ensayos se realizaron en forma paralela.

**ENSAYO DE  $\beta$ -GAL.** A la serie de tubos destinados para este ensaye se le adicionó 2.5 ml de buffer B y se incubaron durante 10 min. a 37°C. Posteriormente se agregaron 0.5 ml de una solución de ONPG a concentración de 4 mg/ml a cada tubo. El cambio de color se midió en unidades de adsorbancia en el rango de 0.1 a 0.4 a 420 nm de longitud de onda. La absorbancia de cada tubo se leyó contra un blanco colorimétrico que contenía todos los reactivos y componentes, excepto la bacteria.

**ENSAYO DE FA.** A esta serie de tubos se le agregó 2.5 ml de buffer P para después incubarse a 37°C por 10 min. Una solución de PNPP a 4 mg/ml fue agregada a cada tubo (0.5 ml).

El cambio de color se leyó de manera semejante al de la  $\beta$ -gal. En ambos casos se incuban los tubos 90 min. como máximo.



Se incluyeron los siguientes testigos positivos: para el ensayo sin la mezcla enzimática S9 se utilizó MMC y, para el ensayo con activación metabólica el B[a]P.

Dado que el extracto fue probado primeramente concentrado y no se indujo el sistema SOS, ya no fue necesario hacer diluciones.

Se realizaron tres experimentos con los extractos concentrados con y sin la mezcla enzimática S9, y en cada experimento se probó la muestra por triplicado.

Expresión de Resultados. Para determinar si un agente es genotóxico se calcula "R", que es la razón de las unidades de la  $\beta$ -gal. entre la FA (que refleja la inducción del gen *su1A*), de acuerdo con la sig. expresión:

$$R = \frac{A_{420} \beta\text{-gal} (t \text{ FA})}{A_{420} \text{ FA} (t \beta\text{-gal.})}$$

donde:

$A_{420} \beta$ -gal.,  $A_{420} \text{ FA}$ ; es la absorbancia a 420 nm de longitud de onda de la  $\beta$ -gal. y la FA respectivamente, y  $t \beta$ -gal.,  $t \text{ FA}$ ; es el tiempo de incubación de estas enzimas.

A partir de R se calcula el factor de inducción (FI), el cual se obtiene al dividir la R de una muestra tratada (RC) entre la R del testigo (RO).

$$FI = \frac{RC}{RO}$$

#### METODO DE EXTRACCION

Hay diferentes metodologías para la extracción de hidrocarburos a partir de mezclas complejas y en la mayoría de estas, se utiliza el hexano como solvente principal (Murray, 1979). En este estudio se empleó el método de microextracción desarrollado por Murray y Lockhart (1981).

Dos gramos de liofilizado de ostión preparado en el laboratorio de fluorescencia de rayos X, del ININ, por P. Avila, se sometieron a reflujo durante 3 hrs. a 37°C con 5 ml de dicloro metano como solvente primario. Dicho solvente se concentró por evaporación hasta alcanzar un volumen de 1 ml que posteriormente se resuspendió en una mezcla de 125 ml de agua y 2 ml de acetona. Una vez logrado lo anterior se adicionó 1 ml de hexano y se agitó durante 3 min. para después separar las fases orgánica y acuosa, por desplazamiento de volumen. Dichas fases se evaporaron a sequedad y el residuo se disolvió en DMSO, para las pruebas de genotoxicidad y en etanol al 95%, para el análisis por cromatografía de gases.

#### CROMATOGRAFIA DE GASES

Para el análisis de hidrocarburos, efectuado en el laboratorio de cromatografía de gases del Centro de Ciencias de la Atmósfera, UNAM. Se empleó un cromatógrafo Perkin-Elmer,



modelo 900 equipado con detector de ionización de llama y programador lineal de temperatura. La columna utilizada fue Alitech RSL-300 con una longitud de 30m y un diámetro interno de 250  $\mu\text{m}$ . Está fue empacada con fenil metil silica (DV-17) al 50%. Las temperaturas de inyección y de detección fueron de 230 y 325°C respectivamente. La temperatura se programó de 80 a 310°C incrementándose a razón de 6°C por minuto. El gas acarreador fue  $\text{H}_2$  con una velocidad lineal de 50 cm/sq.

Las muestras de ostión se analizaron después de la adición de un estándar interno, constituido por 16 HAP: naftaleno, acenofaleno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluorantreno, pireno, criseno, benzo[a]antraceno, benzo[b]fluorantreno, benzo[k]fluorantreno, benzo[a]pireno, indeno[1,2,3-cd]pireno, dibenzo[a,h]antraceno y benzo[g,h,i]perileno.

Para corroborar si el método de extracción era el adecuado, se adicionó una solución de 16 HAP a una de las muestras de ostión de Laguna Verde y se prepararon extractos de acuerdo con el método citado anteriormente. Las fases obtenidas se analizaron posteriormente por cromatografía de gases.

#### ESTADISTICA

Los datos generados en la prueba de Ames fueron analizados mediante el programa SALANAL (Salmonella Assay Analysis) versión 1.0, preparado por el Sistema de Laboratorios Integrados.

Para el cromoenayo, los datos se expresan como la media ( $\bar{x}$ ) mas menos su desviación estándar(s). Para el análisis de significatividad se utilizo un análisis de varianza, donde  $p < 0.05\%$ .

## RESULTADOS

### PRUEBA DE AMES

Al probar la fase acuosa obtenida del ostión del Chijol y sin la mezcla enzimática S9, no se observó efecto mutagénico alguno en las cepas utilizadas, ya que en ninguna de las concentraciones ensayadas se alcanzó el mínimo significativo, es decir un aumento al doble de colonias revertantes con respecto a las espontáneas. En la prueba estadística SALANAL tampoco se detectó significatividad. Por otra parte, tampoco se encontró diferencia en comparación con los valores del extracto de Laguna Verde (Tabla 5 ).

Tabla No. 5. Efecto de la fase acuosa sin S9 en *S. typhimurium*

Concentracion ( $\mu$ l/ml) *	No. de colonias revertantes			
	TA98		TA100	
	Chijol	L. Verde	Chijol	L. Verde
0.0	45 $\pm$ 6	51 $\pm$ 7	208 $\pm$ 22	243 $\pm$ 23
6.2	52 $\pm$ 5	47 $\pm$ 6	214 $\pm$ 27	251 $\pm$ 26
12.5	51 $\pm$ 6	45 $\pm$ 5	248 $\pm$ 30	250 $\pm$ 33
25.0	44 $\pm$ 7	38 $\pm$ 5	253 $\pm$ 24	212 $\pm$ 37
50.0	53 $\pm$ 7	44 $\pm$ 6	225 $\pm$ 28	257 $\pm$ 39
100.0	55 $\pm$ 8	44 $\pm$ 7	221 $\pm$ 30	235 $\pm$ 40
4-NPD	8928	7960	---	---
AS	----	----	8028	9675

\*  $\mu$ l. de extracto/ml. de bacteria.

Resultados similares se obtuvieron con esta misma fase pero ahora en presencia de la mezcla enzimática S9. Como puede observarse en la Tabla 6, el número de revertantes en ambas cepas no varía con respecto a los testigos. Por lo tanto, se puede decir que no hubo efecto mutagénico alguno. Tampoco existe diferencia con los valores de Laguna Verde.

Tabla 6. Efecto de la fase acuosa con S9 en *S. typhimurium*.

Concentración ( $\mu$ l/ml)	No. de colonias revertantes			
	TA98		TA100	
	Chijol	L. Verde	Chijol	L. Verde
0.0	43 $\pm$ 5	34 $\pm$ 3	207 $\pm$ 27	190 $\pm$ 25
6.2	47 $\pm$ 7	34 $\pm$ 4	222 $\pm$ 36	196 $\pm$ 32
12.5	50 $\pm$ 10	31 $\pm$ 3	225 $\pm$ 29	193 $\pm$ 8
25.0	47 $\pm$ 7	28 $\pm$ 5	188 $\pm$ 33	176 $\pm$ 20
50.0	56 $\pm$ 5	30 $\pm$ 3	194 $\pm$ 40	152 $\pm$ 17
100.0	54 $\pm$ 5	35 $\pm$ 2	196 $\pm$ 31	188 $\pm$ 21
2-AF	6642	6196	7728	6876

En la tabla 7 se presentan los resultados obtenidos al probar la fase orgánica sin la mezcla enzimática S9. Como se puede observar no existe variación significativa entre las colonias de revertantes, lo cual sugiere que en esta fase no se encontraba ningún mutágeno directo. Por otra parte tampoco se detectaron diferencias al comparar estos valores con los de Laguna Verde.

Tabla 7. Mutagénesis de la fase orgánica sin S9 en *S. typhimurium*

Concentracion ( $\mu$ l/ml)	No. de colonias revertantes			
	TA98		TA100	
	Chijol	L. Verde	Chijol	L. Verde
0.0	37 $\pm$ 6	38 $\pm$ 8	175 $\pm$ 17	186 $\pm$ 29
6.2	34 $\pm$ 5	36 $\pm$ 4	148 $\pm$ 11	183 $\pm$ 19
12.5	37 $\pm$ 4	35 $\pm$ 4	146 $\pm$ 23	179 $\pm$ 16
25.0	34 $\pm$ 4	40 $\pm$ 2	185 $\pm$ 14	185 $\pm$ 32
50.0	37 $\pm$ 2	39 $\pm$ 2	162 $\pm$ 13	179 $\pm$ 17
100.0	28 $\pm$ 4	43 $\pm$ 5	159 $\pm$ 20	186 $\pm$ 14
4-NPD	6791	7298	---	---
AS	----	----	9200	7237

Por último, tampoco se observó efecto mutagénico al probar la fase orgánica, incluyendo en el bioensayo, activación metabólica (Tabla 8). Al comparar los valores obtenidos con sus respectivos, de Laguna Verde, tampoco se evidenció diferencia alguna.

Tabla 8. Mutagénesis de la fase orgánica con S9 en *S. typhimurium*

Concentración ( $\mu$ l/ml)	No. de colonias revertantes			
	TA98		TA100	
	Chijol	L. Verde	Chijol	L. Verde
0.0	43 $\pm$ 7	42 $\pm$ 8	182 $\pm$ 30	202 $\pm$ 22
6.2	47 $\pm$ 6	42 $\pm$ 7	170 $\pm$ 22	194 $\pm$ 20
12.5	51 $\pm$ 5	44 $\pm$ 10	158 $\pm$ 28	184 $\pm$ 13
25.0	44 $\pm$ 9	43 $\pm$ 7	187 $\pm$ 26	180 $\pm$ 17
50.0	48 $\pm$ 2	46 $\pm$ 2	176 $\pm$ 15	169 $\pm$ 20
100.0	47 $\pm$ 7	36 $\pm$ 4	173 $\pm$ 16	188 $\pm$ 21
2-AF	10819	8372	7728	5278

## CROMOENSAYO

Los datos obtenidos al probar la fase acuosa y orgánica tanto del Chijol como de L. Verde, sin activación metabólica, concuerdan plenamente con lo obtenido por el método de Ames, esto es, no hubo daño aparente al ADN que indujera el sistema SOS en *E. coli* (Tabla 9).

Tabla 9. Factor de inducción (FI) SOS en *E. coli* tratada con extracto orgánico y acuoso, sin S9

FI	FASE	
	ACUOSA	ORGANICA
(T)	1.00	1.00
CHIJOL	1.18 ± 0.07	1.00 ± 0.07
L. VERDE	1.18 ± 0.08	1.09 ± 0.13
MMC	4.37 ± 0.35	4.37 ± 0.35

T= testigo.

p < 0.05%

Por otra parte, al probar estas mismas fases, pero ahora con la mezcla enzimática S9, los resultados fueron los mismos; ninguna dio resultado positivo en el bioensayo.

Al comparar los valores de FI del Chijol con los de Laguna Verde, tampoco se observaron diferencias (Tabla 10).

Tabla 10. Factor de inducción (FI) para ensayos con activación metabólica

FI	FASE	
	ACUOSA	ORGANICA
(T)	1.00	1.00
CHIJOL	1.02 $\pm$ 0.04	1.02 $\pm$ 0.08
L. VERDE	1.15 $\pm$ 0.08	1.17 $\pm$ 0.07
B[a]P	4.24 $\pm$ 0.32	4.24 $\pm$ 0.32

p < 0.05%

Para determinar si los extractos habían tenido efecto tóxico sobre las bacterias, se calcularon en forma independiente las unidades de actividad enzimática, con (S9<sup>+</sup>) y sin (S9<sup>-</sup>) activación metabólica, para  $\beta$ -gal y FA. Los datos se presentan en la Tabla 11.

Tabla 11. Unidades de actividad enzimática.

FASE	$\beta$ -galactosidasa		Fosfatasa alcalina	
	S9 <sup>-</sup>	S9 <sup>+</sup>	S9 <sup>-</sup>	S9 <sup>+</sup>
(t)	3.6	5.3	16.6	13.6
ORG.CHI.	3.6	4.6	14.0	11.6
ORG.L.V.	4.0	4.6	14.6	10.0
ACU.CHI.	4.0	4.0	14.3	10.6
ACU.L.V.	4.3	6.6	15.6	14.6
B[a]P	---	13.3	----	11.3
MMC	13.3	----	14.0	----

ORG.CHI.=Fase orgánica del chijol. ORG.L.V.=Fase orgánica de Laguna Verde. ACU.CHI.=Acuosa del Chijol. ACU.L.V.=Acuosa Laguna Verde.

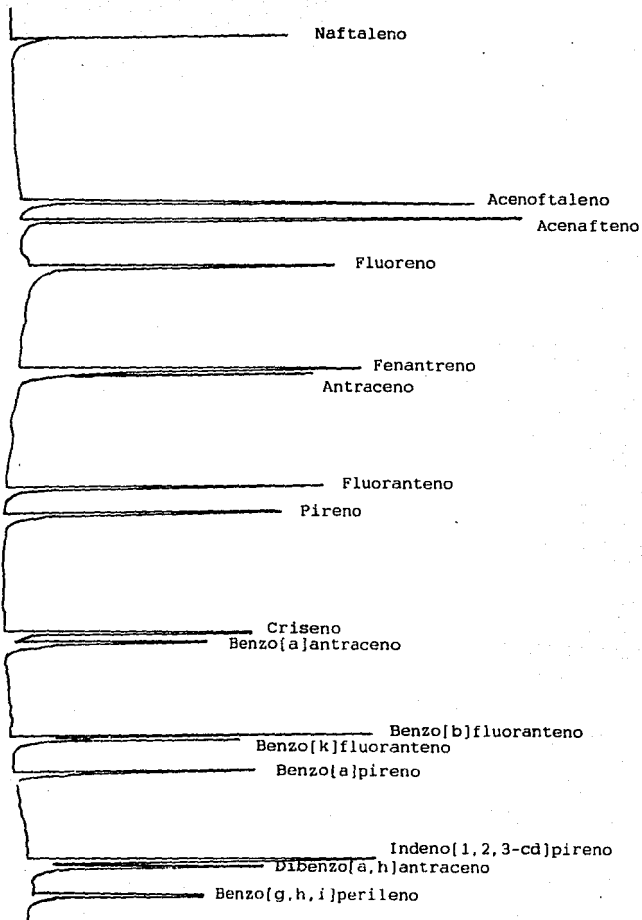
Como se puede observar en la tabla, ninguno de los extractos tuvo efecto tóxico sobre *E. coli*, ya que los valores de las actividades de la fosfatasa alcalina, que es el indicador de síntesis general de proteínas, no difieren al compararlos con los de la muestra testigo. En cuanto a la genotoxicidad solamente la MMC y el B[a]p, ambos mutágenos conocidos, indujeron la síntesis de  $\beta$ -gal.

#### CROMATOGRAFIA DE GASES

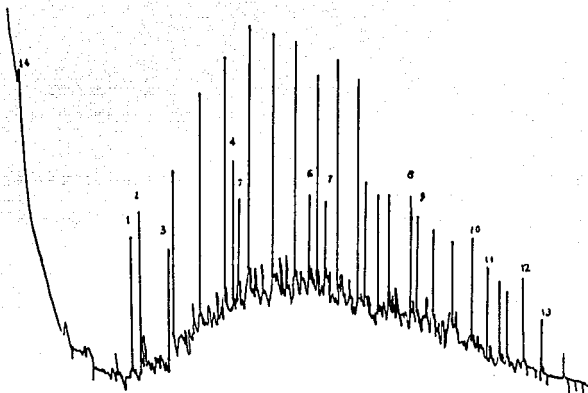
De los 16 HAP adicionados a la muestra de ostión de Laguna Verde (cromatograma No. 1), 14 fueron identificados plenamente en la fase orgánica (cromatograma No. 2). Los dos restantes no pudieron confirmarse, ya que sus tiempos de elución coincidieron con los de un gran número de compuestos del mismo ostión. Como era de esperarse, no se encontró ningún HAP en la fase acuosa (cromatograma No. 3).

Por otra parte, en las fases orgánica y acuosa del ostión del Chijol, no fue posible detectar niveles cuantificables de los 16 HAP que se trataron de identificar (cromatogramas 4 y 5 respectivamente). Lo mismo aconteció para Laguna Verde, ya que tampoco se detectó este tipo de hidrocarburos en los extractos (cromatogramas 6 y 7). Los asteriscos que aparecen en los cromatogramas, nos indican el lugar en el que debieron de eluir los HAP, en caso de encontrarse en el ostión. Tampoco se detectó contaminación por estos hidrocarburos en los solventes utilizados en el método de extracción.

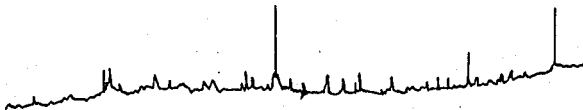




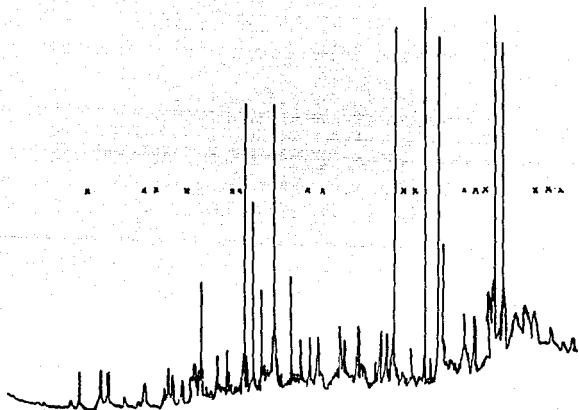
Cromatograma 1. Muestra estandar de 16 HAP.



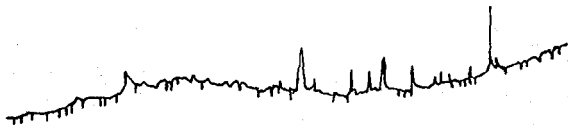
Cromatograma 2. Muestra adicionada de 16 HAP en ostiones de L. Verde, fase orgánica. 1Acenofitaleno 2Acenafteno 3Fluoreno 4Fenan-treno 5Antraceno 6Fluoranteno 7Pireno 8Criseno 9Benzo[a]antraceno 10Benzo[b]fluoranteno 11Benzo[a]pireno 12Indeno[1,2,3 cd]pireno 13Benzo[g,h,i]perileno 14Naftaleno



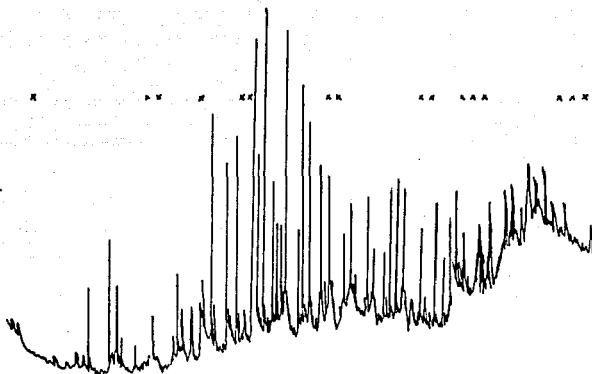
Cromatograma 3. Muestra adicionada de 16 HAP en ostiones de L. Verde. Fase acuosa.



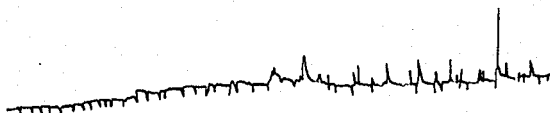
Cromatograma 4. Fase orgánica, ostión del Chijol



Cromatograma 5. Fase acuosa, ostión del Chijol.



Cromatograma 6. Fase orgánica, ostión de Laguna Verde.



Cromatograma 7. Fase acuosa del ostión de Laguna Verde.

## ANÁLISIS DE RESULTADOS

La cromatografía de gases a partir de la muestra adicionada con HAP de Laguna Verde, indica que el método de extracción utilizado fue suficientemente eficaz, ya que no se perdió ninguno de los hidrocarburos que componían la muestra patrón. Dos de estos no pudieron identificarse plenamente ya que sus tiempos de elución coincidían con los de algunos compuestos del mismo ostión.

Las concentraciones de los extractos utilizados en todos los experimentos no tuvieron efecto letal ya que en *E. coli*, la actividad de la enzima fosfatasa alcalina, indicadora de la síntesis general de proteínas, no se vio alterada o interrumpida pues los valores obtenidos en las muestras tratadas no variaron de forma significativa de los obtenidos en la muestra testigo. Tampoco en *Salmonella* se encontró tal efecto, ya que al examinar las cajas de petri en el microscopio de disección, se observó un gran número de microcolonias bacterianas, lo cual indica que dichos extractos no afectaron el crecimiento celular como para impedir que las bacterias siguieran dividiéndose. El análisis realizado por el programa SALANAL tampoco detectó efecto tóxico de los extractos sobre *Salmonella*. La valoración de la letalidad es importante, ya que si por algún motivo se presenta, aún de manera moderada, puede alterar de manera significativa los resultados de genotoxicidad, dando por resultado conclusiones erróneas.

De los metales presentes en este bivalvo, se sabe que el hierro y el cromo son tóxicos para algunas bacterias (Kada et al., 1980), sin embargo, las concentraciones cuantificadas por

Avila, son por lo menos diez veces inferiores a las reportadas como genotóxicas por otros autores.

En las pruebas de genotoxicidad de la fase acuosa, los metales que han sido reportados como tales, V, Fe y Cr, no presentaron dicho efecto. Lo anterior puede deberse a que el estado de oxidación en la que se encontraban estos metales, no tenía acción genotóxica, ya que esta generalmente aumenta con la valencia (Kada et al., 1980). Además de que los datos con que se cuentan, se refieren únicamente a la presencia del elemento sin indicar el tipo de compuesto del que forma parte. Por otra parte, existen datos conflictivos acerca de la concentración necesaria para provocar mutaciones. El protocolo utilizado también influye, ya que metales que tradicionalmente dan resultados negativos, en trabajos recientes han sido reportados como genotóxicos (Kada et al., Pagano y Zeiger, 1990).

El análisis por cromatografía de gases de esta fase nos confirma la inexistencia de hidrocarburos aromáticos, ya que estos son solubles en solventes orgánicos y no en polares como el agua.

Por otra parte, los resultados de la fase orgánica indican que en esta fracción no parecía haber ninguna sustancia genotóxica, o que su concentración era tan baja que no modificaba la información del genoma bacteriano. De los hidrocarburos reportados por Avila, se sabe que los alifáticos no tienen efecto mutagénico. En cuanto a los aromáticos, existen varios trabajos donde el benceno da resultados positivos en diferentes bioensayos (Dean, 1985; Bos et al., 1981), sin embargo en las pruebas bacterianas los resultados son contradictorios (McCarroll et al., 1980). Avila no detectó benceno como tal, sino dos compuestos de benceno cuya estructura no se pudo conocer. Como ya se menciona anteriormente, la actividad mutagénica de algunos hidrocarburos aromáticos depende del tipo y del sitio en donde

se encuentra el radical alquilo. Es posible entonces que los encontrados por Avila, no tengan en sí ningún efecto mutagénico, aunque los resultados preliminares parecían indicar lo contrario.

La inconsistencia de los datos en procariontes probablemente se debe la sustancia química que induce la actividad hepática en los roedores, el Aroclor 1254, que en muchas ocasiones no es lo suficientemente capaz de generar los metabolitos responsables del daño al ADN, catecol, fenol e hidroquinona (Dean, 1985).

Sin embargo, en bioensayos en donde no es necesario adicionar activación metabólica (como en *Drosophila*), también han obtenido resultados contradictorios al probar el ostión del Chijol. Solamente cuando se utilizó el método de mutación somática se obtuvo una debil respuesta mutagénica, esta podría deberse a algun compuesto del benceno, ya que este hidrocarburo ha sido reportado como genotóxico para *Drosophila* por diferentes autores (Dean, 1985).

Los análisis por cromatografía de gases del extracto orgánico indican ausencia de HAP a niveles cuantificables, ya que no se pudo identificar ninguno de los que constituan la muestra patrón. Aunque no se analizó todo el espectro posible de HAP, sí se trabajó con una muestra representativa constituida por 16 hidrocarburos, muchos de los cuales son conocidas sustancias genotóxicas. La ausencia de HAP en los ostiones probablemente se deba a la combinación de varios factores:

a) la proporción de hidrocarburos aromáticos en el petróleo y en los productos de su refinación es generalmente baja, aproximadamente de 10 a 15%.

b) el petróleo en el medio acuatico se acumula, en base a sus características fisicoquímicas, principalmente en el

sedimento, posteriormente en el agua y por último en los organismos.

c) pudieron perderse en el medio por fenómenos fotoquímicos, por descomposición bacteriana o por haber sido degradados por el mismo ostión.



## CONCLUSIONES Y COMENTARIOS

En base a los resultados obtenidos y bajo las condiciones particulares de este trabajo, se concluye lo sig.

1. El método de extracción utilizado fue exitoso ya que se separaron tanto los metales como los hidrocarburos.

2. El análisis por cromatografía de gases nos indica la inexistencia, a niveles cuantificables, de los HAP que se trataron de identificar en los extractos de ostión.

3. Los extractos no tuvieron efecto tóxico sobre las bacterias.

4. Ninguna de las muestras de ostión analizadas tuvo efecto genotóxico en las pruebas realizadas en *Salmonella* y *E. coli*.

Para obtener resultados más completos, es necesario realizar una investigación más profunda. Ya que, por ejemplo, el ostión con el cual se trabajó, es el producto de un sólo muestreo. Por lo tanto, es recomendable tomar muestras de ostión durante todo el año, ya que, como es bien sabido, la concentración de contaminantes depende de varios factores, entre los que podemos citar: la precipitación pluvial, la actividad microbiana, la intensidad de la luz, las tormentas tropicales etc.. Además de conocer de manera certera si los hidrocarburos son metabolizados, almacenados o desechados por el ostión.

## A N E X O

### M E T O D O D E A M E S

#### SALES DE VOGEL-BONNER (50X)

INGREDIENTES	PARA 100 ML
AGUA DESTILADA CALIENTE (45°C)	67 ml.
SULFATO DE MAGNESIO ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )	1 g
ACIDO CITRICO MONOHIDRATADO	10 g
FOSFATO DE POTASIO DIBASICO	
ANHIDRO ( $K_2HPO_4$ )	50 g
FOSFATO DE SODIO Y AMONIO ( $Na_2H_2P_2O_7 \cdot 4H_2O$ )	17.5 g

COLOQUE EL AGUA EN UN VASO DE VIDRIO SOBRE UN AGITADOR MAGNETICO Y VIERTA LAS SALES EN EL ORDEN INDICADO, A MEDIDA QUE SE VAYA DISOLVIENDO LA ANTERIOR. AJUSTAR EL VOLUMEN Y ESTERILIZAR A 121°C DURANTE 20 MIN.

SOLUCION DE SALES (KCl 1.65M,  $MgCl_2$  0.4M).

INGREDIENTES	PARA 500 ML.
CLORURO DE POTASIO (KCl)	61.5 g.
CLORURO DE MAGNESIO ( $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ )	40.7 g.
AGUA DESTILADA	AJUSTAR 500 ml

DISUELVA LOS INGREDIENTES EN EL AGUA. ESTERILICE DURANTE 20 MIN. A 121°C. ALMACENE EN FRASCOS DE VIDRIO CON TAPON DE ROSCAEN EL REFRIGERADOR.

## BUFFER DE FOSFATO DE SODIO 0.2M, pH 7.4.

INGREDIENTES	PARA 500 ML.
FOSFATO DE SODIO MONOBASICO 0.2M ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 13.8 g/500 ml.)	60 ml.
FOSFATO DE SODIO DIBASICO 0.2M ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 14.2 g/ 500 ml.)	440 ml.

AJUSTAR EL pH CON LAS MISMAS SOLUCIONES. ESTERILIZAR A  $121^\circ\text{C}$  DURANTE 20 MIN.

## SOLUCION DE NADP 0.1M.

INGREDIENTES	PARA 5 ML.
NADP	383 mg.
AGUA DESTILADA ESTERIL	5 ml.

COLOQUE LA CANTIDAD DE NADP EN TUBOS DE ENSAYE CON TAPA DE ROSCA Y CUBRALO CON PAPEL METALICO. ALMACENELOS EN UN DESECADOR A  $-20^\circ\text{C}$ . AGREGUE EL AGUA SOLO CUANDO SE VAYA A UTILIZAR Y MANTENGALO EN UN BAÑO DE HIELO. NO ES NECESARIO ESTERILIZAR, PERO SE PUEDE FILTRAR (TAMAÑO DEL PORO 0.22  $\mu\text{m}$ ). UNA VEZ UTILIZADO SE GUARDA EN EL CONGELADOR. PERMANECE ESTABLE POR 6 MESES.

## GLUCOSA 6-FOSFATO 1M

INGREDIENTES	PARA 10 ML.
GLUCOSA 6-FOSFATO	2.82 g
AGUA DESTILADA ESTERIL	10 ml

COLOQUE LAS CANTIDADES INDICADAS DE GLUCOSA 6-FOSFATO EN TUBOS DE ENSAYE CUBIERTOS CON PAPEL ALUMINIO. ALMACENELOS EN DESECADORES Y SOLO CUANDO SE VAYAN A UTILIZAR AGREGUE EL AGUA. LA SOLUCION PUEDE SER ESTERILIZADA POR MEDIO DE FILTROS DE 0.22  $\mu$ m DE DIAMETRO.

## MEZCLA ENZIMATICA S9 (4%)

INGREDIENTES	PARA 50 ML
FRACCION HEPATICA DE RATA	2.0 ml
MgCl <sub>2</sub> 0.4M, KCl 1.65M	1.0 ml
GLUCOSA 6-FOSFATO 1M	0.25 ml
NADP 0.1M	2.0 ml
BUFFER DE FOSFATOS 0.2M pH 7.4	25.0 ml
AGUA DESTILADA ESTERIL	19.75 ml

LOS INGREDIENTES SE AGREGAN EN EL ORDEN INVERSO. LA MEZCLA SE PREPARA INMEDIATAMENTE ANTES DE UTILIZARSE Y SE MANTIENE EN UN BAÑO DE HIELO. NUNCA DEBE RECONGELARSE LA FRACCION SOBRANTE.

## MEDIO MINIMO

INGREDIENTES	PARA 1 LT.
AGAR	15 g
AGUA DESTILADA	930 ml
GLUCOSA AL 40%	50 ml
SALES DE VOGEL-BONNER (50X)	20 ml

AGREGUE EL AGAR AL AGUA Y ESTERILICE A 121°C DURANTE 20 MIN. CUANDO LA SOLUCION SE HAYA ENFRIADO LIGERAMENTE, ADICIONE LAS SALES Y LA GLUCOSA PREVIAMENTE ESTERILIZADAS.

## SOLUCION DE HISTIDINA-BIOTINA 0.5mM

INGREDIENTES	PARA 250 ML
D-BIOTINA	30.9 mg
L-HISTIDINA.HCl	24.0 mg
AGUA DESTILADA	250 ml

DISUELVA LA BIOTINA EN AGUA CALIENTE. ESTERILICE POR FILTRACION (TAMAÑO DE PORO 0.22  $\mu$ m) O A 121°C DURANTE 20 MIN. ALMACENE EN RECIPIENTES DE VIDRIO A 4°C

## AGAR BLANDO

INGREDIENTES	PARA 500 ML
AGAR	3 g
CLORURO DE SODIO (NaCl)	2.5 g
AGUA DESTILADA	500 ml

EL AGAR SE PUEDE DISOLVER EN AGUA CALIENTE O CALENTANDOLO BREVEMENTE EN UNA PARRILLA CON AGITADOR MAGNETICO. UNA VEZ DISUELTO, PREPARE ALICUOTAS DE 100 ML Y ESTERILICE A 121°C DURANTE 20 MIN.

## C R O M O E N S A Y O

## BUFFER B pH 7

INGREDIENTES	PARA 1 LT
FOSFATO DE SODIO DIBASICO ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	16.1 g
FOSFATO DE SODIO MONOBASICO ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )	5.50 g
CLORURO DE POTASIO (KCl)	0.75 g
SULFATO DE MAGNESIO ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	0.25 g
DODECIL SULFATO DE SODIO (SDS)	1.00 g
$\beta$ -MERCAPTOETANOL	2.70 ml
AGUA DESTILADA	1 lt.

ADICIONE LAS SALES A MEDIDA QUE SE VAYA DISOLVIENDO LA INMEDIATA ANTERIOR. AJUSTE A pH 7.

## BUFFER P pH 8.8

INGREDIENTES	PARA 1 LT
TRIS(HIDROXIMETIL)AMINOMETANO ( $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$ ) 1M	121 g
DODECIL SULFATO DE SODIO (SDS)	1.0 g
AGUA DESTILADA	1 lt

AJUSTE LA SOLUCION A pH 8.8 CON HCl 2.5M

## P-NITROFENIL FOSFATO DE SODIO DIBASICO (PNPP) 4mg/ml

INGREDIENTES	PARA 100 ML
PNPP	400 mg
BUFFER P	100 ml

SE PUEDE PREPARAR AL MOMENTO DE UTILIZARSE O ANTES. UNA VEZ UTILIZADOS SE REFRIGERA A - 10 C.

O-NITROFENIL- $\beta$ -D-GALACTOPIRANOSIDO (ONPG) 4mg/ml

INGREDIENTES	PARA 100 ML
ONPG	400 mg
BUFFER DE FOSFATOS pH 7	100 ml

SE PROCEDE IGUAL QUE CON EL PNPP.

## BUFFER DE FOSFATOS pH 7

INGREDIENTES	PARA 100 ML
FOSFATO DE SODIO DIBASICO 0.1M ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	61 ml
FOSFATO DE SODIO MONOBASICO 0.1M ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )	39 ml

AJUSTAR A pH 7 CON LAS MISMAS SOLUCIONES.

## MEZCLA ENZIMATICA S9

INGREDIENTES	PARA 10 ML
FRACCION HEPATICA DE RATA	1.00 ml
KCl 1.65M, MgCl <sub>2</sub> 0.4M	0.20 ml
GLUCOSA 6-FOSFATO 1M	0.05 ml
NADP 0.1M	0.15 ml
BUFFER TRIS 0.4M pH 7.4	2.50 ml
MEDIO DE LURIA	6.10 ml

SE PREPARA AL MOMENTO DE UTILIZARSE. SE MANTIENE EN UN BAÑO DE HIELO Y EL SOBRANTE SE DESCARTA.

## BUFFER TRIS 0.4M pH 7.4

INGREDIENTES	PARA 100 ML
TRIS (HIDROXIMETIL) AMINOMETANO	4.84 g
AGUA DESTILADA ESTERIL	100 ml

## MEDIO DE LURIA-BERTANI

INGREDIENTES	PARA 1 LT.
CLORURO DE SODIO (NaCl)	10 g
PEPTONA DE CASEINA	20 g
EXTRACTO DE LEVADURA	5 g
AGUA BIDEUTILADA	1 lt.

AGREGUE LOS REACTIVOS AL AGUA CALIENTE, UNA VEZ DISUELTOS PREPARE ALICUOTAS DE 100 ML. Y ESTERILICE DURANTE 20 MIN. A 121°C.



## REFERENCIAS

Ames, B.N., 1971. The detection of chemical mutagens with enteric bacteria, in: A. Hollaender (Ed.). Chemical Mutagens, Principles and Methods for their Detection. Plenum, New York, 1:267-282.

Avila, P.P., 1988. Evaluación de los niveles de bioacumulación por metales pesados en el ostión *Crassostrea virginica*, Gmelin, como indicador de contaminación por hidrocarburos en el Canal del Chijol, Ver. Tesis profesional. U.A.G. México.

Bagg, A., G.J. Kenyon y G.C. Walker, 1981. Inductibility of a gene product required for UV and a chemical mutagenesis in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)., 78:5749-5753.

Baker, J.M., 1980. Impact of oil pollution on living resources. International Union for Conservation of Nature and Natural Resources. Commission of Ecology Papers, number 4.

Bartsch, H., C. Malaveille, A.M. Camus y O. Martel-Planche, 1980. Validation and comparative studies on 180 chemicals with *Salmonella typhimurium* strains and V79 Chinese hamster cells in the presence of various metabolising systems. Mutation Res., 76:1-50.

Berman, E., 1980. Toxic metals and their analysis. Ed. L.C. Thomas. London Heyden, pp. 293.

Berridge, S.A., R.A. Dean, R.G. Follows y A. Fish, 1968. The properties of persistent oil at sea. In: Scientific Aspects of Pollution of the Sea by oil. Institute of Petroleum, London, 2-11.

Blakey, D.H. y G.R. Douglas, 1984. Transient DNA lesions induced by benzo[a]pyrene in Chinese hamster ovary cells. Mutation Res., 140:141-145.

Bos, R.P., R.M.E. Brouns, R. van Doorn, J.L.G. Theuvs y

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Referencias 69

P.Th. Henderson, 1981. Non-mutagenicity of toluene, o-,m- and p-xylene, o-methylbenzylalcohol and o-methylbenzylsulphate in the Ames assay. Mutation Res., 88:273-297.

Bos, R.P., J.L.T. Theuws, F.J. Jongeneelen y P.H. Henderson, 1988. Mutagenicity of bi-, tri- and tetra-cyclic aromatic hydrocarbon in the "taped-plate assay" and in the conventional Salmonella mutagenicity assay. Mutation Res., 204:203-206.

Botello, A.V., 1979a. Presencia e importancia de hidrocarburos fósiles en el medio ambiente marino: nota científica. An Centro Cienc. del Mar y Limnol. UNAM. México. 6:1-6.

Botello, A.V., 1979b. Niveles actuales de hidrocarburos fósiles en ecosistemas estuarinos del Golfo de México. An. Centro Cienc. del Mar y Limnol. UNAM. México. 6:7-14.

Botello, A.V., 1985. Vigilancia de la contaminación por petróleo en la bahía de Campeche y la zona costera del Mar Caribe. Informe Técnico. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología. UNAM-CONACYT.

Botello, A.V., y E.F. Mandelli, 1978. Distribution of n-paraffins in sea grasses, benthic algae, oysters and recent sediments from Términos Lagoon, Campeche, México. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 19:162-170

Botello, A.V. y F. Paez-Osuna, 1984. Evaluación geoquímica del río Coatzacoalcos y áreas adyacentes, 1982-1983. Informe final presentado en el Centro de Ecodesarrollo, Instituto de Ciencias del Mar y Limnología. UNAM, México.

Botello, A.V., M. Mendelewics y S. Villanueva, 1986. Impacto ambiental de los hidrocarburos fósiles en dos sistemas costeros del Caribe Occidental (México-Costa Rica). Primer informe anual. Proyecto OEA-CONACYT. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología. UNAM, México. pp. 73.

Botello, A.V., G. Ponce, A. Toledo, G. Díaz y S. Villanueva, 1992. Ecología, recursos costeros y contaminación en el Golfo de México. Ciencia y Desarrollo, CONACYT., 17:28-48.

Boylan, D.B. y B.W. Tripp, 1971. Determination of

hydrocarbons in sea water extracts of crude oil and crude oil fractions. *Nature*, 230:44-47.

Bridges, B.A. y A. Lehman, 1982. Inducible responses to DNA-damage. *Nature*, 298:118-119.

Brookes, P. y P.D. Lawley, 1964. Evidence for the binding of polynuclear aromatic hydrocarbons to the nucleic acids of mouse skin: Relation between carcinogenic power of hydrocarbons and their binding to deoxyribonucleic acid. *Nature*, 202:781-784.

Cavaliere, E., P. Mailander y A. Pelfrene, 1977. Carcinogenic activity of anthanthrene on mouse skin. *Z. Krebsforsch.*, 89:113-118.

Cosma, G.N., R. Jamasbi y A.C. Marchok, 1988. Growth inhibition and DNA damage induced by benzo[a]pirene and formaldehyde in primary cultures of rat tracheal epithelial cells. *Mutation Res.*, 201:161-168.

De Flora, S., 1981. Study of 106 organic and inorganic compounds in the Salmonella/microsome test. *Carcinogenesis*, 2:283-298.

De Flora, S., 1982. Biotransformation and interaction of chemicals as modulators of mutagenicity and carcinogenicity, in: T. Sugimura, S. Kondo y H. Takebe (Eds.). Environmental Mutagens and Carcinogens. Univ. of Tokyo Press. Tokyo/Alan R. Liss, New York, pp. 527-541.

De Flora, S., P. Zanicchi, A. Camoirano, C. Bennicelli y G.S. Badolati, 1984. Genotoxic activity and potency of 135 compounds in the Ames reversion test and in a bacterial DNA-repair test. *Mutation Res.*, 133:161-198.

Dean, B.J., 1978. Genetic toxicology of benzene, toluene, xilenes and phenols. *Mutation Res.*, 47:75-97.

Dean, B.J., 1985. Recent findings on the genetic toxicology of benzene, toluene, xilene and phenols. *Mutation Res.*, 154:153-181.

Deutsche, F., 1975. Pollution in coastal waters. Research Report, R.F.A. pp. 12-33.

Devoret, R., 1981. Prophage lambda induction an inducible error-prone repair in *Escherichia coli*. In: W.E. Cohn (Ed.). *Progress in Nucleic Acids Research and Molecular Biology*.

Academic Press New York, 46:251-263.

Diamond, L., K. Cherian, R.G. Harvey y J. DiGiovanni, 1984. Mutagenic activity of methyl- and fluoro-substituted derivatives of polycyclic aromatic hydrocarbons in a human hepatoma (HepG2) cell-mediated assay. *Mutation Res.*, 136:65-72.

Dipple, A. y C.A.H. Bigger, 1991. Mechanism of action of food-associated polycyclic aromatic hydrocarbon carcinogens. *Mutation Res.*, 259:263-276.

Erhardt, M. y M. Blumer, 1972. The source identification of marine hydrocarbons by gas chromatography. *Environmental Pollution*, 3:179-194.

Farrington, J.W., G.S. Giam, G.R. Harvey, L.P. Parker y J.M. Teal, 1972. Analytical techniques for selected organics compounds In: Golberg E.D. (Ed.) *Marine Pollution Monitoring: Strategies for a National Program, a Workshop*. Santa Catalina Marine Biological Laboratory, pp. 152-176.

Frezza, D., B. Prgorato y S. Presciuttini, 1982. A marine host-mediated assay for the detection of mutagenic compounds in polluted sea waters. *Mutation Res.*, 104:215-223.

Frías, P.H., M. Breña y O. Olvera, 1990. Posible efecto mutagénico de ostión colectado en el Canal del Chijol, Ver. I Congreso Nacional de Genética, SMG. 9-11 Oct., U.A.T. Tlaxcala, Tlax.(Resumen).

Gardner, G.R., 1972. Chemically induced lesions in estuarine or marine teleosts. In *Proceedings, Symposium on Fish Pathology*. Armed Forces Institute of Pathology, Washington, D.C.

Gerner, S.P., y G. Friedrich, 1978. The mutagenic effect of benzene, toluene y xilene studies by the SCE technique. *Mutation Res.*, 58:313-316.

Gocke, E., M.T. King, K. Eckhart y D. Wild, 1981. Mutagenicity of cosmetic ingredients licensed by the European Communities. *Mutation Res.*, 90:91-109.

Gómez-Arroyo, S., y Villalobos-Pietrini, 1981. Induction of chromosome abnormalities in *Vicia fava* by a thinner containing toluene, benzene and n-hexene. *Mutation Res.*, 85(4):224.

Haworth, S., T. Lawler, K. Mortelsmans, W. Speck y E. Zeiger, 1983. Salmonella mutagenicity test results for 250 chemicals. Environ. Mutagen., 5:3-142.

Hite, M., M. Pecharo, I. Smith y S. Thornton, 1980. Effect of benzene in the micronucleus test. Mutation Res., 77:149-155.

Hollstein, M., J. McCann, F. Angelosanto y W. Nichols, 1979. Short-term test for carcinogens and mutagens. Mutation Res., 65:133-226.

Howard-Flanders, P., 1981. Inducible repair of DNA. Sci. Am., 245:56-64.

Howard-Flanders, P., 1968. DNA replication and recombination after UV irradiation. Cold. Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 33:195-205.

Isono, K. y J. Yourno, 1974. Chemical carcinogens as frameshift mutagens: Salmonella DNA sequence sensitive to mutagenesis by polycyclic carcinogens. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 71:1612-1617.

Kada, T.K., Hirano y Y. Shirasu, 1980. Screening of environmental chemical mutagens by the Rec-Assay system with *Bacillus subtilis*. Chemical Mutagens, Vol. 6 pp. 149-173.

Kinoshita, T., R. Santell, P. Pulkrabek y A.M. Jeffry, 1981. Benzene oxide: Genetic toxicity. Mutation Res., 91:99-102.

Klingermann, A.D., M.M. Moore, G.E. Erexson, K.H. Brock, C.L. Doerr, J.W. Allen y S. Nesnow, 1986. Genotoxicity of benz[*l*]aceanthylene. Cancer Lett., 31:123-131.

Kotyk, A., 1973. Mechanisms of nonelectrolyte transport. Biochem. Biophys. Acta, 300:183-210.

Kumar, S., L.P. Kole y H.C. Sikka, 1990. Mutagenicity of dibenz[*a,c*]anthracene and its derivatives in *Salmonella typhimurium* TA100. Mutation Res., 242:337-343.

Lee, R.F., R. Saverheber y A.A. Benson, 1972. Petroleum hydrocarbons: uptake and discharge by the marine mussel *Mytilus edulis*. Science, 177:344-346.

Mackay, G.D., A.Y. McLean, O.J. Betancourt y B.D. Johnson, 1973. The formation of water-in-oil emulsions subsequent to a oil spill. J. Inst. Petrol., 59(568):164-172.

Mandelli, E.F., 1979. Contaminación por metales pesados. Rev. Com. Perm. Pacífico Sur, núm. 10, pp. 209-228.

Maron, D.M. y B.N. Ames, 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. Mutation Res., 113:173-215.

McCarroll, N.E., C.E. Piper y B.H. Keech, 1980. Bacterial microsuspension assay with benzene and other organic solvents. Environ. Mutagen., 2:281-282.

McCarroll, N.E., B.H. Keech y C.E. Piper, 1981a. A microsuspension adaptation of the *Bacillus subtilis* rec assay. Environ. Mutagen., 3:607-616.

McCarroll, N.E., C.E. Piper y B.H. Keech, 1981b. An *E. coli* microsuspension assay for the detection of DNA damage induced by direct-acting agents and promutagens. Environ. Mutagen., 3:429-444.

Meyer, P.A. y J.G. Quinn, 1973. Association of hydrocarbons in subsurface brines. Chemical Geology, 4:225-233.

Mironov, O.G., 1970. The effect of oil pollution on the flora and fauna of the Black Sea. FAO tech. Conf. Mar. Poll. Rome. Paper E-92.

Mohapatra, N., P. MacNair, B.J. Bryant, S. Ellis, K. Rudo, R. Sangaiah, A. Gold y S. Nesnow, 1987. Morphological transforming activity and metabolism and cyclopenta-fused isomers of benz[*a*]anthracene in mammalian cells. Mutation Res., 188:323-334.

Monroe, W.S., 1988. Genética. Ediciones Omega S.A. Tercera edición. Barcelona. pp. 869.

Morimoto, K., y S. Wolff, 1980. Increase of sister chromatid exchanges and perturbations of cell division kinetics in human lymphocytes by benzene metabolites. Cancer Res., 40:1189-1193.

Murray, D.A.J., 1979. Rapid microextraction procedure for analyses of trace amounts of organic compounds in water by gas chromatography and comparisons with macro extraction methods. J. Chromatogra., 177:135-140.

Murray, D.A.J. y W.L. Lockhart, 1981. Microextraction and gas chromatographic analysis of selected petroleum hydrocarbons in water and fish tissue. J. Chromatogra.,

212:305-311.

National Academy of Sciences, 1975. Petroleum in the marine environment. Washington, D.C. National Academy of Sciences, pp.107.

Navarrete, L.M., 1986. Manual de prácticas sobre análisis del petróleo y sus derivados. I.M.P. México. pp. 6-8.

Nesnow, S., A. Gold, R. Sangaiah, L. Triplett y T.J. Slaga, 1984. Mouse skin tumor-initiating activity of benz[e]aceanthrylene and benz[l]aceanthrylene in SENCAR mice. *Cancer Lett.*, 22:263-268.

Nylander, P.O., H. Olofsson, B. Rasmuson y H. Svahlin, 1978. Mutagenic effects of petrol in *Drosophila melanogaster*. I. Effects of benzene and 1,2-dichloroethane. *Mutation Res.*, 57:163-167.

Olsen, L.A., 1984. Effects of contaminated sediment on fish and wildlife: Review and Annotated Bibliography. U.S. Fish Wildl. Ser. FWS/OBS-82/66, pp. 103.

Olvera, O., E. Pimentel., M.P. Cruces., M.E. de la Rosa, J. Guzmán., C. Arceo y P. Avila, 1990. Dererminación del efecto genotóxico del ostión *Crassostrea virginica* del Canal del Chijol, Ver. Inf. Téc. Científ. 01/90 ININ, México.

Olvera, O., M.P. Cruces y E. Pimentel, 1990. Evaluation of the mutagenic effect of oysters by means of the SMART technique. Departamento de Radiobiología, Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, México.

Pagano, D.A. y E. Zeiger, 1992. Conditions for detecting the mutagenicity of divalent metals in *Salmonella typhimurium*. *Environ. Mol. Mut.*, 19:139-146.

Pahlman, R., 1988. Mutagenicity of naphthacene, a non-bay-region aromatic hydrocarbon, in *Salmonella*. *Mutation Res.*, 207:205-212.

Ponce, V.G., 1988. Evaluación de metales pesados en sedimentos recientes y tejidos de ostión *Crassostrea virginica* de la Laguna de Términos, Campeche, México, tesis profesional. Facultad de Ciencias, UNAM, México. pp. 70.

Quillardet, P. y M. Hofnung, 1985. The SOS chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: procedures. *Mutation Res.*, 147:65-78.

Radman, M., 1975. Phenomenology of an inducible mutagenic DNA repair pathway in *Escherichia coli*: SOS repair hypothesis, in: L. Prakash, F. Sherman, M. Miller (Eds.). Molecular and Environmental Aspects of Mutagenesis. Thomas Springfield. IL, pp. 128-142.

Rodríguez-Ariza, A., A. Nieves, J.I. Navas, G. Dorado, J. López-Barea y C. Pueyo. Metal, mutagenicity, and biochemical studies on bivalve molluscs from Spanish coasts. *Environ. Mol. Mutg.*, 19:112-124.

Sánchez M.E. y N. Jouve, 1982. Genética. Ediciones Omega S.A. Barcelona, pp. 501.

Scribner, J.D., 1973. Tumor initiation by apparently noncarcinogenic polynuclear aromatic hydrocarbons. *J. Natl. Cancer Inst.*, 50:1717-1719.

Shimizu, M., Y. Yasui y N. Matsumoto, 1983. Structural specificity of aromatic compounds with special reference to mutagenic activity in *Salmonella typhimurium*: A series of chloro- or fluoro-nitrobenzene derivatives. *Mutation Res.*, 116:217-238.

Sivaider, H.O. y P.G. Mikolaj, 1973. Measurement of evaporation rates from oil slicks on the open sea. Proceedings on the Joint EPA, API, USCG. Conference on Prevention and Control of oil spill. Washington, D.C. March 13-15, 1973:475-484.

Sparks, T.H., J.R. Baylis y C.W.J. Chang, 1981. Comparison of mutagen accumulation in 3 estuarine species using the *Salmonella*/microsome activation system. *Mutation Res.*, 85:133-139.

Styles, J.A. y C.R. Richardson, 1984. Cytogenetic effects of benzene: dosimetric studies on rats exposed to benzene vapour. *Mutation Res.*, 135:203-209.

Sutherland, B.M. Enzymatic photoreactivation of DNA. vol. IX. P. C. Hanawalt, E. Friedberg y Fox. Academic Press, Nueva York, 1978, pp. 113-121.

Tice, R.R., T.F. Vogt y D.L. Costa, 1981. Effects of sex strain age and route of exposure on benzene-induced sister chromatid exchanges in murine bone marrow. *Environ. Mutagen.*, 3:338-339.



Tissot, B., 1977. La geneses del petróleo. La Recherche. 77:37-40.

Toledo, A., 1982. Petróleo y ecodesarrollo en el Sureste de México. Centro de Ecodesarrollo Altadena. México. pp. 65.

Toledo, A., 1988. Energía, ambiente y desarrollo. Centro de Ecodesarrollo, 15, pp.382.

Toledo, A., A.V. Botello, M. Herzig, M. Páez, L. Bozada, F. Contreras, M. Cházaro y A. Báez, 1989. La contaminación en la región del río Coatzacoalcos. Ciencia y Desarrollo, CONACYT, 15:27-46.

UNESCO, 1982. Coral reefs, seagrass best and mangroves: Their Interaction in the Coastal Zones in the Caribbean, UNESCO. Reports in Marine Science, number 23. Reports of a Workshop Held at West Indies Laboratory, St. Croix, U.S. Islands Virgin.

van der Hoeven, N., S.A.L.M. Kooijman y W.K. de Raat, 1990. Salmonella test: relation between mutagenicity and number of revertant colonies, Mutation Res., 234:289-302.

Vogel, E.W., 1985. Summary report on the performance of the Drosophila assay, in: J. Ashby, F.J. de Serres, M. Draper, M. Ishidate Jr., B.H. Margolin, B.E. Matter y M.D. Shelby (Eds.), Evaluation of Short-Term Test for Carcinogens: Report of the International Program on Chemical Safety Collaborative Study on in Vitro Assay, Elsevier, Amsterdam, pp.47-57.

Walker, G.C., 1984. Mutagenesis and inducible responses to DNA damage in *Escherichia coli*. Microbiol. Rev., 48:60-93.

White, M.C., P.F. Infante y B. Walker, 1980. Occupational exposure to benzene: A review of carcinogenic and related health problems following the U.S. Supreme Court Decision, Am. J. Ind. Med., 1:233-243.

Wood, A.W., W. Lewin, R.L. Chang, M.T. Huang, D.E. Ryan, P.E. Thomas, R.E. Lehr, S. Kumar, M. Koreeda, H. Akagi, Y. Ittah, P. Dansette, H. Yagi, D.M. Jerina y A.H. Conney, 1980. Mutagenicity and tumor-initiating activity of cyclo[cd]pyrene and estructurally related compounds, Cancer Res., 40:642-649.

Yoshiaki, I., N. Ueda, S. Maeda, S. Murao, T. Sugiyama, H. Lee y R.G. Harvey, 1988. Induction of chromosomal aberrations in rat bone marrow cells and mutations in

*Salmonella typhimurium* by benz[a]anthracene derivatives. Mutation Res., 206:55-63.

Zobell, C.E., 1971. Sources and biodegradation of carcinogenic hydrocarbons, In: Proceedings, Joint Conference on Prevention and Control of oil Spills. American Petroleum Institute. Washington, D.C., pp.. 441-451.