

33  
2ej



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA**

**SELECCION DE UNA METODOLOGIA PARA CONCENTRACION DE  
CONTAMINANTES ORGANICOS A PARTIR DE AGUA POTABLE,  
RESIDUAL Y RENOVADA, DETERMINACION MEDIANTE  
BIDENSAYO DE LA ACTIVIDAD MUTAGENICA DE  
LAS MUESTRAS OBTENIDAS.**

**TESIS PROFESIONAL  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
BIOLOGO  
PRESENTA:**

**ZARAGOZA**

**LUIS ANTONIO NAVA VARGAS**



**MEXICO, D. F.**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**1994**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

AGRADEZCO SINCERAMENTE AL INGENIERO QUIMICO  
LUIS ARTURO CORREA CAMACHO, SUBDIRECTOR DE  
DESARROLLO DE LA DIRECCION GENERAL DE  
CONSTRUCCION Y OPERACION HIDRAULICA, EL APOYO  
BRINDADO PARA LA REALIZACION DE ESTE TRABAJO.

DE LA MISMA MANERA EXPRESO MI AGRADECIMIENTO A  
TODAS AQUELLAS PERSONAS QUE DE ALGUN MODO  
BRINDARON SU VALIOSA APORTACION AL PRESENTE,  
ESPECIALMENTE A:

BIOL. ELENA SUAREZ ABREU  
BIOL. RAUL VIVEROS  
BIOL. GILBERTO MANJARREZ.

A MI PADRE...

A MI MADRE... POR SU FUERZA Y  
ENTEREZA

A MIS HERMANOS... CON PROFUNDO  
CARIÑO

A LAURA, RODRIGO Y...

LA RAZON DE TODO.

## A. INDICE

A. INDICE .....	i
B. INDICE DE FIGURAS .....	ii
C. INDICE DE GRAFICAS .....	iii
D. INDICE DE TABLAS .....	iv
E . INDICE DE MAPAS .....	v
RESUMEN .....	1
I. Introduccion .....	2
Ia. El agua como medio de contaminación .....	2
II. Sistemas de monitoreo de mezclas complejas .....	7
IIa. Métodos de reducción de volumen (concentración) .....	10
IIb. Métodos de aislamiento .....	12
III. Sistemas de prueba .....	15
IV. Justificación .....	19
V. Hipótesis .....	20
VI. Objetivos .....	21
VII. Metodología .....	22
VIII. Area de estudio .....	23
VIIIa. Determinación de los sitios de muestreo .....	23
IX. Elección de los sistemas de muestreo y concentración..	24
X. Diseño del dispositivo de muestreo .....	25
XI. Preparación de las resinas adsorbentes .....	25
XII. Empaquetamiento de los dispositivos de muestreo .....	25
XIII. Aislamiento de compuestos orgánicos en instalaciones hidráulicas .....	27
XIV. Recuperación de los concentrados yobtención de las muestras .....	27
XV. Rehabilitación de los dispositivos de muestreo .....	28
XVI. Elección del sistema de prueba .....	29

XVII. Sistemas bacterianos .....	29
XVIII. Valor predictivo de las pruebas bacterianas .....	32
XIX. Validación de las pruebas bacterianas .....	33
XX. Características de la prueba con <u>Salmonella</u> .....	34
XXI. Obtención y conservación de los organismos de prueba.	36
XXII. Confirmación de la estabilidad de los organismos de prueba .....	37
XXIII. Activación metabólica .....	39
XXIV. Realización de las pruebas de mutagenicidad de los concentrados obtenidos en campo .....	41
XV. Elaboración del programa de captura, proceso y reporte de resultados de datos del análisis de actividad mutagénica en muestras de agua .....	43
XXVI. Determinación de la actividad mutagénica .....	45
XXVII. Presentación y discusión de resultados .....	50
XXVIIa. Diseño del dispositivo de muestreo .....	50
XXVIIb. Bioensayo .....	52
XXVIIc. Análisis de mutagenicidad .....	53
XXVIIc1. Agua potable .....	53
XXVIIc2. Agua residual y tratada .....	56
XXVIIId. Análisis cromatográfico.....	59
XXVIIe. Programa de captura .....	61
XVIII. Conclusiones .....	62
XXIX. Recomendaciones .....	64
XXX. Anexo 1 (Mutagénesis) .....	65
XXXI. Anexo 2 (Carcinogénesis) .....	67
XXXII. Anexo 3 (Características de las cepas bacterianas).	72
XXXIII. Anexo 4 (Sección de medios y reactivos) .....	75

LITERATURA CITADA .....	78
OTRAS REFERENCIAS .....	94

FIGURA 1	"RUTAS DE CONTAMINACION HACIA LOS MANTOS FREATICOS" .....	97
FIGURA 2	"MEDIOS DE DISPERSION Y VIAS DE TRANSFERENCIA DE LOS CONTAMINANTES AMBIENTALES HACIA EL HOMBRE" .....	98
FIGURA 3	"POZO PERFORADO PROFUNDO" .....	99
FIGURA 4	"PLANTA DE BOMBEO DE AGUA POTABLE" .....	100
FIGURA 5	"TANQUE DE ALMACENAMIENTO DE AGUA POTABLE" .....	101
FIGURA 6	"DISPOSITIVO EXPERIMENTAL DE TRATAMIENTO AVANZADO DE AGUA RESIDUAL" .....	102
FIGURA 7	"PLANTA DE TRATAMIENTO DE AGUA RESIDUAL" .....	103
FIGURA 8	" MATERIALES USADOS EN EL DISEÑO DEL DISPOSITIVO DE MUESTREO" .....	104
FIGURA 9	"PREPARACION DEL DISPOSITIVO DE MUESTREO".....	105
FIGURA 10	"RUTAS QUE PUEDE SEGUIR UNA LESION AL ADN"....	106
FFIGURA 11	"PROCEDIMIENTO ESTANDAR PARA REALIZAR LA PRUEBA DE AMES".....	107
FIGURA 12	"TIPOS DE MUTACIONES GENICAS" .....	108
FIGURA 13	" MUTACIONES POR LECTURA DE MARCO" .....	109
FIGURA 14	"COMPONENTES CELULARES SUCEPTIBLES A LOS COMPUESTOS MUTAGENICOS" .....	110
FIGURA 15	"RIESGOS CLINICOS DE LAS MUTACIONES" .....	111

GRAFICA 1	"PORCENTAJE DE RESULTADOS POSITIVOS POR TIPO DE INSTALACION" .....	113
GRAFICA 2	"NUMERO DE SITIOS MUESTREADOS POR TIPO DE INSTALACION" .....	114
GRAFICA 3	"NUMERO DE MUESTRAS POR DELEGACION EN AGUA POTABLE" .....	115
GRAFICA 4	"PORCENTAJE DE RESULTADOS POSITIVOS POR INSTALACION EN AGUA POTABLE" .....	116
GRAFICA 5	"NUMERO DE INSTALACIONES CON RESULTADO POSITIVO POR DELEGACION" .....	117
GRAFICA 6	"NUMERO DE MUESTRAS POR INSTALACION PARA AGUA RESIDUAL Y TRATADA" .....	118
GRAFICA 7	"NUMERO DE MUESTRAS Y RESULTADOS POSITIVOS POR PLANTA DE TRATAMIENTO" .....	119
GRAFICA 8	"NUMERO DE MUESTRAS POR PLANTA POTABILIZADORA Y POR TREN DE TRATAMIENTO" .....	120
GRAFICA 9	"NUMERO DE MUESTRAS POR TREN DE TRATAMIENTO Y RESULTADOS POSITIVOS PARA EL DISPOSITIVO EXPERIMENTAL DE TRATAMIENTO AVANZADO DE AGUA RESIDUAL (DETAAR)" .....	121
GRAFICA 10	"PORCENTAJE DE RESULTADOS POSITIVOS PARA EL DETEAR" .....	122

TABLA 1	"CARACTERISTICAS DE LOS SISTEMAS BIOLÓGICOS PARA IDENTIFICAR MUTÁGENOS" .....	123
TABLA 2	"PRUEBAS BACTERIANAS PARA DETERMINACION DE MUTAGENICIDAD" .....	124
TABLA 3	"RESULTADOS POSITIVOS EN INSTALACIONES DE AGUA POTABLE" .....	125
TABLA 4	"RESULTADOS DEL ANALISIS CROMATOGRAFICO DE MUESTRAS DEL (DETAAR) QUE REPORTARON RESULTADO POSITIVO EN EL ENSAYO DE MUTAGENICIDAD" .....	126
TABLA 5	"ALTERACIONES GENÉTICAS" .....	127
TABLA 6	"MECANISMOS DE ACCION DE ALGUNOS MUTÁGENOS" ....	128
TABLA 7	"BATERIAS DE CEPAS DE PRUEBA RECOMENDADAS PARA ANALISIS DE RUTINA EN LA PRUEBA DE AMES" .....	129

## V.

## E.

## INDICE DE MAPAS

MAPA 1	"AREA DE ESTUDIO" .....	130
MAPA 2	"RESULTADOS DELEGACION ALVARO OBREGON" .....	131
MAPA 3	"RESULTADOS DELEGACION AZCAPOZALCO" .....	131
MAPA 4	"RESULTADOS DELEGACION BENITO JUAREZ" .....	132
MAPA 5	"RESULTADOS DELEGACION COYOACAN" .....	132
MAPA 6	"RESULTADOS DELEGACION CUAJIMALPA" .....	133
MAPA 7	"RESULTADOS DELEGACION CUAUHEMOC" .....	133
MAPA 8	"RESULTADOS DELEGACION GUSTAVO A. MADERO" .....	134
MAPA 9	"RESULTADOS DELEGACION IZTACALCO" .....	134
MAPA 10	"RESULTADOS DELEGACION IZTAPALAPA" .....	135
MAPA 11	"RESULTADOS DELEGACION MAGDALENA CONTRERAS" ....	135
MAPA 12	"RESULTADOS DELEGACION MILPA ALTA" .....	136
MAPA 13	"RESULTADOS DELEGACION MIGHEL HIDALGO" .....	136
MAPA 14	"RESULTADOS DELEGACION TLAHUAC" .....	137
MAPA 15	"RESULTADOS DELEGACION TLALPAN" .....	137
MAPA 16	"RESULTADOS DELEGACION VENUSTIANO CARRANZA" ....	138
MAPA 17	"RESULTADOS DELEGACION XOCHIMILCO" .....	138
MAPA 18	"RESULTADOS ESTADO DE MEXICO" .....	139

DIAGRAMA 1 .....	140
DIAGRAMA 2 .....	141
HOJAS DE CONTENIDO DE ARCHIVO .....	146

## RESUMEN

En los últimos años, el aumento de información acerca de la importancia de los factores ambientales ha contribuido a incrementar el énfasis sobre la prevención y minimización de la exposición humana a los compuestos químicos de riesgo. Uno de los puntos más importantes en la evaluación de contaminantes ambientales es el análisis de la calidad toxicológica del agua de uso doméstico, industrial y recreacional, así como de las aguas utilizadas para riego agrícola y de áreas verdes. Entre los aspectos toxicológicos de la calidad del agua, aquel que se refiere a la presencia de compuestos carcinogénicos y/o mutagénicos en los centros de distribución toma relevancia dado que no ha sido suficientemente valorado y puede representar un riesgo para los usuarios. Con ésto en mente, en el presente trabajo se seleccionaron metodologías para la obtención de muestras, determinación de actividad mutagénica, recopilación y proceso de los datos obtenidos. Los concentrados de compuestos orgánicos para las pruebas se obtuvieron haciendo pasar el agua a través de una columna de cobre de 19 mm. de diámetro y 25 cm. de longitud, empacada con 20 ml de una resina macroreticular (XAD-2/XAD-4). Los compuestos retenidos fueron eluidos posteriormente con una mezcla de solventes (Hexano/Acetona 85:15) y resuspendidos posteriormente en Dimetil Sulfoxido para obtener la muestra final. Los ensayos de mutagenicidad se realizaron mediante la prueba conocida como **Salmonella microsome assay** utilizando las cepas TA 100 y TA 98. Se analizaron pozos, tanques y sistemas de bombeo de agua potable además de plantas potabilizadoras, plantas de tratamiento de agua residual y plantas experimentales de tratamiento avanzado de agua residual.

Para la recopilación y procesamiento de los datos obtenidos, se creó un programa de captura, proceso y reporte de resultados que facilitó enormemente el manejo de la información. El programa determina cuando un resultado es positivo o negativo y permite consultar los datos en base a varias alternativas mediante las cuales se pueden obtener datos específicos de zonas específicas.

En los bioensayos, se analizaron 924 muestras de agua potable las cuales presentaron porcentajes bajos de resultados positivos, (2.4% para pozos, 2.9% para tanques y 3.5% para rebombos). El análisis estadístico posterior determinó que éstos resultados eran muy probablemente falsos positivos. En general, los resultados en agua potable mostraron que no se puede asociar ningún riesgo ocasionado por la presencia de compuestos mutagénicos en éste tipo de agua.

Para el agua residual y tratada se ensayaron 317 muestras, 71 en plantas de tratamiento de agua residual, 33 en plantas potabilizadoras y 213 en un dispositivo de tratamiento avanzado de agua residual encontrándose un porcentaje de resultados positivos de 10, 6.6 y 33% respectivamente. Para éstos tipos de agua, los resultados positivos reportados fueron bastante claros. La presencia de actividad mutagénica en los efluentes de los sistemas de tratamiento, se asoció a los procesos de desinfección

con cloro que se llevan a cabo al final de los tratamientos.

Finalmente, se propone que los análisis de actividad mutagénica en muestras de agua deben enfocarse hacia la evaluación de sistemas de tratamiento de agua con el objeto de identificar riesgos asociados con el reuso (Riego agrícola, riego de áreas verdes, uso industrial, uso recreacional y en un futuro agua para beber).

## I. INTRODUCCION

Los compuestos químicos, cuando son introducidos en el medio, interactúan con agua, aire y suelo y pueden por ello, representar un riesgo potencial para la salud humana. La difusión masiva de contaminantes en el medio ambiente, aunada al incremento en el uso de diversos productos tales como fármacos, cosméticos, aditivos de alimentos, etc., son hechos que nos indican que existe un riesgo potencial a la salud humana por la exposición crónica que sufren los individuos aún cuando los niveles de los agentes tóxicos no sean muy altos. De aquí la necesidad de estimar el riesgo que representa la exposición a cada compuesto o mezcla de compuestos por medio de determinaciones cualitativas y/o cuantitativas, cuando esto sea posible. Como una alternativa de solución ante tal situación, las autoridades gubernamentales han propuesto la implementación de programas de vigilancia de la calidad del ambiente, así como programas de reducción de actividades industriales y disminución del tránsito vehicular, con la finalidad de disminuir los altos índices de contaminación. Es importante destacar que la importancia del esfuerzo compartido por parte de las autoridades y la población debe enfocarse al estudio y las soluciones para abatir la contaminación ambiental a partir del conocimiento derivado de la investigación experimental en sistemas biológicos diversos, comprendiendo daños somáticos y genéticos (de Garay, 1991).

### Ia. EL AGUA COMO MEDIO DE CONTAMINACION.

Es un hecho que tanto los contaminantes del aire como los del suelo pueden eventualmente precipitarse y/o filtrarse a través de este último y contribuir a la contaminación de los mantos freáticos y ríos subterráneos así como ríos, lagos, presas y otros embalses superficiales que sirven como fuentes de agua potable. Es por esto último, que uno de los aspectos más importantes en la evaluación de contaminantes ambientales es el análisis de la calidad toxicológica del agua de uso doméstico. Las rutas que los contaminantes ambientales toman para llegar a los mantos freáticos son diversas, puede deberse a la precipitación de partículas del aire con la lluvia y a su posterior infiltración al subsuelo, a la filtración de lixiviados de basureros o a la contaminación por fugas de drenajes domésticos o industriales. Es incuestionable el hecho de que las aguas de uso industrial constituyen una de las mayores fuentes de contaminación de los ambientes acuáticos. (Bergman *et al.*, 1986). De cualquier modo, los contaminantes pueden llegar al ser humano mediante el agua de consumo (Fig.1). Existen otras rutas por medio de las cuales los contaminantes pueden llegar al ser humano mediante el agua, y representar un riesgo para su salud, todas ellas se relacionan con la ingestión de productos que fueron cultivados con aguas contaminadas (aguas residuales o tratadas) o que de alguna manera, dentro de una cadena se ven relacionadas con este tipo de aguas (Fig.2).

Sea cual sea la ruta por la cual los contaminantes llegan al ser humano, el hecho es que los efectos adversos a la salud ya son evidentes, por lo que la evaluación de los riesgos y la vigilancia de la buena calidad del medio ambiente se ha convertido en un asunto prioritario.

Entre los aspectos toxicológicos de la calidad del agua, uno que merece especial atención debido a que no ha sido valorado suficientemente a pesar de sus efectos sobre la salud de los individuos que son afectados y en sus descendientes, es aquel que se refiere a la presencia de compuestos mutagénicos (ver anexo 1) y/o carcinogénicos (ver anexo 2) en los centros de distribución de agua potable o en el agua residual o tratada.

Actualmente esta bien establecido que muchos tipos de efluentes industriales son fuentes de mutágenos (Andon et al., 1986; Houk y Claxton, 1986; de Raat et al., 1985; Mc George et al., 1985; Nestmann et al., 1984; Somani et al., 1980.), y, la presencia de estos compuestos en efluentes industriales puede provocar una gran variedad de efectos adversos sobre la biota acuática, más aún cuando son deshechados directamente a los cuerpos de agua, dado que de esta forma pueden representar una amenaza directa para la salud pública debido a la posibilidad de contaminación de los mantos freáticos y/o embalses superficiales utilizados para el abastecimiento de agua potable, así como de las aguas de uso recreacional o de las especies acuáticas comestibles (Mc George et al., 1985). Mas peligroso aún es el hecho de que las descargas industriales estén contribuyendo al aumento de un "estres" mutagénico de los medios acuáticos, cuyas consecuencias son desconocidas (de Raat et al., 1985). Otro aspecto de extrema importancia es el conocimiento de que las aguas tratadas son reutilizadas en actividades tales como: Riego de parques y jardines, lavado de autos, abastecimiento de lagos recreacionales, sistemas de enfriamiento y uso agrícola. Mas recientemente se ha concentrado la atención en el conocimiento de mecanismos y acciones biológicas de centenares de agentes comprendidos en alimentos, plaguicidas, herbicidas, fertilizantes, fármacos y productos diversos que conforman la contaminación ambiental. Este enfoque sustenta la necesidad de dar asiento a una estructura científica básica que sirva de apoyo a los estudios de la contaminación ambiental y los diversos agentes capaces de traducirse en daños genéticos y somáticos (de Garay, 1991).

Los compuestos mutagénicos y/o carcinogénicos pueden provenir tanto de fuentes naturales como artificiales. Las fuentes artificiales proveen esencialmente compuestos químicos que son utilizados en diversas industrias, del tipo de: Fábricas de compuestos químicos y productos derivados; refinerías de petróleo y sus derivados; producción de hules y productos de plástico; equipos de transportación aérea; venta y manejo de productos químicos; laboratorios de investigación y pruebas; laboratorios médicos (Fairchild, 1977); fábricas de productos cosméticos (Gocke., 1981); fábricas y envasadoras de alimentos y laboratorios farmacológicos. Estos y otros productos pueden

integrarse al ambiente, representando un riesgo a la salud humana. Dentro de esta perspectiva es donde se aplica más acertadamente el concepto de contaminación como resultante de la acción del hombre o contaminación antropogénica (Vega, 1990).

Las fuentes naturales involucran compuestos de origen biológico tales como las aflatoxinas, así como materia orgánica y ácidos húmicos y fúlvicos que por efecto de los procesos de desinfección se convierten en compuestos mutagénicos y/o carcinogénicos (Yuefeng y Zhansheng, 1990; Ruud, 1988.)

Por lo anterior, el agua ha sido considerada como un medio a través del cual los compuestos químicos carcinogénicos y/o mutagénicos llegan al ser humano. La primera pregunta acerca de esta posibilidad fue hecha por Heuper y Ruchhoft (1954), quienes probaron compuestos de carbono que fueron extraídos con cloroformo a partir de muestras obtenidas de sitios diversos tales como: Efluente de un separador gravitatorio de aceite de una refinería de petróleo; Agua sin tratar de un canal contaminado con residuos de una refinería de petróleo y aguas no tratadas de los ríos Kanawha y Ohio en Cincinnati. Muestras de éstas aguas fueron probadas en ratones machos de la cepa C57. En todos los animales las pruebas para carcinogenicidad duraron un año. Las muestras de la refinería y el canal contaminado fueron carcinogénicas, mientras que las muestras de los ríos dieron resultados negativos. Aunque las muestras de los ríos no mostraron ser carcinogénicas, logró llamarse la atención y se comenzó la búsqueda de compuestos tóxicos en agua potable.

El desarrollo y la aplicación general de varias herramientas analíticas sofisticadas en los últimos años han modificado en gran forma nuestra manera de ver la contaminación en agua potable. La cromatografía de gases, acoplada a la espectrofotometría de masas para los análisis de agua, han incrementado rápidamente el número de compuestos químicos conocidos que existen en el agua, ya que, si anteriormente la identificación de un compuesto podía tomar meses o años, en la actualidad, con los procedimientos modernos de la espectrofotometría de masas y el desarrollo de sistemas de cómputo asociados, es posible la identificación casi inmediata de cientos de compuestos, (si se cuenta con los patrones de fragmentación de referencia).

Uno de los más importantes hechos de los últimos años a este respecto, fué el descubrimiento de que los compuestos químicos orgánicos, generalmente se encuentran en altas concentraciones en aguas potables sin contaminación industrial, pero provenientes de tratamientos de desinfección con cloro (Rook, 1974; Bellar *et al.*, 1974). Los primeros de tales compuestos identificados, fueron los trihalometanos (THM), principalmente bromo y cloro metanos, con ocasionales trazas de iodométanos. La significancia de estos resultados se vio incrementada al conocerse el hecho de que el cloroformo resultó carcinogénico en ensayos con ratas y ratones. Los resultados de investigaciones con animales se vieron apoyados posteriormente por un gran número de estudios en los que se

observó una correlación entre el agua potable clorada y la mortalidad por cáncer del tracto gastrointestinal y urinario (Wilkins *et al.*, 1979). Por otra parte, varios investigadores han demostrado que los THM representan solo una fracción de los productos de cloración. Datos reportados por Simmons, de la División de investigación de agua potable del laboratorio de investigación medioambiental en Cincinnati, indican que más del 50% de los compuestos orgánicos halogenados producidos por la cloración del agua, pueden ser productos diferentes a THM. Aunque la cloraminación, un procedimiento alternativo a la cloración, suprime la formación de THM, no suprime la formación de productos diferentes a estos (Ching-Yuang, 1990).

Estudios de iniciación/promoción en piel de ratones con varios desinfectantes indican que los compuestos NO-THM no pueden ser fácilmente eliminados. En uno de tales experimentos se comprobó que a pesar de utilizar para los procesos de desinfección agua libre de THM, la actividad de iniciación pudo comprobarse tanto en agua desinfectada con cloro como en agua desinfectada con cloraminas u ozono (Bull, 1980).

Toda vez que los resultados anteriores fueron conocidos, los investigadores comenzaron a estudiar las propiedades biológicas de las mezclas complejas de compuestos presentes en aguas potables. Varios laboratorios han encontrado concentrados orgánicos de aguas potables, con actividad mutagénica en la prueba de *Salmonella* (Loper *et al.*, 1978; Glatz *et al.*, 1978), estos estudios han continuado con demostraciones de que tales concentrados pueden transformar células BALB/3T3 (Lang *et al.*, 1980). En resumen, cuando los compuestos obtenidos de muestras de agua pueden ser suficientemente concentrados, es muy probable encontrar actividad mutagénica en tales muestras.

De acuerdo con Bull (1980) y con base en estos antecedentes, es posible agrupar a los compuestos que representan un riesgo a la salud humana, en las siguientes categorías:

- a) Cantidades traza de una amplia variedad de compuestos orgánicos sintéticos, usualmente en concentraciones de  $\mu\text{g/l}$  en aguas superficiales.
- b) Aparición esporádica de altas concentraciones de compuestos químicos industriales en forma individual, involucrando principalmente estanques contaminados con descargas de solventes.
- c) Compuestos químicos orgánicos naturales o anteriormente depositados, tales como ácidos húmicos y fúlvicos.
- d) Productos de la reacción de desinfectantes con los compuestos químicos presentes en el agua (incluyendo THM como la mayor clase de compuestos orgánicos formados en el agua).

- e) Compuestos químicos filtrados en y desde los sistemas de distribución, tales como metales, asbestos e hidrocarburos aromáticos policíclicos.
- f) Tratamiento químico del agua, incluyendo polielectrolitos, coagulantes y químicos para el control de la corrosión.

Los puntos c y d son los que ocurren con mayor frecuencia, y son ellos precisamente los que plantean los mayores problemas en la evaluación del riesgo asociado con el agua potable.

## II. SISTEMAS DE MONITOREO DE MEZCLAS COMPLEJAS

El análisis de los efectos de las mezclas complejas en seres vivos, no es nuevo, ya en 1775 Pott reportó que el cáncer de escroto en ovejas, era causado por el hollín, el cual es una mezcla de sustancias químicas (Potter, 1963).

La primera demostración de carcinogénesis química en animales fue hecha en 1915 por Yamagiwa e Ishikawa, quienes demostraron que el alquitran de las pinturas provocaba tumores en las orejas de conejos de experimentación (Feron *et al*, 1986)

Entre las mezclas complejas conocidas podemos mencionar: El humo de tabaco, emisiones de gases de industrias y automóviles, atmósferas ocupacionales, agua, aire y suelo contaminados.

En el caso de las mezclas complejas, la evaluación de los efectos mutagénicos y/o carcinogénicos, presenta varios problemas, entre los que se pueden mencionar: los efectos del sinergismo, antagonismo y aditividad de los componentes de las mezclas, además de problemas específicos en relación a su colecta, análisis, diseño experimental y evaluación de resultados, así como problemas comunes en cuanto a caracterización, estabilidad en la composición química, biodisponibilidad y, finalmente las diferencias existentes entre la composición de la muestra analizada y la composición de la mezcla en su forma original, es decir, la que afecta directamente a las poblaciones humanas que se encuentren expuestas a ellas (Feron *et al*, 1986). Todos éstos factores influyen en la confiabilidad de los resultados y pueden conducir a subestimaciones o sobre estimaciones de la muestra analizada.

Uno de los problemas que afectan más la veracidad de los resultados en el análisis de mezclas complejas, es la posible alteración que las muestras pueden sufrir durante su traslado desde el sitio de la colecta, hasta el laboratorio de análisis. Tales alteraciones pueden consistir en la pérdida, transformación, reacción, activación y desactivación de los compuestos presentes en las muestras.

Raabe (1982) y Jungers y Lewtas (1982), revisaron los métodos aplicables a la recolección de partículas presentes en el aire, y encontraron que la actividad biológica de las muestras depende del dispositivo de colección, del método y del solvente utilizado para extraer la muestra. Las muestras deben ser protegidas de la luz, del calor, de la humedad y del aire, para evitar su degradación (Fisher y Chrisp; Fisher y Raabe, 1979).

El problema de la transformación de compuestos mutagénicos durante la colecta y traslado de las muestras, ha sido discutido ampliamente por Pitts (1978), quien encontró que algunas fibras de vidrio cubiertas con Benzo (a) Pireno y expuestas a dióxido de nitrógeno -un contaminante del smog- fueron altamente

mutagénicas en el ensayo con Salmonella typhimurium, en comparación con los análisis en los que se utilizó Benzo (a) Pireno aislado, el análisis químico ulterior, mostró la formación de derivados nitrosados. Esto demuestra que intervalos de tiempo grandes entre la colecta de la muestra y su posterior análisis, pueden ejercer influencia sobre la actividad de las muestras, produciendo transformación química de los compuestos, y como consecuencia, datos deformados de la composición original de las muestras.

En presencia de luz, los contaminantes ambientales pueden también sufrir alteraciones (Crosby, 1969; Kuhr, 1971). Los compuestos químicos fotogenerados pueden ser de vida corta, sufrir un cambio permanente o acumularse en los organismos. Estudios adicionales han demostrado que los compuestos generados fotodinámicamente, pueden ser mutagénicos (Gutter et al., 1977).

Los estudios actuales, corresponden al análisis de mezclas complejas de aire. En el caso del agua, no existe aún un método generalizado que minimice los problemas inherentes al muestreo, que promueven la transformación de las muestras. Los resultados confusos de las pruebas de carcinogenicidad son achacados comúnmente a las diferencias en la extracción, concentración y reconstitución de las muestras (Kool et al., 1985). De la misma manera aún no existe un método de uso para la determinación de actividad mutagénica en muestras de agua. Los métodos actuales, están enfocados a la evaluación de compuestos aislados o a estudios muy específicos de muestras ambientales. En el caso del agua, el método deberá estar de acuerdo con las características, requerimientos y objetivos particulares del estudio que se pretenda realizar, en este caso específico, el análisis de números relativamente grandes de muestras (1000 muestras por año), obtenidas de grandes volúmenes de agua (100-200 litros).

Debido a que las sustancias contaminantes presentes en el agua, se encuentran generalmente en cantidades traza (y más aún en agua que se presume potable), tales sustancias deben ser previamente aisladas y/o concentradas, para que puedan ser detectadas. Es necesario obtener una masa suficiente de orgánicos para poder realizar los análisis biológicos de la mezcla ambiental y la subsecuente separación e identificación química.

Se ha reportado una gran variedad de compuestos químicos en agua, (Keith, 1976), van desde compuestos no volátiles, como los ácidos húmicos, hasta compuestos tan volátiles como el cloroformo. La detección en agua de compuestos orgánicos de varios tipos, adjudica a ésta un riesgo potencial a la salud humana.

Los métodos para producir muestras para pruebas biológicas a partir de mezclas complejas, pueden ser divididos en dos tipos: **Concentración (Reducción de volumen)** y **Aislamiento**. En el primero, el agua es removida dejando a las sustancias disueltas, en el fondo. En el segundo, las sustancias orgánicas son removidas del agua. La combinación de ambos métodos podría mencionarse como un tercer tipo de método.

La elección del sistema para obtener muestras para pruebas biológicas, depende en primera instancia del sistema biológico que se usará para la evaluación de la muestra, la muestra final debe proveer la cantidad suficiente de material en un volumen de solvente que sea compatible y pueda ser utilizado por el sistema de prueba.

Las cantidades traza de los compuestos orgánicos que se encuentran en las mezclas complejas, deben ser previamente concentradas para que puedan ser analizadas (Jolley, 1981). Muchos de los métodos establecidos fueron desarrollados y evaluados para la preparación de muestras para análisis químico, y en la mayoría de los casos, tales métodos deberán ser reevaluados cuando se trate de preparar muestras que se utilizarán para ensayos biológicos ya que no todos los compuestos con actividad mutagénica pueden ser detectados por métodos químicos y/o instrumentales, y los efectos de sinergismo y aditividad así como los efectos antagónicos que pueden ocurrir a los compuestos en las mezclas complejas, sólo pueden ser evaluados mediante bioensayos. Debe considerarse además la presencia de compuestos bioacumulables

## IIa. METODOS DE REDUCCION DE VOLUMEN (CONCENTRACION)

Los métodos de reducción de volumen para la preparación de concentrados orgánicos para pruebas biológicas, incluyen: Concentración por congelamiento, congelación-deseccación, evaporación al vacío y procesos de membrana (osmosis inversa y ultrafiltración).

La concentración por congelamiento es el proceso mediante el cual una muestra de agua es congelada hasta formar una cápsula de hielo puro, quedando en el centro los residuos no congelados de agua, conteniendo las sustancias disueltas. Shapiro (1961), propuso utilizar este método para concentrar muestras ambientales de agua, éste método fue posteriormente evaluado por Baker (1969), el método permite una recuperación efectiva de todos los compuestos, incluyendo los volátiles y orgánicos ionizados. Con este método los compuestos son recuperados de manera equivalente, pero no en su totalidad.

La concentración por congelamiento trabaja bien en soluciones de agua destilada, pero la recuperación de solutos orgánicos, se reduce con el contenido de sales, debido a las alteraciones de la formación del hielo superficial, que producen la incorporación de partes líquidas enriquecidas de solutos en el hielo (Baker, 1969).

La congelación-deseccación, es el proceso en el cual se remueve el agua en forma de vapor, directamente de la muestra congelada por sublimación a presión baja. El equipo para trabajos a gran escala, aunque esta disponible, es caro y estorboso, además de que requiere grandes cantidades de energía y es un proceso lento (Jolley, 1979).

La evaporación al vacío (o destilación al vacío), es la ebullición de las muestras acuosas a presión reducida y aproximadamente a temperatura ambiente. Este método se ha utilizado para concentrar muestras de agua para análisis químico (Jolley et al., 1975), y para pruebas biológicas (Johnston and Herron, 1979), el aparato requerido, puede ser ensablado con componentes que estan disponibles en forma comercial.

La congelación-deseccación y la evaporación al vacío, pueden lograr altos grados de concentración, con pocos contaminantes, y, unicamente las sustancias volátiles dadas la temperatura y la presión pueden perderse. En muestras ambientales de agua, el método puede recuperar grandes porcentajes de carbono orgánico total. La mayor desventaja en ambos casos es la dificultad de recuperar las sustancias a partir de precipitados inorgánicos (Jolley, 1979).

En la osmosis inversa el agua es forzada a pasar a travez de una membrana, por la aplicación de una presión externa que exede la presión osmótica al otro lado de la membrana. Los sistemas de osmosis inversa estan comercialmente disponibles en muchos

tamaños, y generalmente contienen membranas de acetato de celulosa o poliamida (nylon). Las membranas de poliamida, son más estables a PH extremo, pero son altamente sensitivas al cloro y no pueden por lo tanto ser usadas en procesos con agua clorada, a menos que el cloro residual sea químicamente reducido. Una desventaja de los sistemas comercialmente disponibles es que contienen componentes plásticos y adhesivos sintéticos que pueden adsorber componentes de la muestra o liberar contaminantes en el concentrado. En los procesos de ultrafiltración encontramos problemas similares a los de osmosis inversa, además de la saturación rápida de las membranas dependiendo del tipo de agua que se utilice. Todos los métodos de reducción de volúmen tienen ventajas y desventajas, pero una desventaja compartida por todos, es que las especies inorgánicas son concentradas junto con las sustancias orgánicas de interes. El grado en el cual las muestras pueden ser concentradas por estos métodos antes de la precipitación de los inorgánicos presentes, varía con el tipo y concentración de los compuestos inorgánicos originalmente encontrados en la muestra, pero es generalmente de unas 20 a 50 veces. Si el bioensayo es suficientemente sensible, y puede tolerar muestras acuosas, y si las sales inorgánicas presentes no interfieren, este tipo de concentrados pueden ser probados directamente. La concentración por congelación y la osmosis inversa, producen unicamente concentrados acuosos del grado mencionado, si se requieren muestras más concentradas, deberan ser reconcentradas posteriormente por otros medios, con el subsecuente aumento del volumen de muestra. Los métodos de congelación-deseccación y evaporación al vacio, pueden ser usados para producir concentrados acuosos o residuos sólidos, aunque, si los constituyentes inorgánicos precipitan, la recuperación de los residuos orgánicos se dificulta (Kopfler, 1980).

## **Iib. METODOS DE AISLAMIENTO**

Los métodos de aislamiento, remueven los orgánicos del agua concentrándolos en solventes orgánicos. Uno de estos métodos consiste en utilizar solventes orgánicos inmiscibles, para extraer los orgánicos del agua (extracción líquido-líquido), otro método, se basa en la adsorción de los orgánicos en un medio sólido y su posterior elución con un solvente orgánico (método adsorción-elución). Estos métodos han sido ampliamente investigados y utilizados en la preparación de muestras para análisis químico (Kopfler, 1980).

La extracción líquido-líquido, es útil para la recuperación de orgánicos a partir de muestras de agua de varios litros de volumen, las muestras más grandes, sin embargo, requieren una extracción continua utilizando grandes volúmenes de solventes.

Cuando se emplean procesos que utilizan solventes, algunas impurezas de estos, pueden ser concentradas junto con los componentes de la muestra, aún los solventes orgánicos más purificados contienen preservativos y/o antioxidantes, que pueden reaccionar al ser mezclados con los contaminantes orgánicos de las muestras, por ejemplo, el ciclohexano, es una impureza presente en el cloruro de metileno de más alto grado. Cuando el cloruro de metileno es utilizado para extraer muestras que contienen cloro residual, el ciclohexano produce mono, tri y tetracloro ciclohexanos por la reacción con el cloro residual (Logsdon et al., 1977). También los peróxidos pueden contaminar los extractos preparados o reaccionar con ellos para producir sustancias nuevas y diferentes a las originalmente presentes en la muestra o en los solventes. Otro tipo de alteración que puede ocurrir en la muestra es el que se refiere a los cambios ocurridos en los concentrados por la reacción de los compuestos orgánicos entre sí durante el tiempo de traslado de la muestra del lugar del muestreo hasta el lugar del análisis o durante su preparación para la prueba biológica.

Los métodos de adsorción-elución, requieren de complejos aparatos para el aislamiento de los orgánicos del agua, en ellos la muestra es pasada a través de una columna con el adsorbente sólido y los orgánicos son subsecuentemente eluidos con un pequeño volumen del solvente adecuado. Los métodos más comunes son: Carbón activado y resinas macroreticulares.

El método con carbón activado ha sido utilizado para remover compuestos orgánicos de soluciones acuosas (Buelow et al., 1973), sin embargo, la recuperación de compuestos de la columna de carbón activado no es tan buena como con otros adsorbentes (Chriswell et al., 1977)

Las resinas del tipo XAD, producidas por Rhom and Haas, han sido utilizadas ampliamente para recuperar sustancias orgánicas de muestras de agua. (Dressler, 1979; Gustafson y Paleos, 1971). Existen dos tipos disponibles, uno fabricado en un copolímero de estireno-divinil-benceno, y otro que es un copolímero con base

de metil acrilato Las resinas de ambos tipos estan disponibles en varios tamaños de poro, dando diferentes unidades de área de superficie, se han utilizado en el aislamiento de compuestos orgánicos sintéticos de muestras de agua, tienen una gran afinidad para las sustancias hidrofóbicas y retienen virtualmente todo este tipo de materiales, aún si la muestra acuosa es pasada a travez de una columna de resina a tasas de flujo altas (Junk et al., 1974).

Mucha de la materia orgánica en el agua es hidrofílica, sin embargo, Thurman (1978), ha demostrado que aunque la capacidad de las resinas para este tipo de compuestos no es grande, se puede tener una buena recuperación si las tasas de flujo son lo suficientemente lentas. Los ácidos y las bases orgánicas, son adsorbidos de una manera efectiva, sólo después que la ionización ha sido suspendida por un ajuste de PH, pasar el agua con un PH bajo como el de los ácidos orgánicos, generalmente no presenta problemas, pero intentar recuperar bases orgánicas con un PH alto, puede provocar el taponamiento de la columna por hidróxidos orgánicos, lo que provocará que sólo una porción de la muestra total pueda ser procesada. Se ha estimado que cerca del 50% del carbón orgánico total, puede ser recuperado en una columna que utilice resinas del tipo XAD (Malcolm et al., 1977).

Las sustancias orgánicas ionizables pueden ser recuperadas por elución con soluciones acuosas de ácidos o bases orgánicas, mientras que las sustancias orgánicas neutras, pueden ser recuperadas eficazmente con solventes orgánicos (Malcolm, 1977).

Se han utilizado una gran variedad de solventes para la elución de los compuestos orgánicos adsorbidos en las resinas, los más comunmente usados son: Dietileter, metanol, acetona, hexano, cloruro de metileno, y mezclas de ellos. Le Bell (1979), aisló pesticidas organofosforados, eluyendo la muestra con una mezcla de acetona-hexano en una proporción de 15/85 volumen-volumen, y utilizó los extractos para pruebas de mutagenicidad *in vitro*. Los solventes utilizados para la elución. deben ser utilizados con precaución para evitar la contaminación de las muestras con los mismos.

Las resinas del tipo XAD, han sido utilizadas por muchos investigadores para aislar compuestos orgánicos de grandes volúmenes de agua. Mc Neil (1977), recuperó hidrocarburos clorinados, de varios cientos de litros de agua; Junk (1976) y Burnham (1972), utilizaron un sistema muy simple para muestrear volúmenes mayores de 200 litros de agua potable ; Van Rossum y Webb, (1978), concentraron compuestos orgánicos a partir de un volumen de 1000 litros de agua de la llave.

Se ha reportado también que los ácidos húmicos y fúlvicos pueden ser adsorbidos con este tipo de resinas a Ph 2 (Aikin et al., 1979), sin embargo, cerca del 20% del material se adhiere irreversiblemente a la resina y no puede ser recuperado. Por otra parte, mucha de la materia orgánica de las aguas superficiales, esta compuesta por ácidos que aparecen en forma natural, o, por

sus derivados, producidos durante los procesos de desinfección, y, debido a que estos ácidos pueden adherirse a sustancias orgánicas de bajo peso molecular, debe asegurarse su recuperación, para así asegurar también la recuperación de tales sustancias.

### III. SISTEMAS DE PRUEBA

En los últimos años, el aumento de información acerca de la importancia de los factores ambientales ha contribuido a incrementar el énfasis sobre la prevención y disminución de la exposición humana a los compuestos químicos de riesgo. Con este objeto se han propuesto un elevado número de pruebas a corto plazo para identificar carcinógenos potenciales, utilizando organismos que van desde bacteriófagos hasta mamíferos. Estas pruebas generalmente, aprovechan la capacidad que tienen muchos carcinógenos, de causar daños al DNA o anomalías cromosómicas, directa o indirectamente (ver anexo 1).

Parece lógico pensar que el sistema más adecuado para intentar evaluar el riesgo potencial a la salud humana, originado por la presencia de compuestos mutagénicos y/o carcinogénicos en mezclas ambientales, sea el hombre mismo, sin embargo, las determinaciones directas sobre el ser humano son muy difíciles de realizar debido a factores como:

- a) El tiempo que transcurre entre la exposición al compuesto de los individuos, y la manifestación del efecto, causa por la cual los datos epidemiológicos que se llegan a obtener, a pesar de ser información de primera clase, generalmente se obtienen demasiado tarde, cuando ya se ha visto afectada irreversiblemente la población expuesta.
- b) Las limitaciones técnicas para medir la dosis de exposición real, principalmente cuando se trata de mezclas complejas.
- c) Los problemas éticos, económicos y técnicos que este tipo de análisis presentan.

Por lo anterior, los experimentos con sistemas biológicos no humanos resultan de gran importancia en la evaluación de los efectos genéticos de los agentes químicos, debido a su alta reproducibilidad, facilidad de realización, relativa economía y a su carácter preventivo.

Claxton (1977) y Newcombe (1978), han discutido ampliamente la validez de los resultados obtenidos a partir de sistemas biológicos no humanos en la determinación de un riesgo a la salud humana, propiciado por la exposición del hombre a los compuestos químicos. Esta discusión se basa en que, si bien es cierto que los seres vivos comparten algunas características como son: La universalidad del código genético y los mecanismos de traducción y transcripción de la información hereditaria, existen divergencias acentuadas fundamentalmente, en lo que se refiere a permeabilidad, transporte, metabolismo y mecanismos de reparación genética, que afectan la posible ocurrencia de las alteraciones provocadas por las sustancias químicas. Debido a esto la posibilidad de una extrapolación es cada vez menos probable a medida que los organismos de prueba están más alejados funcionalmente del hombre, por lo que el resultado de una prueba aislada, no debe tomarse como resultado final (aunque puede ser

un indicador de riesgo). La obtención de estos resultados, a pesar de todo, constituye un elemento de gran utilidad para normar criterios, aún cuando no se pueda predecir el riesgo con precisión.

El uso de sistemas animales para la identificación de carcinógenos, se ha presentado como una alternativa para estimar el riesgo en el ser humano, debido a que todas las sustancias que han sido carcinógenas en animales, lo son para el hombre, pero el hecho de saber que existen sustancias que solo son carcinógenas para el hombre, aunado al hecho de que las pruebas con animales son relativamente costosas, laboriosas y de larga duración, además de las observaciones que sugieren una estrecha relación entre la carcinogénesis y la mutagénesis (Mc Cannet *al.*, 1975), han motivado un aumento en el uso de pruebas para indentificar mutágenos, como indicadores de la capacidad carcinogénica de los compuestos orgánicos (Ramel, 1978). Trosko y Chang (1978) y Kalter (1971), han sugerido que existe una relación de causa-efecto entre la mutagénesis con la transformación maligna de las células (carcinogénesis) y ciertas alteraciones del desarrollo (teratogénesis).

Es importante recalcar que la detección de carcinógenos a través de estudios epidemiológicos en poblaciones humanas, constituye una de las tareas más difíciles, ya que, en general, dichas poblaciones se encuentran expuestas cotidianamente a bajas concentraciones de una multitud de agentes potencialmente carcinógenos, por lo que la mayoría de los compuestos que han logrado ser identificados, son aquellos a los que grupos de trabajadores se han visto expuestos a concentraciones elevadas y por períodos prolongados (Infante y Wagoner, 1976), o bien, son medicamentos de administración crónica o drogas de abuso (Villalobos-Pietrini, *et al.*, 1977; Espinoza-Aguirre, *et al.*, 1987). De aquí la importancia que tiene el hecho de saber que la mayoría de los carcinógenos son capaces de producir mutaciones y que la primera etapa en el proceso del cáncer, conocida como iniciación, obedece a una mutación, como lo sugieren los datos que apoyan la teoría genética del origen del cáncer (Braun, 1975).

En virtud de todo lo anterior, las pruebas para detectar mutágenos, son consideradas en la actualidad como una alternativa en el monitoreo de carcinógenos ambientales, dado que los agentes mutagénicos pueden constituir un riesgo reproductivo para la población, ya que se considera que las mutaciones pueden causar un incremento en la incidencia de esterilidad, abortos, muertes perinatales y padecimientos hereditarios. De aquí, que el monitoreo de mutágenos en muestras de agua, aparezca como un elemento adecuado, indicador de riesgos, que puede tambien emplearse como el criterio que determinará en que sitios deberá realizarse un análisis químico preciso, para identificar a los agentes potencialmente genotóxicos y sus posibles fuentes emisoras. Debe entenderse que solo después de haber caracterizado analítica y cuantitativamente a los contaminantes responsables de la actividad mutagénica, puede ser posible evaluar la magnitud

del riesgo, mientras tanto, lo más importante es establecer un registro permanente en el que se recopile la información proveniente del monitoreo de mutágenos, ya que ésta información podrá ser de gran utilidad para establecer sistemas de evaluación epidemiológica en las áreas en que se detecten riesgos.

Existen diversos sistemas de prueba para detección de mutágenos que no incluyen al ser humano como sujeto de ensayo, de acuerdo a su nivel, podemos mencionar: ADN, Virus, bacterias, hongos, cultivos de células de mamíferos, plantas, insectos y mamíferos (Tabla 1).

ADN.- Las pruebas con ADN, a pesar de sus limitaciones, permiten estimar en poco tiempo el efecto que puede tener un compuesto dado si logra in vivo llegar hasta esta molécula, estas pruebas permiten además, deducir el mecanismo de acción del compuesto probado (Brookes y Lawley, 1964; Searle, 1984).

VIRUS.- Los ensayos con virus se emplean en pruebas virus-bacteria, en los cuales la actividad mutagénica se mide en base a la capacidad que tenga un compuesto de activar o liberar la replicación de los virus (fagos) que se encuentran integrados en el cromosoma bacteriano y que debido a esta activación producen la muerte de la bacteria (Mamber, 1984).

SISTEMAS BACTERIANOS.- Los sistemas bacterianos permiten determinar la inducción de mutaciones génicas además de que proveen indicios de los mecanismos a través de los cuales se producen las mutaciones, y dan información sobre la capacidad mutagénica de los compuestos probados (Ames, 1973a; Leifer, et al, 1981; Quillardet, et al, 1985).

HONGOS.- Los hongos como sistema de prueba se asemejan más a los mamíferos en cuanto a que sus células poseen un núcleo y el ADN esta agrupado en cromosomas y asociado a nucleoproteínas. Sus ciclos de división incluyen procesos mitóticos y meióticos. Las pruebas comprenden mutaciones génicas, recombinación mitótica, conversión génica y segregación cromosómica defectuosa (no disyunción) (Zimmerman, 1973; Zimmerman et al, 1984).

CULTIVOS CELULARES.- Los cultivos celulares son sistemas de prueba técnicamente más complejos, en ellos se utilizan diferentes líneas y tejidos celulares y aunque no en el mismo grado que los microorganismos, permiten obtener resultados en corto tiempo, en experimentos controlados. Estos ensayos son adecuados para el estudio de mutaciones génicas y aberraciones cromosómicas numéricas y estructurales. En estos ensayos se puede incluir el uso de activadores metabólicos complementarios (Brusick, 1986; Liber y Thilli, 1982; Crespi y Thilly, 1984; Simons, 1982; Howell, et al, 1984).

PLANTAS.- Las plantas se han utilizado generalmente como medidores biológicos del efecto de contaminantes tales como: Plaguicidas, herbicidas, fertilizantes químicos y otras sustancias en el medio, además de que pueden utilizarse en

laboratorio bajo condiciones controladas. Debido a que las plantas metabolizan los compuestos en forma diferente a como lo hacen los mamíferos, es posible que algunos compuestos que son inócuos para estos últimos en forma directa, puedan transformarse en metabolitos activos por la acción de las plantas, y convertirse en un riesgo para los consumidores. En las plantas se pueden valorar mutaciones génicas y aberraciones cromosómicas. Las especies más utilizadas son:

Tradescantia paludosa, Allium cepa y Vicia faba (Ehrenberg, 1975; Kihlman, 1975; Ronchi, 1970; Christianson, 1975).

**INSECTOS.-** De entre los insectos, la mosca de la fruta, Drosophila melanogaster es la más utilizada debido al amplio conocimiento que se tiene de su genética, y porque se reproduce en muy poco tiempo, además de que requiere un mantenimiento relativamente mínimo. Por estas causas son el animal más rápido y eficiente para detectar mutaciones génicas y cromosómicas en células germinales, tiene además la capacidad de metabolizar los compuestos de manera muy similar a como lo hacen los mamíferos, y es susceptible de ser usada como medidor biológico (Baars, 1980; Fujikawa, et al 1975).

**MAMIFEROS.-** El mamífero más estudiado desde el punto de vista genético, es el ratón, esto lo hace un organismo ideal para la identificación de mutágenos, se puede utilizar en la evaluación de mutaciones génicas, somáticas y germinales. Los ensayos con mamíferos, son de mayor complejidad y tiempo de realización más amplio, por lo que su costo es también más elevado (Nettesheim, 1972; Shubick, 1972; Adams, 1978; Fox, 1977; Brusick, 1986).

Más recientemente se han enfocado los esfuerzos de los investigadores en el uso de biomarcadores de exposición. Los biomarcadores pueden ser definidos como indicadores de exposición a contaminantes ambientales de un organismo expuesto. La evaluación de los biomarcadores en un sistema biológico puede ser utilizada para identificar y cuantificar la exposición directa a sustancias de riesgo (Stevens et al, 1992). Los biomarcadores se han utilizado como una nueva forma de evaluación de los efectos del medio sobre el organismo humano (Hanke et al, 1992), y como indicadores de daño al ADN (Norpoth, 1993). La inducción de enzimas en el hígado de mamíferos por diversos compuestos, así como algunos ensayos para la determinación de actividad mutagenica (intercambio de cromátidas hermanas en meristemas radiculares de vegetales o en linfocitos humanos) pueden ser utilizados con éxito como biomarcadores de exposición. Debe considerarse también el desarrollo de inmunoensayos específicos para biomarcadores de exposición de los efectos de agentes químicos ambientales (Rosner, 1991).

#### IV. JUSTIFICACION

La presencia de varios cientos a varios miles de compuestos en aguas potables y tratadas, en una fracción de  $\mu\text{g/ml}$  parece ser la regla más que la excepción. Individualmente, muchos de estos compuestos pueden contribuir en muy poco a la aparición de enfermedades humanas (con la excepción tal vez de los THM), sin embargo, todos ellos sumados aumentan desde uno a varios miligramos la concentración total de contaminantes orgánicos por litro de agua y pueden explicar algunos de los riesgos sugeridos por los datos epidemiológicos (Wilkins et al., 1979).

El abrumador número de compuestos químicos reportados en aguas potables, sus bajas concentraciones individuales, las complicaciones asociadas con la desinfección y la necesidad de demostrar la reducción o eliminación del riesgo carcinogénico por agua potable, residual y renovada a través de varias opciones de tratamiento, dictaminan la necesidad de un ensayo para la evaluación de tal riesgo en éstos tipos de aguas. Los resultados obtenidos de tales ensayos pueden arrojar más luz acerca de la amenaza ambiental provocada por la presencia de sustancias genotóxicas en el agua, y pueden servir además para alertar a las agencias responsables del ambiente de la problemática y riesgo potencial que representan las aguas contaminadas con compuestos genotóxicos así como la necesidad de análisis biológicos y químicos más detallados.

## V. HIPOTESIS

Si los dispositivos para muestreo en campo permiten una mayor capacidad de muestreo (Mayor número y volumen de muestra) y su diseño permite que sean artefactos herméticos y transportables, entonces, el uso de éstos dispositivos aumentará la probabilidad de detectar actividad mutagénica en una muestra dada y contribuirá a minimizar los problemas de transformación química que pueden sufrir las muestras.

## VI. OBJETIVOS

Debido a que la identificación de actividad mutagénica en mezclas ambientales, representa un primer paso en la estimación de un riesgo potencial a la salud humana por la exposición que pueden sufrir los individuos ante tales mezclas, en el presente trabajo se proyecta:

- a) Establecer una técnica que permita la rápida recuperación y posterior evaluación mutagénica de concentrados orgánicos provenientes de muestras de grandes volúmenes de agua, diseñando para tal efecto, dispositivos que permitan la toma de muestras en cualquier tipo de instalación hidráulica o embalse de agua, además de minimizar los efectos de transformación química de las muestras.
- b) Seleccionar un bioensayo para determinar la actividad mutagénica de los concentrados aislados a partir de las muestras de agua. El bioensayo debe ser reproducible, sensible, debe permitir el análisis de un número de muestras relativamente grande en intervalos cortos de tiempo (1000 muestras por año), y debe ser económico.
- c) Realizar ensayos para determinación de actividad mutagénica en muestras de agua provenientes de instalaciones de distribución de agua potable, y fuentes de agua residual y tratada.
- d) Aplicar el método estadístico conocido como la prueba de la duplicación para definir si un resultado es positivo o negativo.
- e) Elaborar una base de datos que permita la recopilación de los datos obtenidos de los bioensayos y facilite la consulta de los mismos.
- f) Ubicar dentro de la zona metropolitana del Distrito Federal, los sitios y/o tipos de agua que representen un riesgo a la salud de la población por la presencia de compuestos con actividad mutagénica.

## VII. METODOLOGIA

La metodología para la realización del presente trabajo se llevo a cabo bajo el siguiente protocolo:

- a) Elección de los sistemas de monitoreo y concentración de muestras, realizando una revisión de los métodos de extracción, concentración y aislamiento de compuestos orgánicos a partir de muestras de agua.
- b) Diseño de los dispositivos de muestreo, que cumplan con los requisitos establecidos en los objetivos.
- c) Preparación de los dispositivos para el muestreo en campo.
- d) Aislamiento de los compuestos orgánicos a partir de agua en sitios de distribución de agua potable y fuentes de agua residual y tratada, utilizando los sistemas seleccionados en el punto (a).
- e) Recuperación de los concentrados orgánicos y obtención de las muestras para análisis biológico, utilizando métodos acordes al sistema de concentración o aislamiento seleccionado en el punto (a).
- f) Elección del sistema de prueba más adecuado para la determinación de mutagenicidad en muestras de agua.
- g) Obtención y conservación de los organismos de prueba.
- h) Confirmación de la estabilidad de los organismos de prueba.
- i) Obtención de la mezcla de activación metabólica, en caso de elegir un sistema que la requiera.
- j) Realización de las pruebas de mutagenicidad de los concentrados orgánicos obtenidos.
- k) Determinación de la actividad mutagénica, interpretación de los datos proporcionados por el sistema de prueba elegido.
- l) Elaboración de un programa de captura, proceso y reporte de resultados.

### VIII. AREA DE ESTUDIO

Debido a que las técnicas que se describen y desarrollan en el presente trabajo formaran parte del sistema de vigilancia de la calidad del agua establecido en el Laboratorio Central de Control de Calidad del Agua, dependiente de la Dirección General de Construcción y Operación Hidráulica del D.D.F., el área de estudio se ubicó dentro de los límites del Distrito Federal, incluyendo todas las delegaciones y algunos sitios localizados en la zona conurbada del Estado de México (Mapa 1).

En el D.F. existen un total de 1290 instalaciones entre las cuales se encuentran, 847 pozos, 243 tanques de almacenamiento, 183 rebombeos, 4 plantas potabilizadoras, y 13 plantas de tratamiento de agua residual, 3 de las cuales cuentan con tratamientos avanzados. Del Edo. de México se muestrearon las instalaciones que contribuyen al abastecimiento de agua del Distrito Federal, incluyendo las grandes entradas de agua provenientes del sistema Lerma-Cutzamala, denominadas en este trabajo como "Agua En Bloque". Todos estos sitios representan el universo de muestreo comprendido dentro del área de estudio.

#### VIIIa. DETERMINACION DE LOS SITIOS DE MUESTREO

Con la finalidad de probar el dispositivo en diferentes instalaciones hidráulicas, se realizaron muestreos en sitios tales como: Pozos profundos, plantas de bombeo, tanques de almacenamiento, plantas potabilizadoras y plantas de tratamiento de agua residual. Figs. 3, 4, 5, 6 y 7. Se dio prioridad al agua potable con el objeto de determinar un riesgo potencial asociado con el consumo.

## IX. ELECCION DE LOS SISTEMAS DE MUESTREO Y CONCENTRACION

En el presente trabajo, el monitoreo requiere de grandes volúmenes de muestra (>100 litros), recolectados en campo de varios sitios diferentes. Cada sitio de muestreo presenta características especiales de toma de muestra y problemas particulares, por lo que, los dispositivos de muestreo y los sistemas de concentración utilizados, deben tener las siguientes características:

- a) Deben permitir la concentración/aislamiento a partir de grandes volúmenes de muestra.
- b) Deben ser completamente manipulables y transportables.
- c) Debe permitir la conservación de la muestra a baja temperatura desde el sitio del muestreo hasta el laboratorio de análisis.
- d) Debe impedir la exposición de las muestras al aire, luz y humedad externa durante su transportación y tratamiento.
- e) Deben ser técnicamente sencillos y de rápida realización.
- f) Deben ser relativamente económicos.

Dadas las necesidades de monitoreo requeridas, y en base a los datos proporcionados anteriormente, el método de obtención de muestras seleccionado para el presente trabajo, debe ser un método de adsorción-elución que retenga los compuestos que se desean obtener al hacer pasar la muestra de agua por una columna empacada con un sólido, para que posteriormente los compuestos retenidos, sean eluidos con solventes orgánicos.

De todos los métodos de adsorción-elución, los que utilizan resinas macrorreticulares han presentado los mejores resultados en el aislamiento de orgánicos (Williams, 1982). Debido a su simplicidad, estas técnicas parecen ser unas de las más adecuadas en la preparación de muestras para análisis biológicos, aunque debe tenerse en cuenta, que no todos los compuestos serán retenidos, y no todos los que son retenidos, pueden ser totalmente recuperados. Por lo anterior, y a pesar de las limitaciones de estos procedimientos, el material adsorbente elegido fue el correspondiente a resinas macrorreticulares del tipo XAD en sus dos principales presentaciones, (Estireno divinil benceno y metil acrilato).

## **X. DISEÑO DEL DISPOSITIVO DE MUESTREO**

Con la finalidad de facilitar su manipulación en campo, y asegurar su durabilidad, además de ser de un material utilizado en las tuberías de conducción que no permite el paso de los rayos solares, el dispositivo se fabricó con un tubo de cobre de una longitud de 25 cm y 19 mm de diámetro, en ambos extremos del tubo se soldaron conectores de cobre con cuerda externa de 19 mm de diámetro, para permitir el acoplamiento de conexiones terminales (conexiones para manguera). Las conexiones para manguera se acoplan a los conectores colocando entre ambas piezas un anillo de hule (empaque para manguera) para evitar fugas. Fig. 8.

## **XI. PREPARACION DE LAS RESINAS ADSORBENTES**

Las resinas son producidas para uso industrial y contienen muchos contaminantes de alto peso molecular, pero pueden ser preparadas para su uso en laboratorio mediante varias extracciones con metanol, dietil eter y acetonitrilo (Junk et al., 1974), u otros solventes. Antes de su uso, las resinas deben ser evaluadas para asegurar que la extracción en efecto ha removido los contaminantes de las resinas en el grado requerido. Si las partículas de las resinas se dejan secar, pueden romperse exponiendo nuevamente los contaminantes en la superficie, por lo que las resinas lavadas deben ser almacenadas en metanol hasta que sean usadas. El procedimiento para el lavado de las resinas utilizado en el presente trabajo, fue el siguiente:

En una vaso de precipitados de 2 litros, se coloca la cantidad de resina requerida (aproximadamente 10g por muestra). Agregar metanol (grado cromatográfico) hasta cubrir la resina, decantar y deshechar el solvente. El procedimiento se repite utilizando acetonitrilo en lugar de metanol, y se efectúa una tercera vez sustituyendo ahora el acetonitrilo por éter. Finalmente se da un último lavado con metanol, deshechando el solvente. La resina así lavada se almacena en metanol y se conserva a 4°C hasta su uso. Este procedimiento se realiza para cada uno de los dos tipos de resina utilizados.

## **XII. EMPAQUETAMIENTO DE LOS DISPOSITIVOS DE MUESTREO**

La preparación de los dispositivos de muestreo se realiza de la siguiente manera:

Se preparan dos dispositivos de muestreo, (uno para cada tipo de resina). Lavar cada dispositivo perfectamente y enjuagarlo con agua destilada, posteriormente colocar en dos conexiones terminales un soporte (soporte de un filtro Swinex), una porción adecuada de fibra de vidrio y un empaque para manguera, como se indica en la figura 9.

Colocar en uno de los extremos del dispositivo una de las conexiones preparadas en el punto anterior y obstruir la salida mediante una manguera látex y una pinza Hoffman. Agregar al dispositivo por el extremo abierto, 20 ml de la resina preparada (XAD2 o XAD4), llenar el espacio restante en la columna con agua destilada y colocar la otra conexión terminal en este extremo del dispositivo. Terminado el empaquetamiento de los dos dispositivos, se conectan en serie utilizando un niple de acoplamiento, el dispositivo así conectado, está listo para su utilización.

### XIII.

#### AISLAMIENTO DE COMPUESTOS ORGANICOS EN INSTALACIONES HIDRAULICAS.

El dispositivo de muestreo se traslada hasta el sitio donde se tomará la muestra. Mediante conexiones y adaptadores de diferentes medidas, se conecta el dispositivo a la toma de la instalación que se va a muestrear, en el caso de algunos tanques y embalses, se incluye una bomba (eléctrica o de combustible), entre los implementos de muestreo. Una vez conectado el dispositivo, se libera la obstrucción de la parte inferior del mismo, y se deja fluir el agua, controlando el flujo con la llave de la misma instalación o con la pinza Hoffman, en caso de utilizar la Bomba, el flujo se regula con el control de velocidad de la bomba y se realiza una conexión paralela para liberar presión. El flujo en cualquiera de los casos se ajusta a 280 ml/min. y se deja fluir el tiempo necesario para que pasen 100 litros de muestra. Las tasas de flujo se aproximan a las sugeridas por Williams (1982), y se ajustan a las necesidades propias del trabajo. Transcurrido el tiempo requerido, el dispositivo se retira, se obstruyen ambas terminales y se transporta hacia el laboratorio para su elución y análisis en condiciones que permitan su conservación (a 4°C). En el caso de las plantas de tratamiento de agua residual, la colecta de la muestra se realizó en garrafones de 20 litros de volumen y la concentración se efectuó en el laboratorio mediante el uso de una bomba peristáltica. Este muestreo sirve de marco para comparar los procedimientos de muestreo en campo (uso del dispositivo diseñado) y en laboratorio (limitaciones en el volumen, y riesgo de transformación química).

#### XIV. RECUPERACION DE LOS CONCENTRADOS Y OBTENCION DE LAS MUESTRAS

Una vez que las muestras llegan al laboratorio, se liberan las obstrucciones y se deja escurrir el agua del interior del dispositivo, se elimina el total del agua succionandola por la parte inferior del dispositivo mediante vacío (debe incluirse una trampa para el agua). No debe permitirse que la resina en el dispositivo se seque. Ya que se ha extraído el agua, retirar la terminal superior y agregar 100 ml de una mezcla de hexano/acetona (85:15 v/v), controlando el flujo mediante una manguera latex y una pinza Hoffman a una tasa de 15 ml/min., el eluido se colecta en un vaso de precipitados de 250 ml y se divide en 5 partes, cuatro quintas partes se utilizan para los ensayos biológicos, y una quinta parte para el análisis cromatográfico. La parte destinada al análisis biológico, se coloca en un vaso de 100 ml y se evapora al vacío hasta sequedad, posteriormente se resuspende en 4 ml de dimetil sulfóxido grado cromatográfico. El eluido final (4 ml), representa la muestra y se almacena en un vial de vidrio boro-silicato a una temperatura bajo cero (para disminuir la actividad química), hasta su utilización. La parte destinada al análisis cromatográfico, se evapora al vacío hasta sequedad y se resuspende en 1.5 ml de cloruro de metileno grado cromatográfico para ser analizada por cromatografía de gases y espectrofotometría de masas.

#### XV. REHABILITACION DE LOS DISPOSITIVOS DE MUESTREO.

Para que los dispositivos puedan ser reutilizados deben ser correctamente descontaminados para lo cual se lleva a cabo el procedimiento siguiente:

Una vez eluida la muestra con la mezcla de solventes (Punto XIV), la resina es extraída y empacada para su destrucción por incineración. Los cartuchos vacíos se lavan perfectamente con detergente neutro con la ayuda de una esponja o de un cepillo de cerdas naturales. Se elimina el detergente mediante un lavado con agua. Posteriormente se realiza un "pulimento" colocando dentro del cartucho una solución 0.1N de ácido nítrico permitiendo un tiempo de contacto de 5 min. Después de esto los cartuchos se lavan con agua tridestilada y desionizada y se secan en horno a 50 C. Una vez realizado éste proceso, los cartuchos están listos para su reutilización.

## **XVI. ELECCION DEL SISTEMA DE PRUEBA**

En el caso particular de un monitoreo rutinario de mezclas complejas ambientales, en el cual se requiere del ensayo de un número elevado de muestras, para el establecimiento de programas de vigilancia permanente (aproximadamente 1000 muestras por año), el sistema de prueba elegido, debe satisfacer los siguientes puntos:

- Debe ser un sistema de pruebas de corta duración y de fácil realización.
- El sistema de prueba debe ser relativamente económico y de materiales de fácil adquisición.
- Debe ser una reproducible.
- Debe ser sensible.
- El sistema elegido debe ser capaz de predecir carcinogenicidad, en base a un alto índice de coorelación mutagénesis-carcinogénesis

Tomando en cuenta todos los puntos analizados anteriormente, y enfatizando que el trabajo que se pretende realizar requiere del análisis de un número relativamente grande de muestras, que las muestras corresponden a mezclas complejas en las que sólo se pueden ensayar dosis únicas y que los resultados de los ensayos deben reportarse en poco tiempo, los sistemas bacterianos aparecen como los más adecuados para análisis de esta clase, ya que actualmente, las pruebas a corto plazo de este tipo se han convertido en una útil herramienta experimental para investigar el riesgo a la salud humana asociado con el agua (Loper, 1980), por tal motivo, en el presente trabajo se eligió un sistema de estas características para el análisis de la actividad mutagénica en muestras de agua potable, residual y renovada.

## **XVII. SISTEMAS BACTERIANOS**

La bioquímica y la genética de las bacterias han sido objeto de diversos estudios durante años. No obstante su aparente simplicidad, comparadas con organismos eucariontes, las bacterias poseen elaborados mecanismos para responder a los daños ocasionados al ADN. Las bacterias, por lo tanto, son comunmente usadas, tanto en estudios fundamentales de los mecanismos involucrados en la respuesta biológica al daño al ADN, como en ensayos a corto plazo para medir el potencial carcinogénico de algunos compuestos. Estos estudios han contribuido al concepto comunmente aceptado de que el daño al ADN esta involucrado en los procesos de carcinogénesis, sin embargo, ciertos cánceres, son inducidos por agentes que no parecen causar daño al ADN, y tales agentes no pueden ser detectados por ninguna prueba diseñada para mutágenos.

Las respuestas bacterianas a los daños al ADN, incluyen conocidos efectos celulares como son: Inducción de mutaciones, muerte selectiva de células con sistemas deficientes de reparación al ADN, y la producción de bacteriófagos por bacterias lisogénicas, otros más recientes incluyen el uso de respuestas moleculares, tales como la inducción de genes específicos, como los genes involucrados en la respuesta SOS. Todas las pruebas a corto plazo que utilizan bacterias, constan de dos componentes principales: la célula blanco y un sistema de activación metabólica. El sistema metabolizante es aportado de manera exógena, aunque las capacidades endógenas de las células blanco no deben ser ignoradas, y deberan ser tomadas en cuenta en la interpretación de los resultados (Venitt et al., 1983; Tweats et al., 1984).

El conocimiento sobre la respuesta bacteriana hacia los agentes que dañan al ADN ha progresado considerablemente desde 1980 (IARC, 1980). En particular, la naturaleza química de las lesiones al ADN, los procesos enzimáticos de estas lesiones, la regulación de la síntesis de estas enzimas y los mecanismos de la mutagénesis, son ahora mejor comprendidos (Walker, 1984), permitiendo un profundo entendimiento de las bases científicas de las pruebas bacterianas, una mejor interpretación de las respuestas de las pruebas establecidas y apoyo para el desarrollo de nuevas técnicas.

Dependiendo de la naturaleza de la lesión y de su posición, en particular con respecto a la horquilla de replicación de la doble hélice de ADN, cada lesión puede constar al menos de cuatro fases, las cuales no son mutuamente exclusivas ni excluyen otras posibilidades (Fig 10). En primer lugar, la lesión puede ser procesada sin efecto mutagénico, esto puede ocurrir por reversión de la mutación (debido por ejemplo a la enzima fotoliasa), o por reparación de la lesión mediante el mecanismo de escisión (debida por ejemplo, a la endonucleasa Uvr y otras enzimas). En segundo lugar, la lesión puede provocar directamente codificación errónea. En tercer lugar la lesión puede inducir respuesta SOS, la cual incluye mutagénesis SOS. Finalmente, la lesión puede inducir otras respuestas tales como: La respuesta adaptativa hacia agentes alquilantes, la respuesta hacia agentes oxidantes y la respuesta al shock térmico.

La producción de mutaciones ocurre por mutación pasiva y activa y por mutación SOS. La inducción del fago es predominantemente una consecuencia de la inducción SOS, aunque es posible también, que sea el resultado de mutaciones en el gen Cl. El mecanismo de muerte preferencial es debido principalmente a mecanismos de reparación como el de escisión, respuesta SOS o respuestas adaptativas. Todo esto confirma que el efecto final se debe a varios factores, y no es un simple reflejo de la lesión inicial.

Aunque las pruebas bacterianas estan diseñadas para predecir efectos en eucariontes, tienen algunas limitaciones debidas a las diferencias entre los tipos celulares, por ejemplo, el ADN de

células eucariontes, a diferencia de las células procariontes, esta agrupado en cromosomas, los cuales están rodeados por una membrana nuclear, y, algo de mayor importancia es que la respuesta al daño al ADN puede ser diferente.

En la actualidad se han desarrollado un gran número de pruebas bacterianas. Para seleccionar una prueba se deben considerar los siguientes criterios:

- a) Reproducibilidad de la prueba dentro del mismo laboratorio y entre laboratorios.
- b) Sensibilidad de la prueba basándose en los siguientes parámetros:
  - i) Dosis mínima con la cual se obtiene una respuesta positiva.
  - ii) Dosis máxima que puede ser probada.
- iii) Posible rango de variación entre la respuesta máxima y mínima. La respuesta máxima puede estar limitada por el efecto tóxico sobre las células. La diferencia entre sensibilidades puede deberse a factores como: La permeabilidad y la capacidad de reparación de los organismos, el procedimiento experimental (como por ejemplo, ensayos de incorporación en placa vs ensayos de preincubación en líquido), sistemas de activación metabólica, coomutágenos y cofactores en el sistema de activación.
- c) Rapidez.- Que tan largo es un experimento, y cuantos experimentos se necesitan (incluyendo controles y duplicados), para probar una muestra o un compuesto, satisfactoriamente.
- d) Simplicidad.- Que operaciones y equipos se requieren para realizar un procedimiento estandar de rutina, y el número de cepas bacterianas que se necesitan para realizar la prueba.
- e) Complejidad.- Las pruebas bacterianas son relativamente fáciles de realizar, pero debe de tomarse en cuenta el nivel de experiencia técnica requerido, ya que en la mayoría de los casos, las pruebas van más allá de una simple rutina de procedimientos.
- f) Cuantificación.- Que la prueba sea capaz de producir curvas dosis-efecto reproducibles.
- g) Protocolos.- Que se cuente con protocolos estándar bien establecidos, y apropiados controles internos.
- h) Costos y mano de obra.- Debe quedar claro que la consideración de los costos no deberá ser a expensas de la calidad de los resultados de la prueba, no se deben omitir controles ni duplicados a riesgo de invalidar los resultados
- i) Existencia de bases de datos.- Conocer el número de compuestos y clases de compuestos que han sido analizados en

la prueba, el número de laboratorios que usan la prueba y el número de años que ha sido usada.

- j) Conocimiento de los mecanismos.- Es aconsejable conocer los mecanismos mediante los cuales el organismo de prueba actúa, para así poder conducir e interpretar un resultado dado.
- k) Número de cepas requerido para el análisis.- Algunos ensayos requieren de la combinación de un número determinado de cepas para una evaluación completa, mientras que otros, solo requieren de una y esto reduce los costos y los tiempos de realización. En resumen la elección de una prueba debe ser realizada tomando en cuenta además de todos los factores anteriores, dos factores de suma importancia que son: Los objetivos y propósitos de la misma.

#### XVIII. VALOR PREDICTIVO DE LAS PRUEBAS BACTERIANAS

Los mecanismos moleculares de la respuesta de bacterias hacia agentes genotóxicos están en algunos casos ya bien esclarecidos. En el caso de las células de mamífero, el conocimiento es mucho más limitado, a pesar de los recientes progresos nuestros conocimientos sobre los mecanismos moleculares de la carcinogénesis son aún muy restringidos, por lo que es prematuro utilizar modelos teóricos para extrapolación desde respuestas en pruebas bacterianas a carcinogénesis.

En la práctica, el valor predictivo de las pruebas bacterianas, así como para todas las pruebas a corto plazo, está establecido empíricamente, correlacionando los resultados obtenidos en pruebas bacterianas con los que se obtienen en pruebas de carcinogenicidad utilizando animales, pero a pesar de todo, el concepto más importante es que las mutaciones puntuales, revelan un daño al ADN, y este daño puede estar, muy probablemente, involucrado en carcinogénesis.

## XIX. VALIDACION DE LAS PRUEBAS BACTERIANAS

Las pruebas bacterianas han sido validadas comparando los resultados obtenidos con una amplia variedad de compuestos carcinógenos y no carcinógenos. La sensibilidad (El porcentaje de resultados positivos), la especificidad (El porcentaje de resultados negativos) y la exactitud (El porcentaje de resultados correctos) de las pruebas, se ha calculado de la siguiente forma: (Cooper et al., 1979).

$$\text{SENSIBILIDAD} = \frac{\text{No.de carcinog.que dieron resultado positivo} \times 100}{\text{No. de carcinógenos probados.}}$$
$$\text{ESPECIFICIDAD} = \frac{\text{No.de carcinog.que dieron resultado negativo} \times 100}{\text{No. de carcinógenos probados.}}$$
$$\text{EXACTITUD} = \frac{\text{No. de resultados correctos} \times 100}{\text{No. de compuestos químicos probados}}$$

Los resultados de validación son generalmente reportados, tanto de los laboratorios que originalmente establecieron los métodos de prueba, así como de otros laboratorios en los que las pruebas son utilizadas, sin embargo, los resultados dependen de la frecuencia de respuestas positivas a carcinógenos, que un compuesto tiene en los diferentes ensayos, y este resultado, puede estar influenciado por la prueba seleccionada. Las discrepancias entre resultados pueden deberse en gran parte al número tan limitado de compuestos probados, y a las diferencias en la pureza de los compuestos químicos utilizados en los diferentes laboratorios. Otro método de validación para estas pruebas, son los estudios de colaboración nacional e internacional, en los cuales se ensayan compuestos del mismo lote, utilizando la misma prueba (de Serres y Ashby, 1981; Dunkel et al., 1984,1985).

La capacidad de predicción de un ensayo puede ser definida como "La probabilidad de que un compuesto químico probado sea un carcinógeno (siempre que el resultado sea positivo), o como la probabilidad de que el compuesto químico no sea carcinogénico, (siempre que el resultado haya sido negativo)." Algunos investigadores han sugerido que estas probabilidades pudieran ser calculadas a partir de sensibilidades y especificidades conocidas para cada ensayo (Rosenkranz et al., 1984; Chang et al., 1985). Obviamente, el valor predictivo de un ensayo debe ser considerado antes de hacer la selección de alguno de ellos.

Muchos ensayos bacterianos ya han sido evaluados y se ha determinado su valor predictivo (Pet-Edwards., 1985),

encontrándose que algunos de ellos son mejores predictores de carcinógenos que de no-carcinógenos, y viceversa, y a este respecto se pudo determinar que los ensayos bacterianos no son muy diferentes que los ensayos con mamíferos en la detección de mutágenos y daño al ADN.

En la tabla 2, se enlistan una serie de ensayos bacterianos para la determinación de actividad mutagénica de compuestos químicos, y se enumeran sus características, únicamente restaría hacer referencia a los ensayos de bioluminiscencia (Ulitzer et al., 1980; Ulitzer & Weiser, 1981), pruebas de transposición (Data et al., 1983; Shinder et al., 1984), y Multitest (Toman et al., 1985).

En base a las características de las diferentes pruebas enumeradas en la tabla 2, se determinó que la prueba que ofrece las mayores ventajas en cuanto a sensibilidad, validación, simplicidad y rapidez, es la conocida como Salmonella microsome assay. La prueba, también ha demostrado tener un buen porcentaje de exactitud y predictividad de carcinógenos (Takachi et al., 1980), y una variabilidad aceptable, traducida en una buena reproducibilidad (Carol Cheli et al., 1980), es además una prueba de fácil realización y relativamente bajo costo, por lo que fué la prueba seleccionada para el presente trabajo. La prueba elegida es sensitiva porque: Una población bacteriana grande es expuesta al agente de prueba; porque la bacteria se divide en presencia del compuesto probado y un sistema metabolizante, además de ser deficiente en sus sistemas de reparación; porque la pared de la bacteria es permeable a compuestos de alto peso molecular, y porque las mutaciones en el operón de la histidina proporcionan muchos puntos vulnerables a una gran variedad de compuestos químicos electrofílicos. Las características de las cepas utilizadas se presentan en el anexo 3.

## XX. CARACTERISTICAS DE LA PRUEBA CON Salmonella.

Salmonella microsome Assay (Ames et al., 1973a,b; Maron y Ames, 1983), es la más popular y más frecuentemente usada prueba bacteriana para determinación de actividad mutagénica. Esta prueba, que ha sido valorada ampliamente (Kier et al., 1986), utiliza cepas mutantes de la bacteria Salmonella typhimurium, que han sufrido una alteración genética, de manera que no son capaces de producir histidina, un aminoácido esencial para su crecimiento. El sistema, en términos generales, se basa en que la presencia de sustancias genotóxicas en el medio de cultivo que se utiliza en la prueba, provocará, siguiendo los mismos pasos que provocaron la mutación en la bacteria, un proceso inverso denominado reversión, el cual, una vez que ha sucedido, permitirá que las bacterias produzcan histidina, y puedan crecer en el medio que han sido sembradas. El medio utilizado contiene trazas de histidina y en una primera etapa ocurre un crecimiento de toda la población auxótrofa en presencia del compuesto hasta agotar toda la histidina presente, en una segunda etapa, sólo aquellas bacterias que pudieron mutar por efectos del compuesto

probado, podrán continuar creciendo para formar colonias visibles de bacterias protótrofas.

Las cepas utilizadas en esta prueba, tienen un determinado y constante porcentaje de reversión espontánea, cuando son sembradas en el medio mencionado, y sin que haya sustancias genotóxicas presentes, o cuando se adiciona una sustancia con la función de control negativo o blanco. La diferencia entre el porcentaje de reversión espontánea y el porcentaje de reversión inducida, producido por la presencia de las sustancias puestas a prueba, nos indicará si dichas sustancias poseen actividad genotóxica o no. En la prueba se incluye un homogenado de hígado de roedores (o de otros tejidos de mamíferos), como una aproximación al metabolismo de mamíferos (Ames et al., 1973a; IARC, 1980).

Para 1983, se contaba con datos de más de 5000 compuestos químicos probados con este método (Maron & Ames, 1983), tres años después, el número de compuestos probados de esta manera, había crecido enormemente (Kier et al., 1986).

La reproducibilidad de los protocolos estandar de la prueba de Salmonella ha sido evaluada en varios trabajos interlaboratorio (Venitt, 1982; Haworth et al., 1983; Dunkel et al., 1984; Venitt y Foster, 1985). Las pruebas de evaluación no se han limitado únicamente a los protocolos, sino que también han incluido estudios sobre la naturaleza bioquímica de las cepas recomendadas.

## **XXI. OBTENCION Y CONSERVACION DE LOS ORGANISMOS DE PRUEBA**

Para el presente trabajo se utilizaron dos cepas bacterianas de Salmonella typhimurium: TA100 y TA98.

Las cepas TA100 y TA98, son capaces de detectar en conjunto, mutaciones por sustitución de bases y mutaciones por corrimiento de marco (frame-shift). (Barnes et al., 1982).

Las cepas bacterianas fueron proporcionadas por la doctora Christine de Bellecombe, de la Unidad de Programación Molecular y Toxicología Genética del Instituto Pasteur (Francia).

Una vez obtenidas las cepas bacterianas se procedió a realizar reservas de ellas para asegurar su disponibilidad. Las reservas permanentes se almacenaron en nitrógeno líquido, utilizando Dimetil sulfóxido grado cromatográfico como crioprotector, mediante el siguiente procedimiento:

En un matraz erlenmeyer con tapón de rosca de 250 ml, se colocaron 2.5g de caldo nutritivo OXOID No 2 y 100 ml de agua destilada, la mezcla se homogeizó y esterilizó en autoclave (121°C/15 lb de presión). Este medio se utilizó para sembrar con ayuda de un asa, la cepa bacteriana correspondiente (TA98 o TA100). El matraz inoculado, se incubó en baño maria por espacio de 16 horas, hasta alcanzar una densidad aproximada de  $1.2 \times 10^7$ , pasado el tiempo requerido para alcanzar la densidad celular deseada, en una botella de dilución estéril, se colocó una mezcla de suspensión bacteriana y dimetil sulfóxido (0.09 ml de dimetil sulfóxido por ml de suspensión bacteriana), la mezcla se agita suavemente, y posteriormente, en condiciones asepticas se distribuye en crioviales de 1.2 ml de volumen, estériles y previamente etiquetados. Los crioviales se llenan hasta cerca del borde para permitir la expansión debida al congelamiento, esto elimina además, el aire que queda en la tapa ayudando a disminuir el daño por oxidación.

Una vez listos, los crioviales se congelan en hielo seco y posteriormente se almacenan en nitrógeno líquido hasta su uso.

Además de estas reservas, se prepararon reservas temporales, que pueden ser almacenadas a 4°C. El uso de reservas temporales, disminuye el riesgo de descongelamiento que se presenta cuando las reservas permanentes son abiertas muchas veces, las reservas permanentes deberan desecharse cuando hayan sido abiertas más de 10 veces.

Las reservas temporales se preparan, realizando a partir de una reserva permanente un aislamiento por estria cruzada, sobre una placa de Ampicilina (ver seccion de medios y reactivos), la placa se incuba durante 48 hrs. a 37°C, después de transcurrido este tiempo, una colonia aislada se retira con ayuda de un asa y se resuspende en 0.3 ml de una solución amortiguadora de fosfatos (ver sección de medios y reactivos) en un tubo de cultivo con tapon de rosca de 13X100 mm, posteriormente, se remoja un hisopo estéril en esta suspensión, se escurre en la

boca del tubo el exeso de líquido y se realizan 5 estrias paralelas sobre la superficie de cada una de tres placas Histidina biotina, (ver sección de medios y reactivos), las placas se incuban durante 16 hrs. a 37°C, transcurrido este tiempo se sellan con una película de Parafina (Parafilm) y se almacenan a 4°C hasta su uso. Las reservas temporales tienen una vida media de dos meses.

## XXII. CONFIRMACION DE LA ESTABILIDAD DE LOS ORGANISMOS DE PRUEBA

Requerimiento de histidina.- Para comprobar el requerimiento de histidina de cada cepa, se utilizaron placas histidina-biotina y placas control (ver sección de medios y reactivos). El procedimiento se realiza para cada una de las dos cepas. En cada placa, con ayuda de un hisopo estéril, se hacen 4 estrias a partir de un cultivo bacteriano fresco, las placas, se incuban 24 hrs. a 37°C, después de transcurrido este tiempo, se comprueba el crecimiento bacteriano en las placas histidina-biotina y la ausencia de crecimiento en las placas control.

Mutación rfa.- La verificación de la existencia de esta mutación se realiza probando la sensibilidad de las cepas bacterianas al Cristal violeta (Ames et al., 1973a). El procedimiento, es el siguiente: De un cultivo de toda la noche, (Aproximadamente 16 hrs.), se toman 0.1 ml y se colocan en un tubo de cultivo 13X100 que contenga 2 ml de agar de superficie fundido y mantenido a 45°C (ver sección de medios y reactivos), el contenido final, se homogeniza en un agitador a vórtice a baja velocidad, y se vacía sobre una placa de agar nutritivo (ver sección de medios y reactivos), se distribuye homogéneamente por rotación de la placa y se deja solidificar. Después de esto, en condiciones asépticas, se coloca un disco estéril de papel filtro (Watman #4) de 1 cm de diámetro en el centro de la caja. Sobre el disco se colocan 10ul de una solución lug/ml de cristal violeta. La placa se incuba a 37°C durante 12 hrs. al cabo de las cuales, se comprueba la sensibilidad de la cepa puesta a prueba, por la aparición de una zona de inhibición del crecimiento alrededor del disco. La muerte celular es producida por el ingreso de moléculas de alto peso molecular al interior de la célula en las cepas en que la membrana ha sido alterada por los efectos de la mutación rfa.

Mutación UvrB.- Esta mutación se comprueba, demostrando la sensibilidad a la luz ultravioleta (U.V.) de las cepas que llevan tal mutación (Ames et al., 1973). El procedimiento es el siguiente: Con un hisopo estéril se hacen estrias por separado de cada una de las cepas (incluyendo una cepa silvestre que no lleva tal mutación) sobre placas de agar nutritivo. En condiciones asépticas, se destapan las cajas y se coloca una pieza metálica o acrílica estéril sobre cada placa, de manera que quede cubierta únicamente la mitad de cada estria, inmediatamente después, las placas se irradian durante 8 segundos con una lámpara de luz ultravioleta de 15W a 30-35 cm de distancia. La presencia de la mutación UvrB, se comprueba con la muerte celular observada en la mitad de cada estria, de las cepas que no

pueden reparar el daño genético provocado por la luz ultravioleta.

Factor R.- Este factor provee a las células, de resistencia contra los efectos de la ampicilina, además de conferirles mayor sensibilidad en la detección de actividad mutagénica. Para comprobar la presencia de este factor, se procedió de la siguiente manera: Sobre placas de ampicilina (ver sección de medios y reactivos), se realizan estrias paralelas de cada una de las cepas (se incluyen cepas silvestres), las placas se incuban durante 16 hrs. a 37°C al cabo de las cuales puede verificarse el crecimiento de los organismos que poseen el factor R.

### XXIII. ACTIVACION METABOLICA

Dado que los microorganismos (hongos y bacterias), no poseen todo el aparato enzimático capaz de activar o desactivar compuestos, que existen en los mamíferos, se han desarrollado estrategias para conocer el efecto de los metabolitos cuando se utilizan estas pruebas. Una de estas estrategias y la más frecuentemente usada, es el empleo de homogenados celulares que contienen enzimas microsomaes provenientes fundamentalmente del hígado de roedores, las cuales ejercen su acción *in vitro* sobre los compuestos. Se han utilizado también fluidos corporales de individuos expuestos a los agentes químicos y el ensayo *in vivo*.

La mezcla de activación metabólica se incluye como una aproximación de la prueba al metabolismo de mamíferos dado que muchos compuestos son procarcinógenos. La mezcla se obtiene a partir del tejido de hígados de roedores bajo el siguiente procedimiento:

Mantener ratas macho de la variedad Sprague-Dowley, hasta que alcancen 200g de peso aproximadamente. Diluir el compuesto conocido como Aroclor 254 en aceite de maíz a una concentración de 200ug/ml. Aplicar una inyección intraperitoneal a cada animal (500ug/Kg de peso), 5 días antes de sacrificarlos. Durante los 5 días, mantener a los animales con alimentos Purina y agua. 12 horas antes de sacrificarlos, se les retira el alimento pero no el agua, al quinto día, los animales se sacrifican por dislocación cervical, se colocan boca arriba sobre una charola de disección y se aseguran sus patas con pinzas, se limpia la zona ventral con alcohol al 70% y se corta a través de la piel con tijeras de punta estériles, desde la parte abdominal hasta cerca del tórax. Abrir la cavidad abdominal cortando el músculo, cuidando de no introducir ningún cuerpo externo en ella y de no lesionar ningún otro órgano, a partir de este paso, los subsecuentes se realizan a 4°C utilizando hielo. Extraer el hígado y cortarlo en porciones, colocar las porciones en vasos de precipitados de 100 ml previamente tarados y esterilizados, que contengan una solución de KCL 0.15M a razón de 1 ml/g de hígado (un hígado pesa aproximadamente entre 10 y 15 g). Una vez pesados, los hígados son lavados 3 o 4 veces más con la solución de KCL, posteriormente se transfieren a vasos de precipitados de 100 ml, que contengan 3 volúmenes de KCL (3 ml/g de hígado). Los hígados son macerados con tijeras estériles y homogenizados en un aparato homogenizador con pistón de teflón. El homogenizado se centrifuga a 9000 G, el sobrenadante (la fracción S-9) es decantado y conservado entre 0 y 4°C, posteriormente es distribuido en porciones de 1 a 2 ml en crioviales y congelado bajo nitrógeno líquido, y en esta forma se conserva hasta su uso.

Lo anterior sirve para preparar la fracción S-9, que es el componente principal de la mezcla S-9. Para la realización de los ensayos se utiliza mezcla S-9 con dos diferentes concentraciones de fracción S-9, (4 y 10%) los componentes finales de ambas mezclas son:

4%	10%	
19.75	16.75 ml	Agua destilada
25.00	25.00 ml	Amortiguador de fosfatos
2.00	2.00 ml	NADP 0.1M
0.25	0.25 g	Glucosa-6-fosfato
1.00	1.00 ml	Solución de cloruros de Potasio y Magnesio
2.00	5.00 ml	Fracción S-9

(Ver sección de medios y reactivos para la preparación de las soluciones salinas y cofactores.

#### XXIV. REALIZACION DE LAS PRUEBAS DE MUTAGENICIDAD DE LOS CONCENTRADOS OBTENIDOS EN CAMPO.

La prueba de incorporación en placa (Ames et al., 1973a, 1973b), se efectúa mezclando el compuesto a probar, la bacteria de prueba y la mezcla S-9 en un tubo con agar blando, el cual es vaciado sobre una placa de agar mínimo. Cada ensayo incluye la prueba de controles positivos y negativos. Después de un tiempo de incubación de 48 hrs. a 37°C se cuentan las colonias revertantes. El procedimiento se realiza como se describe a continuación:

En un tubo 13X100 mm. con tapón de rosca, el cual contiene 2 ml de agar de superficie, fundido y conservado a 45°C, adicionar 0.1 ml del cultivo bacteriano (cepa TA 100 o TA 98), 0.1 ml o menos del compuesto o mezcla a probar y 0.5 ml de la mezcla de activación metabólica al (al 0,4 o 10%), homogenizar esta mezcla agitandola a vórtice y vaciarla sobre una placa de agar mínimo (ver sección de medios y reactivos), rotar la placa para distribuir bien la mezcla, dejar solidificar e incubar por 48 hrs. a 37°C. Fig 11.

Cada muestra a probar, requiere los siguientes tratamientos :

- 1.- Bacteria TA 98 unicamente (reversión espontánea)
- 2.- Bacteria TA 98 + muestra
- 3.- Muestra + Bacteria TA 98 + Mezcla S-9 al 10%
- 4.- Muestra + Bacteria TA 98 + Mezcla S-9 al 4%
- 5.- Muestra + Bacteria TA 98 + solución de cofactores
- 6.- DMSO + Bacteria TA 98
- 7.- DMSO + Bacteria TA 98 + mezcla S-9 al 10%
- 8.- DMSO + Bacteria TA 98 + mezcla S-9 al 4%
- 9.- DMSO + Bacteria TA 98 + solución de cofactores
- 10.- 4-NQO + Bacteria TA98
- 11.- Benzo (a) Pireno + Bacteria TA 98 + Mezcla S-9 al 10%
- 12.- Benzo (a) Pireno + Bacteria TA 98 + Mezcla S-9 al 4%
- 13.- Bacteria TA 100 unicamente ( Reversión espontánea)
- 14.- Bacteria TA 100 + muestra
- 15.- Muestra + Bacteria TA 100 + mezcla S-9 al 10%
- 16.- Muestra + Bacteria TA 100 + mezcla S-9 al 4%
- 17.- Muestra + Bacteria TA 100 + solución de cofactores
- 18.- DMSO + Bacteria TA 100 + mezcla S-9 al 10%
- 19.- DMSO + Bacteria TA 100 + mezcla S-9 al 4%
- 20.- DMSO + Bacteria TA 100 + solución de cofactores
- 21.- DMSO + Bacteria TA 100
- 22.- 4NQO + Bacteria TA 100
- 23.- 2-Amino Antraceno + Bacteria TA 100 + Mezcla S-9 al 10%
- 24.- 2-Amino Antraceno + Bacteria TA 100 + Mezcla S-9 al 4%

Cada tratamiento se realiza por triplicado. El No 1, reversión espontánea, indica la tasa de revertantes normales de cada cepa y permite identificar una variación significativa en éstas.

Los tratamientos con DMSO (Dimetil sulfóxido), son importantes como controles negativos ya que éste solvente es utilizado para resuspender los concentrados de la muestras y son por lo tanto utilizados como el parámetro de comparación para las muestras analizadas.

**XKV. ELABORACION DEL PROGRAMA DE CAPTURA, PROCESO Y REPORTE DE RESULTADOS DE DATOS DEL ANALISIS DE ACTIVIDAD MUTAGENICA EN MUESTRAS DE AGUA.**

Uno de los aspectos mas importantes en todo tipo de análisis es la recopilación de los datos y resultados proporcionados por el mismo, de tal manera que se facilite su procesamiento y comprensión.

Actualmente, mediante el uso de programas y/o paquetes computacionales se ha facilitado ésta tarea. Las ventajas que se obtienen al utilizar estas herramientas son grandes. Permiten el almacenamiento y proceso de grandes volúmenes de información y su rápida consulta, facilitan las comparaciones y sirven como archivos históricos de datos. Con este objeto, en el presente trabajo se creó un programa de captura, proceso y reporte de resultados de datos de actividad mutagénica en muestras de agua.

El programa fué elaborado mediante un paquete que maneja una base de datos y tiene como finalidad facilitar la captura, cálculo y consulta de resultados de la prueba de actividad mutagénica conocida como MUTATEST.

Los datos introducidos en el programa pueden ser consultados en base a varias alternativas mediante las cuales se podrán obtener datos específicos de zonas específicas.

El sistema cuenta con los siguientes módulos:

Un programa de menú principal denominado MENMUT.  
Un programa para ingreso de datos llamado DATOSMUT.  
Un programa para proceso de datos denominado ALTASMUT.  
Un programa de bajas llamado BAJASMUT.  
Un programa de cambios denominado CAMBIMUT.  
Un programa de consultas denominado CONSUMUT, que presenta las opciones siguientes:

Consultas por NOMBRE del sitio analizado en un programa denominado NAME.

Consultas por NUMERO DE FOLIO en un programa denominado FOLIS.

Consulta por NUMERO DE MUESTRA en NUM.

Consultas por FECHA en FLECHA.

Consultas por RESULTADO en RESUL.

Consultas de DATOS CRUDOS en CRUDA.

Consultas por DELEGACION en DELA.

Consultas por TIPO DE INSTALACION en TOPO.

Todos los programas trabajan tomando datos de una base denominada MUT92.

Los programas de consulta estan apoyados en diversos archivos de reporte cuando se desea consultar mas de un registro, o por presentación en pantalla cuando el registro consultado es único. El programa NAME se apoya en el archivo llamado NEIM. El programa FLECHA se apoy en el archivo denominado DATE. El programa RESUL se vale del archivo RESULTA. El programa DELA se apoya en el archivo DELE y el programa TOPO se auxilia del archivo denominado TYPE. Los programas NAME, FOLIS, NUM y CRUDA se reportan en pantalla o formatos creados dentro de cada uno de ellos.

Los diagramas de flujo del sistema y de los programas utilizados se presentan en los diagramas 1 y 2. El nombre y número de los campos creados y sus extensiones respectivas se presentan en las hojas de contenido de archivo 1 y 2.

## XXVI DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD MUTAGENICA

Debido al aumento en la utilización de ensayos de mutagenicidad, se ha visto la necesidad de establecer los métodos estadísticos apropiados para la evaluación de los datos. Los objetivos principales de estos métodos son: Conocer los criterios para decidir si un resultado es positivo o negativo y determinar un estimado cuantitativo de la actividad de un agente de prueba. (Breslow, 1986).

Actualmente existen varios procedimientos propuestos para el análisis de pruebas a corto plazo pero aún no hay un consenso general para asegurar cual es el más apropiado. En un principio se propusieron algunos métodos para la determinación de la positividad de una muestra, como por ejemplo, el requerimiento de una duplicación de la respuesta producida por efecto del agente de prueba, en relación a los controles y/o blancos (Clive et al., 1979; Chu et al., 1981). Otros autores han adoptado herramientas estadísticas estándares, tales como la prueba de 't' para comparación de mediciones continuas y  $X^2$ , para la comparación de proporciones (Weinstein y Lewinson, 1978; Gilbert, 1980; Amphlet y Delow, 1984).

El objetivo final de un ensayo de mutagenicidad *in vitro*, es determinar si el tratamiento de un cultivo celular con un compuesto de prueba, da como resultado un incremento en la fracción de mutantes, para cumplir con este objetivo se deben adoptar los siguientes pasos experimentales:

- a) Tratamiento de las células con el agente de prueba o con su solvente en el caso del control.
- b) subcultivo de las células para permitir que haya tiempo para la expresión fenotípica de las mutaciones inducidas durante el tratamiento, y,
- c) Estimación del número de mutantes y del total de unidades formadoras de colonias en el cultivo.

Los mutantes son contados a partir de una alícuota proveniente de un cultivo que se ha colocado bajo condiciones que permiten seleccionar las células mutantes, en tanto que el total de la población celular se estima de una fracción muy pequeña del cultivo bajo condiciones de crecimiento estándares. La cuenta se realiza colocando las células en cajas de petri y contando el número de colonias resultantes, por lo que el resultado es un estimado de la fracción de mutantes, la cual es la tasa de unidades formadoras de colonias mutantes con respecto al total de colonias en el cultivo, y esta es la variable usada para comparar cultivos tratados con cultivos control.

En el cultivo tratado, la fracción de mutantes es un estimado de la proporción de células en las que la mutación se indujo durante la exposición, pero se debe asumir que:

- 1) La mutación no tiene efecto sobre la viabilidad de la célula después de la exposición, ni sobre su tasa de crecimiento durante la fase de expresión, ni sobre su capacidad de formar colonias. Es decir, la dosis utilizada no produce un efecto tóxico que pueda enmascarar un posible efecto mutagénico.
- 2) No existen mutantes en el cultivo antes de la exposición, ni se formaron espontáneamente durante la expresión o selección (En algunos ensayos las tasas de reversión espontánea están bien tipificadas y no causan problemas).

No hay manera de corregir el efecto ocasionado si la primera suposición no es válida, en cuanto a la segunda, el efecto de los mutantes que se producen antes o después de la exposición debe ser tomado en cuenta e incluirse en la fracción mutante del control para el análisis estadístico.

Los métodos utilizados para el análisis de mutagenicidad con bacterias son más simplificados, ya que en ellos solo se dispone de los estimados de los números de mutantes producidos en el ensayo, por cuenta directa de colonias en cajas petri. A pesar de la simplicidad de estos ensayos, el precio que se paga es alto, ya que mientras que los ensayos no bacterianos proporcionan información más confiable que es susceptible de ajustes, en los ensayos bacterianos no se puede hacer ninguna corrección cuando existe un decremento en la sobrevivencia celular al incrementarse la dosis o si la dosis única es alta, de tal manera que a dosis altas los efectos de la muerte celular predominan sobre los de la mutagénesis, lo que puede conducir a resultados erróneos. Además de esto, existen fuentes de variación relacionadas directamente con los ensayos. Cada ensayo, consta de una o más observaciones de la fracción mutante (o del estimado del número de mutantes producidos en un ensayo), en cada nivel de dosis, por ejemplo, un ensayo bacteriano como el de *Salmonella*, puede requerir tres placas o más por replicado en cada dosis y cada una sirve para registrar el número de colonias mutantes, pero aún así, los ensayos por replicados realizados en tiempos diferentes por los mismos técnicos en el mismo laboratorio, pueden dar resultados diferentes. Existen diferencias sustanciales en la cuenta de colonias revertantes de *Salmonella* entre los replicados de cada ensayo y aún entre los ensayos dobles. Por lo tanto, un análisis estadístico apropiado de los datos de los ensayos debe requerir del conocimiento de las fuentes y naturaleza de esta variación, más aún, dado que las células utilizadas en los ensayos son muestreadas de una población grande, existe un cierto grado de variación en el número de células mutantes después de la administración de un compuesto de prueba ya que, debido a la naturaleza estocástica de los procesos biológicos involucrados, algunas células morirán o mutarán en tanto que otras no lo harán por lo que el resultado final presentará una variación acorde a la distribución de Poisson (Margolin *et al*, 1981).

En los ensayos que requieren del subcultivo de las células, la muestra final es tomada después de transcurrido un tiempo suficiente para la expresión fenotípica, y las células son divididas en dos submuestras para determinar su capacidad de formación de colonias y la presencia y/o ausencia de condiciones selectivas. Asumiendo que cada célula mutante tiene la misma probabilidad de ser plateada y poder formar una colonia, el conteo del número de colonias formadas se puede representar mediante una variable binomial basada en el muestreo del número total de células mutantes en la suspensión. La formación de colonias en el ensayo de reversión de *Salmonella*, tiene lugar en la misma caja de Petri en la que el agente de prueba es adicionado, sin la intervención de un paso de subcultivo o alguna dilución celular. En este caso el muestreo (que es de acuerdo a la distribución de Poisson) se acopla bien con la variación binomial que resulta de la formación al azar de colonias y da como resultado una variabilidad "Poissoniana" teórica para el conteo final de colonias mutantes en cada nivel de dosis (Margolin et al, 1981).

En la práctica, el grado de variabilidad en conteos de una placa a otra en los ensayos por replicado, a menudo excede del mínimo teórico especificado por la distribución de Poisson. Esta variación es a veces producida por leves errores de procedimiento, como por ejemplo, el uso de suspensiones celulares no homogéneas o errores de titulación, lo que resulta en diferencias en el número inicial de células colocadas en cada placa. También puede haber diferencias en la cantidad y pureza del agente de prueba, en la cantidad de histidina y de otros materiales traza, y en la cantidad de nutrientes. Las variaciones en la temperatura de trabajo pueden influir también en la formación de colonias o en el tiempo de formación de las mismas. Lo importante es tratar de comprender y cuantificar estas fuentes de variación ya que nos pueden indicar aspectos del procedimiento experimental que necesitan mejorarse. Estos aspectos deben ser tomados en cuenta para el análisis estadístico y poder así obtener un estimado válido de la varianza con el cual se puedan comparar diferencias en el tratamiento para controlar la posibilidad de obtener un resultado falso (Dunkel, 1979).

De acuerdo a Breslow (1986), los procedimientos generales recomendados para el análisis estadístico de los datos de mutagenicidad deben involucrar los siguientes puntos:

- a) Registro de los conteos individuales del número de colonias mutantes en cada nivel de dosis (incluyendo el control) y el uso de estos datos en el análisis.
- b) Especificaciones paramétricas de la frecuencia de mutantes esperada, como una función de la dosis, o especificación semiparamétrica de al menos la porción lineal de la curva dosis-respuesta.
- c) Obtención de una verdadera varianza que cambie con la dosis y que pueda exceder la variabilidad asociada con la

distribución de Poisson. De manera ideal, el grado de variación externa se estima a partir de las observaciones de los replicados registrados en cada nivel de dosis.

- d) Ajuste del modelo, utilizando un procedimiento que corrija la variabilidad externa y que sea resistente a datos aberrantes.
- e) Examen de la prueba de bondad de ajuste del modelo, específicamente en el caso de que se trate de una suposición de linealidad en la porción inicial de la función dosis-respuesta.
- f) Estimación de la potencia mutagénica en términos de la pendiente inicial de la función dosis-respuesta.

Todos estos pasos se encuentran limitados en los ensayos bacterianos de mutagenicidad, y en este caso en particular se realizan ensayos puntuales de dosis únicas, por lo que es prácticamente imposible por las características propias de los ensayos, realizar curvas dosis-respuestas. Por lo que en el presente trabajo, se utiliza un diseño simple para la determinación de la positividad de las muestras ensayadas, este tipo de diseño solo puede funcionar si se controlan en lo posible las fuentes de variación antes mencionadas, incluyendo las que se refieren al manejo y error humanos.

Para tener un mayor control sobre los resultados de los ensayos, es necesario establecer ciertas condiciones para las pruebas biológicas.

- 1) Todas las cepas utilizadas deben mantener una estabilidad con respecto a sus marcadores genéticos y tasas de reversión espontánea, ya que esto sirve como un control de calidad de las suspensiones bacterianas utilizadas en los ensayos.
- 2) Las respuestas de los controles negativos y positivos deben ser consistentes y mantenerse dentro de los rangos correspondientes a cada cepa a una dosis dada.
- 3) La dosis ensayada no debe ser tóxica, entendiéndose por dosis tóxica aquella que siendo mayor que la dosis que provocó la respuesta máxima, produce una respuesta menor que esta, es decir, produce un decremento en la respuesta después de alcanzar un nivel máximo. En *Salmonella microsome assay* Cuando se ensaya una sola dosis, una medida indirecta de la toxicidad de una muestra, es el análisis visual del crecimiento inicial, producido por las trasas de histidina presentes en el medio (background), en cada placa.

Si se toma en cuenta que las concentraciones de compuestos orgánicos en agua potable o tratada son demasiado pequeñas, aún si las muestras son suficientemente concentradas, y que por lo tanto el ensayo de diferentes concentraciones carece de sentido (con excepción tal vez de algunas aguas tratadas), la prueba que

aparece como la más adecuada para definir si una muestra es positiva o negativa es la conocida como regla de la duplicación (Chu et al., 1981), en la cual un ensayo con una cepa es considerado positivo si hay una dosis con un promedio de respuesta capaz de duplicar el promedio de respuesta del control negativo correspondiente. Otra prueba que también puede aplicarse es una modificación a la regla de la duplicación en la cual deben existir por lo menos dos dosis consecutivas que cumplan con la regla de la duplicación.

La regla de la duplicación presenta algunas ventajas: Es simple y utiliza como marco de comparación las reversiones de los controles correspondientes, de tal manera que cualquier variación en la prueba que pueda afectarla es disminuida al ser tomada en cuenta en la comparación. Esta prueba tiene también algunas limitaciones, las cuales radican en que, las cepas con tasas bajas de reversión espontánea pueden presentar problemas de falsos positivos, mientras que las cepas con tasas altas, presentarían problemas de falsos negativos. Este problema disminuye en gran medida cuando se usa la regla modificada.

Las verificaciones de resultados demuestran dudosas así como el criterio del propio investigador deben entrar en juego cuando se presentan problemas de este tipo.

En el presente estudio no se utilizan cepas con tasas de reversión muy bajas (TA 98, presenta una reversión entre 30 y 50 colonias por placa, y TA 100 entre 100 y 200). De las dos cepas utilizadas TA 100 ha presentado en diversos estudios un bajo porcentaje de falsos negativos y ha podido evaluarse bien utilizando estas reglas.

En resumen, cuando en ensayos repetidos un resultado es persistentemente diferente, uno debe suponer que se está provocando algún efecto, aún cuando la prueba estadística no lo detecte ampliamente.

En base a lo anterior y de acuerdo a lo sugerido por Chu et al (1981), una prueba es considerada positiva si:

$$\frac{XRM}{XRC} \geq 2$$

XRC

Donde:

XRM = Media de tres placas de la reversión de la muestra

XRC = Media de tres placas de la reversión del control correspondiente.

o si: el resultado de una muestra en ensayos repetidos es persistentemente diferente y mayor ( $\sim 2$ ) con respecto a su control correspondiente.

## XXVII. PRESENTACION Y DISCUSION DE RESULTADOS.

### XXVIIa. DISEÑO DEL DISPOSITIVO DE MUESTREO.

En cuanto al dispositivo diseñado para muestreo en campo, se observó que éste fué útil para la toma de muestras en diferentes instalaciones hidráulicas y diferentes condiciones de operación. En el caso de los pozos la adaptación del dispositivo consistió en la simple conexión de las terminales del equipo a las llaves o grifos de la instalación. Para los tanques y para algunos procesos de tratamiento de aguas residuales, se requirió el uso de una bomba de combustible. Generalmente, el dispositivo fué perfectamente adaptable a cualquier instalación y condiciones de muestreo. Finalmente, el uso del equipo diseñado, disminuye en gran medida los problemas ocasionados por la manipulación excesiva de las muestras. El hecho de que el dispositivo de utilizado sea de un material opaco y pueda cerrarse herméticamente, evita el contacto de la muestra con la luz, aire y posibles agentes externos, además de que por su tamaño reducido es posible transportarlo en condiciones de temperatura ideales. Aunado a esto, el dispositivo permite que las muestras puedan ser procesadas el mismo día en que se realizó el muestreo y permite también obtener las muestras a partir de volúmenes de agua relativamente grandes, lo que de otra manera representaría un problema de transportación. Mas aún, la posibilidad de obtener muestras a partir de volúmenes grandes permite por supuesto la concentración de una cantidad mayor de contaminantes con lo que se aumenta la probabilidad de detectar actividad mutagénica en una muestra dada. Este hecho se comprobó al comparar los resultados de las muestras obtenidas del efluente de la planta de tratamiento de agua residual Cerro de la Estrella en donde los muestreos se realizaron a partir de volúmenes de 20 litros, colectados en garrafones, contra los resultados del influente del Dispositivo Experimental De Tratamiento Avanzado de Agua Residual (DETAAR) en donde las muestras se obtuvieron de volúmenes de 100-200 litros mediante el uso del dispositivo diseñado. El parámetro de comparación se establece con el hecho de que los efluentes de la planta de tratamiento Cerro de la Estrella, son utilizados como influentes para el DETAAR, es decir, es el mismo tipo de agua. En la grafica 1 se muestran los porcentajes de resultados positivos obtenidos con los diferentes volúmenes de muestra. Debe hacerse notar que la disminución de los factores de transformación química de las muestras, propiciada por el uso del dispositivo de muestreo no pudo comprobarse en el presente trabajo, y solo se supone por las características del equipo usado y las condiciones de transporte, que en efecto, las alteraciones sufridas por las muestras se han disminuído.

El uso de cobre en el diseño del equipo se debe a que éste metal es prácticamente inactivo ante una gran variedad de sustancias y resistente a la corrosión (The index Merck, 1979) y solamente es soluble ante ácidos fuertes como el ácido sulfúrico o el ácido nítrico (Rangel, 1977), por éste motivo éste material es comunmente utilizado en tuberías de conducción de agua así como en instalaciones eléctricas. No obstante se ha reportado que

en aguas blandas con pH bajo (alrededor de 6.0) puede presentarse solubilidad de cobre y plomo en las tuberías de conducción soldadas con éste último (Holm y Shock, 1991). En el caso de los pozos de abastecimiento del Distrito Federal los rangos de pH detectados oscilan entre 6.5 y 7.5 y para las aguas residuales no se reportan valores menores a 7, por lo que es muy poco probable que ocurra desprendimiento del material en cuestión y que éste pueda reaccionar con los componentes del agua o con el agua misma. Ante aire húmedo, el cobre tiende a formar gradualmente una cubierta de carbonato que protege aún mas al material contra la corrosión, esta cubierta bien pudiera reaccionar con algunos orgánicos en el agua. Para evitar ésto, el dispositivo recibe diariamente el tratamiento de rehabilitación indicado en el punto XV.

En resumen, el dispositivo de muestreo diseñado resultó efectivo en el aislamiento de compuestos orgánicos a partir de muestras de agua. Actualmente éste artefacto es utilizado en el Laboratorio Central de Control de Calidad del Agua de la Dirección General de Construcción y Operación Hidráulica del Departamento del Distrito Federal, en la obtención de muestras para análisis de actividad mutagénica en muestras de agua residual y renovada.

## XXVIIb. BIOENSAYO

En cuanto al bioensayo, la elección de un sistema bacteriano para los análisis de mutagenicidad presenta las ventajas y desventajas mencionadas en un principio, pero principalmente satisface la necesidad del análisis de un elevado número de muestras así como la entrega relativamente rápida de resultados, y, aunque el hecho de que una muestra dé un resultado positivo en un análisis aislado, no significa que exista un riesgo asociado al sitio, los resultados repetitivos haran suponer la existencia de un riesgo potencial y llamaran la atención hacia un análisis más profundo del lugar y de su entorno (posibles fuentes de contaminación), o bien hacia la evaluación más precisa de los diferentes procesos en plantas de tratamiento.

Por otra parte, los resultados de las pruebas biológicas de concentrados orgánicos, pueden ser usados para estimar el riesgo a la salud humana asociado con estas, pero sólo en el grado en que los concentrados representen la materia orgánica real presente en las muestras. Los concentrados deben tener cantidades representativas de todos los orgánicos originalmente presentes, o al menos una fracción predeterminada de ellos. Mas aún, la integridad de los compuestos químicos en la muestra debe ser mantenida, y eliminados los contaminantes, o al menos asegurarse que no interfieran con la muestra biológica. Todos estos requisitos, no pueden ser cubiertos por ningun sistema de concentración, por lo que el sistema que deba usarse, deberá ser acorde con los objetivos del estudio y en base a ciertos resultados esperados o en base a parámetros de mayor o menor importancia a criterio del investigador.

Por lo anterior, y hasta que los métodos de concentración sean correctamente desarrollados y evaluados, la información proporcionada por ellos, deberá servir sólo como una guia de la representatividad de los concentrados producidos por los mismos, por lo cual, se debe tomar con reservas la interpretación que pueda darse a los resultados biológicos.

## XXVIIC. ANALISIS DE MUTAGENICIDAD

Entre Febrero de 1991 y Diciembre de 1992 se realizaron un total de 1241 muestreos de los cuales 771 correspondieron a pozos, 68 a tanques de almacenamiento, 85 a plantas de rebombeo, 71 a plantas de tratamiento de agua residual, 33 a plantas potabilizadoras y 213 a dispositivos de tratamiento avanzado (Gráfica 2).

### XXVIIC1. AGUA POTABLE

Los resultados se presentan por delegación y por tipo de instalación, (Mapas 2 al 18) con el fin de determinar la existencia de zonas de mayor exposición, y en tal caso, tratar de determinar las posibles causas de la contaminación o las posibles fuentes emisoras. El número de muestreos por delegación para instalaciones de agua potable (Pozos, Tanques, Rebombes y agua en bloque), se muestran en la grafica 3. Las diferencias en el número de muestreos realizados para cada delegación estan en relación al número de instalaciones ubicadas en cada una de ellas.

Del total de pozos analizados, sólo un 2.4% presentó resultados positivos, para los tanques se reportó un 2.9% mientras que los rebombes presentaron un 3.5% de actividad mutagénica (Gráfica 4).

Los análisis realizados en Agua en bloque no presentaron resultados positivos.

En el caso de los pozos unicamente se presentaron resultados positivos en las delegaciones: Xochimilco, Iztapalapa, Tlalpan, Benito Juarez, Milpa Alta, Coyoacan, Tlahuac y Miguel Hidalgo Con 5,3,3,2,2,2,1 y 1 casos respectivamente (Gráfica 5).

Para los tanques, sólo se reportó un resultado positivo en la delegación Tlalpan y uno en la delegación Gustavo A. Madero. (Gráfica 5.)

En cuanto a los rebombes se reportaron resultados positivos en las delegaciones Tlalpan, Iztapalapa y Gustavo A. Madero, uno en cada delegación ( Gráfica 5).

En la tabla 3 se muestran los datos de los ensayos que reportaron resultados positivos en muestras de agua potable, residual y tratada. El total de resultados positivos para instalaciones de agua potable fué de 22, 13 de los cuales se reportaron con la cepa TA 98, la cual presentó un promedio de revertantes espontáneas de 26 colonias por placa para el control negativo sin activación metabólica (DMSO); de 30 colonias por placa para el control negativo con activación metabólica (DMSO + S9 al 4%) y 33 colonias por placa para el control negativo con activación metabólica (DMSO + S9 al 10%).

En los resultados positivos detectados con la cepa TA 98, el valor de los controles negativos correspondientes estuvo siempre por debajo de los valores promedio presentados por dichos controles a lo largo del estudio (Tabla 3) y fuera de los rangos establecidos. El tratamiento que presentó un mayor número de resultados positivos para la cepa TA 98 fué el correspondiente a DMSO + S9 al 10% con 10 casos. El intervalo de confianza del 95% para el promedio de colonias revertantes por placa de éste tratamiento se estableció entre 30 y 36 colonias por placa, y en ninguno de los casos el valor del control negativo se ubicó dentro de éste rango.

Para los tratamientos con DMSO + S9 al 4% El intervalo de confianza del 95% de la media del número de colonias revertantes espontáneas, se ubicó entre 28 y 32 colonias por placa, con este tratamiento se presentaron 3 resultados que duplicaron el porcentaje de reversión espontánea del control negativo, pero los valores de éstos controles también fueron menores al promedio y se ubicaron fuera del rango establecido.

Sólo se reportaron tres resultados positivos para los tratamientos sin activación metabólica con la cepa TA 98, en dos de estos casos el valor del control negativo fue extremadamente bajo, muy alejado del promedio y totalmente fuera del rango establecido (24 a 27 colonias por placa), y únicamente en el Tanque "Chalmita", el valor del control quedó dentro del rango establecido, aunque el resultado de la muestra fué marginal (Tabla 3).

Con base en éstos datos y tomando en cuenta que las cepas con porcentajes bajos de revertantes espontáneas han presentado un alto porcentaje de resultados falsos positivos debido a que a medida que disminuye el número de colonias que se pueden contar en una placa disminuye la significancia y la confiabilidad del la prueba utilizada (Chu, et al, 1981), los resultados obtenidos con la cepa TA 98 son muy probablemente falsos positivos, esto se apoya además en el hecho de que todas las muestras positivas se ensayaron por lo menos dos veces y en algunos casos se realizó un nuevo muestreo, encontrándose que los resultados de las repeticiones fueron siempre negativos.

Para la cepa TA 100, los promedios del número de colonias revertantes espontáneas para los controles negativos fueron de: 117 colonias por placa para el control negativo sin activación metabólica (DMSO); 126 para el control negativo con activación metabólica (DMSO + S9 al 4%) y 139 para el control negativo con activación metabólica (DMSO + S9 al 10%). Los intervalos de confianza del 95% para las medias de estos controles se establecieron entre 112 y 122, 120 y 133, y 133 y 145 colonias revertantes por placa respectivamente. De los 9 resultados positivos detectados con ésta cepa, en 4 casos se presentaron también problemas de valores bajos en los controles negativos correspondientes (Tabla 3) con la consiguiente pérdida de significancia de éstos resultados; un caso presentó un valor para

el control negativo por encima del valor promedio, aunque la respuesta de la muestra parece clara. Los 4 casos restantes presentaron valores de los controles negativos dentro de los rangos establecidos, por lo que éstos resultados fueron considerados positivos. Las repeticiones de los ensayos ratificaron éstos resultados, no así los muestreos repetidos de estos sitios.

En general los sitios de agua potable presentaron un bajo porcentaje de respuestas positivas a la prueba de Ames, esto es debido a que las muestras de agua potable contienen concentraciones mínimas de compuestos orgánicos con actividad mutagénica, aunque su número puede ser grande (Keith. L.H., 1976), o bien están exentos de estos compuestos. La ausencia de compuestos con actividad mutagénica en pozos de agua potable del D.F. es un resultado esperado ya que por las características de éstas instalaciones (Pozos excavados profundos), es poco probable que contaminantes domésticos o industriales puedan filtrarse hasta ellos. En estos análisis debe tomarse en cuenta que dada la gran cantidad de sitios que deben ser analizados (principalmente en el caso de los pozos) no es posible realizar un análisis adecuado de cada sitio, y el número de análisis que se realiza para cada uno es muy reducido como para poder hacer una evaluación objetiva del estado de cada uno de ellos, aunque si fué posible realizar un análisis por zonas (En éste caso delegaciones). El hecho de que en los muestreos repetidos de los sitios que reportaron resultados positivos éstos no sean repetitivos nos conduce a pensar que los contaminantes aparecen en los pozos de manera excepcional o que fueron; introducidos por otros medios (Contaminación en el muestreo o en el procesamiento de la muestra), y por lo tanto la población no está expuesta real o permanentemente. Otro aspecto importante en el análisis de actividad mutagénica en muestras de agua potable, radica en que aún cuando se reporte un resultado positivo en una muestra determinada debe considerarse que las muestras ensayadas son concentrados provenientes de volúmenes cercanos a los 100 litros, por lo que la probabilidad de que un individuo sufra los efectos de la actividad mutagénica detectada por el sistema utilizado en éste trabajo es considerablemente baja tomando en cuenta la cantidad de agua que puede ingerir una persona por día, aunque no deben ignorarse los posibles efectos de compuestos bioacumulables, principalmente organometálicos del tipo del tetraetil o tetrametil de plomo y mercurio, o compuestos tales como los óxidos y carbonatos de plomo o arsenico solubles en agua que causan trastornos en diversos órganos al pasar por el tracto digestivo (Albert, 1990).

Debido a los escasos resultados positivos encontrados en instalaciones de agua potable, a la presencia excepcional de compuestos genotóxicos en éstos lugares, y en base a las anteriores consideraciones, en éste estudio no se puede establecer la presencia de compuestos con actividad mutagénica en sitios de abastecimiento de agua potable y por lo tanto, tampoco puede establecerse un riesgo relacionado.

## XXVIIc2. AGUA RESIDUAL Y TRATADA

En el caso del agua residual y tratada, se realizaron 71 muestreos en plantas de tratamiento de agua residual, 33 en plantas potabilizadoras y 213 en un dispositivo de tratamiento avanzado. (Gráfica 6). Para este tipo de agua, la situación es diferente ya que aquí las concentraciones de compuestos son mayores por las características propias de las muestras y los análisis pueden ser repetidos en varias ocasiones ya que el número de sitios que se debe de analizar es menor y puede hacerse una evaluación por sitio y por tipo de proceso.

Para las plantas de tratamiento de agua residual se realizaron 71 muestreos, 30 en la Planta de Tratamiento San Luis Tlaxialtemalco, 33 en la Planta de Tratamiento Cerro de la Estrella, 4 en la Planta de Tratamiento Tlatelolco y 4 en la Planta de tratamiento El Rosario (Gráfica 7), las dos primeras plantas poseen procesos mas avanzados por lo que se realizó un número mayor de muestreos en ellas. Solo se muestreó el efluente de cada planta ya que los datos que interesan son la remoción final y la formación de compuestos por procesos de desinfección.

San Luis Tlaxialtemalco presento 2 resultados positivos, cerro de la Estrella 6, Tlatelolco y El Rosario no presentaron resultados positivos (Gráfica 7). En éstos casos aunque también se presentan problemas de valores bajos en los controles negativos, las respuestas de las muestras son mucho mas claras e incluso se reafirman en los diferentes tratamientos y en las diferentes cepas (Tabla 3). A pesar de ésto se reportó un bajo número de resultados positivos en éstos sitios, éste hecho se debe a varios factores: El muestreo en estos sitios se realizó por medio de recipientes con volúmenes de solo 15-20 litros en los que las muestras se transportaron al laboratorio de análisis expuestas a la luz, aire y temperatura ambiente, por lo que no se puede asegurar la conservación de las mismas, además de que el tren de tratamiento analizado correspondía al proceso final o efluente de un tratamiento secundario, aunque la primera causa parece ser la más importante.

De los 33 muestreos en plantas potabilizadoras, 24 se efectuaron en la planta Santa Catarina y 9 en la planta Santa Maria Aztahuacan. (Gráfica 8). En la planta Santa Catarina se realizaron análisis en diferentes procesos, 11 muestreos se aplicaron al influente o entrada a la planta, es decir, agua sin tratar, 3 muestreos a procesos intermedios de tratamiento, y 10 muestreos al efluente o salida de la planta, el cual incluye un proceso de desinfección con cloro. Únicamente se reporto un resultado positivo en una muestra de influente de esta planta (Gráfica 9).

En la planta Santa Maria Aztahuacan, sólo se realizaron 9 muestreos, 4 de los cuales se aplicaron al influente de la planta y los 5 restantes al efluente (Gráfica 10), en este caso el resultado positivo encontrado correspondió a un efluente el cual

incluía un proceso de desinfección con cloro. En todos los casos el muestreo se realizó en garrafones de polipropileno y el volumen de muestra fué de 20 litros.

Los resultados de las plantas potabilizadoras, requieren de un estudio más profundo (en este estudio el número de sitios analizados fue muy reducido), ya que, aunque es agua potable que proviene de pozos excavados, ésta ha presentado problemas de calidad en lo que respecta a parámetros fisicoquímicos y bacteriológicos, y es lógico esperar que las concentraciones totales de compuestos sean altas, además en éste tipo de sitios se incluye un proceso de desinfección con cloro con concentraciones un poco mayores a las normales, lo que les confiere una mayor probabilidad de contener productos de cloración relacionados con genotoxicidad.

Únicamente se reportaron 2 resultados positivos en plantas potabilizadoras, en uno de los cuales encontramos el problema de valor bajo del control negativo, pero en la muestra asociada con procesos de desinfección la respuesta fué bastante clara (Tabla 3), aunque como ya se dijo anteriormente no es posible asociar una actividad mutagénica a tales sitios dada la baja cantidad de muestras efectuadas en los mismos.

En general, solo pudo observarse una respuesta positiva clara en las muestras que corresponden a los tratamientos avanzados, este comportamiento es debido a que, como ya se ha mencionado, las concentraciones de compuestos en este tipo de muestras es mucho mayor que en agua potable, y, a que en este caso los muestreos se realizaron con el dispositivo diseñado para ello y los volúmenes de muestra fueron de 100-150 litros. Los muestreos fueron realizados en un dispositivo experimental para obtención de agua potable y se analizaron cuatro diferentes trenes de tratamiento que correspondieron a la entrada a la planta o influente, dos tratamientos intermedios que correspondieron a un proceso de filtración normal y un proceso de filtración a presión, y a la salida de la planta o efluente, en el que se incluye un proceso de desinfección. Para cada tren de tratamiento se analizaron 21, 35, 51 y 106 muestras respectivamente. Se muestreo un mayor número de veces en los dos últimos trenes ya que corresponden a las fases finales del proceso y es de mayor interés detectar los compuestos remanentes y los posibles compuestos formados por el proceso mismo. (Gráfica 11).

Los resultados del tratamiento avanzado presentaron un comportamiento lógico al obtenerse un 57% de resultados positivos para los influentes, un 50% para los tratamientos intermedios y un 14% para los efluentes. (Gráfica 12).

En el caso de los influentes, de los 12 resultados positivos reportados, 9 presentaron el problema de valores bajos de los controles negativos, pero, aquí las respuestas de las muestras fueron suficientemente altas para considerar los resultados como positivos y los resultados se repitieron en diferentes

tratamientos.

Para el proceso de desinfección con cloro se presentaron 15 casos que duplicaron el porcentaje de reversión espontánea de los controles negativos, únicamente para dos muestras los valores de los controles negativos se ubicaron fuera de los rangos establecidos, pero aún en éstos casos las respuestas de las muestras fueron claras (Tabla 3).

En los tratamientos intermedios que involucran procesos de filtración, se reportaron un total de 43 resultados positivos, al igual que en los procesos anteriores se presentaron algunos casos de valores bajos de reversión espontánea de los controles negativos (Únicamente 5 casos), pero las respuestas de las muestras fueron suficientemente altas como para poder decir que aún éstos resultados deben considerarse como positivos (Tabla 3).

En el caso de los efluentes en los que se espera una remoción casi total de compuestos orgánicos, dado que involucran un proceso de ósmosis inversa, la actividad mutagénica detectada se adjudica los procesos de desinfección con cloro que se involucran en la parte final de los procesos de tratamiento (Rook, 1974; Bellar et al., 1974).

En la tabla 3 también podemos observar que la concentración de la mezcla S-9 contribuye de manera directa al aumento del número de colonias revertantes espontáneas en ambas cepas, por lo que es importante utilizar controles negativos independientes para cada tratamiento, principalmente con la cepa con reversión espontánea bas baja (TA 98). El aumento del número de colonias por placa, puede atribuirse a la contribución nutricional y energética que la mezcla S-9 aporta al sistema.

Otro factor de interés que se observa en la tabla 3, radica en que la cepa TA 98 detectó un mayor número de resultados positivos. Excluyendo los resultados falsos positivos encontrados en las muestras de agua potable, prácticamente el 100% de los resultados positivos reportados fueron detectados por la cepa TA 98, mientras que la cepa TA 100 detectó únicamente un 5%. Este hecho es atribuible a que la cepa TA 98 detecta preferentemente mutaciones por corrimiento de marco de lectura (Ames et al., 1973a), y éstas mutaciones (causadas fundamentalmente por supresiones o inserciones), son con frecuencia letales o irreparables a diferencia de las mutaciones causadas por transiciones o transversiones que en muchos casos son benignas o silenciosas (Lehninger, 1981).

## XXVIId. ANALISIS CROMATOGRAFICO.

Ya que los resultados de los tratamientos avanzados presentaron las respuestas más claras a las pruebas biológicas, se realizaron algunas correlaciones de estos resultados con un análisis cromatográfico de las mismas muestras, esta coorrelación dio los siguientes resultados:

Se analizaron 11 muestras de influentes por cromatografía, de las cuales solo una reportó un contaminante orgánico (Dietilftalato) el cual no esta reportado como mutagénico, ésta muestra resultó negativa en el analisis de mutagenicidad. De las 10 muestras restantes, 8 resultaron positivas en el ensayo de mutagenicidad, y no se reportaron mutágenos por cromatografía. Tabla 4.

De los procesos de filtración se analizaron 14 muestras por cromatografía, en 4 de las cuales se reportó un contaminante orgánico (tetracloroeteno), compuesto que no ha sido reportado como mutagénico en la prueba de Ames, pero del cual se sabe que es un carcinógeno potencial, cinco muestras reportaron actividad mutagénica, pero no se reportaron mutágenos por cromatografía (Tabla 4).

Para el efluente de la planta se analizaron 22 muestras por cromatografía, 5 de las cuales reportaron el compuesto tetracloroeteno que como ya se ha mencionado está reportado como un posible carcinógeno. Solo 3 muestras reportaron actividad mutagénica, pero no se reportaron compuestos mutagénicos en el análisis cromatográfico (Tabla 4).

Es importante mencionar que el tetracloroeteno es considerado como un contaminnte prioritario segun la USEPA (Agencia de protección al medio de los Estados Unidos de Norte America), y que su presencia en aguas residuales es debida principalmente a que éste compuesto es utilizado para el lavado en seco en tintorerias, como desengrasante en algunas industrias y como antihelmintico en medicina veterinaria.

Como puede observarse no existió ninguna coorelación entre ambos grupos de resultados, esto se debe a que, las mezclas complejas del tipo de los concentrados obtenidos de muestras de agua pueden contener un número muy elevado de compuestos orgánicos diferentes por causa de las incontables combinaciones de compuestos que se pueden dar en estos tipos de mezclas bajo diversas condiciones (conversión química, fotodescomposición, metabolismo microbiano o simple combinación de compuestos), y, un organismo sensor como el utilizado en la prueba de Ames, puede detectar un cierto número de estos compuestos, mientras que un análisis cromatográfico que debe apoyarse en un espectrofotómetro de masas el cual basa su poder de identificación en una base de datos limitada y dependiente a su vez de la información que le puedan proporcionar otros bioensayos y el análisis químico, detectará solo aquellos compuestos contenidos dentro de dicha base.

De ninguna manera debe menospreciarse el poder de los análisis instrumentales, pues mientras que un análisis biológico nos proporciona datos cualitativos en un tiempo relativamente largo, un análisis instrumental nos dara resultados cuantitativos casi instantáneos, además de que, como puede observarse en los resultados, existen compuestos que no pueden ser detectados por el ensayo biológico pero que en algunos casos seran detectados por el análisis instrumental. De aquí que ambos tipos de ensayo, deban complementarse para obtener resultados más rápidos y completos.

Por lo anterior, los análisis cromatográficos deben tomarse como un apoyo complementario, ya que pueden ser utilizados para la identificación de algun agente causante en los casos de coincidencia de resultados, o pueden dar información acerca de los tipos o familias de compuestos presentes en la muestra que puedan tener relación con la actividad mutagénica detectada, o bien, el análisis cromatográfico puede identificar algun compuesto cancerígeno o mutagénico que no sea detectado por el ensayo biológico.

## **XXVIIe. PROGRAMA DE CAPTURA**

La obtención y análisis de los resultados, así como la interpretación organización y manejo se simplificó enormemente gracias al uso del programa de captura, proceso y reporte de resultados. Este programa permite además la creación de archivos permanentes que se van enriqueciendo continuamente y facilita la consulta de datos que serán de utilidad en el futuro para las zonas o sitios en que se detecten riesgos. El sistema asimismo, proporciona un registro permanente de los datos de controles positivos y negativos con los cuales es posible llevar a cabo un control adecuado del sistema biológico empleado (Los datos de la base creada en este trabajo se utilizaron para el establecimiento de los rangos de revertantes espontáneos para cada cepa).

El programa es simple y únicamente permite el manejo de una base de datos mediante instrucciones sencillas, además de algunas operaciones aritméticas. Su virtud principal consiste en que puede ser utilizado incluso por personas sin experiencia en sistemas de cómputo. La simplicidad del programa facilita su adaptación para ser utilizado en ensayos similares. Anexando algunas instrucciones es posible manejar la base para aplicar un tratamiento estadístico sencillo a los datos. Las aplicaciones básicas del programa son: Captura, proceso ("decide" si un resultado es positivo o negativo), y reporte de resultados. Si se desean otras aplicaciones que no puedan ser cubiertas por el paquete utilizado, tales como graficación o análisis estadísticos más complejos, el programa puede ser codificado en algún lenguaje científico o de uso general (Turbo Pascal, Qbasic o C), respetando la estructura determinada en los diagramas de flujo.

Para los fines del presente trabajo se utilizó un paquete comercial, por la conveniencia y facilidad que brinda contar con una estructura de base de datos ya elaborada, aunque esto introduce la desventaja que representa la necesidad de contar con el paquete comercial y la licencia correspondiente para poder utilizarlo.

## XXVIII. CONCLUSIONES

- 1.- El dispositivo diseñado satisface las necesidades de muestreo requeridas en el presente trabajo dado que permite la recuperación de contaminantes aún en bajas concentraciones, la concentración a partir de grandes volúmenes de agua y muy probablemente disminuye los factores de transformación de los compuestos presentes en las muestras.
- 2.- La elección de un sistema bacteriano para los análisis de mutagenicidad en muestras de agua fue adecuada pues permite el análisis de grandes números de muestras en intervalos cortos de tiempo, son sistemas relativamente económicos, de sencilla realización y reportan resultados en poco tiempo.
- 3.- La prueba estadística aplicada para decidir si un resultado es positivo o negativo es adecuada, aunque debe tenerse mucho cuidado en el manejo de los controles negativos para evitar la presencia de resultados falsos positivos.
- 4.- El volumen de muestra fué determinante para aumentar la probabilidad de detectar actividad mutagénica en una muestra dada.
- 5.- No existe actividad mutagénica en muestras provenientes de instalaciones de agua potable o bien, las concentraciones de compuestos potencialmente genotóxicos son mínimas y/o no detectadas por el sistema.
- 6.- No se puede asociar ningún riesgo genotóxico a los centros de distribución de agua potable.
- 7.- Las muestras de agua residual poseen actividad mutagénica, pero para análisis más precisos es necesario utilizar el dispositivo de muestreo diseñado en éste trabajo.
- 8.- Las plantas potabilizadoras requieren de un análisis más completo, aumentando el número de muestras y utilizando el dispositivo diseñado en el presente trabajo.
- 9.- Las muestras de agua tratada aún después de procesos de tratamiento avanzado poseen actividad mutagénica.
- 10.- Los procesos de desinfección con cloro son potencialmente promotores de compuestos con actividad mutagénica.
- 11.- Los análisis instrumentales y los análisis biológicos deben complementarse recíprocamente para obtener resultados más exactos.
- 12.- Los análisis de actividad mutagénica en muestras de agua deben enfocarse primordialmente al estudio de las aguas residuales y tratadas con el objeto de identificar los riesgos asociados con el reuso.

13.- El uso de bases de datos facilita en gran manera la recopilación, proceso y reporte de resultados, de la misma forma funcionan como archivo histórico para el establecimiento de controles o como registros de datos.

## XXIX. RECOMENDACIONES

Quando en un sistema de tratamiento de aguas, se reportan resultados positivos en el proceso final, deben realizarse análisis de los trenes anteriores para determinar que procesos deben ser revisados y/o modificados, o bien determinar si uno de los procesos puede estar ocasionando la formación de nuevos compuestos (como sucede con los procesos de desinfección con cloro). Los resultados positivos de muestras de agua residual, son también la evidencia de que se están desechando contaminantes de alto riesgo a las redes de drenaje.

En caso de que la actividad mutagénica se detecte en algún sitio de distribución de agua potable, debe localizarse la posible fuente emisora causante de la contaminación, para así prevenirla, ya que no puede suspenderse el servicio de distribución, puesto que esto implicaría un riesgo real e inmediato al exponer a la población a condiciones insalubres y deshidratación por falta de agua. Afortunadamente, al menos en el D.F no parece existir la posibilidad de enfrentar un riesgo por la presencia de sustancias mutagénicas en las redes de abastecimiento.

Finalmente, el hecho de que no se detecte actividad mutagénica en agua potable y si se detecte ésta en otros tipos de instalaciones, tales como plantas de tratamiento de agua residual, como fue el caso de los tratamientos terciarios, conduce a pensar que la utilidad de estos análisis esta más enfocada a la evaluación de sistemas de tratamiento y/o efluentes industriales, que al monitoreo rutinario de una enorme red de pozos, o bien al análisis más objetivo de una serie de sitios predeterminados en base a características específicas.

Como complemento de éste trabajo es necesario realizar la comprobación de la disminución de los factores de transformación química de las muestras efectuando muestreos simultáneos con el sistema tradicional de recolección de muestras en recipientes y el dispositivo diseñado en el presente trabajo.

De la misma forma, sería aconsejable efectuar algunos análisis para asegurar que efectivamente el cobre del cual está fabricado el dispositivo de muestreo no reacciona con los compuestos presentes en el agua y no aparece en la muestra final.

### XXX. ANEXO 1 MUTAGENESIS

Una mutación es considerada como un cambio detectable y heredable en la secuencia de bases nitrogenadas que constituyen el material genético (ADN), dicho cambio no es causado por segregación genética o recombinación, y es transmitido a las células hijas y a las generaciones siguientes, dando lugar a generaciones de células mutantes, siempre que no exista un factor letal dominante.

En organismos multicelulares, cuando los descendientes de una célula mutante producen sólo células somáticas, se forma una zona localizada de células mutantes, la cual puede producir un crecimiento canceroso. Cuando las mutaciones son producidas en las células germinales, son transmitidas a las siguientes generaciones dando lugar a individuos con una o más nuevas características.

Los cambios pueden ocurrir directamente en los genes o en los agrupamientos de genes llamados cromosomas. Las anomalías que se refieren grupos de genes, pueden deberse a arreglos estructurales (inversiones o translocaciones), o numéricos (eliminaciones, deleciones) o a adquisición de genes o cromosomas. Tabla 5.

Las mutaciones génicas, conocidas más comúnmente como intragénicas o mutaciones puntuales, son cambios heredables que ocurren dentro de los límites de un gen; que pueden producirse espontáneamente (en ausencia de alguna causa definida) o pueden ser inducidos experimentalmente o de manera accidental por una gran variedad de mutágenos físicos o químicos. Las mutaciones espontáneas, indudablemente son producto de múltiples causas y provocan por ello una gran variedad de lesiones (siendo la sustitución de pares de bases la más frecuente). Los tipos de mutaciones espontáneas y sus frecuencias características dependen del organismo en cuestión, de los genes involucrados y de ciertos factores relacionados con el medio.

Dado que la información genética contenida en un gen es codificada por una secuencia de nucleótidos en la molécula de ADN, y es replicada formando cadenas de nucleótidos complementarias, las mutaciones intragénicas pueden ser el resultado de algún cambio en la secuencia normal de nucleótidos o de las bases que los componen.

Las sustituciones de nucleótidos o bases son llamadas transiciones y transversiones, e incluyen, inserciones, deleciones, inversiones o transposiciones. Fig 12.

Transiciones.- Una transición es el reemplazo de una base púrica por otra base púrica o de una base pirimidica por otra del mismo tipo en algún sitio de la molécula de ADN.

Transversiones.- En las transversiones, ocurre el reemplazo de una base púrica por una pirimidica o viceversa.

Las consecuencias de las mutaciones por sustitución de pares de bases son transcripciones erróneas de los codones en el ARN mensajero cuando se transcribe un gen estructural.

Las mutaciones por corrimiento de marco (Frame Shift), son causadas por una inserción o una delección de un nucleótido o de un número de nucleótidos múltiplo de tres en la molécula de ADN. Las mutaciones Frame Shift, desplazan el punto de inicio de la transcripción genética, provocando que el ARN mensajero sea mal leído en el proceso de translación desde el punto en donde se llevo a cabo la inserción o la delección. Cuando suceden dos mutaciones de signo contrario, la segunda mutación restaurará la primera corrigiendo la lectura del marco en el ARN mensajero, excepto en el segmento formado por los límites de las mutaciones. Fig 13.

La frecuencia o probabilidad de ocurrencia de una mutación para cada organismo (especialmente bacterias) se conoce como tasa de mutación y puede estimarse por diversos métodos a partir del número de mutantes encontrados experimentalmente.

Los agentes químicos que pueden incrementar significativamente la tasa de mutación por encima de los niveles de mutación espontánea, son denominados mutágenos o agentes mutagénicos. Los agentes mutagénicos más conocidos son, las radiaciones ionizantes, los rayos ultravioleta los análogos de bases y los agentes alquilantes e intercalantes, los cuales pueden inducir tanto mutaciones génicas, como cambios estructurales en los cromosomas.

Aunque la acción de las sustancias carcinogénicas y/o mutagénicas, esta relacionada con su estructura química, una estructura determinada puede tener más de una actividad, como lo demuestra el hecho de que algunos agentes alquilantes, sean también intercalantes. Tabla 6.

Las mutaciones pueden resultar de la acción directa de los agentes químicos sobre el material genético o sobre otros componentes celulares funcionalmente ligados a él, como los que participan en la división celular (centriolo y microtúbulos), las proteínas de la cromatina y las enzimas que contribuyen a su reparación o replicación. Fig 14.

Las mutaciones pueden constituir una ventaja, ser neutras o tener manifestaciones patológicas entre las que se incluyen padecimientos congénitos y cáncer. Fig 15.

Existen en la actualidad una gran variedad de enfermedades hereditarias (Mc Kusic.A.V., 1975). Cerca del 3% de todos los recién nacidos son portadores de anomalías congénitas que requieren atención médica, y cerca del 60% de los abortos que ocurren en el primer trimestre del embarazo son consecuencia de aberraciones cromosómicas (Shepard, 1975), lo que pone de manifiesto la contribución de las alteraciones genéticas en la patología humana.

## XXXI. ANEXO 2. CARCINOGENESIS

En el sentido estricto podríamos definir al cáncer como un tumor neoplásico, y una neoplasia como "Una masa anormal de tejido cuyo crecimiento excede del de los tejidos normales, y que no esta coordinado con estos mismos, y que persiste en la misma manera excesiva después de cesar el estímulo que desencadenó el cambio" (Willis, R.A., 1952). Esta masa anormal carece de finalidad, hace presa del huesped y es relativamente autónoma.

Una célula cancerosa plenamente desarrollada es practicamente distinta biológicamente a la célula que le dio origen y tiene una capacidad patente para quedar libre de los controles reguladores de las células normales, gracias a lo cual tiene un mayor potencial de crecimiento y un mayor grado de autonomía. Todos estos cambios fenotípicos se pueden resumir como sigue:

**TRANSFORMACION.-** La transformación es un cambio fenotípico en las células que es pasado de las predecesoras a las descendientes. Los cambios ocurren en las dimensiones y el aspecto de las células afectadas. Una célula transformada puede transferirse facilmente a cultivos *in vitro* con el medio adecuado, o introducirse en huéspedes singénicos adecuados, en los cuales producen un tumor, lo cual no sucede con células normales (con excepción de los fibroblastos), estas células suelen ser más móviles que sus equivalentes normales y su movimiento no cesa aún después de ponerse en contacto con otras células, su crecimiento al igual que su movimiento no son dependientes de la densidad de población y producen apilamientos desorganizados que exeden de la etapa confluyente cuando se les cultiva; esto bien podría potenciar el crecimiento del cáncer en los tejidos. Otro atributo de las células transformadas es que no son dependientes del anclaje o fijación para su crecimiento, por lo que, cuando se les cultiva pueden crecer tanto en medios sólidos como líquidos. Las células transformadas pueden mantenerse indefinidamente como líneas celulares tumorales durante años, y sobre todo, son capaces de producir neoplasias al sembrarse en huéspedes singénicos adecuados.

Muchas otras modificaciones, como propiedades de superficie, nuevos antígenos, modificaciones bioquímicas y anomalías cariotípicas, también se observan en las células transformadas:

**Cambios en la membrana.-** Para muchos investigadores, el cáncer es en última instancia una enfermedad de la membrana (Nicolson y Poste, 1976), basados en que, el caracter invasor, la capacidad para conservar la viabilidad en medios de cultivo, la disminución de la adherencia y cohesión y la incapacidad patente para reaccionar a los controles reguladores tales como: La inhibición por contacto y la inhibición del crecimiento dependiente de la densidad poblacional, significan todos ellos modificaciones en las propiedades de superficie de las membranas .

Cambios antigénicos.- La mayor parte de las células transformadas y los cánceres provocados en animales, poseen antígenos inmunológicamente diferentes de los antígenos normales de histocompatibilidad, aunque esto es menos evidente en tumores espontáneos de animales y seres humanos (Stanley, y Ramzi).

#### AGENTES CARCINOGENICOS

Existen varios agentes que pueden causar cáncer en animales de laboratorio, y pueden clasificarse de la siguiente manera:

- 1) Virus oncógenos.
- 2) Radiación.
- 3) Carcinógenos químicos.

Virus oncógenos.- La oncogenicidad por virus ha sido comprobada en animales, y, aunque en humanos no ha podido comprobarse plenamente, algunos científicos estiman que muy pronto se podrá probar que los virus causan cáncer en humanos, mientras que otros no están totalmente de acuerdo. Un hecho que es irrefutable es que los virus oncógenos existen y han podido identificarse y clasificarse.

Los oncovirus pueden clasificarse en grupos de DNA y RNA, éstos últimos son más conocidos como "oncornavirus", ambos tipos tienen la capacidad de introducirse de manera directa o indirecta como sucesiones de ácidos nucleicos.

La relación más fuerte entre el cáncer humano y un virus oncógeno se aprecia con el virus HTLV-1, que ocasiona una forma de malignidad conocida como leucemia de linfocitos T. Otras aproximaciones las podemos observar con el virus de Epstein-bar (EBV), el linfoma de Burkitt africano y carcinoma nasofaríngeo (Klein, 1975), pero aún se carece de pruebas definitivas.

Radiación.- Las pruebas del efecto carcinogénico de la radiación en seres humanos, provienen de diversas fuentes, algunas involucran a la luz solar, radiación terapéutica y exposición ocupacional, otras lamentablemente incluyen los efectos observados después de los estallidos de bombas atómicas.

Para tratar de explicar el mecanismo o mecanismos biomoleculares involucrados en la inducción de cáncer por radiaciones ionizantes, se plantean dos teorías principales:

- La radiación ionizante daña directa o indirectamente al ADN y produce en efecto, mutaciones.
- Una lesión por radiación activa virus latentes o activa un oncogen dentro de las células.

Independientemente del mecanismo de acción de la energía radiante el resultado final es el mismo: Daño al ADN de las células. Existen algunos factores que guardan estrecha relación con las mutaciones provocadas por la radiación, entre las que podemos mencionar: Tipo de radiación; Dosis; Índice de dosificación; Duración de la exposición; Capacidad de reparación de las células blanco y rapidez de división de las células blanco. La conjugación de todos estos factores determina en última instancia el efecto oncogénico de una exposición a radiaciones.

**Carcinógenos químicos.**- Los agentes ambientales con potencial carcinogénico, fueron descubiertos por Sir Percival Potts, en 1775, al encontrar relación entre el cáncer de escroto sufrido por trabajadores que deshollinaban chimeneas a causa del hollín mismo. Yamagiwa e Ishicawa, obtuvieron en 1915 el primer modelo químico experimental del cáncer al hacer incisiones repetidas en las orejas de conejos de experimentación, con alquitran, compuesto que poco más tarde se demostró que contenía hidrocarburos aromáticos policíclicos (Shimkin y Triolo, 1967).

Los carcinógenos incluyen productos sintéticos y naturales de estructura química muy diversa, están divididos en dos grupos principales conocidos como: Carcinógenos de acción directa y procarcinógenos, que precisan de activación química o enzimática.

Ambos grupos se ven sujetos a procesos de activación - inactivación in vivo. Independientemente del grupo al que pertenezcan, todos los carcinógenos son electrófilos muy reactivos que se conjugan covalentemente con residuos nucleófilos del ADN, ARN y proteínas celulares.

Los carcinógenos de acción directa pueden ser inactivados cuando se administran de manera sistémica o bucal, y quizá de esta manera no lleguen a los blancos clave, pero si se administran directamente cerca de un blanco, producen fácilmente transformación neoplásica o cáncer (Miller y Miller, 1971). Los carcinógenos de este tipo pueden formarse en el huésped si se encuentran los precursores adecuados. La nitrosamina carcinógeno conocido, puede ser producida en el organismo si se combinan nitritos (que pueden ingresar por la alimentación), con algunas aminas secundarias en el medio ácido del estómago. Los procarcinógenos incluyen la mayor parte de los carcinógenos químicos comprobados, y solo muestran su efecto cuando son activados metabólicamente en el organismo, y pueden eventualmente experimentar degradación química o enzimática en formas inactivas. Independientemente de la vía de administración, los procarcinógenos producen efecto carcinogénico máximo sobre los tejidos que poseen la capacidad de convertirlos en carcinógenos.

El hígado es el órgano blanco de muchos procarcinógenos, pues tiene la mayor capacidad para conversión metabólica para los agentes potencialmente carcinógenos.

En un tercer grupo, podríamos agrupar a otra clase de compuestos, los cuales son denominados promotores o fomentadores, estas sustancias, por sí mismas, poseen escasa o nula actividad mutagénica, pero pueden aumentar enormemente la acción carcinogénica de compuestos de los otros dos grupos.

Tomando en cuenta que la mayor parte de los procarcinógenos, carcinógenos de acción directa y carcinógenos promovidos, se conjugan con el ADN, ARN o proteínas de manera covalente (especialmente en el caso del ADN), podemos decir que la mayor parte de los carcinógenos químicos son mutágenos, pero no todos los mutágenos son obligadamente carcinógenos. Este hecho remarca la importancia que adquieren los análisis de mutagenicidad, ya que éstos permiten la selección de agentes potencialmente carcinógenos mediante procedimientos relativamente sencillos.

Las proteínas celulares sufren también la conjugación con carcinógenos, y posiblemente en mayor proporción que los ácidos nucleicos. Los blancos más frecuentes en proteínas son el azufre de la metionina, el nitrógeno 1 de la histidina y el carbono 3 de la tirosina. La alteración de las proteínas puede provocar en las células cambios fenotípicos, y es también muy posible que la alteración de moléculas represoras proporcione un mecanismo epigenético mediante el cual se modifique la expresión del genoma.

Ryser (1971) y Weinstein (1976), plantearon para los carcinógenos químicos, los siguientes enunciados:

- 1) La carcinogénesis depende de la dosis y es aditiva, cuanto mayor sea la dosis acumulativa, cuanto mayor será la frecuencia con que podrá producir tumores.
- 2) Hay un retraso entre la exposición y la aparición de tumores en razón inversa de la potencia del carcinógeno. En seres humanos se calcula entre 5 y 30 años en animales inferiores el retraso suele ser proporcional a la duración de la vida de la especie.
- 3) La conversión de tejido normal en neoplasia maligna es un fenómeno de muchas etapas.
- 4) La acción de algunas clases de carcinógenos, llamados "inhibidores", se ve notablemente aumentada por agentes fomentadores, hormonas y posiblemente otros cofactores.
- 5) La proliferación celular aumenta la carcinogénesis.
- 6) Las neoplasias provocadas por el mismo carcinógeno químico, a menudo muestran diversidad antigénica, al igual que diversidad de fenotipos en términos de cuadro histológico, grado de diferenciación, propiedades de la superficie celular y otros atributos de transformación neoplásica.

## ORIGEN DEL CANCER

Para tratar de explicar el origen del cáncer, se han propuesto dos teorías fundamentales, una de ellas apoyada en la mutación somática, denominada, Teoría Genética, y otra basada en la diferenciación celular aberrante, denominada teoría epigenética. Ambas teorías no se excluyen mutuamente y pueden tener validez en casos particulares o simultáneamente. La teoría de la mutación es apoyada por una buena cantidad de datos y brinda un modelo atractivo para el cambio celular que origina transformación neoplásica. La teoría epigenética también es apoyada por un conjunto impresionante de datos (Braun, A.C., 1975), pero sobre todas las observaciones, el aspecto más atractivo de esta teoría, radica en la esperanza de que pudiera lograrse que las células cancerosas en el ser humano, experimenten rediferenciación para convertirse en células normales.

### XXXII. ANEXO 3. CARACTERISTICAS DE LAS CEPAS BACTERIANAS

Salmonella typhimurium tiene una membrana de lipopolisacárido que es relativamente impermeable, particularmente a los compuestos de alto peso molecular. En la bacteria de tipo silvestre, la mutación *rfa*, o de carácter "rugoso", produce una disminución parcial del lipopolisacárido en la pared bacteriana, lo cual facilita la entrada de moléculas grandes, que no penetrarían en condiciones normales (Maron & Ames, 1983). Las cepas tienen un núcleo de lipopolisacárido, en el cual las heptosas proximal y distal no existen a causa del efecto final de una mutación que involucra los sitios *rfaE* y *rfaF* (Ames et al., 1973b).

Las cepas bacterianas tienen también una mutación que elimina el correcto funcionamiento de los sistemas de reparación del ADN, y esto aumenta la sensibilidad de la prueba. La mutación *AubrB* es una delección del gen que codifica una endonucleasa que esta involucrada en el funcionamiento del sistema de reparación por excisión, esta endonucleasa reconoce las lesiones que alteran la estructura de la doble hélice de ADN, por lo que la ausencia de esta enzima provoca una alteración en la reparación de estas lesiones. La delección *AuvrB*, se extiende a través del operon de la biotina, por lo que estas cepas requieren también un aporte nutricional exógeno, de esta vitamina.

En un ensayo de reversión como el de Salmonella, la respuesta de cada cepa de prueba depende de la naturaleza de su mutación original, en el operon de la histidina, y de su capacidad para procesar las lesiones al ADN. Una cepa dada, usualmente responde a ciertas clases de compuestos, mientras que otra cepa diferente, responde a compuestos diferentes, esto es especialmente importante cuando se trata de establecer una batería de pruebas capaz de detectar el mayor número de compuestos posible, con el menor número de cepas.

En la batería original (Ames et al., 1975), se recomendaba el uso de 5 cepas (tabla 5), cada cepa llevaba una de tres mutaciones (his G46, C3076 y his D3052), todas las cepas llevaban la mutación *uvr* además de tener una mayor permeabilidad a ciertos compuestos químicos como resultado de la mutación *rfa*. Dos de las cepas (TA 100 y TA 98), llevaban además el plásmido PKM 101, el cual poco tiempo después mostro que es un puerto para los genes SOS (*muc ab*), involucrados en mutagénesis (Shanabruch & Walker, 1980). Las células que tienen el plásmido, parecen tener un incremento en su capacidad para iniciar la reparación de lesiones del ADN por error prone. El plásmido, contiene el gen *bla*, el cual codifica la enzima  $\beta$ -lactamasa, esta enzima es responsable de la resistencia de las cepas a la ampicilina y otras penicilinas de anillo lactámico. Los genes *muc* de este plásmido codifican una endonucleasa que actúa sobre las cadenas simples y dobles de ADN (Langer et al., 1982).

El plásmido PKM 101, aumenta la susceptibilidad a la mutagénesis provocada por compuestos químicos y luz ultravioleta,

lo que da como resultado un incremento en la frecuencia de transiciones y transversiones. Las investigaciones acerca de cómo el plásmido aumenta la capacidad de daños mutagénicos se han realizado en Escherichia coli, el plásmido, como se mencionó anteriormente, codifica los genes *muca* y *mucB* (*muc*, es un acrónimo para Mutagénesis U.V. and Chemical), los cuales son análogos de los genes cromosomales *muDy muc* (*Umu* es un acrónimo para U.V. Mutable), estos genes cromosomales, son requeridos cuando existe mutagénesis por luz ultravioleta y compuestos químicos (Walker, 1984), de esta manera, los daños al ADN, inducen la expresión, tanto de los sitios *Muc A/B* como de los sitios *Umu D/C*.

La nueva batería mínima de cepas, recomendada por Maron y Ames (1983), incluye 4 cepas, cada una de las cuales lleva una diferente mutación (his D3052; his G46; his g428; his D6610). Tabla 7.

Dos de las cepas (TA 98 y TA 100), se incluían en la primera batería, las otras dos (TA 97 y TA 102), son recientes (Levin et al., 1982; Maron & Ames, 1983), todas las cepas son *rfa* y llevan el plásmido PKM 101. TA 102, lleva la mutación his G428 en un plasmido multicopia y es *uvr+*, esta cepa es sensitiva a la mitomicina C y mutágenos oxidantes tales como el peróxido de hidrógeno, la bleomicina y quinonas (Chesis et al., 1984; Levin et al., 1984). La utilización de estas últimas cepas requiere de una evaluación previa de la prueba por sí misma, así como de su reproducibilidad en diferentes laboratorios. La selección de una batería óptima de cepas, requiere del análisis de todos los datos generados con cada una de las cepas, tanto en la primera batería, como en la segunda, así como de las necesidades propias del análisis.

Las mutaciones iniciales de las cepas de la nueva batería, presentan 4 cambios fundamentales de la secuencia de nucleótidos: his D3052, es una mutación *frame shift*; his G46 es una transición AT-GC; his D6610 es una mutación *frame shift*+4; y his G428 es una transición GC-AT (tabla 5 y ). La reversión de estas mutaciones a la secuencia original, cubre un amplio espectro de eventos: Dos eventos *frame shift* básicos (+4 y -1) y dos posibles eventos de transición (GC-AT y AT-GC). Debe recalcar que la reversión puede también deberse a una mutación secundaria, como supresores intragénicos y extragénicos. Las pruebas de reversión por lo tanto, permiten la detección de un amplio espectro de eventos genéticos, y no la simple restauración de la secuencia original del ADN (Levin et al., 1984b; Levin y Ames, 1985).

Aunque la batería de pruebas recomendada presenta varias ventajas con respecto a la anterior, es necesario decir que la validación de esta nueva batería, no ha sido tan extensa como la primera, al respecto, se debe comentar que la cepa TA 102 requiere atención especial con respecto a posibles variaciones en el porcentaje de revertantes, probablemente debido a variaciones en el número de copias del plásmido PKM101 (Levin et al., 1984b).

Con la cepa TA 97, el escaso crecimiento de las colonias que se presenta después de de 48 hrs. de incubación, hace difícil el conteo de estas (Levin et al., 1982a). Por estas razones técnicas, muchos autores prefieren utilizar la primera batería, y otros más, dependiendo del análisis a realizar, utilizan únicamente dos cepas (incluidas en ambas baterías), TA100 y TA98 (Mitchel, 1978; Williams, 1982; Wilcox y Denny, 1984).

Por lo anterior, y por la necesidad de establecer algunas prioridades, en el presente trabajo se seleccionaron las cepas TA 100 y TA 98 para llevar a cabo los análisis de mutagenicidad, ya que, lo que se pretende, es establecer la efectividad de los métodos en la recuperación de compuestos con actividad mutagénica a partir de muestras de agua; aunque para un análisis más exacto, se recomienda utilizar la batería completa.

## 1.- Medio mínimo Vogel-Bonner.

- i) En un matraz Erlen meyer con tapón de rosca, de 1000ml, se colocan 7.5g de agar bacteriológico y se disuelve en 300 ml de agua destilada.
- ii) En una botella de dilución de boca ancha se colocan 10 g de dextrosa y se disuelven en 100 ml de agua destilada.
- iii) En una botella de dilución de boca angosta, se colocan 10 ml. de medio Vogel-Bonner y se agregan 100 ml de agua destilada.
- iv) Esterilizar en autoclave a 121 C/15lb de presión por 20 minutos.
- v) Mezclar todas las soluciones en el matraz del agar.
- vi) Vaciar en cajas de Petri 10x100 mm en condiciones asépticas. (Aprox. 30 ml por caja).

## 2.- Medio Vogel-Bonner.

- i) Disolver en 600 ml de agua destilada los siguientes reactivos en este estricto orden:

Sulfato de magnesio Heptahidratado	10 g.
Acido citrico	100 g
Fosfato de potasio monobásico	500 g
Fosfato de sodio y amonio tetrahidratado	175 g

(No agregar el siguiente reactivo hasta que se haya disuelto el anterior).

- ii) Aforar a 1000 ml.
- iii) Agregar 1 ml de cloroformo y almacenar a 4 °C en frasco ámbar.

## 3.- Agar de superficie.

- i) En una botella de dilución de 100 ml, colocar 0.6 g de agar bacteriológico y 0.5 g de cloruro de sodio.
- ii) Disolver en 100 ml de agua destilada.
- iii) Esterilizar en autoclave a 121 C/15lb de presión durante 20 minutos.

- iv) Agregar 10 ml de solución Histidina/biotina 0.5mM estéril, y distribuirla en tubos de ensaye con tapón de rosca 13x100 en volúmenes de 2ml.

#### 4.- Solución de Histidina/Biotina.

##### a) Solucion 0.5 mM.

- i) En un matraz volumétrico de 100 ml. colocar 0.007g de L-Histidina y 0.0122g de (D+) Biotina y disolverlos en 90 ml de agua destilada.
- ii) Aforar a 100 ml.
- iii) Esterilizar en autoclave.
- iv) Almacenar a 4 °C.

##### b) Solucion 0.1 M - 0.5mM

- i) Disolver 1.5516 g de L-Histidina y 0.0122 g de (D+) Biotina en 100 ml de agua destilada
- ii) Esterilizar en autoclave.
- iii) Almacenar a 4 °C en la obscuridad.

#### 5.- Medio completo (Agar nutritivo).

- i) En un matraz Erlen meyer de 1000 ml se colocan 7.5g de agar bacteriológico y 26 g de caldo nutritivo OXOID No 2 y se disuelven en 500 ml. de agua destilada
- ii) Esterilizar en auticlave.
- iii) Vaciar en cajas de Petri 10x100 mm, encondiciones asépticas.

#### 6.- Caldo OXOID.

- i) Disolver 122.5 g de caldo nutritivo OXOID No 2 en 500 ml de agua destilada.
- ii) Distribuir en botellas de dilusión en volúmenes de 100 ml.
- iii) Esterilizar en auticlave.

7.- Solucion de ampicilina.

- i) Se disuelven 80 mg de ampicilina en 10 ml de Hidróxido de Sodio 0.02 N, se esteriliza en autoclave, y se almacena a 4 °C.

8.- Solucion de cloruro de potasio 0.15 M.

- i) Disolver 11.18 g de cloruro de potasio en 1000 ml de agua destilada y almacenar a 4 °C.

9.-Solución de cloruros.

- i) Disolver 8.1332g de cloruro de magnesio hexahidratado y 12.3019 g de cloruro de potasio en 100 ml de agua destilada.
- ii) Esterilizar en autoclave y almacenar a 4 °C.

10.-Amortiguador de fosfatos.

a) Solución A.

- i) Disolver 2.8369 g de Fosfato de sodio monobásico en 100 ml de agua destilada.

b) solución B.

- i) Disolver 2.76 g de fosfato de sodio y amonio en 100 ml de agua destilada.

- c) Mezclar 81 ml de solución A y 19 ml de solución B, ajustar el PH a 7.4 y almacenar a 4 °C.

11.- Placas de ampicilina.

- i) Sobre una placa de medio completo, colocar 0.1 ml de solución de ampicilina en condiciones asépticas, distribuir la solución homogéneamente y dejar que se difunda en el agar. Almacenar a 4 °C.

12.- Placas Histidina-Biotina.

- i) En placas de medio mínimo Vogel-Bonner, colocar 0.1 ml de solución b de Histidina-Biotina, en condiciones asépticas distribuir la solución homogéneamente y dejar que se difunda en el agar. Almacenar a 4 °C.

## LITERATURA CITADA

- Aikin, G.R., Thurman, E.M., Malcolm, R.L., and Walton, H.F., (1979). "Comparison of XAD macroporous resin for the concentration of fulvic acid from aqueous solution." Anal. Chem., 51, 1799-1803.
- Albert, L.A. "Curso de Toxicología" Ambiental. Editorial Limusa. 311 pags. México, 1990.
- Ames, B.N., Durston, W.E., Yamasaki, E., & Lee, F.D., (1973a). "Carcinogens are mutagens: A simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection." Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 70, 2281-2285.
- Ames, B.N., Lee, F.D., & Durston, W.E., (1973b). "An improved bacterial test system for detection and clasification of mutagens and carcinogens." Proc. Natl. Acad. USA, 70, 782-786.
- Ames, B.N., Mayaw, R., and Gold, L.S., (1987). "Ranking possible carcinogenic hazard." Science. Vol 236, pp. 271-278.
- Amphlett, G.E. and Delow, G.F., (1984). "Statistical analysis of the micronucleus test." Mutat. Res. 128, 161-166.
- Andon, B., Jackson, M., Houk, V. and Claxton, L., (1986). "Evaluation of chemical and biological methods for the identification of mutagenic and citotoxic hazardous waste samples." In: Hazardous and industrial solids waste testing. Am. Soc. Phi. pp. 204-215.
- Baars, A.S. (1980). "Biotransformation of xenobiotics in Drosophila melanogaster and its relevance for mutagenicity testing." Drug. Metab. Rev., 11, 191-221.
- Baker, R.A., (1969). "Trace organic contaminant concentration by freezing-III. ice washing." Water. res. 3, 717-730.
- Barnes, W., Tuley, E. and Eisenstadt, E. (1982). "Base sequence analysis of His<sup>+</sup> revertants of the his g46 missense mutation in Salmonella typhimurium." Environ. Mutagen., 4, 297.

- Bellar, T.A., Lichtenberg, J.J., and Kroner, A.D., (1974).** "The occurrence of organohalides in chlorinated drinking water." *J. Amer. Water Works Assoc.* 66, 703-706.
- Bergman, H.L., Kimerle, R.A., and Maki, A.W., Eds. (1986).** "Environmental hazard assessment of effluents." Pergamon Press. 386 pp.
- Braun, A.C., (1975).** "Differentiation and dedifferentiation." In: Becker, F.F., Ed. *Cancer, a comprehensive treatise.* Vol.3 New York, Plenum Press, p. 121.
- Brookes, P. and Lawley, P.D. (1964).** "Evidence for the binding of polynuclear aromatic hydrocarbons to the nucleic acids of mouse skin: Relation between carcinogenic power of the hydrocarbons and their binding to DNA." *Nature* 202, 781-784.
- Brusick, D.J. (1986).** "Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low PH treatment conditions and increased ion concentrations." *Environ. Mut.*, 8, 879-886.
- Buelow, R.W., Carswell, J.K., and Symons, J.M., (1973).** "An improved method for determining organics by activated carbon adsorption and solvent extraction." *J. Amer. Water Works Assoc.*, 65, 57-72.
- Bull, R.J., (1980).** "Health effects of alternate disinfectants and their reaction products." *J. Amer. Water Works Assoc.* 72, 299-303.
- Burnham, A.K., Calder, G.V., Fritz, J.S., Junk, G.A., Svec, H.J., and Willis, R., (1972).** "Anal. Chem. 44, 139-142.
- Carol Cheli, Donna de Francesco, Lynn A. Petrizco, Elena C. McCoy, and Herbert S. Rosencranz. (1980).** "The Salmonella mutagenicity assay: Reproducibility." *Mutat. Res.*, 79, 145-150.
- Chang Kong, V., Haimes, Y.Y., Rosenkranz, H.S., and Pet-Edwards, J., (1985).** "The carcinogenicity prediction and battery selection method (CPBS)." *Mutat. Res.*, 153, 135-166.

- Chesis, P.L., Levin, D.E., Smith, H.T., Ernster, L., & Ames, B.N., (1984). 'Mutagenicity of quinones: Pathways of metabolism activation and detoxification." Proc. Natl. Acad. USA, 81, 1696-1700.
- Ching-Yuan Kuo., and Weinberg, H.S., (1990). "Analysis of inorganic disinfection by products in ozonated drinking water by ion chromatography." In: Proceedings of technology conference, Amer. Water Works Assoc. pp. 503-525.
- Chriswell, C.D., Ericson, R.L., Junk, G.A., Lee, K.W., Fritz, J.S., and Svec, H.J., (1977). "Comparison of macroreticular resin and activated carbon as sorbents." J. Amer. Water Works Assoc. 69, 669-674.
- Chu, K.C., Patel, K.M., Lin, A.H., Tarone, R.E., Linhart, M.S. and Dunkel, V.C., (1981). "Evaluating statistical analysis and reproducibility of microbial mutagenicity assays." Mutat. Res. 85, 119-132.
- Claxton, L.D. and Barry, P.Z., (1977). "Chemical mutagenesis: An Emerging Issue for public Health." Am. J. Public Health, 67, 1037-1041.
- Clive, D., Johnson, K.O., Spector, J.F.S., Batson, A.G. and Brown, M.M.M., (1979). "Validation and characterization of the L5178Y/TK +/- mouse lymphoma mutagen assay system." Mutat. Res., 59, 61-108.
- Cortinas de Nava, C., Ostrosky, P., and Galvan, S.C., (1987). "Principios de mutagénesis y su relación con carcinogénesis y teratógénesis." Cristina Cortinas de Nava, Ed. Instituto de Investigaciones Biomedicas., UNAM. México, D.F.
- Cooper, J.A., Saracci, R.L., & Cole, P., (1979). " Describing the validity of carcinogens screening tests." Br. J. Cancer, 39, 87-89.
- Christianson, H.L. (1975). " Mitotic crossing over as an important mechanism of floral sectoring in Tradescantia." Mutat Res., 28, 389-395.
- Crosby, D.G., (1969). "The nonmetabolic descomposition of pesticides." Ann. NY Acad. Sci., 160, 82-96.

- Crespi, C.L. and Thilly, W.G. (1984). "Assay for gene mutation in a human lymphoblast line, AHH-1 competent for Xenobiotic metabolism." *Mutat. Res.*, 128, 221-230.
- Data, A.R., Randolph, B.W., & Rosner, J.L., (1983). "Detection of chemicals that stimulate Tn9 Transposition in Escherichia coli K12." *Mol. Gen. Genet.*, 189, 245-250.
- de Garay, A.L., (1991), "Ciencia y contaminación ambiental. Acercamiento entre sociedad y gobierno." *Diario Exelsior* 28 de Abril, p. 50-A.
- de Raat, W.K., Hansweit, A.O., and de Kreuk, J.F., (1985). "The role of mutagenicity testing in the ecotoxicological evaluation of industrial discharges into the aquatic environment." *Fed. Chem. Toxicol.* 23, 33-41.
- de Serres, S.J., and Ashby, J. Eds. (1981). "Evaluation of short-Term test for carcinogens." Report of the international collaborative programme, New York, Elsevier.
- Dressler, M., (1979). "Extraction of trace amounts of organic compounds from water with porous organic polymers." *J. Chromatogr.* 165, 167-206.
- Dunkel, V.C., Zeiger, E., Brusick, D., Mc Coy, E., Mc Gregor, D., Mortelmans, K., Rosencranz, H.S., & Simmon, V.F., (1984). "Reproducibility of microbial mutagenicity assays. I. Test with Salmonella typhimurium and Escherichia coli, using a standard protocol ." *Environ. Mutag.*, 6 (suppl. 2), 1-154.
- Dunkel, V.C., Zeiger, E., Brusick, D., Mc Coy, E., Mc Gregor, D., Mortelmans, K., Rosencranz, H.S., & Simmon, V.F., (1985). "Reproducibility of microbial mutagenicity assays. II. Testing of carcinogenesis and non-carcinogenesis in Salmonella typhimurium and Escherichia coli." *Environ. Mutag.*, 7 (suppl. 5), 1-248.
- Ehrenberg, L. (1975). "Chemical mutagens. Principles and methods for their detection." A. Hollander ed, Plenum Press, New York Vol. 2 pp 365-386.

- Espinosa-Aguirre, J.J., Aroumir, C., Meza, M.T., Cienfuegos, E., and Cortinas de Nava, C., (1987). "Genotoxicity of amebicide and anthelmintic drugs in Escherichia coli pol A<sup>+</sup>/pol A<sup>-</sup>." Mut. Res., 188, 111-120.
- Fairchild, E.S., (1977). "Registry of toxic effects of chemical substances." USDH. USPHS. CDC. NIOSH. DHEW. Pub. No (NIOSH) 78-104-A.
- Feron, V.J., Griesmer, R.A. and Nesnow, S. (1983). "Testing of complex chemical mixtures" In: Montesano. R., Bartsch, H., Wilbourn, J., and Yamasaki, H. eds, "Long-Term and Short-Term assays for carcinogens: A critical appraisal." IARC Scientific publications No 83 pp483-494.
- Fisher, G.L., and Crisp, C.E., (1979). "Physical and biological studies in oval fly ash." In: Waters, M.D., Nesnow, S., Husingh, J.L., Sandhu, S.S., and Claxton. L., Eds. Application of short term bioassays in the fractionation and analysis of complex environmental mixtures. New York, Plenum, pp. 441-462.
- Fisher, G.L., and Raabe, O.G., (1979). "Physical factors effecting the mutagenicity of fly ash from a coal-fired power plant." Science, 204, 879-881.
- Fox, J.G. (1977). "Clinical assessment of laboratory rodents in long term bioassay studies ." J. Environ. Pathol. Toxicol. 1, 199-226.
- Fujikawa, K., Ryoo, H. and Kondo. S. (1975). "The Drosophila reversion assay using the unstable zeste-white somatic eye color system." Mutat. Res., 5, 310-324.
- Gilbert, R.S., (1980). "The analysis of fluctuation tests." Mutat Res., 74, 283-289.
- Glatz, B.A., Chriswell, C.D., Argüello, M.D., Svec, H.J., Fritz, J.S., Green, S.M., and Thopson, M.A., (1978). "Examination of drinking water for mutagenic activity." J. Amer. Water Works Assoc. 70, 465-468.
- Gocke, E., King, M.T., and Wild, D., (1981). "Mutagenicity Of cosmetics ingredients licensed by the European communities." Mutat. Res., 90, 91-109.

- Gustafson, R.L., and Paleos, J., (1971). "Interactions responsible for the selective adsorption of organics on organic surfaces." In: Organic compounds in aquatic environments. Faust, S.J. and Hunter, Eds. Marcel Dekker Inc. New York pp.213-237.
- Gutter, B., Speck, W.T., Rosenkranz, H.S., (1977). "Light-induced mutagenicity of neutral red (3-Amino-7-dimethylamino-2-Methylphenazine hydrochloride)." Cancer Res. 37, 1112-1114.
- Hanke, J., Indulski, J. and Lutz, W. (1992). "Biomarkers: A new way of evaluating the effects of environment upon the human organism." Medycyna Pracy 43 (1), 63-71.
- Haworth, S., Lawlor, T., Mortelmans, K., Speck, W., and Zeiger, E., (1983). "Salmonella mutagenicity test results for 250 chemicals." Environ. Mutagenesis, 1, 3-142.
- Heuper, W.C., and Ruchhoft, C.C., (1954). "Carcinogenic studies on absorbates of industrially polluted raw and finished water supplies." Arch. Ind. Hyg. Ocup. Med. 9, 488-495.
- Holm, T.R. and Shock, M.R. (1991). "Potential effects of polyphosphate products on lead solubility in plumbing systems." J. Am. Water Works Ass. 7 (83), 76-82.
- Houk, V.S., and Claxton, L.D., (1986). "Screening complex hazardous wastes for mutagenic activity using a modified version of the TLC Salmonella Assay." Mutat. res. 169, 81-92.
- Howell, J.N., Greene, M.H., Corner, R.C., Maher, V.M., McCormick, J.J. (1984). "Fibroblasts from patients with hereditary cutaneous malignant melanoma are abnormally sensitive to the mutagenic effect simulated sun light and 4-Nitroquinoline-1-oxide." Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 81, 1179-1183.
- IARC., (1980). "IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans." Suppl. 2, Long-Term and Short-Term Screening Assays for carcinogens : A critical Appraisal, Lyon, PP. 85-106.

- Infante, P.F., Wagoner, J.K., Waxweiler, R.J., (1976).**, "Carcinogenic, mutagenic and teratogenic risks associated with vinyl chloride." *Mutat. Res.* 41, 131- .
- Johnston, J.B., and Herron. J.N., (1979).** " A routine water monitoring test for mutagenic compounds." UIVC-WRC-79-0141. University of Illinois: Urbana IL. 87 pp.
- Jolley, R.L., Kratz, S., Morchek, J.E., Pitt, W.W., and Rainey, W.T., (1975).** "Analysing organics in dilute aqueous solution." *Chem. Tech.* 5, 312-318.
- Jungers, R.H., and Lewtas, J., (1982).** "Airborne particle collection and extraction methods applicable to genetic bioassays." In: Tice, R.R., Costa, D.L., and Schaich, K.M., Eds. *Genotoxic effects of airborne agents.* New York, Plenum pp. 35-47.
- Junk, G.A., Richard, J.J., Grieser, M.D., Witiak, D., Argüello, M.O., Vic, R., and Calder, G.V., (1974).** "Use of macroreticular resins in the analysis of water for trace organic contaminants." *J. Chromatogr.*, 99, 745-762.
- Junk, G.A., Richard, J.J., Svec, H.J. and Fritz, J.S., (1976).** *J. Am. Water works Assoc.* 68, 218-222.
- Kalter, H., (1971).** "Correlations between teratogenic and mutagenic effects of chemicals in mammals." In: *Chemical mutagens. Principles and methods for their detection.* Ed. A. Hollander 1, 57-62.
- Keith, L.H., (1976).** "Identification and analysis of organic pollutants in water." Ann Arbor Science publishers, Inc. Ann Arbor, MI.
- Kier, L.E., Brusick, D.J., Auletta, A.E., Von Halle, E.S., Brawn, M.M., Simmon, V.F., Dunkel, V., Mc Cann, J., Mortelmans, K., Prival, M., Rao, T.K., & Ray, V., (1986).** "The Salmonella/mammalian microsomal assay." A report of the US. Environmental Protection Agency. *Gene Tox. Program.* *Mutat. Res.* 168, 69-240.
- Kihlman, B.A. (1975).** "Sister chromatid exchanges in Vicia faba. II. Effect of thiotepa, caffeine and 8-ethoxy caffeine on the frequency of SCE's." *Chromosoma*, 51, 11-18.

- Klein, G., (1975). "The Epstein-Barr virus and neoplasia." *New Eng. J. Med.* 293, 1353.
- Kuhr, R.J., (1971). "The formation and importance of carbamate insecticide metabolites as terminal residues." In: *Pesticide terminal residues.* London, Butterworth and Co. pp. 199-220.
- Kool, J.H., Kuper, F., Van Haermgen, H. & Koeman, J.A., (1985). "A carcinogenicity study with mutagenic organic concentrates of drinking water in the Netherlands." *Food. Chem. Toxicol.*, 23, 79-85.
- Lang, D.R., Kurzepa, H., Cole, M.S., and Loper, J.C., (1980). "Malignant transformation of BAKB/3T3 cells by residue organic mixtures from drinking water." *J. Environ. Pathol. Toxicol.* (in press).
- le Bell, G.L., Williams, D.T., Griffith. G., and Benoit, F.M., (1979). "Isolation and concentration of organophosphorus pesticides from drinking water at the ng/l level, using macroreticular resin." *J. Assoc. off. Anal. Chem.* Vol 62, No 2 pp 241-249
- Leifer, Z., Kada, T., Mandel, M., Zeiger, E., Stafford, R. and Rosenkranz, H.S. (1981). "An evaluation of test using DNA repair deficient bacteria for predicting genotoxicity and carcinogenicity." *Mutat. Res.*, 87, 211- 297.
- Lehninger, A.L. "Bioquímica" Segunda edicion Ediciones Omega 1117 Pags. Barcelona 1981.
- Levin, D.E., Yamasaki, E., and Ames, B.N., (1982). "A new Salmonella tester strain for the detection of Frame - Shift mutagens: A run of cytosines as a mutational hot-spot." *Mutat. Res.*, 94, 315-330.
- Levin, D.E., Marnett, L.J., and Ames, B.N., (1984b). "Spontaneous and mutagen induced deletions: mechanistic studies in Salmonella tester strain TA-102." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 81, 4457-4461.
- Levin, D.E., & Ames, B.N., (1985). "Classifyng mutagens as to heir specificity in causing the six possible transitions and transversions: A simple analysis using the Salmonella mutagenicity assay." *Environ. Mutagenesis*, 8, 9-28.

- Liber, H.L. and Thilly, W.G. (1984). "Mutation assay at the thymidine kinase locus in diploid human lymphoblasts." *Mutat. Res.*, 94, 467-485.
- Logsdon, G.J., Nottingham, K.E., Meiggs, T.O., (1977). "Formation of nitrosamines chlorocycloalkanes during analytical procedures." Presented at the 91st meeting of the association of official analytical chemists, Washington, D.C.
- Loper J.C., Lang, D.R., Schoeny, R.S., Richmond, B.B., Gallagher, P.M., and Smith, C.C., (1978). "Residues organic mixtures from drinking water show in vitro mutagenic and transforming activity." *J. Toxicol. Environ. Health* 4, 919-938.
- Loper, J.C., (1980). "Overview of the use of short-term biological test in the assessment of the health effects of water chlorination" In *Water Chlorination: Environmental impact and Health Effects*. Vol 3. R.L. Jolley, W.A. Brungs, And R.B. Cumming, Eds. Ann Arbor Science: An Arbor, MI. p. 937-945.
- Malcolm, R.L., Thurman, E.M., and Aiken, G.R., (1977). "The concentration and fractionation of trace organic solutes from natural and polluted water using XAD-8 methyl methacrylate resin." In: *Trace substances in environmental Chemistry*, American Chemical Society, Miami, FL.
- Mamber, S.W., Bryson, V. and Katz, S.E. (1984). "Evaluation of the Escherichia coli K 12 inductest for detection of potential chemical carcinogens." *Mutat. Res.*, 130, 141-151.
- Margolyn, B.A., Kaplan, n! and Zeiger, E. (1981). "Statistical analysis of the Ames Salminella/microsome test." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 78, 3779-3783.
- Maron, D.M., and Ames B.N., (1983). "Revised methods for the Salmonella mutagenicity test." *Mutat. Res.*, 113, 173-215.
- Mc Cann, J., E. Chol, E. Yamasaki, and B.N. Ames. (1975). "Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella microsome test: Assay of 300 chemicals ." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 72, 5135-5139.

- Mc George, L.J., Louis, J.B., (1985). "Mutagenicity analysis of industrial effluents." Plenum Publishing corp. pp 247-268.
- Mc Kusic, A.V., (1975). "Mendelian inheritance in man." Catalog of autosomal dominant autosomal recessive and X linked phenotypes. The Johns Hopkins University Press.
- Mc Neil, E.E., Otson, R., Milles, W.F., and Rajabulee, F.L.M., (1977). J. Chromatogr. 132, 271-287.
- Miller, E.C., and Miller, J.A., (1971). "The mutagenicity of chemical carcinogens: correlations, problems and interpretations." Chemical Mutagens, New York, Plenum Press. p. 83.
- Mitchel, I de G., (1978). "Microbial assays for mutagenicity: A modified liquid culture method compared with the agar plate system for precision and sensitivity." Mutat. Res., 54, 1-16.
- Mohn G., Kerklaan. P.R.M., van Zeland, A.A., Ellenberger, J., Baan, R.A., Lohman. P.H.M. and Pons, F.W. (1984). "Methodologies for the determination of various genetic effects in permeable strains of *E. coli* K-12 differing in DNA repair capacity. Quantification of DNA adduct formation, experiments with organ homogenates and hepatocytes, and animal-mediated assays." Mutat. Res., 125, 133-184.
- Nettesheim, P. (1972). "Respiratory carcinogenesis, studies with the syrian golden hamster. A review." Prog. Exp. umor Res., 16, 185-200.
- Nestmann, E.R., Kowbel, D.J., Kamraa, O.P., and Douglas, G.R., (1984). "Reduction of genetic activity in effluent from pulp and paper mill effluent by secondary treatment in a aerated lagoon." Hazardous waste. 1, 67-72.
- Newcombe, H.B., (1978). "Problems for assessing the genetic impact of mutagens on man." Can. J. Genet. Cytol., 20, 459-462.

- Nicolson, G.L., and Poste, G., (1976). "The cancer cells dynamic aspects and modification in cell-surface organization." *New Eng. J. Med.* 295, 197-253.
- Norpoth, K. (1993). "Genotoxicity of environmental and occupational carcinogens." *Atemswegs-und Lungenkrankheiten* 18 (11), 474-479.
- Pet-Edwards, J., Chankong, V., Rosenkranz, H.S., and Haimes, Y.Y., (1985). "Application of the carcinogenicity prediction and battery selection method (CPBS) to the gene-tox data base." *Mutat. Res.*, 153, 187-200.
- Pitts Jr, J.N., Van Cauwenbergh, K.A., Grosjean, D., Schmid, J.P., and Hynds, P.M., (1978). "Atmospheric reactions of polycyclic aromatic hydrocarbons: Facile formation of mutagenic nitro derivatives." *Science*, 202, 515-519.
- Potter, M., (1963). "Percival Pott's contribution to cancer research." *Natl. Cancer Inst. Monogr.* 10, 1-13.
- Quillardet, P. and Hofnung, M. (1985). "The SOS Chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: procedures." *Mutat. Res.*, 147, 65-78.
- Raabe, O.G., (1982). "Problems associated with assessing the mutagenicity of inhalable particulate matter." In: Tice, R.R., Costa, D.L., & Schaich, K.M., Eds. *Genotoxic effects of airborne agents*. New York, Plenum. pp. 209-223.
- Ramel, C., (1978). "The detection and control of mutagenic and carcinogenic compounds in the environment." *AMBIO*, 7, 244- .
- Rangel, R. *Fundamentos de química analítica*. Ed Limusa 225 pags. México, 1977.
- Rhom and Hass, (1984). "Summery bulleting amberlite polymeric adsorbents." *Technical Bulleting Fluid process Chemicals*. Rhom and Hass Company Philadelphia. PA.
- Rook, J.J., (1974). "Formation of haloforms during chlorination of natural waters." *J. Water Treat. Exam.* 22,234-243.

- Ronchi, V.N. (1970). "The effect of colchiine on subchromatid exchanges in root meristem cell of Vicia faba and Allium cepa." Mutat. Res., 9, 385-394.
- Rosenkranz, H.S., Klopman, G., Chankong, V., Pet-Edwards, J., and Halmes Y.Y., (1984). "Prediction of environmental carcinogens: a strategy for the mid 1980's." Environ. Mutagenesis, 6, 251-258.
- Rosner, M.H., Grassman, J.A. and Hass, R.A. (1991). "Immunochemical techniques in biological monitoring." Environ. Health Persp. 94(0), 131-134.
- Ruiz-Rubio, M., Alejandre-duran, E. and Pueyo, C. (1985). "Oxidative mutagens specific for AT base pairs induce forward mutations to L-arabinose resistance in Salmonella Typhimurium." Mutat. Res., 147, 153-163.
- Ruud, J.B.P., and de Leer, W.B., (1990). "3,5-dihydroxy benzaldehyde, the MX- Precursor?." In: Proceedings of technology conference. Amer. Water works Assoc. pp. 1515-1518.
- Ryser, H.J., (1971). "Chemical carcinogenesis." New. Eng. J. Med. 285, 721.
- Searle, C.E., ed. (1984). "Chemical carcinogens (ACS Monographs 182)." Whashington, D.C. Ammer, Soc.
- Shanabruch, W. G., and Walker, G.C., (1980). "Localization of the plasmid (PKM-101) gene (s) involved in rec A<sub>+</sub>, Lex A<sub>+</sub>-dependent mutagenesis." Mol. Gen. Genet., 179, 289-297.
- Shapiro, J., (1961). "Freezing out a safe technique for concentration of dilute solutions." Science, 133, 2063-2064.
- Shepard, Th. H., Miller, J.R., and Marois, M., (1975). In : "Methods for detection of environmental agents that produce congenital defects." North-Holland/American Elsevier p. 13.
- Shimkim, M.B., and Triolo, V.A., (1967). "History of carcinogenesis: Some prospective ramarks." In: 20th annual symposium on fundamental cancer research. Baltimore, Williams and Wilkins Co. p. 1.

- Shinder, G., Toursman, S. and Dubow, M.S., (1984).** "Bacteriophage mu-DNA transposition to identify new classes of genotoxic agents." In: Liu, D. & Dutka, B.J., Eds. Drug and chemical toxicology, Vol 1, Toxicology Screening Procedures using bacterial system, New York, Marcel Dekker, pp. 295-308.
- Shubick, P. (1972).** "The use of the syrian golden hamster in toxicology and carcinogenesis research." Cancer Research., 38, 2642- 2645.
- Simmons, V.F., Kauhanen, K., and Tardiff, R.G., (1977).** "Mutagenic activity of chemical identified in drinking water." Presented at the second international conference on Environmental Mutagens. Edinburgh.
- Simons, J.W.I. (1982).** "Effect of temperature on mutation in cultured human skin fibroblasts." Mutat. Res., 92, 417-426.
- Somani, S.M., Teece, R.G., and Shaeffer, D.J., (1980).** "Identification of cocarcinogens and promoters in industrial discharges into and in Illinois River." Toxicol. Environ. Health, 6, 315-331.
- Stanley, L.R., and Ramzi, S.C., (1984).** "Patologia estructural y funcional. Segunda Edicion Ed. Interamericana. México, D.F.
- Stevens, D.K., Bull, R.J., Nauman, C.H. and Blancato, J.N., (1992).** "Decision model for biomarkers of exposure." Regulatory Toxicology and Pharmacology. 14, (3), 286-290.
- Tacachi, Kawachi., Takie Komatsu., Tsuneo Kada., and Yataro Tazima. (1980).** "Results of recent Studies on the relevance of various short-term screening test in Japan." Elsevier/North-Holland Biomedical Press. The predictive value of short-term screening test in carcinogenicity evaluation, G.M. Williams Eds.
- Thurman, E.M., Malcolm, R.L., and Aiken, G.R., (1978).** "Prediction of capacity factors for aqueous organic solutes adsorbed on a porous acrylic resin." Anal. Chem. 99, 745-762.

- Toman, Z., Dambly-Chaudrere, C., Tenenbaum, L., and Radman, M., (1985).** "A system for detection of genetic an epigenetic alterations in Escherichia coli induced by DNA-Damaging agents." J. Mol. Biol., 186, 97-105.
- Trosko, J.E., Chang, Ch., (1978).** "Relationship between mutagenesis and carcinogenesis." Photobiol, 28, 157- .
- Tweats, D., Bootman, J., Combes. R., Green, M., And Watkins, P., (1984).** "Assay for DNA repair in bacteria." In: Dean, B.J., Ed., Report of the UKEMS Sub committee on Guidelines for mutagenicity testing, Part 2 Swansea, UK Environmental mutagen society. pp 525.
- Ulitzur, S., Weiser, I., and Yannai, S., (1980).** "A new sensitive and simple bioluminescence test for mutagenic compounds." Mutat. Res., 74, 113-124.
- Ulitzur, S., and Weiser, I., (1981).** "Acridine dyes and other DNA-intercalating agents induce the luminiscence system of lumious bacteria and their dark variants." Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 3338-3342.
- U.S. Environmental Protection Agency.** National Primary Drinking Water Regulations; Substitution of contaminants in drinking water priority list of additional substances wich may require regulation under the safe drinking water. Act, 53FR 1892, Jan 22, 1988.
- Van Rossum, P., and Webb, R.G., (1978).** J. Chromatogr. 150, 381-392.
- Vega, S., Reynaga, O., "Evaluación epidemiológica de riesgos causados por agentes químicos ambientales." Ed Limusa, México, D.F. 1988.**
- Venitt, S., (1982).**"UKEMS collaborative genotoxicity trial. Bacterial mutation test of 4 chloro-methyl-biphenyl, 4-hydroxymethyl- biphenyl and benzilchloride. Analysis of data from 17 laboratories." Mutat. Res., 100, 91-109.

- Venitt, S., Forster, R., and Longstaff, E., (1983). "Bacterial mutation assays." In: Dean, B.J., Ed., Report of the UKEMS Sub-committee on Guidelines for mutagenicity testing, Part 1, Swansea, UK. Environmental Mutagens Society. pp. 5-40.
- Venitt, S., Crofton-Sleigh, C. and Forster, R. (1984) "Bacterial mutation assay using reverse mutation. In: Venitt, S. and Parry, J.M., Eds, Mutagenicity testing, a practical approach, Chapter 3, Oxford IRL Press, pp 45-98.
- Venitt, S., and Forster, R., (1985). "Bacterial mutagenicity assays." coordinators' reports. In: Parry, J.M., & Arlett, C.F., Eds., Comparative genetic toxicology: the second UKEMS study, London, Mc Millan Press. pp. 103-144.
- Villalobos-Pietrinni, R., Aguirre, J.A. and Breña, M., (1977). "MUTaciones en bacterias: Un método para detectar los efectos genéticos de las drogas de abuso." Centro mexicano de estudios de farmaco-dependencia. Depto. de radiobiología y Genética Instituto Nacional De Energía Nuclear, México. Laboratorio de radiobiología y mutagénesis ambiental, Depto. de biología experimental, UNAM.
- Walker, G.C., (1984). "Mutagenesis and inducible responses to deoxyribonucleic acid damage in Escherichia coli." Microbiol. Rev., 48, 60-93.
- Weinstein, B., (1976). "Molecular events in chemical carcinogenesis." Adv. Patho. Biol. 4, 106.
- Weinstein, D., and Lewinson, T.M., (1978). "A statistical treatment of the Ames mutagenicity assay." Mutat. Res., 51, 433-434.
- Wilcox, P., and Denny, S., (1984). "Effect of dechlorinating agents on the mutagenic activity of chlorinated water samples." In: Water chlorination, Chemistry, Environmental Impact and Health Effect. Vol.5. Lewis Publishers Inc.
- Wilkins, J.R.III., Reiches, N.A., and Kruse, C.W., (1979). "Organic chemical contaminants in drinking water and cancer." J. Epidemiol., 110, 420-448.

Williams, D.T., (1982). "Determination of mutagenic potential and organic contaminants of great lakes drinking water." Chemosphere, Vol 11, 3, 263-276.

Willis, R.A., (1952). "The spread of tumors in the human body." London, Butter worth and Co.

Yuefeng Xie and Zhanshengwang., (1990). "Effects of water treatment on mutagenic activity and concentration of MX in water." In: Proceedings of technology conference. Amer. water works Assoc. pp. 1423-1434.

Zimmermann, F.K. (1973). " A yeast strain for visual screening for the two reciprocal products of mitotic crossing over." Mutat. Res., 21, 263-269.

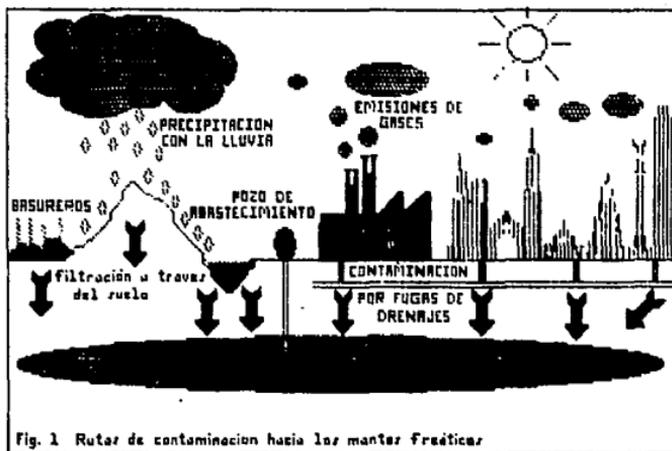
Zimmermann, F.K., von Borstel, R.C., von Halle, F.S., Parry, J.M., Siebert, D., Zetterberg, G., Barale, R. and Loprieno, N. (1984). " Testing of chemical for genetic activity with Saccharomyces cerevisiae: A report of the U.S. Environmental Protection Agency, Gene-Tox Program. Mutat. Res., 133, 199-244.

#### OTRAS REFERENCIAS

- Ashby, J., (1986). "The value and limitations of short-term genotoxicity assays and the inadequacy of current cancer bioassay chemical selection criteria." Genetic Toxicology of environmental chemicals Part B. Genetic effects and applied mutagenesis. Alan, R., Liss Inc. pp. 111-119.
- Brusick, D.J., (1978). "Implications of treatment-condition-induced genotoxicity for chemical screening and data interpretation." Mutat. Res., 189, 1-6.
- Curtis C.T., Richter, S.A., Crouch, E.A. and Klema, E.D., (1987). "Cancer risk management." Reprinted from Environmental Science & Technology, Vol 21, p. 415.
- Ehrenberg, L., Anderstam, B., Hussain, S., and Hamnerius, Y., (1983). "Statistical aspects of the design of biological test for the detection of low genotoxic activity." Hereditas, 98, 33-41.
- Haynes, R.H., and Friederike Eckardt., (1979). "Analysis of dose-response patterns in mutation research." Can. J. Genet. Cytol. 21, 277-302.
- Jolley, R.L., (1988). "Concentrating organics in water for biological testing." Environmental science & Technology, Vol 15 No 8 pp 874-879.
- Jones, E., "Aplique el dBase III plus." Mc Graw-Hill, México, D.F. 1990.
- Katz, A. J., (1978). "Design and analysis of experiments on mutagenicity. I. Minimal sample sizes." Mutat. Res. 50, 30-307.
- Lewtas, J., Nesnow, S., and Roy, E.A., (1983). "A comparative potency methods for cancer risk Assessment: Clarification of the rationale theoretical basis, and application to diesel particulate emissions." Risk Analysis Vol.3 No 2 pp. 133-137.

- Melton, R.G., (1979). "GC/MS analysis of organics in drinking water concentrates and advanced waste treatment concentrates." Preliminary report-combined results on five Drinking Water Supplies. Contract. No 68-032458, USEPA, Cincinnati OH.
- Nesnow, S., Triplett, L.L., and Slaga, T.J., (1983). "Mouse skin tumour. Initiation-Promotion and complete carcinogenesis bioassays: Mechanisms and Biological Activities of emission samples." Environmental Health Perspectives, 47, 255-268.
- Nesnow, S., (1990). "Mouse skin tumours, and human lung cancer: Relationship with complex environmental emissions." Complex mixtures and cancer risks. Lyon. International Agency For Research on Cancer. (IARC).
- Nestmann, E.R., (1985). "Detection of genetic activity in effluent from pulp and paper mills: Mutagenicity in Saccharomyces cerevisiae." In: Mutagenicity testing in Environmental Pollution control, Edited by Zimmermann, F.K., and Taylor-Mayer, R.E., Ellis Horwood Limited Publisher pp. 105-117.
- Quillardet, P., Tovati, E., and Hofnung, M., (1991). "First characterization of the mutagenic specificity of 7-metoxi-2-nitronaphto [2,1-b] furan (R 7000) in Salmonella Typhimurium." Mutat. Res., 248, 85-92.
- Schwartz, D.J., and Kopfler, F.C., (1979). "Water distribution system, a new source of mutagens in drinking waters." Reprinted from Environmental Science & Technology, Vol 13 p. 1138.
- Yamasaky, E., and Ames, B.N., (1977). "Concentration of mutagen from urine by adsorption with the non polar resin XAD-2: Cigarette smokers have mutagenic urine." Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol 74, No 8, pp 3555-3559.

**FIGURAS**



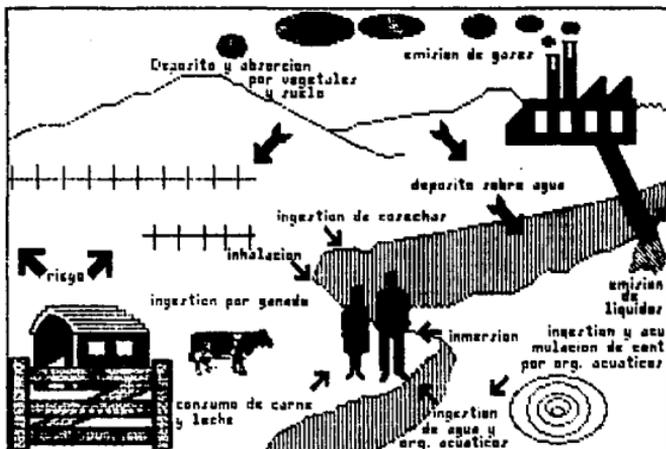


Fig 2 Medios de dispersion y vias de transferencia de los contaminantes ambientales hacia el hombre.

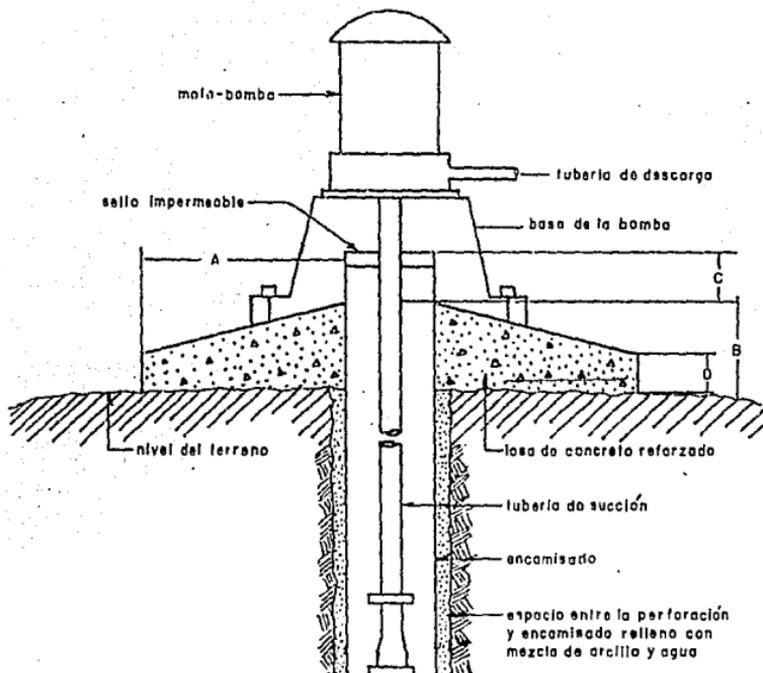


FIGURA 3 "POZO PERFORADO PROFUNDO"

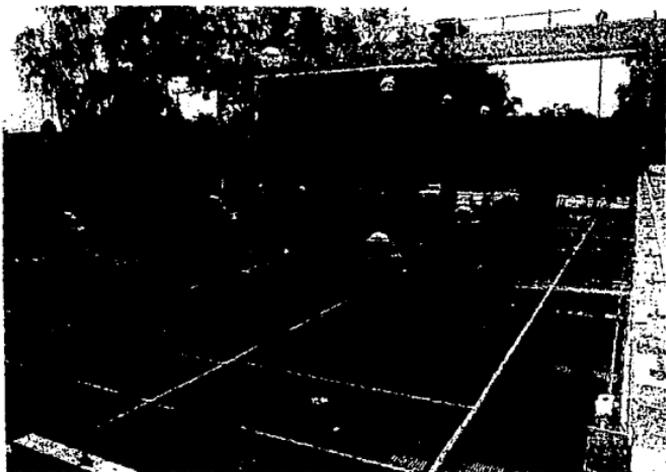


FIGURA 4 "PLANTA DE BOMBEO DE AGUA POTABLE"

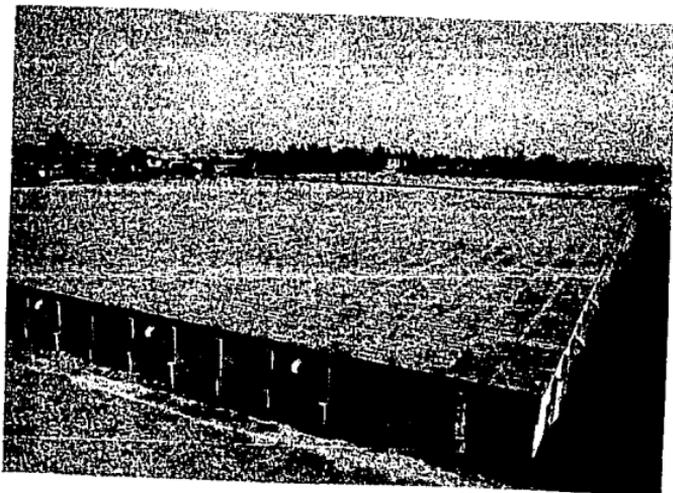


FIGURA 5 "TANQUE DE ALMACENAMIENTO DE AGUA POTABLE"

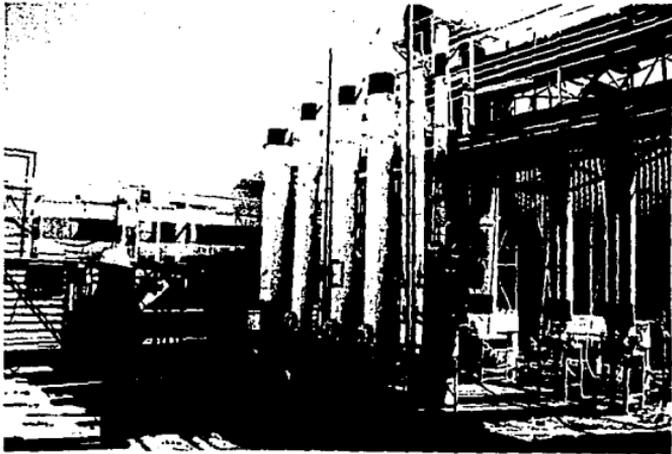


FIGURA 6 "DISPOSITIVO EXPERIMENTAL DE TRATAMIENTO AVANZADO DE AGUA RESIDUAL"

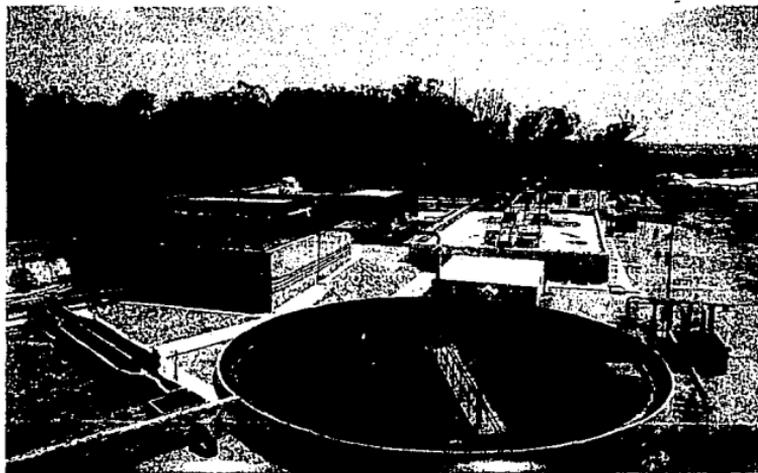
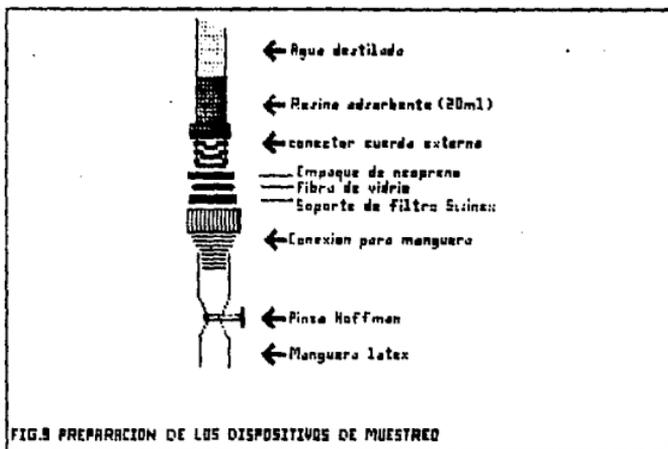
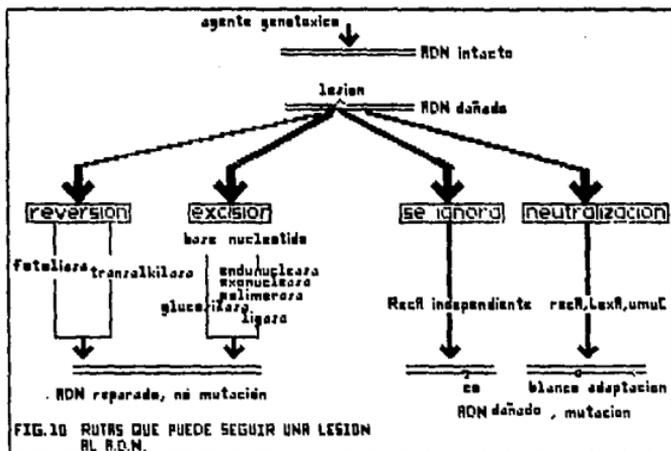
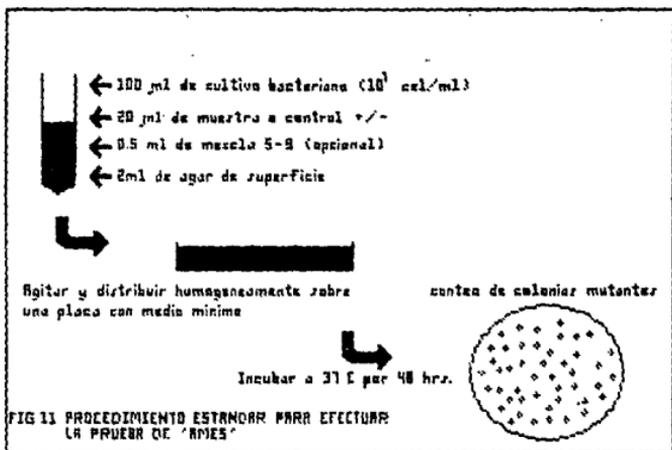


FIGURA 1 "PLANTA DE TRATAMIENTO DE AGUA RESIDUAL"











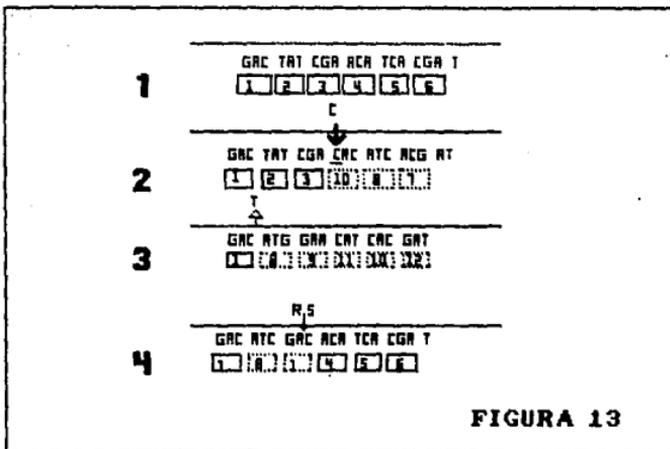
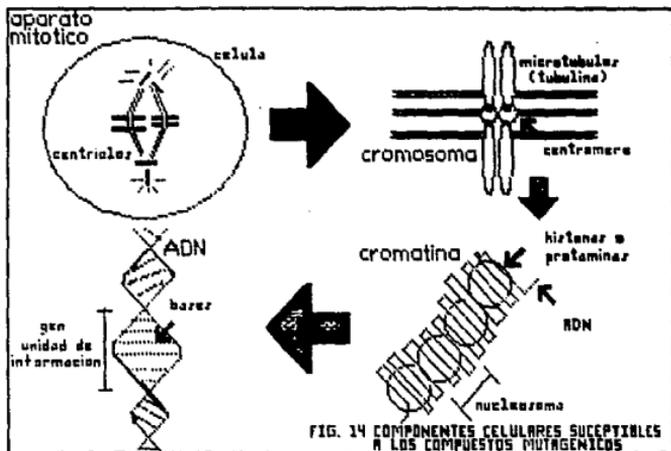
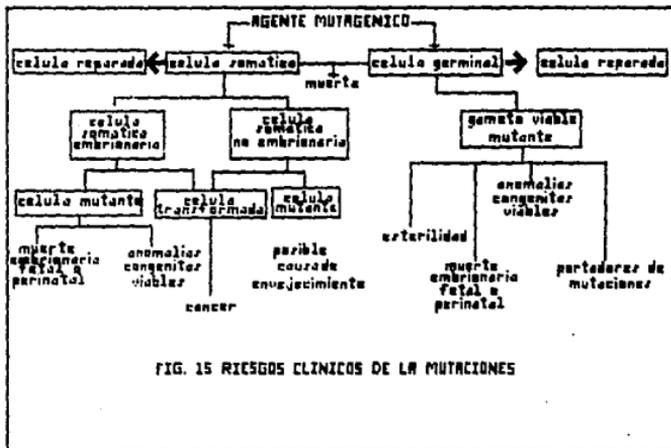


FIGURA 13

DIAGRAMA QUE ILUSTRAS EL EFECTO DE LAS MUTACIONES POR LECTURA DE MARCO, LAS CUALES ALTERAN LA LECTURA DEL CODIGO GENETICO. 1.- SECUENCIA --- NORMAL DE NUCLEOTIDOS EN UNA CADENA SIMPLE DE ADN, QUE CODIFICA LA SECUENCIA DE UN AMINOACIDO EN UN POLIPEPTIDO FUNCIONAL - LOS AMINOACIDOS SE REPRESENTAN POR NUMEROS Y SON CODIFICADOS POR GRUPOS DE 3 NUCLEOTIDOS. 2.- INSERCIÓN DE UN NUCLEOTIDO -CITOSINA- QUE DA COMO RESULTADO UNA SECUENCIA MUTANTE Y UN POLIPEPTIDO SIN ACTIVIDAD BIOLÓGICA. - EL AMINOACIDO INCORRECTO SE INDICA CON LAS LINEAS PUNTEADAS-. 3.- DELECCIÓN DE UN NUCLEOTIDO -TIMINA- QUE DA COMO RESULTADO OTRA SECUENCIA MUTANTE. 4.- RECOMBINACIÓN PARCIAL DE LA LECTURA CORRECTA DEL MARCO POR RECOMBINACIÓN GENÉTICA DE LAS SECUENCIAS 2 Y 3 -R, S MARCA EL SITIO DE RECOMBINACIÓN- EN EL INTERVALO ENTRE LA DELECCIÓN Y EL SITIO DE INSERCIÓN.





GRAFICAS

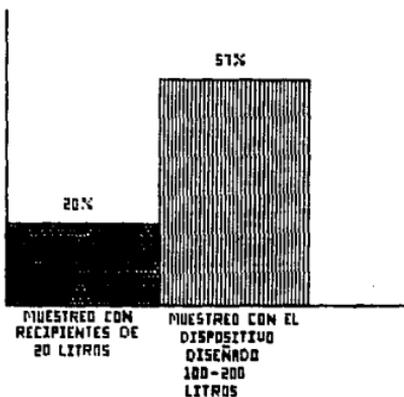
TABLAS

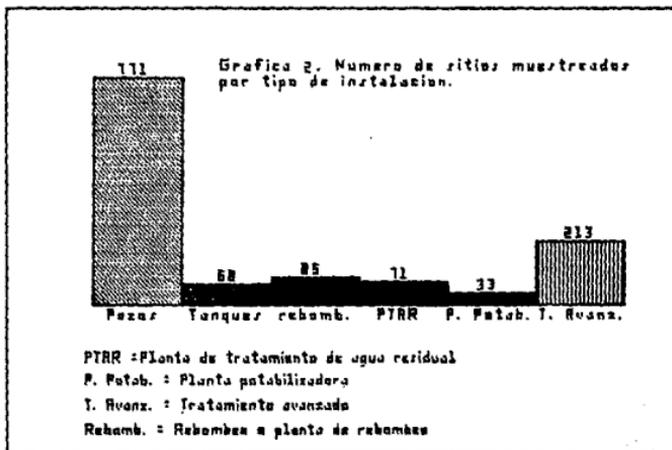
MAPAS

DIAGRAMAS

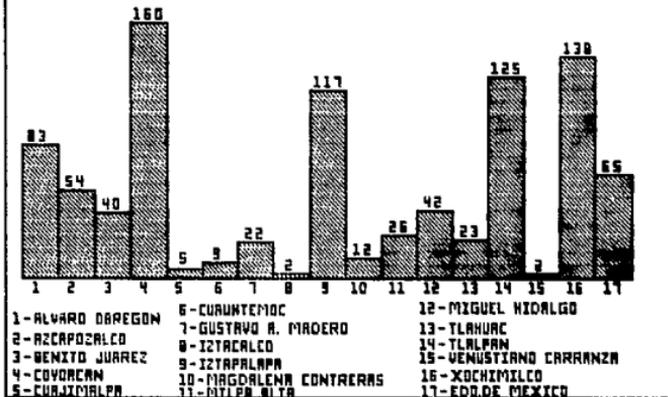
**GRAFICA 1      PORCENTAJES DE RESULTADOS POSITIVOS POR TIPO DE MUESTREO**

**% DE  
RESULTADOS  
POSITIVOS**

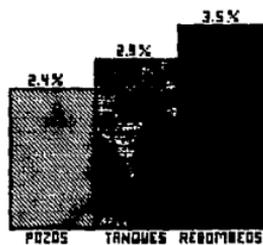




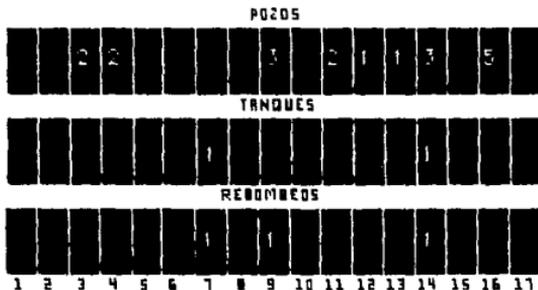
GRAFICA 3 No DE MUESTRAS POR DELEGACION EN AGUA POTABLE



GRAFICA 4 PORCENTAJE DE RESULTADOS POSITIVOS POR INSTALACION EN AGUA POTABLE

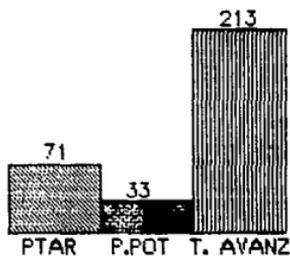


GRAFICA 5 NUMERO DE INSTALACIONES CON RESULTADO POSITIVO POR DELEGACION



1-ALVARO OREGON	6-CUAUHTEMOC	12-MIGUEL HIDALGO
2-AZCAPOCALCO	7-GUSTAVO A. MADERO	13-TLAHUAC
3-BENITO JUAREZ	8-IZTACALCO	14-TLALPAM
4-COYOACAN	9-IZTAPALAPA	15-VENUSTIANO CARRANZA
5-CUAJIMALPA	10-MARGARENA CONTRERAS	16-XOCHIMILCO
	11-MILPA ALTA	17-EDO. DE MEXICO

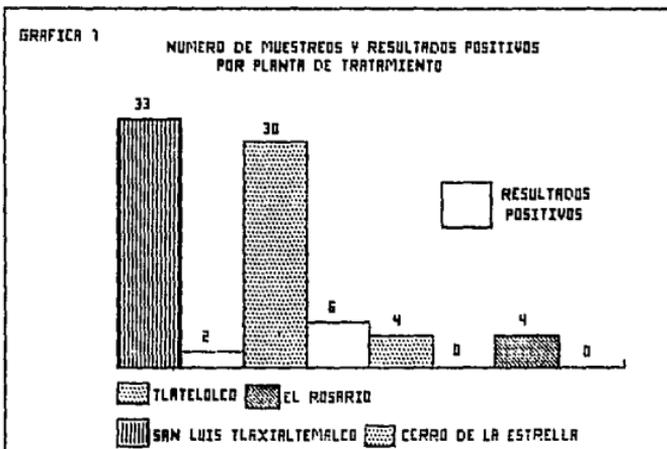
GRAFICA 6 No DE MUESTRAS POR INSTALACION PARA AGUA RESIDUAL Y TRATAR



PTAR : Planta de tratamiento de agua residual

P. Pat. : Planta potabilizadora

T. Avanz. : Tratamiento avanzado



**GRAFICA 8** NUMERO DE MUESTRAS POR PLANTA POTABILIZADORA Y POR TRAMO DE TRATAMIENTO

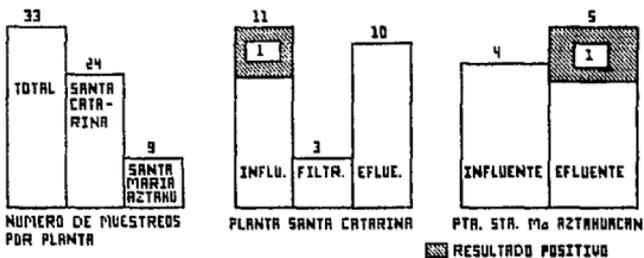
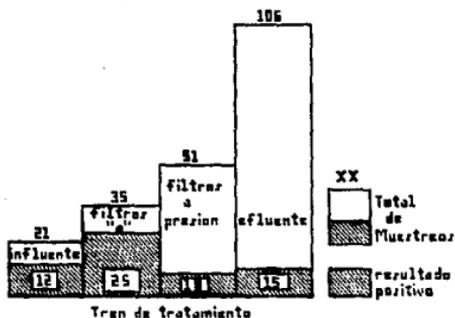


Grafico 9 No de muestras por tran de tratamiento y resultados positivos para el dispositivo experimental de tratamiento avanzado de agua residual (DETARR)



GRAFICA 10 PORCENTAJE DE RESULTADOS POSITIVOS  
PARA EL COETANAR

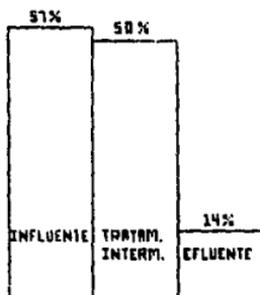


TABLA 1. CARACTERISTICAS DE LOS SISTEMAS BIOLÓGICOS PARA IDENTIFICAR MUTAGENOS			
SISTEMA	ALTERACION IDENTIFICADA	DURACION PROMEDIADA DE UNA PRUEBA	FACTORES LIMITANTES
ROM	CAMBIO EN LA MOLECULA	2-3 DIAS	COSTO DEL EQUIPO Y USO DE ALIQUANTOS TÉCNICOS RELATIVAMENTE DIFÍCILES
VIRUS	MUTACIONES GENICAS INDUCCIÓN DE FAGO.	2-3 DIAS	MÍNIMOS
BACTERIAS	MUTACIONES GENICAS	3-5 DIAS	MÍNIMOS
HONGOS	MUTACIONES GENICAS Y SEGR. GACION CROMOSOMICA DEFECTUOSA	1-3 SEMANAS	MÍNIMOS
ENSAYO VIA INSPERDERO: BACTERIAS HONGOS Y CULTIVOS DE CELULAS DE MARILTERO	LOS CITRANAS PARA CADA SISTEMA	1-5 SEMANAS	REQUERIMIENTOS DE BIOTERIO
PLANTAS	MUTACIONES GENICAS; REARREGLOS CROMOSOMICOS; NUMERICOS Y ESTRUCTURALES	1-5 SEMANAS	MÍNIMOS
INSECTOS	MUTACIONES GENICAS; REARREGLOS CROMOSOMICOS; NUMERICOS Y ESTRUCTURALES	2-7 SEMANAS	MÍNIMOS
CULTIVOS DE CELULAS DE MARILTERO	MUTACIONES GENICAS; REARREGLOS CROMOSOMICOS; NUMERICOS Y ESTRUCTURALES	2-5 SEMANAS	COSTO DEL MATERIAL Y DEL EQUIPO USO DE TÉCNICOS LABORIOSAS INTERPRETACION CITOGENETICA
MARILTEROS	MUTACIONES GENICAS; REARREGLOS CROMOSOMICOS; NUMERICOS Y ESTRUCTURALES	2-7 MESES	COSTO DE LA INVESTIGACION POR LOS REQUERIMIENTOS Y EL TIEMPO DE REALIZACION
MUTAGENOS	C SORATIOS REARREGLOS CRO- E L RPOSORCOS, NUNE- U TURLES Y ESTRUCT- A S GERTINALES DURANTO Y/O DISINTEGRACION DE ERDROS-ORAS. TERMS- RISION DE MUTACIONES A LOS DESCENDIENTES	1-2 SEMANAS	PROBLEMAS ETICOS, CONTROL DE MUCHAS VARIABLES OBTENCION DE DOMINIOS
MUTAGENOS	1-2 SEMANAS	1-2 DIAS	ESTUDIOS EPIDEMIOLOGICOS TIEMPO

TABLA 2

PRUEBAS BACTERIARIAS PARA DETERMINACION DE MUTAGENICIDAD

NOMBRE	ANO	INDICADOR	ORGANISMO	MECANISMO	VALIDACION	SIMPLICIDAD	CEPAS	SENSIBILIDAD	REFERENCIA
AMES	1975	his1	S. typh.	reversion	>>1000 >>100	++	4	+++	Maron & Ames (1983)
HP2	1976	trp1	E. coli.	reversion	>>100 >>10	++	1	+++	Vennit et al. (1984)
K12/343/113	1974	k	E. coli.		>30 >3	+	1	+++	Mohr et al. (1984)
araR	1978	araR	S. typh.	dir	>40 >4	++	1	+++	Ruz-Rubio et al (1985)
Inductest	1976	fago	E. coli.	CI romp.	>100 >5	+++	1	+	Marber et al. (1984)
SOS chrono- test	1982	B-gal.fos	E. coli.	LexA romp.	>100 >5	+++	1	+++	Quillardet et al. (1985)
Rec assay		Inhibicion del crecin.	B. subtilis	DNA repar.	>>100 >10	+++	2	++	Leifer et al. (1981)
Pol A assay		Inhibicion del crecin.	E. coli.	DNA repar.	>>100 >10	+++	2	++	Leifer et al.

Nombre = Nombre comun de la prueba; AÑO = Año de la primera publicacion; Indicador = indicador de la mutacion;

his1= colonias his1; trp1= colonias trp1; araR= colonias resistentes a la arabinosa; galI= colonias galI; fago=

formacion de placas por fagos; Rec-assay de la B-galactosidasa; fos= ensayo para fosfatasa alcalina.

ORGANISMO= organismo de prueba; S. typh.= Salmonella typhimurium; E. coli.= Escherichia coli; B. subtilis= Bacillus subtilis.

MECANISMO= mecanismo molecular involucrado; reversion= reversion; dir= direccion de mutagenesis; CI romp.= ruptura

del represor CI por el fago lambda; araR romp.= ruptura del represor LexA; VALIDACION= estimacion aproximada del numero de

compuestos validados y estimacion aproximada del numero de laboratorios que han hecho publicaciones acerca de la prueba.

>= mas de >>= mucho mas de; SIMPLICIDAD= estimacion de la simplicidad de los procedimientos, incluyendo necesidades de

reactivos; + = relativamente simple; ++ = simple; +++ = simple; CEPA = numero de cepas utilizadas en la prueba.

SENSIBILIDAD= capacidad para detectar pocas cantidades de mutagenos; + = poco sensible; ++ = muy sensible;

+++ = extremadamente sensible; REFERENCIAS= referencias bibliograficas sobre la prueba.

TABLA 3

RESULTADOS POSITIVOS EN INSTALACIONES DE AGUA POTABLE

DELEGACION	TIPO DE INSTAL.	NOMBRE DEL SITIO	YRA	KRC	KRM/KRC	CEPA	TRATAMIENTO
XOCHIMILCO	POZO	NATIVITAS	184	88	2.09	TA 100	S9 AL 4%
XOCHIMILCO	POZO	STA. CRUZ ACALPICOA	161	24	2.54	TA 98	S9 AL 10%
XOCHIMILCO	POZO	EXCLUSORIO SUR 1	160	29	2.06	TA 98	S9 AL 10%
XOCHIMILCO	POZO	LA NORIA 6	170	53	2.07	TA 100	S9 AL 4%
XOCHIMILCO	POZO	SAN LORENZO ATENOHAYA	155	25	2.2	TA 98	S9 AL 10%
IZTAPALAPA	POZO	POPISIMA 7	155	24	2.61	TA 98	S9 AL 4%
IZTAPALAPA	POZO	SECTOR POPULAR 2	152	24	2.15	TA 98	S9 AL 10%
IZTAPALAPA	POZO	UNIDAD MODELO 2	1312	141	2.21	TA 100	S9 AL 10%
IZTAPALAPA	REBOMBEO	UNIDAD 2	1299	118	2.53	TA 100	-S9
TLALPAM	REBOMBEO	TOPILEJO 1	155	27	2.03	TA 98	S9 AL 10%
TLALPAM	POZO	PERIFERICO 14	1382	181	2.11	TA 100	S9 AL 10%
TLALPAM	POZO	INDUCTO TLALPAM 1	165 151	27 24	2.03 2.08	TA 98 TA 98	S9 AL 10% S9 AL 4%
TLALPAM	POZO	VILLA COAPA 7	129 154	24 25	2.75 2.16	TA 98 TA 98	S9 AL 10% S9 AL 4%
TLALPAM	TANQUE	CTL 10	1171	85	2.01	TA 100	S9 AL 10%
BENITO JUAREZ	POZO	MACIAS	167	25	2.57	TA 98	S9 AL 10%
BENITO JUAREZ	POZO	ALANDE 2	153	26	2.03	TA 98	S9 AL 10%
COYOACAN	POZO	PERIFERICO 3	123	42	2.41	TA 98	-S9
COYOACAN	POZO	AUXILIAR 7-4	1239	112	2.13	TA 100	S9 AL 4%
GUSTAVO A. N.	TANQUE	CHALMITA	150	25	2.2	TA 98	-S9
GUSTAVO A. N.	REBOMBEO	CACATENCO 1	1283	127	2.22	TA 100	-S9
TLAHUAC	POZO	ITULYEHUALCO 2	1249	117	2.12	TA 100	-S9
RIGUEL HIDALGO	POZO	POPOTLA	125 147	42 21	2.05 2.22	TA 98 TA 98	-S9 S9 AL 10%

YRA: MEDIA DE 3 PLACAS DE LA REVERSION DE LA MUESTRA.  
 KRC: MEDIA DE 3 PLACAS DE LA REVERSION DEL CONTROL CORRESPONDIENTE.  
 SI KRM/KRC >= 2 LA MUESTRA SE CONSIDERA POSITIVA.

PROMEDIOS Y RANGOS ESTABLECIDOS PARA LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS DE LOS CONTROLES NEGATIVOS

	PROMEDIO	RANGO ESTABLECIDO
CEPA TA 98 -S9	26 COL/PLACA	24 , 27 COLONIAS POR PLACA
CEPA TA 98 S9 AL 4%	30 COL/PLACA	28 , 32 COLONIAS POR PLACA
CEPA TA 98 S9 AL 10%	33 COL/PLACA	30 , 36 COLONIAS POR PLACA
CEPA TA 100 -S9	117 COL/PLACA	112 , 123 COLONIAS POR PLACA
CEPA TA 100 S9 AL 4%	126 COL/PLACA	120 , 133 COLONIAS POR PLACA
CEPA TA 100 S9 AL 10%	139 COL/PLACA	133 , 145 COLONIAS POR PLACA

TABLA 3 (CONTINUACION)

RESULTADOS POSITIVOS PLANTAS DE TRATAMIENTO DE AGUA RESIDUAL Y PLANTAS POTABILIZADORAS

DELEGACION	TIPO DE INSTAL.	NOMBRE DEL SITIO	VRM	VEC	VRM/VEC	CEPA	TRATAMIENTO
MOCHIMILCO	PTAR	SEN LUIS TLAXIATEMELCO	132	112	12.66	17A 98	-59
MOCHIMILCO	PTAR	SEN LUIS TLAXIATEMELCO	138 132	135 122	12.17 12.93	17A 98 17A 98	59 AL 4% 59 AL 10%
IZTAPALAPA	PTAR	CEPEO DE LA ESTRELLA	126	122	12.16	17A 98	-59
IZTAPALAPA	PTAR	CEPEO DE LA ESTRELLA	142	121	12.0	17A 98	59 AL 4%
IZTAPALAPA	PTAR	CEPEO DE LA ESTRELLA	143 137 134 129	153 138 141 122	12.13 12.61 12.36 12.30	17A 98 17A 98 17A 98 17A 100	59 59 AL 4% 59 AL 10% -59
IZTAPALAPA	PTAR	CEPEO DE LA ESTRELLA	168	133	12.66	17A 98	-59
IZTAPALAPA	PTAR	CEPEO DE LA ESTRELLA	158 154	123 124	12.52 12.18	17A 98 17A 98	59 AL 4% 59 AL 10%
IZTAPALAPA	PTAR	CEPEO DE LA ESTRELLA	156	127	12.07	17A 98	59 AL 10%
IZTAPALAPA	P.P.	ISTA MARIA AZTINHUACAN	166	138	12.42	17A 98	-59
IZTAPALAPA	P.P.	ISTA CANTARINA	153	127	12.14	17A 98	59 AL 10%

PTAR= PLANTA DE TRATAMIENTO DE AGUA RESIDUAL.  
P.P.= PLANTA POTABILIZADORA.

**TABLA 3 (CONTINUACION)**  
**RESULTADOS POSITIVOS DEL DISPOSITIVO EXPERIMENTAL DE TRATAMIENTO**  
**AVANZADO DE AGUA RESIDUAL (DETAAR)**

PROCESO DE TRATAMIENTO	XRM	XRC	XRM/XRC	CIPA	TRATAMIENTO
INFLUENTE	150	121	12.76	TA 98	S9 AL 4%
INFLUENTE	155	123	12.39	TA 98	S9 AL 10%
INFLUENTE	152	126	12.0	TA98	S9 AL 10%
INFLUENTE	182 160	121 125	13.9 12.4	TA 98 TA 98	S9 AL 10% S9 AL 4%
INFLUENTE	165 166	125 121	12.6 13.14	TA 98 TA 98	S9 AL 4% S9 AL 10%
INFLUENTE	189 201	125 121	13.56 19.57	TA 98 TA 98	S9 AL 4% S9 AL 10%
INFLUENTE	1108 103	125 121	14.32 13.95	TA 98 TA 98	S9 AL 4% S9 AL 10%
INFLUENTE	106 106	133 124	13.72 13.58	TA 98 TA 98	S9 AL 4% S9 AL 10%
INFLUENTE	173 1105	129 136	12.51 12.91	TA 98 TA 98	S9 AL 4% S9 AL 10%
INFLUENTE	149	121	12.33	TA 98	S9 AL 4%
INFLUENTE	175 198	126 121	13.57 13.76	TA 98 TA 98	S9 AL 4% S9 AL 10%
INFLUENTE	176 200	125 100	12.84 12.0	TA 98 TA 100	S9 AL 10% S9 AL 4%
DESINFECCION	150	121	12.38	TA 98	S9 AL 4%
DESINFECCION	136	117	12.11	TA 98	-S9
DESINFECCION	149 167	117 126	12.41 12.57	TA 98 TA 98	-S9 S9 AL 10%
DESINFECCION	176 168	125 121	13.83 13.23	TA 98 TA 98	S9 AL 4% S9 AL 10%
DESINFECCION	156	128	12.0	TA 98	S9 AL 10%
DESINFECCION	142	120	12.1	TA 98	-S9
DESINFECCION	154	127	12.0	TA 98	S9 AL 4%
DESINFECCION	164	132	12.06	TA 98	-S9
DESINFECCION	157	125	12.28	TA 98	S9 AL 10%
DESINFECCION	158	127	12.14	TA 98	S9 AL 4%
DESINFECCION	167	133	12.63	TA 98	S9 AL 4%
DESINFECCION	1117 1343	140 141	12.87 12.43	TA98 TA 100	-S9 -S9
DESINFECCION	1104	133	13.15	TA 98	S9 AL 10%
DESINFECCION	1328	1161	12.83	TA 100	S9 AL 4%
DESINFECCION	150	125	12.0	TA 98	-S9

**TABLA 3 (CONTINUACION)**  
**RESULTADOS POSITIVOS DEL DISPOSITIVO EXPERIMENTAL DE TRATAMIENTO**  
**AVANZADO DE AGUA RESIDUAL (DETAAR)**

PROCESO DE TRATAMIENTO	XRM	XRC	XRM/XRC	CEPA	TRATAMIENTO
FILTROS A PRESION	123 126	122 124	13.72 14.0	TA 98 TA 98	59 AL 4% 59 AL 10%
FILTROS A PRESION	114	129	12.87	TA 98	59 AL 10%
FILTROS A PRESION	137	128	12.83	TA 98	59 AL 10%
FILTROS A PRESION	167	130	12.23	TA 98	59 AL 4%
FILTROS A PRESION	166	130	12.2	TA 98	59 AL 4%
FILTROS A PRESION	164 132	125 123	12.56 12.26	TA 98 TA 98	59 AL 4% 59 AL 10%
FILTROS A PRESION	168	123	12.95	TA 98	59 AL 10%
FILTROS A PRESION	154 168	127 127	12.9 12.51	TA 98 TA 98	59 AL 4% 59 AL 10%
FILTROS A PRESION	184	139	12.15	TA 98	59 AL 10%
FILTROS A PRESION	171	133	12.15	TA 98	59 AL 10%
FILTROS A PRESION	147	122	12.13	TA 98	59 AL 4%
FILTROS A PRESION	158	125	12.32	TA 98	59 AL 10%
FILTROS A PRESION	159	125	12.36	TA 98	59 AL 10%
FILTROS A PRESION	155 198 152	124 127 124	12.29 13.33 16.33	TA 98 TA 98 TA 98	-59 59 AL 4% 59 AL 10%
FILTROS A PRESION	189 194	127 124	13.29 13.91	TA 98 TA 98	59 AL 4% 59 AL 10%
FILTROS A PRESION	172 163	127 124	12.98 14.29	TA 98 TA 98	59 AL 4% 59 AL 10%
FILTROS A PRESION	1134	138	13.52	TA 98	59 AL 10%
FILTROS A PRESION	1128	130	14.0	TA 98	59 AL 10%

**TABLA 3 (CONTINUACION)**  
**RESULTADOS POSITIVOS DEL DISPOSITIVO EXPERIMENTAL DE TRATAMIENTO**  
**AVANZADO DE AGUA RESIDUAL (DETAAR)**

PROCESO DE TRATAMIENTO	XMM	XRC	XOMX/XRC	CEFA	TRATAMIENTO
FILTRACION "A"	154 163	127 124	12.9 12.62	ITA 98 ITA 98	59 AL 4% 59 AL 10%
FILTRACION "A"	101	138	12.13	ITA 98	59 AL 10%
FILTRACION "A"	1103	138	12.71	ITA 98	59 AL 10%
FILTRACION "A"	1130	138	13.42	ITA 98	59 AL 10%
FILTRACION "A"	102 109	133 130	12.48 12.63	ITA 98 ITA 98	59 AL 4% 59 AL 10%
FILTRACION "A"	166 183	133 130	12.9 12.83	ITA 98 ITA 98	59 AL 4% 59 AL 10%
FILTRACION "A"	193 149	133 130	12.57 14.36	ITA 98 ITA 98	59 AL 4% 59 AL 10%
FILTRACION "A"	175	133	12.27	ITA 98	59 AL 4%
FILTRACION "A"	166 124	133 130	12.9 14.13	ITA 98 ITA 98	59 AL 4% 59 AL 10%
FILTRACION "A"	197	142	12.3	ITA 98	59 AL 10%
FILTRACION "A"	194	142	12.23	ITA 98	59 AL 10%
FILTRACION "A"	1150	142	13.57	ITA 98	59 AL 10%
FILTRACION "A"	107 116	143 142	12.82 12.76	ITA 98 ITA 98	59 AL 4% 59 AL 10%
FILTRACION "A"	1111	133	13.36	ITA 98	59 AL 10%
FILTRACION "A"	107	133	12.63	ITA 98	59 AL 10%
FILTRACION "A"	176 168	128 133	12.71 12.66	ITA 98 ITA 98	59 AL 4% 59 AL 10%
FILTRACION "A"	192	133	12.78	ITA 98	59 AL 10%
FILTRACION "A"	170	134	12.85	ITA 98	59 AL 10%
FILTRACION "A"	177	134	12.26	ITA 98	59 AL 10%
FILTRACION "A"	176 166	139 138	12.3 12.94	ITA 98 ITA 98	59 AL 4% 59 AL 10%
FILTRACION "A"	166 117	139 136	12.2 12.25	ITA 98 ITA 98	59 AL 4% 59 AL 10%
FILTRACION "A"	161 184	139 136	12.83 12.83	ITA 98 ITA 98	59 AL 4% 59 AL 10%
FILTRACION "A"	164	138	12.13	ITA 98	59 AL 4% 59 AL 10 x
FILTRACION "A"	193	136	12.58	ITA 98	59 AL 10 x
FILTRACION "A"	105	142	12.82	ITA 98	59 AL 10 x

**TABLA 4****RESULTADOS DEL ANALISIS CROMATOGRAFICO DE MUESTRAS DEL D.E.T.A.A.R.  
QUE REPORTARON RESULTADOS POSITIVOS EN EL ENSAYO DE MUTAGENICIDAD**

	<b>INFLUENTES</b>	<b>FILTRACION</b>	<b>EFLUENTES</b>
<b>MUESTRAS ANALIZADAS</b>	<b>11</b>	<b>14</b>	<b>22</b>
<b>ACTIVIDAD MUTAGENICA</b>	<b>8</b>	<b>5</b>	<b>3</b>
<b>MUTAG. POR CROMATOG.</b>	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>8</b>
<b>COMP. SANCIONADOS</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>5</b>

**TABLA 5**  
**ALTERACIONES GENETICAS**

NIVEL DE LA MUTACION	TIPO DE MUTACION	DESCRIPCION
ALTERACIONES EN LA SECUENCIA DE BASES INTRAGENICA	SUSTITUCION DE BASES	CAMBIO DE UNA BASE POR OTRA: A) TRANSICION PURINA-PURINA PIRIMIDINA-PIRIMIDINA  B) TRANSVERSION PURINA-PIRIMIDINA PIRIMIDINA-PURINA
	DESFASEAMIENTO	CORRIMIENTO DE BASES POR PERDIDA O ADICION
ANOMALIAS EN EL ARREGLO DE LOS GENES	INVERSION	CAMBIO DE ORIENTACION DEL GEN, MANTENIENDO SU POSICION RELATIVA RESPECTO DE LOS OTROS GENES
	TRANSLOCACION	CAMBIO DE POSICION DE UN GEN CON RELACION A OTROS GENES
ANOMALIAS EN EL NUMERO DE GENES	ELIMINACION	PERDIDA DE UN GEN
	DUPLICACION	ADQUISICION DE UNA COPIA EXTRA DE UN GEN
ABERRACIONES CROMOSOMICAS ESTRUCTURALES	REARREGLOS: TRANSLOCACIONES INVERSIONES, ANILLOS	CAMBIO EN NUMERO, POSICION U ORIENTACION DE GRUPOS DE GENES
MODIFICACION DEL NUMERO DE CROMOSOMAS	ANEUPLOIDIA: A) MONOSOMIA B) POLISOMIA	SEGREGACION CROMOSOMICA DEFECTUOSA, QUE RESULTA EN PERDIDA O ADQUISICION DE UNO O MAS CROMOSOMAS
	POLIPLOIDIA	AUMENTO DE JUEGOS COMPLETOS DE CROMOSOMAS

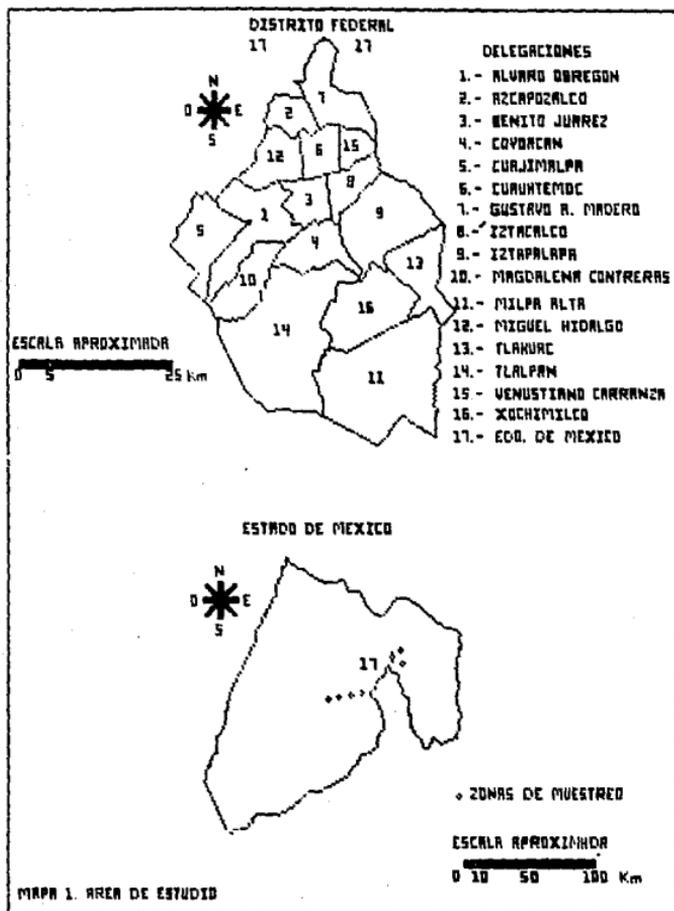
MECANISMOS DE ACCION DE ALGUNOS MUTAGENOS

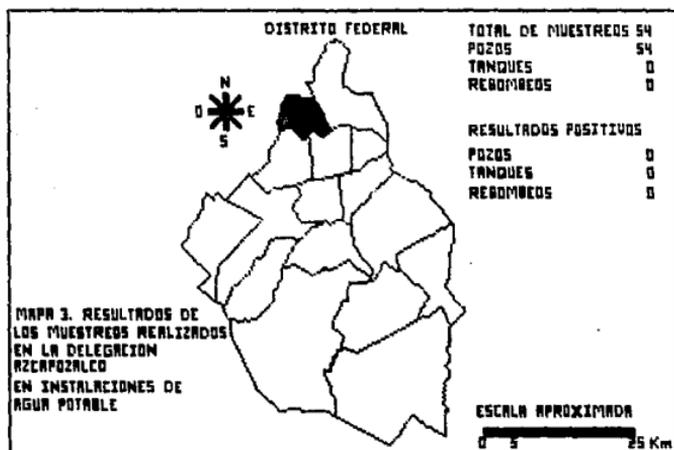
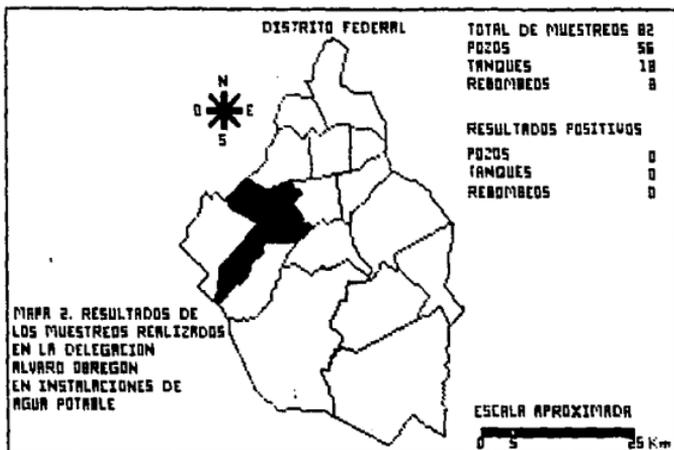
TIPOS DE COMPUESTOS	MOLECULAS SUCEPTIBLES	ALTERACION EN LAS MOLECULAS	ORIGEN DE LA MUTACION	MUTACIONES POSIBLES	EJEMPLOS DE COMPUESTOS
ALQUILANTES MONO Y POLIFUNCIONALES	ADN HISTONAS PROTEINAS ENZIMAS DE REPARACION TUBULINA	INTRODUCCION DE RADICALES ALQUILOS: -CH3 -CH2-CH3 ENTRECruzAMIENTOS INTER O INTRA CADENAS, BLOQUEO DE GRUPOS SULFIDRILOS	ERROR EN EL APAREAMIENTO ENTRE BASES, DESPURINACION, CAMBIO EN LA ESTRUCTURA Y FUNCION DE LAS PROTEINAS, ALTERACION DEL ENSAMBLE DE MICROTUBULOS	GENICAS: TRANSICIONES, TRANSVERSIONES, ELIMINACIONES  CROMOSOMICAS: ABERRACIONES ESTRUCTURALES	METILMETANO SULFONATO, NITROSOGUANIDINA, CLOROQUINA, GRISEOFULVINA, DIELDRIM
ANALOGOS DE BASES	ADN	SUSTITUCION DE BASES	ERROR EN EL APAREAMIENTO ENTRE BASES	GENICAS: TRANSICIONES  CROMOSOMICAS: ABERRACIONES ESTRUCTURALES	2-AMINO-PURINA, BRONO URACILO, 5-BRONO DEOHIDRURIDINA
INTERCALANTES	ADN	INSERACION ENTRE BASES ADYACENTES EN LA DOBLE HELICE	ALTERACION DE LA HELICE ERROR EN LA REPLICACION, LA REPARACION Y LA RECOMBINACION	GENICAS: DESFAZAMIENTOS, ELIMINACIONES  CROMOSOMICAS: ABERRACIONES ESTRUCTURALES	QUINOCRINA, ACRIDINA, PROFLAVINA, BROMURO DE ETIDIO
DESAMINANTES	ADN HISTONAS PROTEINAS	ELIMINACION DE UN GRUPO AMINO CON INTRODUCCION DE UN GRUPO HIPOXILICO, ENTRECruzAMIENTOS INTER O INTRA CADENAS	CONVERSION DE ADENINA A HIPOXANTINA, DE GUANINA A XANTINA, Y DE CITOSINA A URACILO, CAMBIO EN LA ESTRUCTURA DE LAS PROTEINAS	GENICAS: TRANSICIONES ELIMINACIONES DESFAZAMIENTOS  CROMOSOMICAS: ABERRACIONES ESTRUCTURALES	ACIDO NIROSICO
PRODUCTORES DE RADICALES LIBRES Y PEROXIDOS	ADN	SUSTITUCION DE CITOSINA POR TIMINA, POSIBLE FORMACION DE N-6 HIDROXIADEMINA	ERROR EN EL APAREAMIENTO DE BASES	GENICAS: TRANSICIONES  CROMOSOMICAS: ABERRACIONES ESTRUCTURALES	HIDROXILAMINA

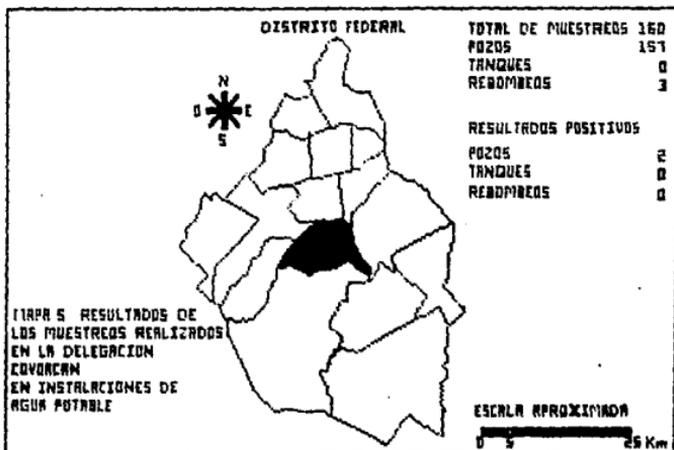
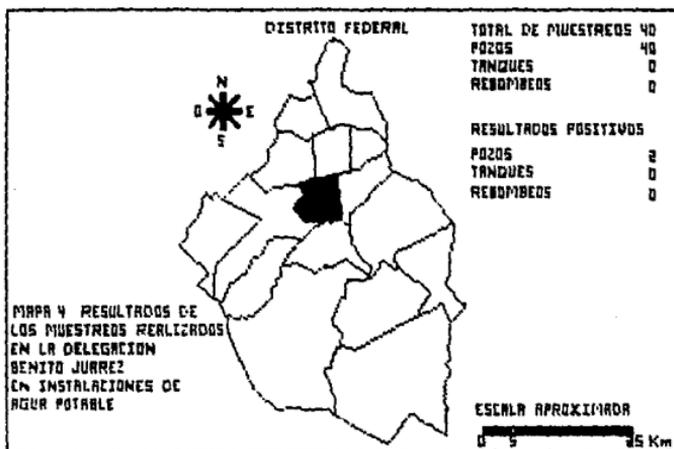
TABLA 7

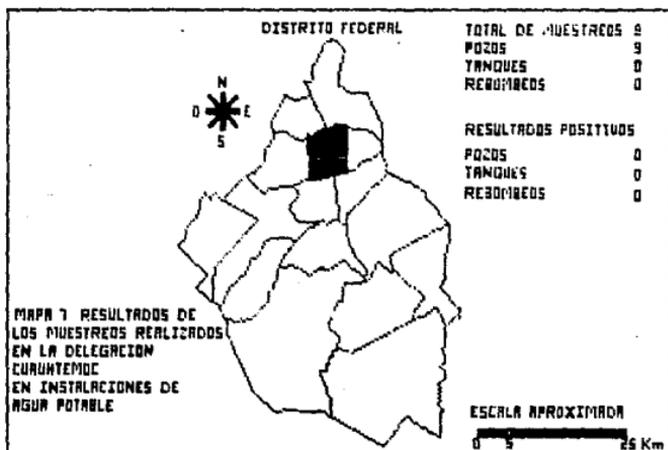
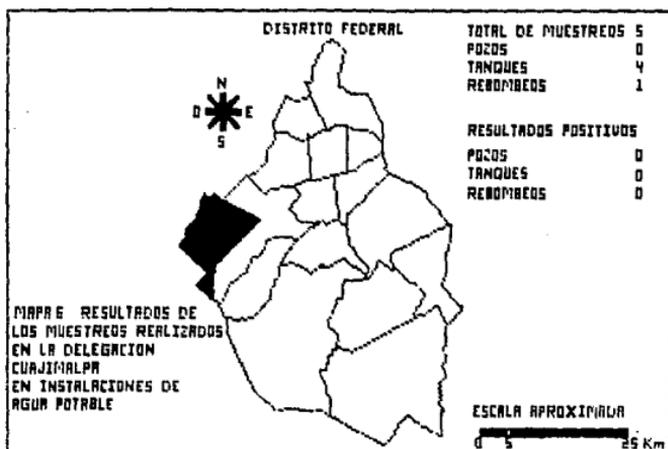
CEPAS RECOMENDADAS PARA ANALISIS DE RUTINA EN LA PRUEBA DE AMES			
CEPA	MUTACION	REPARACION	PRESENCIA DEL PLASMIDO
TA1335	his G46	Auvr B	-
TA1537	his C3076	Auvr B	-
TA1538	his D3052	Auvr B	-
TA98	his D3052	Auvr B	+
TA100	his G46	Auvr B	+
TA97	his D6610	Auvr B	+
TA102	his G428	+	+

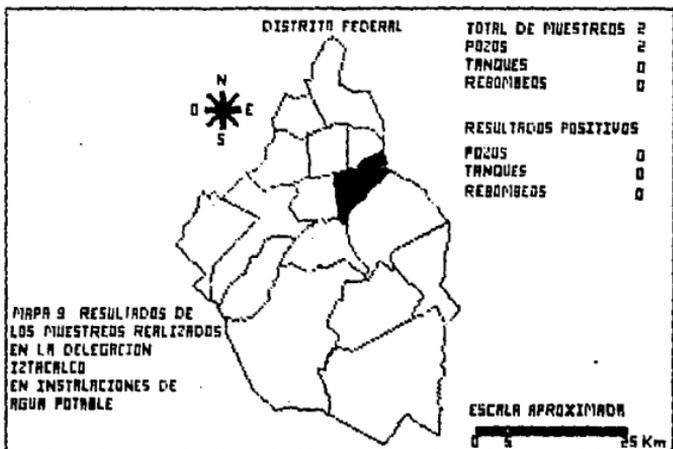
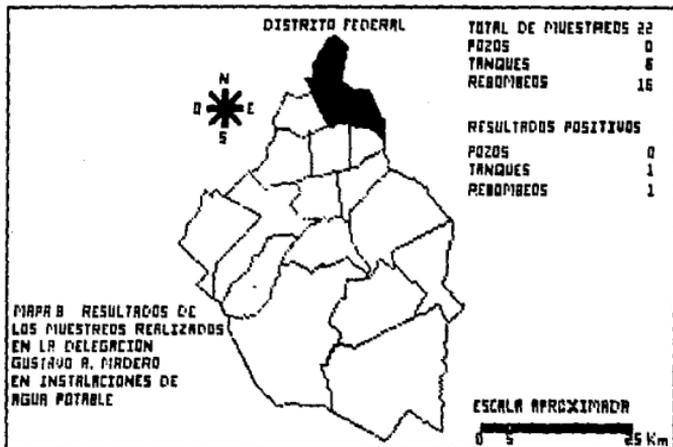
LAS PRIMERAS 5 CEPAS FUERON RECOMENDADAS EN UN PRINCIPIO. LAS  
 ULTIMAS 4 FUERON RECOMENDADAS MAS RECIENTEMENTE  
 (MARON Y AMES, 1983)

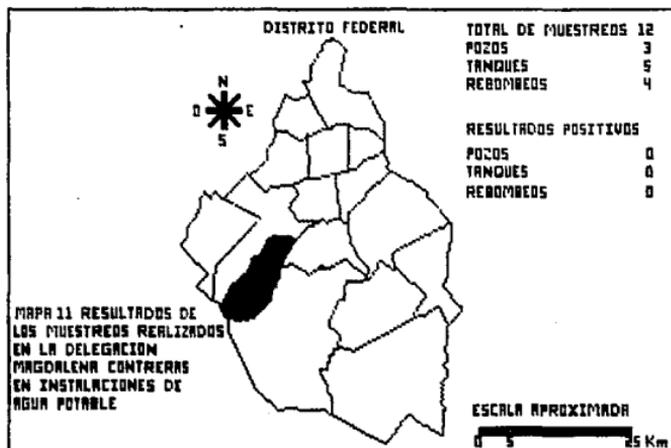
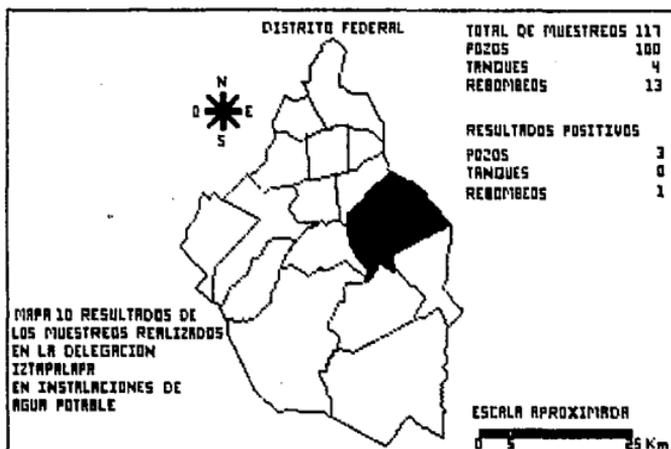


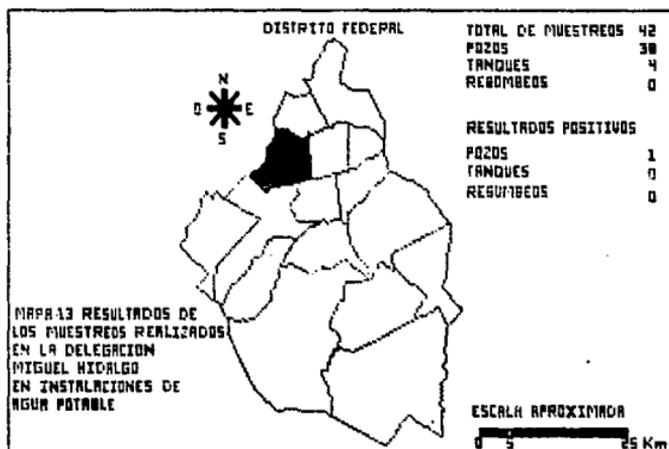
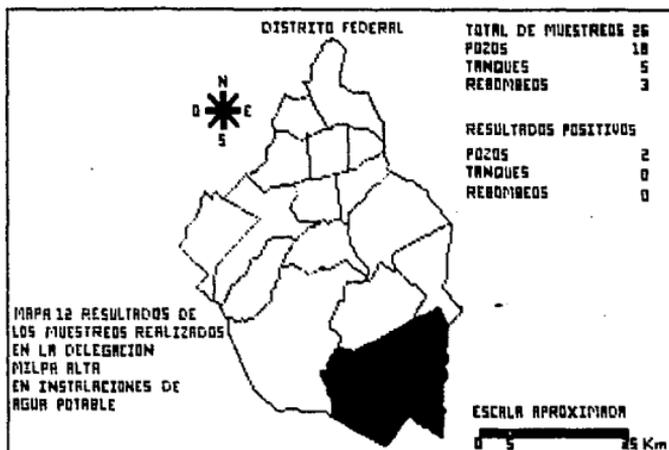


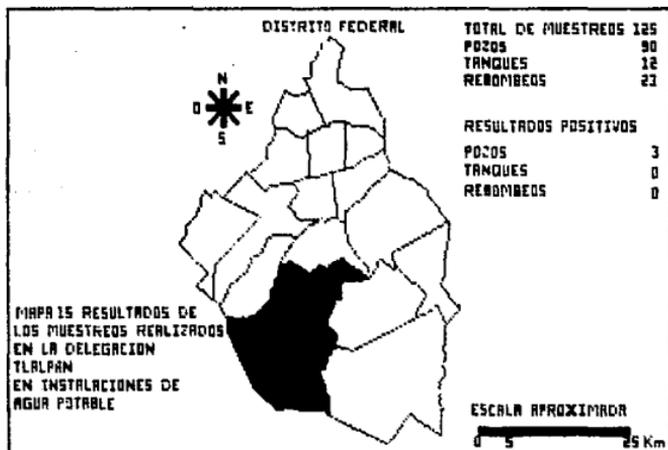
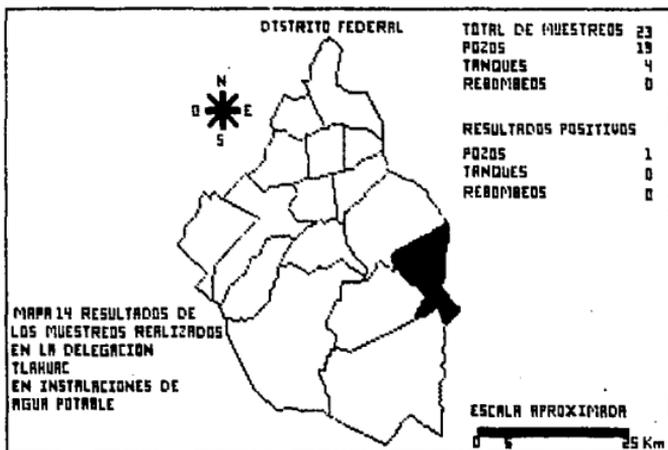


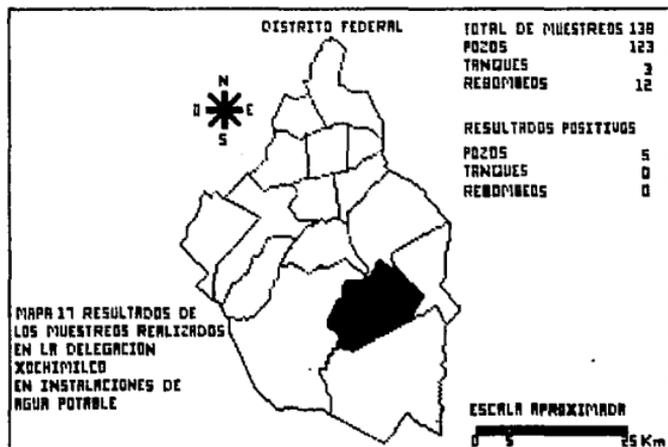
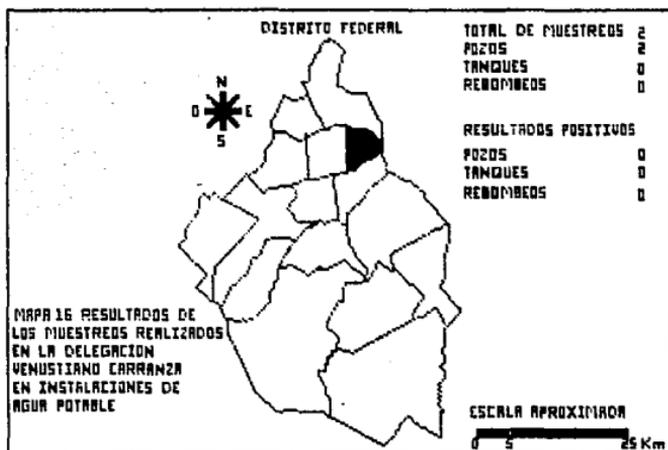


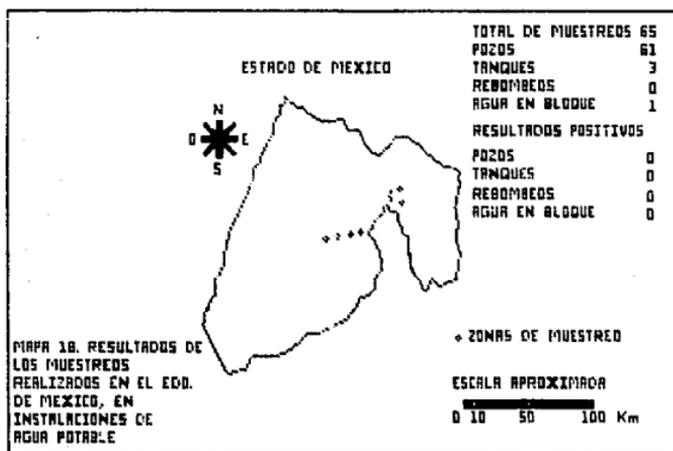












# DIAGRAMA 1

ANALISIS DE  
MUTAGENOS  
CAPTURA Y PROCESO DE DATOS  
"FLUJO DEL SISTEMA"

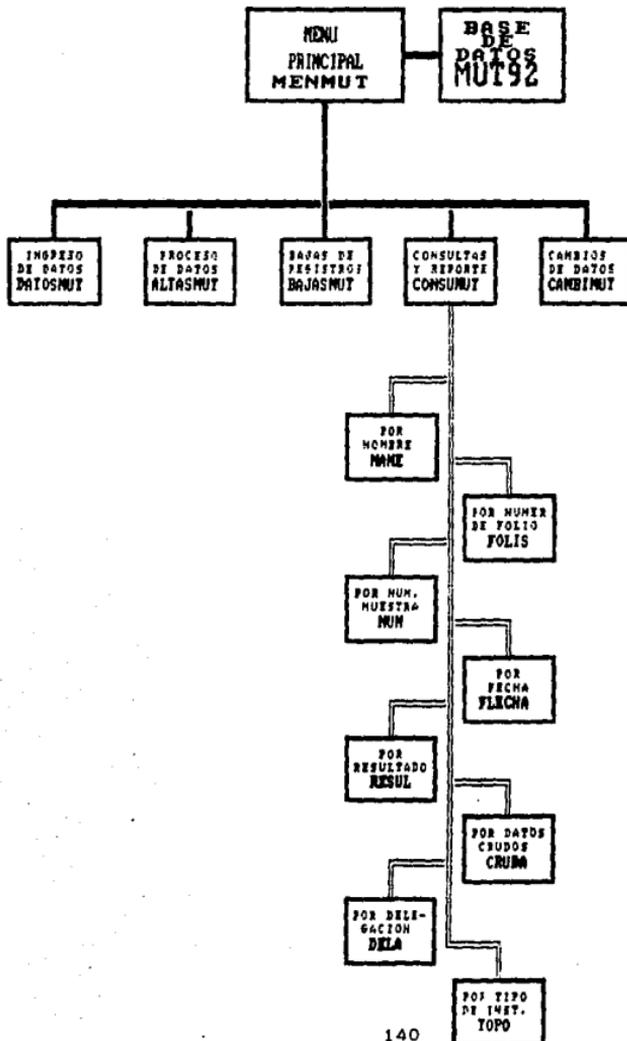
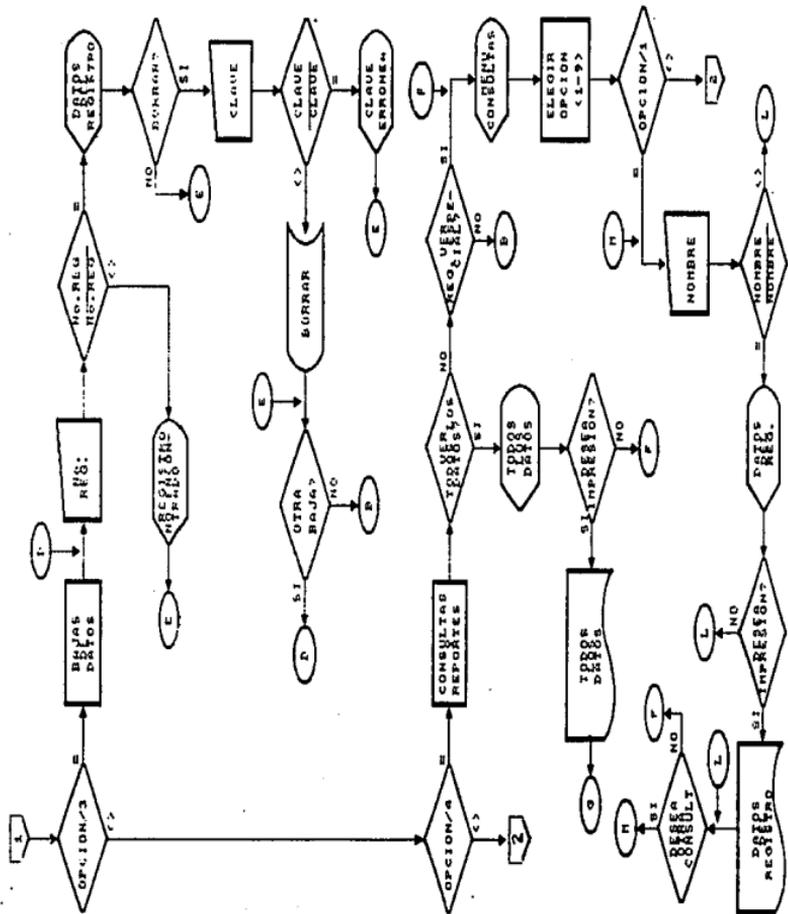




DIAGRAMA 2 (CONTINUACION)









HOJA DE CONTENIDO DE ARCHIVO

Nombre del programa: MUT92 Sistema: Proceso de datos  
 Sistema: IBM PC Fecha: 0-XXX-0000  
 Tipo de Archivo: Base de datos Organización: Secuencial  
 Numero de Registros: Tamaño del Registro: 389  
 Analista: Luis Antonio Nava Vargas Hoja 1 de 2

No	CAMPO	No DE CARACTERES	POSICION		FORMATO A AN N	DEC.	OBS.
			DE	A			
1	FECHA	8		1 8		FECHA	DE MUESTREO
2	DELEGA	2		9 10	X		DELEGACION
3	NOMBRE	35		11 45	X		NOMBRE DEL SITIO
4	TIPO	2		46 47	X		TIPO DE INSTAL.
5	NOFOLIO	7		48 54	X		NUMERO DE FOLIO
6	NUMERO	3		55 57	X		NUMERO CONSECUTIVO
7	R1098	6		58 63	X		CLAVE DE ENSAYO
8	R2098	6		64 69	X		CLAVE DE ENSAYO
9	R3098	6		70 75	X		CLAVE DE ENSAYO
10	R1498	6		76 81	X		CLAVE DE ENSAYO
11	R2498	6		82 87	X		CLAVE DE ENSAYO
12	R3498	6		88 93	X		CLAVE DE ENSAYO
13	R11098	6		94 99	X		CLAVE DE ENSAYO
14	R21098	6		100 105	X		CLAVE DE ENSAYO
15	R31098	6		106 111	X		CLAVE DE ENSAYO
16	C1098	6		112 117	X		CLAVE DE CONTROL
17	C2098	6		118 123	X		CLAVE DE CONTROL
18	C3098	6		124 129	X		CLAVE DE CONTROL
19	C1498	6		130 135	X		CLAVE DE CONTROL
20	C2498	6		136 141	X		CLAVE DE CONTROL
21	C3498	6		142 147	X		CLAVE DE CONTROL
22	C11098	6		148 153	X		CLAVE DE CONTROL
23	C21098	6		154 159	X		CLAVE DE CONTROL
24	C31098	6		160 165	X		CLAVE DE CONTROL
25	R10100	6		166 171	X		CLAVE DE ENSAYO
26	R20100	6		172 177	X		CLAVE DE ENSAYO
27	R30100	6		178 183	X		CLAVE DE ENSAYO
28	R14100	6		184 189	X		CLAVE DE ENSAYO
29	R24100	6		190 195	X		CLAVE DE ENSAYO
30	R34100	6		196 201	X		CLAVE DE ENSAYO
31	R110100	6		202 207	X		CLAVE DE ENSAYO
32	R210100	6		208 213	X		CLAVE DE ENSAYO
33	R310100	6		214 219	X		CLAVE DE ENSAYO
34	C10100	6		220 225	X		CLAVE DE CONTROL
35	C20100	6		226 231	X		CLAVE DE CONTROL
36	C30100	6		232 237	X		CLAVE DE CONTROL
37	C14100	6		238 243	X		CLAVE DE CONTROL
38	C24100	6		244 249	X		CLAVE DE CONTROL
39	C34100	6		250 255	X		CLAVE DE CONTROL
40	C110100	6		256 261	X		CLAVE DE CONTROL
41	C210100	6		262 267	X		CLAVE DE CONTROL
42	C310100	6		268 273	X		CLAVE DE CONTROL

