

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS PROFESIONALES ZARAGOZA

**ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD GENOTÓXICA EN MUESTRAS DE LA PLANTA
DE TRATAMIENTO DE AGUA RESIDUAL SAN LUIS TLAXIALTEMALCO
MEDIANTE EL ENSAYO COMETA**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA

SILVIA CANO MARTINEZ

DIRECTOR

M. EN C. LUIS ANTONIO NAVA VARGAS

ASESOR INTERNO

DRA. ELIA ROLDÁN REYES

MÉXICO D.F.

MARZO 2010



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 esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

I.- AGRADECIMIENTOS

En forma muy especial agradezco al M. en C. Luis Antonio Nava Vargas por la dirección de ésta tesis.

Asimismo, a la Doctora Elia Roldán Reyes le agradezco su valiosa asesoría en éste trabajo.

A la Bióloga Ma. De los Ángeles Galván Villanueva por todo su apoyo y colaboración.

A la Doctora Lucila Álvarez Barrera.

A la Bióloga Aída Zapata Cruz

y

A toda mi familia por su apoyo incondicional, en especial a mis padres: Marcos Cano y Josefina Martínez.

ÍNDICE

Índice	Página
Agradecimientos	2
1.- Resumen	5
2.- Introducción	6
3.- Hipótesis	12
4.- Objetivos	13
5.- Área de estudio	
5.1.- Ubicación	14
6.- Resumen del método	17
6.1.- Colecta de muestras Influyente, Efluente	18
6.2.- Concentración de muestras	19
6.3.- Elución de muestras	20
6.4.- Separación de linfocitos	22
6.5.- Determinación de la dosis a ensayar	23
6.6.- Pruebas de viabilidad	
6.6.1.- Método Dual	24
6.6.2.- Método de Exclusión con Azul de Tripano	26
6.7.- Diluciones y tiempos de exposición	27
6.8.- Protocolos para evaluar la genotoxicidad	28
6.5.1.- Preparación de portaobjetos	29
6.5.2.- Lisis de células tratadas	30
6.9.- Ensayo SCG Alcalino	
6.9.1.- Preparación de diluciones	32
6.9.2.- Electroforesis	34
6.10.- Evaluación del daño	35
7.- Resultados	
7.1.- Viabilidad	36
7.2.- Viabilidad después del tratamiento	38
7.3.- Actividad Genotóxica Prueba 1	40

7.4.- Actividad Genotóxica Prueba 2	41
7.5.- Comparación de los 3 tiempos de exposición	43
7.6.- Comparación de las diluciones	51
7.7.- Comparación del proceso de tratamiento Influyente/Efluente	59
8.- Discusión	67
9.- Conclusiones	74
10.- Referencias Bibliográficas	75

1.- RESUMEN

En el presente trabajo se evaluó el efecto genotóxico mediante el Ensayo Cometa (SCGE - Single Cell Gel Electrophoresis) de diferentes diluciones de concentrados de muestras de agua residual (Influyente) y agua residual tratada (Efluente) de la Planta de Tratamiento de San Luis Tlaxiátemalco, Xochimilco.

Los muestreos se realizaron utilizando dispositivos especiales para colectas en campo, las cuales funcionan mediante un proceso de adsorción con resinas, elución con solventes (hexano - acetona 85/ 15 VV), concentración y resuspensión en Dimetil Sulfóxido (DMSO).

Todas las muestras presentaron actividad genotóxica. Para el Influyente se observó que la concentración más baja produce un mayor efecto genotóxico y no se observó reparación en los tiempos de exposición ensayados

Para el Efluente en la concentración más baja, los tiempos de exposición más prolongados permitieron observar indicios de procesos de reparación observándose que el daño genotóxico aumentó de forma proporcional con el incremento de la concentración.

2. INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, la contaminación de los cuerpos de agua es producto principalmente de las descargas de aguas residuales sin tratamiento, ya sea de tipo doméstico, industrial, agrícola, pecuario o minero. Las fuentes de contaminación que influyen sobre la calidad de los recursos hídricos se pueden clasificar en las siguientes categorías: materia orgánica, contaminantes patógenos y microbianos, nutrientes, salinización, acidificación, metales pesados, compuestos orgánicos tóxicos y contaminantes micro orgánicos, termales y partículas en suspensión (CNA, 2005).

En México, a finales del año 2001, más del 70% de los cuerpos de agua del país presentaban algún indicio de contaminación. Las cuencas que destacan por sus altos índices de contaminación son: Lerma-Santiago, Balsas; las Aguas del Valle de México y el Sistema Cutzamala (Carabias y Landa, 2005).

Actualmente la Ciudad de México afronta grandes retos para dotar a su población de los servicios básicos para su vida diaria, como lo son: el transporte de alimentos, el suministro de agua potable, el desalojo de las aguas pluviales y residuales y su tratamiento. El problema del suministro de agua se agudiza debido a que la dificultad de proporcionar el servicio radica no sólo en aspectos técnicos y económicos, sino que también incide de manera importante la escasez de este recurso en el Valle de México.

El agotamiento de las fuentes de abastecimiento y la posible degradación de la calidad del agua como consecuencia de la explotación del acuífero y de las actividades humanas, han complicado el suministro a la ciudad y obligado a utilizar fuentes cada vez más lejanas para contribuir a satisfacer los requerimientos de la población.

El alto costo, la dificultad para seguir incrementando el volumen de agua suministrada y la carencia de fuentes de abastecimiento adicionales, motivó al Gobierno del Distrito Federal (GDF) a enfocar sus esfuerzos en acciones encaminadas a disminuir los consumos de los usuarios sin detrimento de su calidad de vida ni de las actividades productivas, así como a diseñar e implementar acciones orientadas a utilizar de manera mas eficiente los recursos disponibles para el suministro. Estas acciones tienen como objetivo fundamental disminuir el consumo de agua de la Zona Metropolitana, (pozos y

manantiales), para impedir el agotamiento del acuífero y con ello contribuir a disminuir el creciente hundimiento de la ciudad.

Una de las formas más eficientes para recuperar agua de primer uso, (agua potable), es utilizar agua de origen residual en actividades secundarias que no requieren agua estrictamente potable, por lo tanto se hace también necesario garantizar la calidad de las aguas que después de un tratamiento se reutilizarán en: riego de parques y jardines, abastecimiento de lagos recreativos, lavado de autos, enfriamiento de maquinaria industrial y riego agrícola (Escalas, 2006).

Para este fin, el GDF cuenta con 24 plantas de tratamiento de agua residual que producen agua que ha sido tratada para mejorar su calidad y pueda ser reutilizada en las actividades mencionadas (GDF/SMA/SOS/SACM, 2007).

Al analizar la calidad del agua tratada es necesario llevar a cabo los estudios pertinentes para prever las interferencias que pudieran provocar los contaminantes remanentes en las actividades a las que esta destinada, o bien los posibles efectos en seres vivos ocasionados por la presencia de estos contaminantes que no fueran removidos por los procesos de tratamiento. Estos trabajos permitirían a la vez llevar a cabo la evaluación de diferentes procesos de remoción de contaminantes de cada planta de tratamiento (Nava, 2004).

Las rutas que los contaminantes toman para llegar a los depósitos de agua son diversos, 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, a la contaminación por fugas de drenajes domésticos o industriales o bien por descargas ilícitas o mal planeadas sobre los cuerpos de agua o suelos porosos, teniéndose a las aguas residuales como una de las mayores fuentes de contaminación de los ambientes acuáticos (Nava, 2004).

En la Ciudad de México, el agua residual corresponde a un conjunto de descargas líquidas provenientes tanto de las precipitaciones pluviales (que arrastran un sin número de contaminantes de origen antropogénico) y de las aguas de abastecimiento que, tras haber sido utilizadas en casas habitación, comercios, industrias y servicios públicos, han perdido las características que las hacían potables. Una de las actividades de mayor riesgo de contaminación, corresponde a los efluentes industriales, que han sido identificados como

fuentes de compuestos tóxicos, incluyendo aquellos con actividad genotóxica (Richardson *et al.*, 2003).

El riesgo tóxico y/o genotóxico de las aguas residuales y tratadas, radica fundamentalmente en que éstas pueden representar una amenaza directa para la salud pública debido a la posibilidad de contaminación de mantos freáticos y/o embalses de agua potable (Ohe y Watanabe, 2004), más peligroso es el hecho de que las descargas industriales estén contribuyendo a un "estrés mutagénico" de los medios acuáticos, que se manifiesta en una disminución de la capacidad de los organismos para sobrevivir y reproducirse (De Ratt *et al.*, 1985).

Existen diversas pruebas para la determinación de actividad genotóxica, los tres métodos más comúnmente usados para determinar daño y reparación en la molécula de ADN, involucran en primer lugar, el registro de aberraciones cromosómicas, micronúcleos y/o intercambio de cromátidas hermanas en poblaciones de células en proliferación, en segunda instancia, la detección de síntesis y reparación de ADN en células individuales (también denominada síntesis no programada); y finalmente, la detección de rupturas de cadena sencilla (bajo condiciones alcalinas) También detecta sitios lábiles al álcali y entrecruzamientos en la cadena de ADN (crosslinking) en células somáticas y células germinales (Tice *et al.*, 1996).

El Ensayo de Electroforesis en Gel de Células individuales (SCGE- SINGLE CELL GEL ELECTROFORESIS), también llamada Ensayo Cometa, proporciona resultados a corto plazo en células blancas en estudios *in vivo* e *in vitro* y ha demostrado utilidad en la evaluación de daño y reparación de ADN inducidos por agentes físicos y químicos en diversos sistemas celulares, (Van Kooij *et al.*, 2004; Buschini *et al.*, 2004; Jamil *et al.*, 2004; Gandhi y Kumar, 2004), así como para monitorear poblaciones expuestas a químicos genotóxicos (McDorman *et al.*, 2003).

Su principio se basa en que cuando la doble cadena de ADN es separada por tratamiento alcalino, puede ser detectada la discontinuidad en las cadenas sencillas, es una técnica particularmente valiosa que permite la detección de diferencias intercelulares en la reparación y el daño genético del ADN, y en poblaciones eucarióticas y presenta las siguientes ventajas, según Tice *et al.*, 1996:

- Se requiere de una muestra de células muy pequeña (<10,000 células).
- Se obtienen datos de células individuales.
- Tiene gran sensibilidad.
- Se puede trabajar con diversos tipos celulares (cualquier célula eucarionte).
- Es una técnica muy rápida, sencilla y económica.

Altamirano *et al.*, en 1996 probó el efecto de pentóxido de vanadio (compuesto altamente tóxico liberado a la atmósfera por las actividades humanas, pues se utiliza como catalizador y como colorante en cerámica) en la función reproductiva del ratón macho, por medio del Ensayo Cometa. La importancia de estos estudios radica en que si un compuesto al que están expuestos los seres humanos provoca daño genético en animales de prueba, el riesgo asociado a tal exposición es de gran importancia para la salud humana.

El Ensayo Cometa ha sido utilizado para evaluar el ambiente acuático del Lago Igapó II (localizado en el área metropolitana de Londrina, Brasil) por medio de la especie *Tilapia rendalli* (Giacomini *et al.*, 2004).

La técnica de electroforesis en gel de células individuales, ha sido ampliamente utilizada en estudios de toxicología genética, y un gran número de investigadores han efectuado el ensayo alcalino a pH>13 para evaluar genotoxicidad de químicos *in vivo* e *in vitro* (Kiffe y Christen, 2003; Ohe y Watanabe, 2004; Jamil *et al.*, 2004).

Una importante contribución del Ensayo Cometa a la Toxicología Genética es su aplicación en estudios *in vivo*. Como se requiere de un número pequeño de células (1000 células) para el análisis, virtualmente cualquier tejido u órgano es adecuado para la investigación. Se ha utilizado también para monitorear la relación entre la edad y el incremento de niveles basales de daño en ADN en hepatocitos de ratas (Higami *et al.*, 1994), y la inducción de la persistencia de daño en ADN en células somáticas y células germinales de machos y hembras de roedores tratados químicamente (Labieniec y Gabryelak, 2005).

En adición a su valor en estudios de laboratorio el Ensayo Cometa se convierte en la mejor herramienta para el biomonitoreo ambiental. Las situaciones de exposición adversa, resultado de la disposición inadecuada de residuos peligrosos son generalmente identificados por técnicas analíticas que caracterizan los niveles de contaminantes conocidos. Sin embargo esas

técnicas no proveen una visión del riesgo biológico asociado con mezclas complejas, como su interacción o su acción en varias sendas ambientales. Una aproximación para evaluar las posibles consecuencias ambientales del riesgo de la contaminación por residuos, involucra la evaluación de daño genotóxico (y otros efectos) en organismos indicadores (Morillas *et al.*, 2002; Akcha *et al.*, 2003; Pamdey *et al.*, 2006). Esta prueba una vez más ha sido sugerida como una técnica ideal para dichos estudios.

Una importante aplicación del Ensayo Cometa es en el campo de la Epidemiología Humana, en la evaluación de daño en ADN en células tomadas de individuos expuestos ocupacional, clínica o ambientalmente, para diferentes evaluaciones en la habilidad de reparación de ADN (Valverde *et al.*, 1999).

Realizar estudios directos de efectos genéticos transmitidos, inducidos químicamente (mutaciones) en humanos es virtualmente imposible, así que el riesgo debe ser estimado a partir de una variedad de sistemas de prueba experimentales. Los datos de los efectos genéticos transmisibles en mamíferos de laboratorio deben ser indispensables no solamente como una medida definitiva sino también para conformar un estándar para evaluar la calidad de resultados en pruebas de línea germinal de un mamífero como indicadores de riesgo genético en humanos (Van Kooij *et al.*, 2004).

El ensayo cometa ha sido utilizado en la determinación de genotoxicidad en muestras de agua residual, utilizando linfocitos humanos (Ohe y Kumar, 2004; Nava, 2004), y los datos preliminares demostraron su efecto genotóxico aunque no se determinaron reparación ni tiempos de exposición.

En exposiciones ambientales, debe aclararse que la extrapolación con daño a la salud humana no es directa debido a una infinidad de factores principalmente de carácter biológico y de respuesta de cada especie ante la agresión de sustancias tóxicas, así como factores de disponibilidad del compuesto tóxico o mezclas de ellos en el medio, no obstante un resultado positivo deberá tomarse como indicador de riesgo o bien como guía para realizar análisis más profundos en un punto o sitio determinado (Higami *et al.*, 1994).

En este contexto, las pruebas que pueden indicar daño directo al ADN, son consideradas en la actualidad como una alternativa en el monitoreo de carcinógenos ambientales (Gamulin *et al.*, 2007) proporcionando además información acerca de los riesgos reproductivos de la población, ya que se

considera que el daño sobre el material genético puede causar un incremento en la incidencia de esterilidad, abortos, muertes peri natales y padecimientos hereditarios (Gandhi y Kumar, 2004; García y Mandina, 2004).

Debido a que no es económicamente factible determinar la toxicidad específica de cada una de las múltiples sustancias potencialmente tóxicas que aparecen en mezclas complejas tales como aire, agua suelo o efluentes industriales, el ensayo de la muestra global en sistemas biológicos es un modo directo para determinar la toxicidad de tales mezclas.

Por lo anterior, en el presente trabajo se determinará la actividad genotóxica mediante el Ensayo Cometa en concentrados de agua residual (Influyente) y en agua residual tratada (Efluente) provenientes de la Planta de Tratamiento de Agua Residual San Luis Tlaxialtemalco, Xochimilco (PTAR SLT), evaluando los efectos del tiempo de exposición de linfocitos humanos a dichos concentrados y las diluciones más adecuadas, esto es, como una contribución para el establecimiento de una metodología estándar con el fin de que este tipo de pruebas se implementen de rutina en las Plantas de Tratamiento de Agua Residual.

3.- HIPÓTESIS

Debido a que los procesos de tratamiento de agua residual tienen como objetivo disminuir en lo posible la carga de contaminantes:

- El Ensayo Cometa registrará mayor actividad genotóxica en el Influyente de la Planta de Tratamiento que en el Efluente.
- Una mayor concentración de muestra (dentro de los límites de viabilidad, > 80%) producirá un mayor efecto genotóxico en células humanas (linfocitos) *in vitro*.
- Un mayor tiempo de exposición de las células humanas (linfocitos) a los concentrados de agua residual y agua residual tratada (dentro de los límites de viabilidad, > 80%) producirá un mayor efecto genotóxico sobre ellas.
- La exposición de las células humanas (linfocitos) tratadas a la luz blanca natural antes de la lisis producirá un efecto de reparación del daño genotóxico.

4.-OBJETIVOS

Determinar la genotoxicidad de los concentrados de muestras de agua obtenidas del Influyente y Efluente de la Planta de Tratamiento de Agua Residual San Luis Tlaxialtemalco, mediante el Ensayo Cometa.

- Evaluar el efecto genotóxico de las diferentes diluciones de los concentrados de muestras de agua residual y residual tratada, en células humanas (linfocitos).
- Evaluar el efecto genotóxico que el tiempo de exposición (a los concentrados de agua residual y agua residual tratada) produce en células humanas (linfocitos)
- Determinar si existe reparación del ADN en células humanas (linfocitos) expuestas a luz blanca después del tratamiento y antes de la lisis.

5.- AREA DE ESTUDIO.

5.1 Ubicación.

La Planta de Tratamiento San Luis Tlaxialtemalco (círculo rojo) se encuentra ubicada en el Camino Antigo Xochimilco - Tulyehualco, frente al Bosque de San Luis Tlaxialtemalco en la Delegación Xochimilco, D.F. Fig. 1.

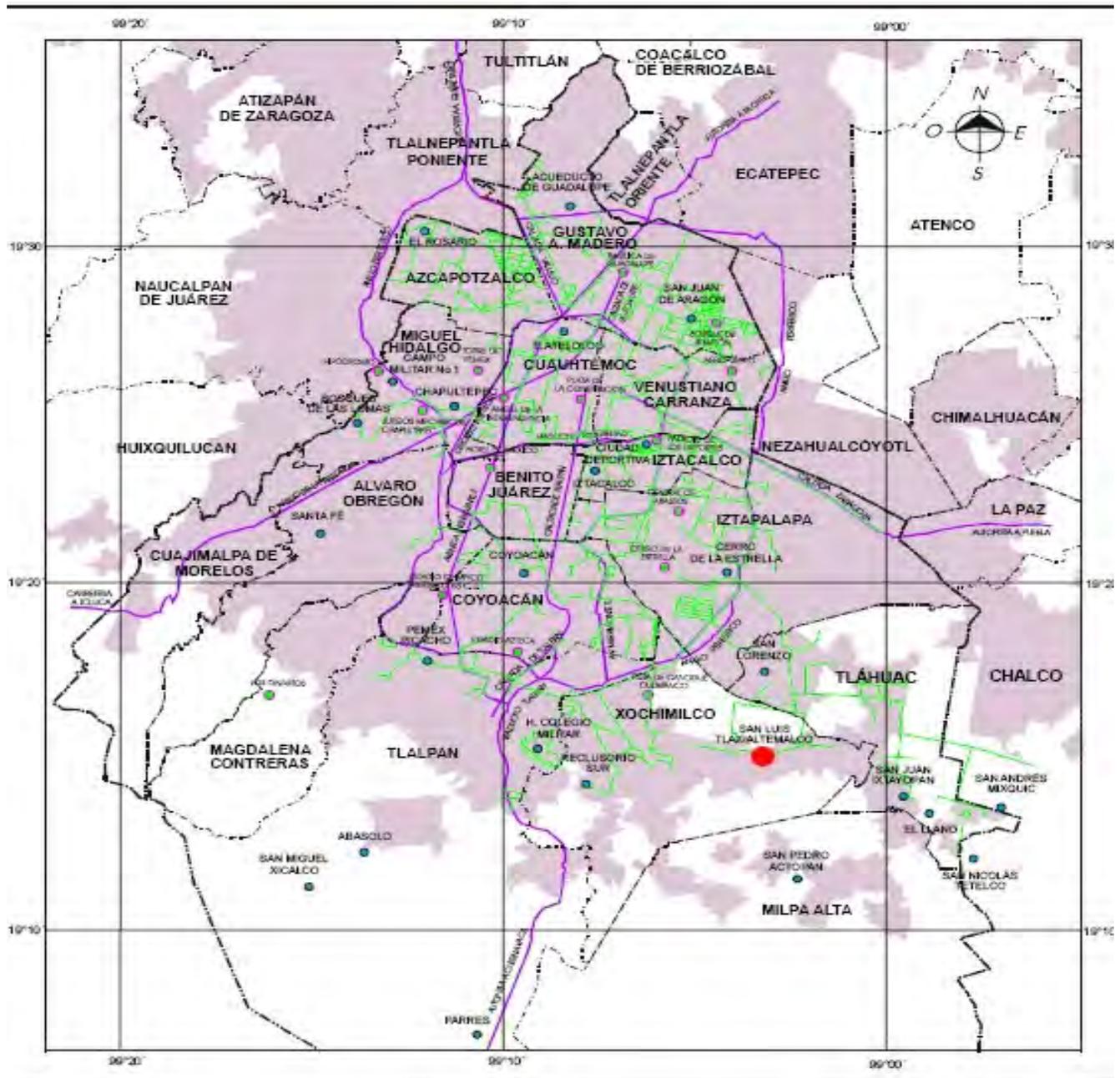


Fig. 1. Planta de Tratamiento San Luis Tlaxialtemalco (círculo rojo).

Ésta Planta cuenta con un tren de tratamiento (Tabla 1) que consiste en:

Tratamiento preliminar.- El objetivo de este tratamiento es separar de las aguas residuales los sólidos grandes que pueden obstruir o dañar los equipos de bombeo o bien afectar el proceso de tratamiento. Para tal propósito, en la parte final del canal de llegada existe una rejilla que evita el paso de tales sólidos al cárcamo de agua cruda.

Tratamiento primario.- Su propósito es la separación de los sólidos sedimentables, así como grasas, aceites y material flotante que se encuentra en el agua a tratar. Para esto, cada unidad consta de un tanque de forma rectangular dividido en módulos con alimentación del tanque. Los sólidos sedimentables son arrastrados mecánicamente hacia tolvas de recolección ubicadas en el fondo del estanque. Las natas superficiales y el material flotante también son arrastrados de la superficie hacia un rebosadero y finalmente son regresados al drenaje. El agua resultante del proceso es colectada en una caja de concreto y enviada por gravedad a la siguiente etapa.

Tratamiento secundario. Consta de las siguientes etapas:

Aireación. Su propósito es proveer los requerimientos de oxígeno, nutrientes y las condiciones ambientales adecuadas para que los microorganismos existentes en el tanque de aireación degraden la materia orgánica para posteriormente separar los lodos activados de la mezcla (denominada licor mezclado), produciendo un efluente clarificado. Para lograr este objetivo, el tratamiento secundario consta, además del tanque de aireación, de sopladores, sistemas de aspersion para rompimiento de espuma, tanque de sedimentador secundario y sistema de recirculación de lodos. Funciona de manera similar al sedimentador primario solo que aquí el arrastre del sedimento se efectúa únicamente en el fondo del tanque. Los lodos activados arrastrados del fondo son colectados en una caja de concreto (cárcamo de lodos) y reciclados al sistema de aireación.

Desinfección. En plantas que proporcionan tratamiento secundario como último proceso, los efluentes de éste se colectan en una caja de concreto donde reciben una dosificación de cloro (de 5 a 15 ppm por 60 min.). El propósito de este tratamiento es la eliminación de la mayor cantidad de bacterias que no forman flóculo durante el paso de lodos activados, en esta etapa se eliminan también un gran porcentaje de huevos de helmintos y quistes de protozoarios

parásitos que pueden representar un riesgo para la salud de los usuarios del agua renovada.

Tratamiento terciario. Cuando la planta cuenta con este tipo de proceso, el efluente del sedimentador secundario se coloca en un tanque y posteriormente se somete a procesos de filtración (qué es la principal función de éste proceso) con grava, arena y antracita para finalmente pasar a un tanque de contacto con cloro para su desinfección (Nava, 2004).

ETAPA	PROCESO	REMOCIÓN O EFECTO
Preliminar	Cribado Desarenación	Sólidos de gran tamaño Arena y sólidos suspendidos
Primario	Sedimentación Espumación	Sólidos suspendidos, grasas y aceites Detergentes
Secundario	Aireación Sedimentación de alta tasa	Materia orgánica de origen carbonoso y nitrogenado
Terciario	Filtración	Sólidos suspendidos y coloidales
Desinfección	Cloración	Bacterias patógenas
Tratamiento de lodos	Digestión Espesamiento Secado	Estabilización de lodos Concentración Deshidratación

Tabla 1. -Etapas del Proceso en la Planta de Tratamiento San Luis Tlaxialtemalco, Xochimilco. GDF/SMM, 2007.

6.- RESUMEN DEL MÉTODO.

La figura 2 muestra en diagrama de bloques el desarrollo del método y los procesos involucrados.

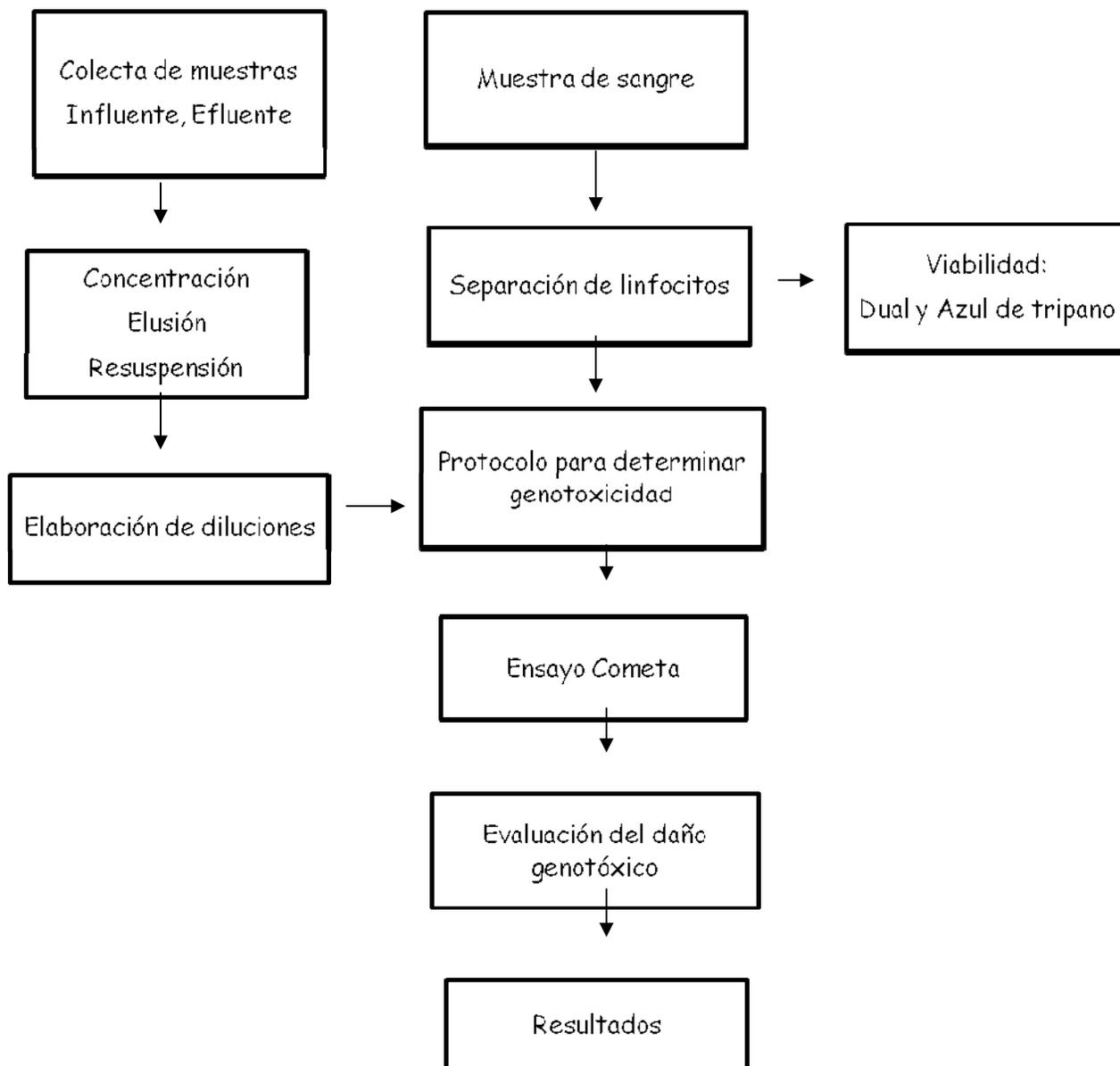


Fig. 2.- Diagrama de flujo del Método.

6.1.- Colecta de muestras Influyente, Efluente.

Se realizaron un total de 12 muestreos en 2 puntos: La entrada o Influyente y la salida o Efluente de la Planta de Tratamiento San Luis Tlaxialtemalco.

Para el **Influyente** se preparó una muestra compuesta con un volumen final de 8L, para tal fin, en garrafones de polipropileno de 10L se colectaron 6 muestras de 8L con intervalos de 2.5 horas cada una. En el laboratorio, las 6 muestras se combinaron en un recipiente de 50L, se homogeneizaron y se obtuvo una muestra única de 8L.

Para el **Efluente**, el volumen de muestra fue de 240L (40L por muestra en intervalos de 2.5 horas) por lo que los dispositivos de muestreo se trasladaron hasta el sitio donde se tomó la muestra de agua. Cada dispositivo consta de una columna de polipropileno empacada con resinas macro reticulares, de acuerdo al procedimiento descrito por Nava, 1994.

6.2.-Concentración de muestras

Para concentrar la muestra del **Influyente**, la tapa del garrafón de muestreo se sustituyó por una tapa igual, perforada y a la que se le adaptó un tubo Tygon. Las tapas del dispositivo de concentración y del garrafón que contiene la muestra se unieron para formar una unidad que conectó ambas partes, el flujo se ajustó a 280 ml/min, dejando fluir el tiempo necesario (aproximadamente 30 minutos). La Figura 3 muestra las partes del dispositivo.

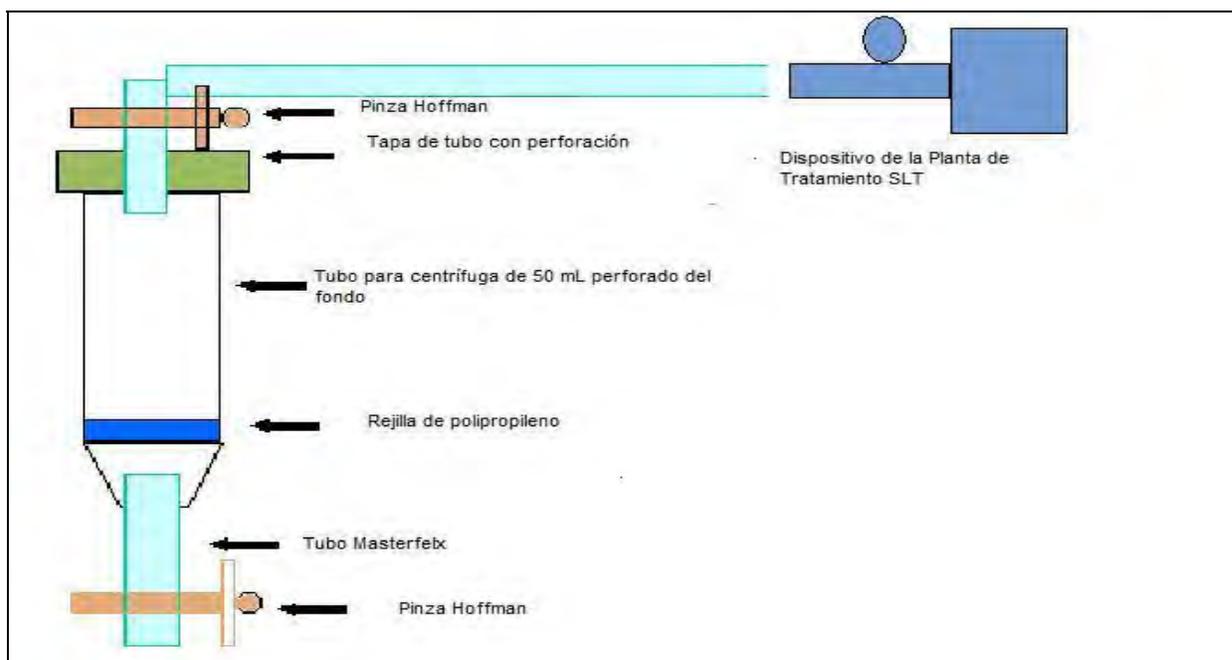


Fig. 3.- Dispositivo de muestreo y concentración del Efluente.

Para la concentración del **Efluente** (la Fig. 4 muestra las partes del dispositivo) mediante conexiones y adaptadores de diferentes medidas, se conectó el dispositivo a la toma de la instalación que se muestreó, se liberaron las obstrucciones de ambos extremos del dispositivo dejando fluir el agua a una tasa de 280 ml/min., controlando el flujo con la llave de la instalación o bien con una pinza Hoffman. Transcurrido el tiempo necesario (2.5 horas aproximadamente) para completar el volumen requerido, el dispositivo se retiró, se obstruyeron las terminales y se almacenó en una hielera a baja temperatura (entre 12 y 18°C): Una vez que se completaron los 6 muestreos, los dispositivos se trasladaron hacia el laboratorio de análisis.

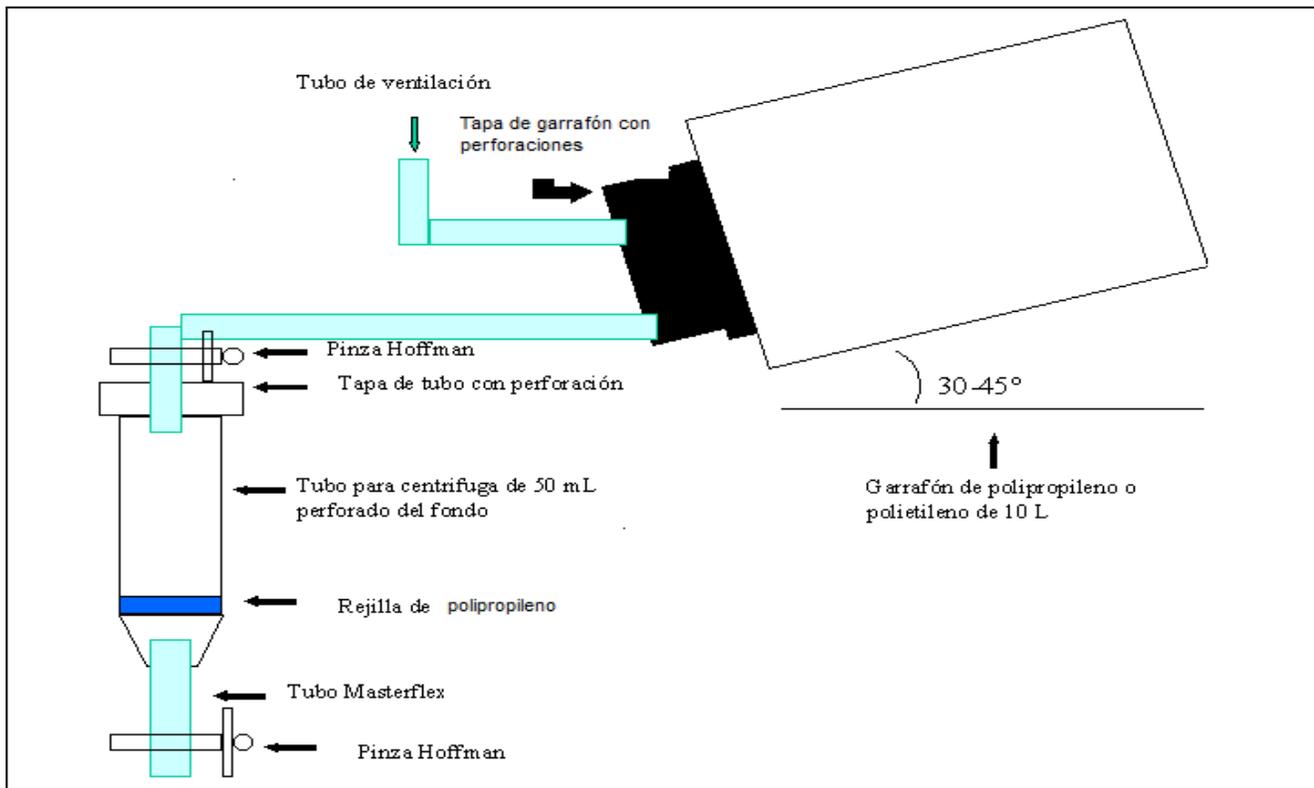


Fig. 4.- Concentración del Influyente en laboratorio

6.3.- Elución de muestras

Elución del Influyente.- Toda vez que pasaron los 8L a través del dispositivo descrito en la Fig. 3, se conectó por la terminal superior un flujo moderado de aire, suficiente para extraer el total del agua del interior del dispositivo. Se retiró el aire, desconectando la terminal superior y se agregaron 80 ml de una mezcla de solvente (hexano-acetona 85/15 % V/V) El volumen final (80ml) se evaporó a sequedad y se resuspendió en 4 mL de Dimetilsulfóxido. Ésta mezcla se esterilizó por filtración por medio de una membrana de politetrafluoruro de etileno con poro de 0.20 μ m (Marca ADVANTEC) y se colocó en un vial de vidrio boro-silicato representando de ésta forma la muestra concentrada y se almacenó a 0°C hasta su análisis.

Elución del Efluente.- En el laboratorio, se liberaron las obstrucciones, dejando escurrir el agua del interior de los dispositivos. Se conectó por la terminal superior un flujo moderado de aire, suficiente para extraer el total del agua del interior del dispositivo. Se retiró el aire, desconectando la terminal superior y se agregaron 80 ml de una mezcla de solvente (hexano-acetona, 85/15 % V/V). Se colectó el solvente con el extracto en un vaso de precipitados de 500 ml. Se repitió la acción para cada uno de los 6 dispositivos colectando los 6 en el mismo vaso. El volumen final ~480 ml, se evaporó al vacío hasta aproximadamente 80 ml, éste volumen se trasladó a un vaso de 100 ml y se evaporó a sequedad. Se resuspendió en 4 ml de dimetilsulfóxido (DMSO). Esta mezcla se esterilizó por filtración por medio de una membrana de politetrafluoruro de etileno con poro de 0.20 μ m (Marca ADVANTEC) y se colocó en un vial de vidrio boro-silicato representando la muestra concentrada y se almacenó a 0°C hasta su análisis.

El muestreo, concentración y elución de muestras se llevó a cabo de acuerdo a Nava, 1994.

6.4.- Separación de linfocitos

Reactivos

- Heparina ® (Sigma)
- Buffer salino de fosfatos (BSF), (libre de Ca^{++} y Mg^{++})
- Ficoll (Histopaque ® 1077)
- Suero fetal bovino (Microlab)
- Dimetil Sulfoxido (DMSO) (Sigma)
- Medio RPMI (Sigma)

Para la obtención de linfocitos se obtuvo sangre completa heparinizada de 3 individuos sanos, no fumadores, de sexo masculino con edades entre 25 y 32 años.

Se colectaron 40 mL (con jeringa impregnada de heparina) y se mezclaron con 40 mL de BSF. Se colocó ésta mezcla en un tubo para centrífuga con 50 mL de Ficoll.

Se centrifugó el tubo a 2000 rpm, durante 25 minutos, se desechó la capa de suero y con ayuda de una micropipeta, se recuperó la capa de células (capa blanca, evitando succionar la capa roja) y se trasladó a otro tubo de centrífuga con 50 mL de BSF.

Se centrifugó nuevamente a 2000 rpm durante 20 minutos. El botón de células blancas se recuperó y se resuspendió en medio RPMI (con 10% de suero fetal bovino y 10% de DMSO (Tice, 1996).

NOTA: El propósito del DMSO es prevenir la peroxidación de lípidos, relacionados con el procesamiento de algunos tejidos (Tice, 1996).

La concentración final de células (linfocitos) fue de aproximadamente 42,400,000 cel/mL que son aproximadamente 500,000 cel/10 μ L.

6.5.- Determinación de las dosis a ensayar. Curva dosis-respuesta (Viabilidad) para la determinación de las concentraciones (diluciones de las muestras) que se utilizaron para cada ensayo.

La finalidad de la determinación de una dilución óptima de trabajo, es encontrar la dosis máxima que permita evidenciar actividad genotóxica sin enmascarar los resultados por excesiva toxicidad o disminuir los efectos por excesiva dilución.

Para cumplir este objetivo se realizó un ensayo, utilizando las muestras de agua provenientes del Influyente y Efluente de la Planta de Tratamiento San Luis Tlaxialtemalco.

Las concentraciones utilizadas fueron:

Muestra concentrada

Dilución 1:10

Dilución 1:25

Dilución 1:50

Dilución 1:75

Dilución 1:100

Dilución 1:150

Dilución 1:200

Se expusieron 500,000 células en 400 μL de medio RPMI y 100 μL de cada dilución y se realizó para cada uno de los sitios de muestreo (Influyente y Efluente). El tiempo de incubación fue de 6 horas (Nava, 2004).

La determinación de las dosis óptimas se realizó probando la viabilidad de las células en cada dilución utilizando el Método de Exclusión con Azul de Tripaño y otro que utiliza un compuesto de Fluoresceína denominado Método Dual (Strauss, 1991).

6.6.- Pruebas de Viabilidad

6.6.1.- Método Dual

Reactivos

- Bromuro de etidio (BE)
- Etanol (EtOH) (JT Baker)
- Diacetato de 5-6 carboxifluoriceina (DCFA)
- Acetona

Preparación de la Solución Dual

- Buffer salino de fosfatos (BSF), (libre de Ca^{++} y Mg^{++})
- Solución A.- Bromuro de etidio (BE). Para la solución stock, se disolvieron 50 mg de BE en 1.0mL de EtOH al 100%, adicionando 1.0mL a 49 mL de buffer salino. Para la solución de trabajo, se mezclaron 50 μ L de solución stock y 2.0 mL solución salina (concentración final = $0.025\mu\text{g}\mu\text{L}^{-1}$) protegiéndola de la luz.
- Solución B.- Diacetato de 5-6 carboxifluoriceina (DCFA). Para la solución stock se disolvieron 3 mg DCFA en 1.0 mL de acetona. Para la solución de trabajo, se mezclaron 84 μ L de solución stock a 2.0 mL de buffer salino (concentración final = $0.125\mu\text{g}\mu\text{L}^{-1}$) protegiendo de la luz.
- Solución C.- Solución de final. Se combinaron A y B en una relación de 1:1. Se guardó en refrigeración.

Procedimiento.

De cada tratamiento con las diferentes diluciones de los diferentes tipos de agua, se colocaron 40 μ L de células en un tubo de centrifuga, adicionando 10 μ L de solución C. Se incubaron 4 minutos a 37°C; después del tiempo de incubación se les adicionó 1mL de solución de lavado (BSF), centrifugando a 1800 rpm por 10 minutos. Se obtuvo el botón de células, eliminando el sobrenadante. Se repitió el lavado. Se mezclaron las células en 10 μ L de BSF y se trasladaron a un portaobjetos, colocando encima un cubreobjetos.

Se observaron las células con un microscopio de fluorescencia equipado con un filtro de excitación de 515-560 nm, con objetivos 10x, 40x. Se contaron 100 células para determinar el número de células viables (verde fluorescente en citoplasma), el número de células comprometidas (escasa coloración verde fluorescente en citoplasma y núcleos rojos fluorescentes), y número de células muertas (rojo fluorescente en núcleos) (Strauss, 1991). Se realizaron 3 réplicas.

6.6.2.- Método de Exclusión con Azul de Tripano

Reactivos

- Azul de tripano 0.4% (Sigma)
- Solución salina balanceada de Hanks (SSBH) (libre de Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺) (Sigma)

Procedimiento

Reactivos

- Azul de tripano 0.4% (Sigma)
- Solución salina balanceada de Hanks (SSBH) (libre de Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺) (Sigma)

Procedimiento

De cada tratamiento con las diferentes diluciones de los diferentes tipos de agua se colocaron 10µl de células en un tubo de centrifuga, adicionando 10µl de azul de tripano. Se dejaron transcurrir 10 minutos a fin de que se tiñeran las células. Con ayuda de una pipeta Pasteur se colocó la cantidad necesaria de la suspensión de células-azul de tripano, para llenar un hemocitómetro (Cámara de Neubauer). Las células no viables (muertas) se tiñeron de azul, mientras que las vivas no se tiñeron (Tice *et al.*, 2000). Se determinó el % de viabilidad de los linfocitos, cuantificando en 100 células consecutivas, las muertas, con el microscopio fotónico a 40X y se realizaron 3 réplicas.

6.7.- Diluciones del Influyente y Efluente, y tiempos de exposición

Se consideraron 3 tiempos de exposición: 2, 4 y 6 horas, así como 2 diluciones para cada tipo de agua: 1:100 y 1:150 para el Influyente y 1:50 y 1:75 para el Efluente (Hartmann *et al*, 2003), de acuerdo a la tabla 2.

INFLUENTE					
Dil: 1:100			Dil: 1:150		
TIEMPO DE EXPOSICIÓN			TIEMPO DE EXPOSICIÓN		
2 HORAS	4 HORAS	6 HORAS	2 HORAS	4 HORAS	6 HORAS

EFLUENTE					
Dil: 1:50			Dil: 1:75		
TIEMPO DE EXPOSICIÓN			TIEMPO DE EXPOSICIÓN		
2 HORAS	4 HORAS	6 HORAS	2 HORAS	4 HORAS	6 HORAS

Tabla 2.- Diluciones y tiempos de exposición.

6.8.- Protocolos para la determinación de genotoxicidad en las muestras.

Para realizar las pruebas de genotoxicidad, las células fueron expuestas a las diferentes diluciones de los concentrados por un espacio de 2, 4, y 6 horas bajo el siguiente protocolo:

1	500000 células + 500 µl de medio RPMI (Control sin Tratamiento).
2	500000 células +400 µl de medio RPMI + 100 µl de DMSO* (Control Solvente).
3	500000 células + 500 µl de medio RPMI + H ₂ O ₂ 200 µM (Control Positivo)
4	500000 células + 400 µl de medio RPMI + 100 µl muestra (Influente dil. 1:100 tiempo 2 horas)
5	500000 células + 400 µl de medio RPMI + 100 µl muestra (Influente dil. 1:100 tiempo 4 horas)
6	500000 células + 400 µl de medio RPMI + 100 µl muestra (Influente dil. 1:100 tiempo 6 horas)
7	500000 células + 400 µl de medio RPMI + 100 µl muestra (Influente dil. 1:150 tiempo 2 horas)
8	500000 células + 400 µl de medio RPMI + 100 µl muestra (Influente dil. 1:150 tiempo 4 horas)
9	500000 células + 400 µl de medio RPMI + 100 µl muestra (Influente dil. 1:150 tiempo 6 horas)
10	500000 células + 400 µl de medio RPMI + 100 µl muestra (efluente dil. 1:50 tiempo 2 horas)
11	500000 células + 400 µl de medio RPMI + 100 µl muestra (efluente dil. 1:50 tiempo 4 horas)
12	500000 células + 400 µl de medio RPMI + 100 µl muestra (efluente dil. 1:50 tiempo 6 horas)
13	500000 células + 400 µl de medio RPMI + 100 µl muestra (efluente dil. 1:75 tiempo 2 horas)
14	500000 células + 400 µl de medio RPMI + 100 µl muestra (efluente dil. 1:75 tiempo 4 horas)
15	500000 células + 400 µl de medio RPMI + 100 µl muestra (efluente dil. 1:75 tiempo 6 horas)

*DMSO diluido 1:100 V/V en RPMI.

Tabla 3.- Protocolo para determinación de genotoxicidad

Las pruebas se realizaron por triplicado para cada tratamiento (45 repeticiones) y se realizaron 2 pruebas simultáneas, **prueba 1** para evaluar daño y **prueba 2** para evaluar daño y reparación (en total 90).

Finalizado el tiempo de tratamiento las células fueron lavadas con buffer de fosfatos, se evaluó la viabilidad después del tratamiento y posteriormente fueron embebidas en agarosa y sometidas a electroforesis mediante el siguiente procedimiento:

6.8.1.- Preparación de portaobjetos

Material:

- Portaobjetos del No. 1 (Corning)
- Micro pipetas de 5 y 1000 μL (Jencons)

Reactivos:

- Agarosa de bajo punto de fusión (ABPF)(Low meeting point agarose)
- Agarosa de punto de fusión normal(APFN) (Normal melting agarose)
- Buffer salino fosfato (BSF) (libre de Ca^{++} y Mg^{++})

Procedimiento:

Preparación de ABPF 0.5%. - Se disolvieron 125 mg en 25ml de BSF a 45 °C. Se colocaron 5mL en viales y se guardaron a 4°C.

Antes de utilizar los viales de ABPF, se colocaron en baño de agua a 37°C para estabilizarlos a esa temperatura.

Preparación de APFN 1.0%. - Se disolvieron 500mg de NMA en 50 mL de BSF a 45 °C.

Mientras la agarosa APFN estuvo caliente, se sumergió un portaobjetos esmerilado hasta un medio del área rugosa y se removió cuidadosamente. Se limpió la parte posterior del portaobjetos para eliminar el exceso de agarosa y se colocó el portaobjetos en una bandeja sobre una superficie plana dejándose secar. Se guardaron los portaobjetos a temperatura ambiente hasta utilizarlos, evitando condiciones de alta humedad (Tice, 1996).

6.8.2.- Lisis de células tratadas

Material:

Portaobjetos con APFN.

Reactivos:

Cantidades para concentración final en 1000 ml:

NaCl 2.5 M -146.1 g (JT Baker)

EDTA 100 mM - 37.2 g (JT Baker)

Tris 10 mM - 1.2 g (Sigma)

Tritón X-100 - 10mL (Sigma)

Dimetil Sulfóxido (DMSO) - 100mL (Sigma)

Hidróxido de sodio (NaOH) - 8g

Se disolvieron los 3 primeros reactivos en 700 mL de agua destilada. Se adicionaron 8g de NaOH y se mezcló hasta disolver. Se ajustó a pH 10; se completó el volumen a 890 mL con agua destilada, guardándose a temperatura ambiente.

Solución final de lisis.

Se adicionaron los volúmenes señalados de Triton X-100 y de DMSO antes de la preparación de los portaobjetos, guardándose en refrigeración por 30 a 60 minutos.

Para realizar la prueba, se adicionaron a cada portaobjetos (preparados previamente con agarosa APFN), 75 μ L de ABPF (a 37°C) mezclados con ~10,000 células tratadas (10 μ L), colocando un cubreobjetos, una vez hecho esto se colocó el portaobjetos en una charola, reposando en hielo hasta que la capa de agarosa se endureció (5 minutos). Se deslizó el cubreobjetos cuidadosamente del portaobjetos, adicionando una tercera capa de agarosa (75 μ L ABPF).

Se colocó nuevamente un cubreobjetos, regresando el portaobjetos a la charola hasta que la capa de agarosa solidificó (5 minutos).

Para la prueba 2 en este punto, se expuso a la luz blanca natural por 30 minutos antes de la lisis. Y para la prueba 1, bajo la luz amarilla, se pasó rápidamente al siguiente paso:

Se removió el cubreobjetos y se sumergió el portaobjetos lentamente en solución de lisis fresca y fría, colocándose en refrigeración a 4°C por 1 hora (Tice, 1996).

6.9.- Ensayo SCG alcalino

6.9.1.- Preparación de disoluciones

Reactivos

- EDTA disodio (JT Baker)
- Hidróxido de sodio (NaOH) (JT Baker)
- Bromuro de etidio BE ($2\mu\text{g}/\text{mL}$)
- Solución salina balanceada de Hanks (SSBH) (libre de Ca^{++} y Mg^{++}) (Sigma)
- Buffer salino fosfanato (BSF) (libre de Ca^{++} y Mg^{++})
- Base Trizma (Tris- Hidroxi Metil Amino Metano) (Sigma)

Procedimiento

A) **SSBH con EDTA 20mM**: A 400 ml de SSBH se adicionaron 3.72 g de EDTA, llevándose a pH 7.0 - 7.5, se aforó a 500 mL, guardándose a temperatura ambiente.

B) **BSF**: BSF de Dulbecco - Polvo para 1 Litro: Se adicionaron 990 mL de agua destilada, llevándose a pH 7.4, se aforó a 1000 mL, esterilizándose por medio de filtración (membrana de teflón $0.20\mu\text{m}$), y se guardó a temperatura ambiente.

C) **Buffer de electroforesis (NaOH 300mM / EDTA 1mM)**: Preparado a partir de las soluciones stock:

1. NaOH 10N (200g/500mL de agua destilada)

2. EDTA 200mM (14.89g / 200mL agua destilada, llevada a pH 10).

La solución final se preparó antes de cada corrida de electroforesis): Se mezclaron 30mL de NaOH y 5 mL de EDTA, aforando con agua destilada a 1000mL.

D) **Buffer de neutralización:** Tris 0.4M - Se adicionaron 48.5g a 800mL de agua destilada, llevándose a pH 7.5, se aforó a 1000mL. Se almacenó a temperatura ambiente.

E) **Solución Colorante:** Bromuro de etidio (Stock 10X - 20 μ g/mL). Se adicionaron 10mg a 50mL de agua destilada. Para el stock IX, se mezcló 1mL con 9mL de agua destilada.

Se guardó a temperatura ambiente (Tice, 1996).

6.9.2.- Electroforesis

Material.

- Portaobjetos con células lisadas
- Micropipetas y puntas (Jencons)

Procedimiento

Después de permanecer una hora a 4°C, los portaobjetos se removieron cuidadosamente de la solución de lisis, se colocaron uno al lado de otro, tan cerca como fue posible, en forma horizontal en la caja de electroforesis, cerca del cátodo (-) pues al existir rompimientos de cadena en el ADN éste emigrará hacia el ánodo (+) esto se debe a que la migración se efectúa hacia el electrodo de carga opuesta a la de las partículas que migran y dependiendo de la cantidad y del tamaño de los rompimientos será la longitud de la cola del cometa.

Se llenó el contenedor con el buffer de electroforesis hasta que el nivel del líquido cubrió completamente los portaobjetos. Se encendió el equipo llevándose a 25 volts, se ajustó la corriente a 300 miliampers, los portaobjetos permanecieron en esas condiciones durante 20 minutos.

Transcurrido ese tiempo, se apagó el equipo. Se sacaron los portaobjetos del buffer colocándolos en una charola. Se humedeció la superficie de los portaobjetos gota a gota con buffer de neutralización, esperando 5 minutos.

Se escurrieron los portaobjetos, repitiendo dos veces más este procedimiento. Para la evaluación de la integridad del ADN, a los portaobjetos se les adicionó 50µL de bromuro de etidio y se colocó un cubreobjetos limpio. Antes de observar los portaobjetos, se limpió el exceso de líquido en la parte trasera y en los bordes. Se procedió a llevarlos al microscopio para la evaluación de daño (Tice, 1996).

6.10.- Evaluación de daño.

La integridad del ADN en la técnica de electroforesis se evaluó de la siguiente manera:

Se consideraron células sin daño las que presentaron una forma esférica sin cola (solo núcleo), mientras que una célula dañada presentó la apariencia de un cometa con una cabeza (núcleo) brillante y fluorescente y una cola, en la que su longitud se relaciona con el daño en la cadena de ADN.

La migración se efectúa hacia el electrodo de carga opuesta a la de las partículas que migran, y dependiendo de la cantidad y del tamaño de los rompimientos va a ser la longitud del cometa. Para la visualización del daño en ADN, se utilizó un objetivo de 40X en un microscopio de epifluorescencia equipado con un filtro de excitación de 515- 560 nm. La extensión de la migración del ADN que sufrió rupturas se midió con reglilla micrométrica acoplada a un lente ocular. Cada división de la reglilla micrométrica fue tomada como una unidad de migración (con el objetivo de 40X, con el cual se realizaron las lecturas, cada unidad de migración equivale a 2.48 micras) (Hughes *et al.*, 1997, Woods *et al.*, 1999).

7.- RESULTADOS

7.1.- VIABILIDAD

Los resultados de las pruebas de viabilidad para las diluciones provenientes del Influyente mostraron que las diluciones 1:100, 1:150 y 1:200 presentaron un porcentaje de supervivencia mayor al 90% por lo que se decidió utilizar las dos primeras para realizar los ensayos para este sitio (Hartmann *et al.*, 2003). Se presentan los datos del Método Dual (Tabla 4).

INFLUENTE	
DILUCIÓN	% VIABILIDAD
1:10	0%
1:25	12%
1:50	52%
1:75	78%
1:100	94%
1:150	96%
1:200	96%

Tabla 4.- Porcentajes de viabilidad del Influyente con el Método Dual.

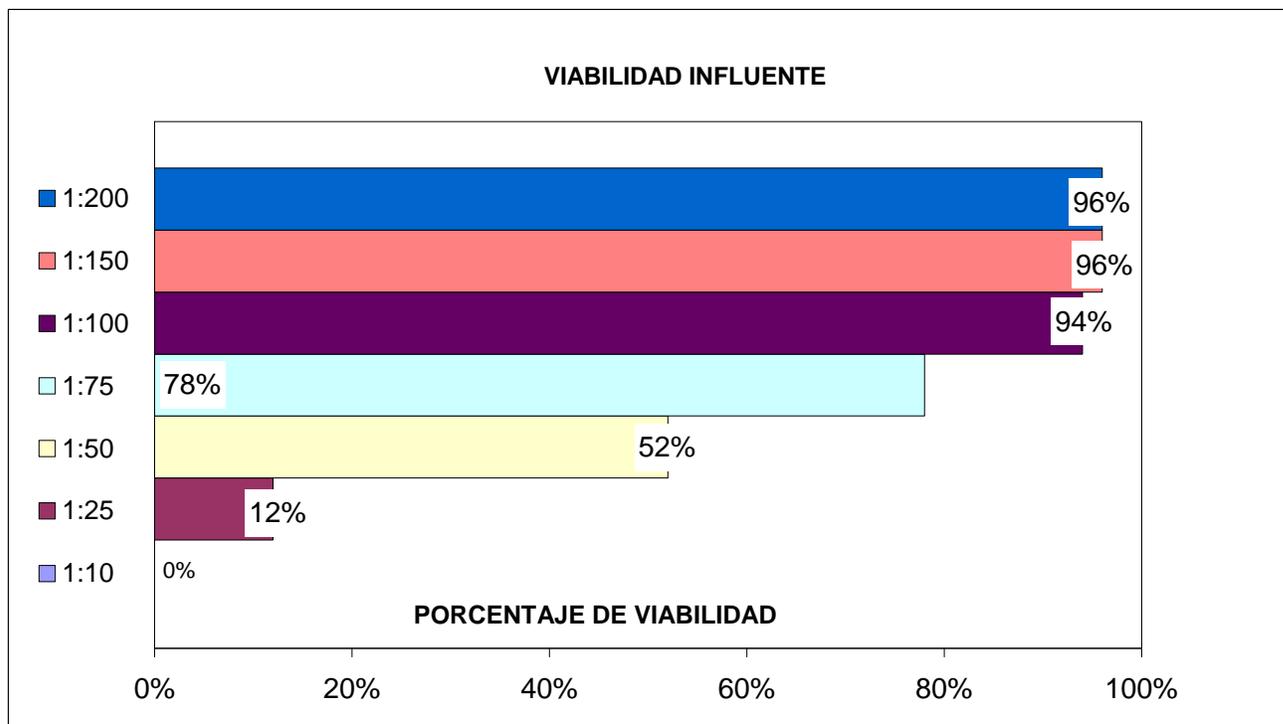


Figura 5.- Gráfica de Viabilidad del Influyente con el Método Dual.

Mientras que para el Efluente las diluciones 1:150 y 1:75 fueron las más apropiadas (Hartmann *et al.*, 2003) de acuerdo a los siguientes resultados del Método Dual:

EFLUENTE	
DILUCIÓN	% VIABILIDAD
1:10	0.18
1:25	34%
1:50	94%
1:75	96%
1:100	97%
1:150	97%
1:200	96%

Tabla 5. - Porcentajes de Viabilidad del Efluente con el Método Dual.

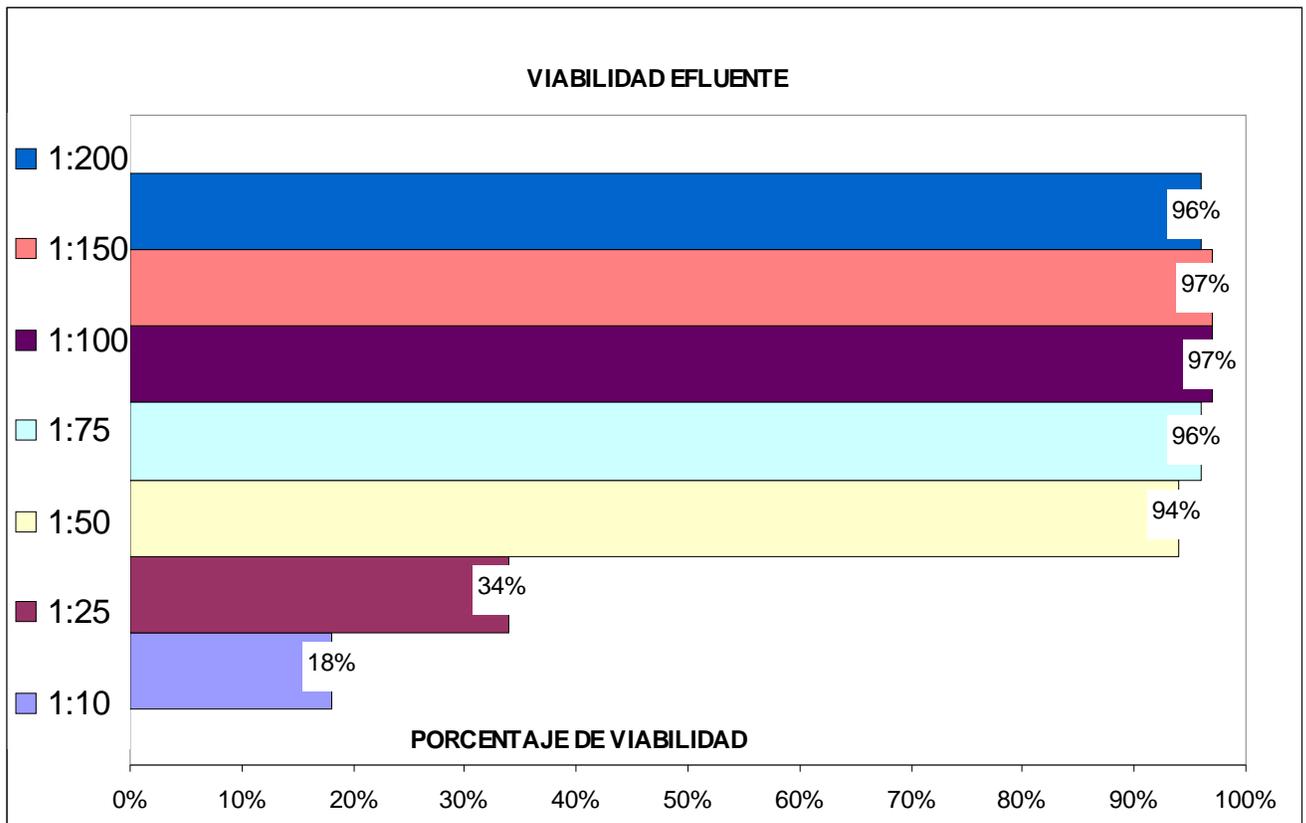


Figura 6. - Gráfica de % de Viabilidad del Efluente con el Método Dual.

7.2.- VIABILIDAD DESPUES DEL TRATAMIENTO.

Los resultados de las pruebas de viabilidad después del tratamiento mostraron una viabilidad mayor al 90% en todos los casos corroborando el hecho de que las diluciones utilizadas no provocan muerte por toxicidad.

Por otro lado, la comparación de las medias (estadígrafo de prueba t de Student) de los 2 métodos utilizados para la determinación de viabilidad mostró que no hay diferencia significativa al 95% al utilizar uno u otro (Dual o Azul de Tripano) como se puede observar en la Fig. 7.

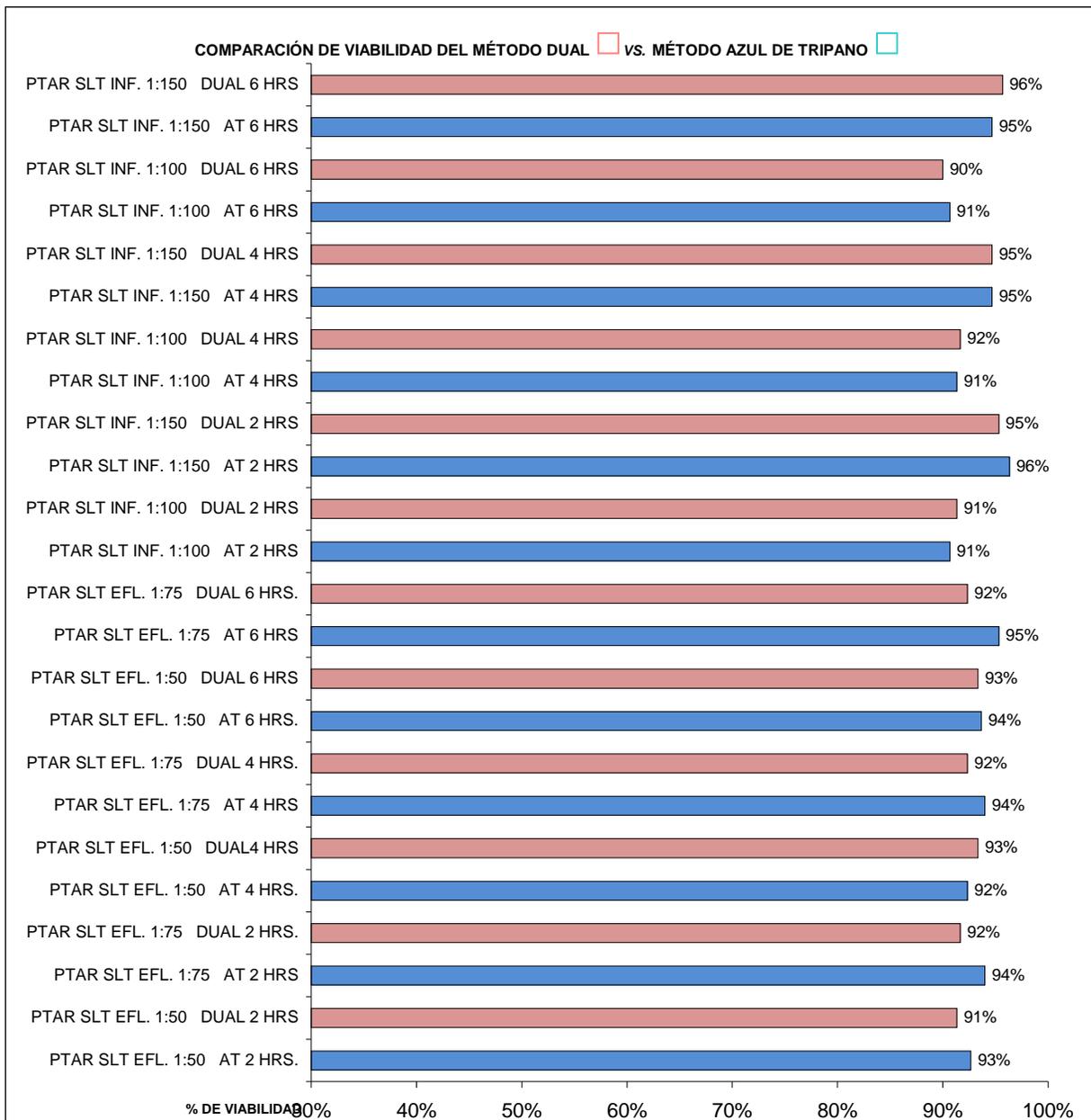


Figura 7.- Porcentajes de viabilidad después del tratamiento con el Método Dual y el Método de Exclusión con Azul de Tripiano.

7.3.- Actividad genotóxica prueba 1(Sin tiempo de exposición a la luz)

Los resultados de los análisis de la prueba 1 mostraron que todas las muestras de agua residual y agua residual tratada presentaron actividad genotóxica y diferencia significativa con su control negativo al aplicar la prueba de "U" de Mann Whitney con un nivel de confianza de 95%.

PLANTA DE TRATAMIENTO SAN LUIS TLAXIALTEMALCO		
PRUEBA 1		
INFLUENTE		
DILUCIÓN	TIEMPO DE EXPOSICIÓN EN HORAS	\bar{X} UNIDADES DE MIGRACIÓN
	2	10.8
1:100	4	10.50
	6	12.34
	2	13.48
1:150	4	12.66
	6	14.38
EFLUENTE		
DILUCIÓN	TIEMPO DE EXPOSICIÓN EN HORAS	\bar{X} UNIDADES DE MIGRACIÓN
	2	10.49
1:50	4	11.63
	6	7.9
	2	7.51
1:75	4	6.7
	6	6.2
CONTROL SOLVENTE DMSO: 100 μ L DMSO/ 400 μ L RPMI		6 HORAS \bar{X} = 0.66
CONTROL SIN TRATAMIENTO: 500 μ L RPMI		6 HORAS \bar{X} = 0.80

Tabla 6. . Medias de las unidades de migración de las diferentes diluciones y tiempos de exposición para la prueba 1.

7.4.- Actividad genotóxica prueba 2 (30 minutos de exposición a luz blanca natural)

De la misma forma, los resultados de los análisis de la prueba 2 mostraron que todas las muestras de agua residual y agua residual tratada presentaron actividad genotóxica y diferencia significativa con su control de solvente al aplicar la prueba de "U" de Mann Whitney con un nivel de confianza de 95%.

PLANTA DE TRATAMIENTO SAN LUIS TLAXIALTEMALCO		
PRUEBA 2		
INFLUENTE		
DILUCIÓN	TIEMPO DE EXPOSICIÓN EN HORAS	̄X UNIDADES DE MIGRACIÓN
	2	10.74
1:100	4	10.02
	6	11.98
	2	12.68
1:150	4	12.36
	6	13.86
EFLUENTE		
DILUCIÓN	TIEMPO DE EXPOSICIÓN EN HORAS	̄X UNIDADES DE MIGRACIÓN
	2	9.82
1:50	4	11.13
	6	7.1
	2	7.49
1:75	4	6.12
	6	5.58

Tabla 7. Medias de las unidades de migración (2.48μ cada unidad) y comparación estadística contra el control de solvente DMSO (media de la migración del control $\bar{X} = 0.66$), para los diferentes tiempos y diluciones en la prueba 2.

La comparación entre las medias de la longitud de migración de las pruebas 1 y 2 no mostró diferencia significativa con la prueba U de Mann-Whitney al 95% de confianza; aunque es evidente que existe una ligera disminución en la longitud de migración en la prueba 2, en todos los casos, (lo que parece ser indicativo de reparación), esta no es suficiente para determinar que la diferencia es estadísticamente significativa pero deberá tomarse en cuenta para el análisis de resultados.

COMPARACIÓN ENTRE LAS MEDIAS DE LONGITUD			
INFLUENTE			
		MEDIAS DE LA LONGITUD DE MIGRACIÓN	
DILUCIÓN	TIEMPO DE EXPOSICIÓN EN HORAS	PRUEBA 1	PRUEBA 2
	2	10.8	10.74
1:100	4	10.5	10.02
	6	12.34	11.98
	2	13.48	12.68
1:150	4	12.66	12.36
	6	14.38	13.86
EFLUENTE			
		MEDIAS DE LA LONGITUD DE MIGRACIÓN	
DILUCIÓN	TIEMPO DE EXPOSICIÓN EN HORAS	PRUEBA 1	PRUEBA 2
	2	10.49	9.82
1:50	4	11.63	11.13
	6	7.9	7.1
	2	7.51	7.49
1:75	4	6.7	6.12
	6	6.2	5.58

Tabla 8.- Comparación de las medias de la longitud de migración de las pruebas 1 (daño) y 2 (daño y reparación).

7.5.- COMPARACIÓN DE LOS DIFERENTES TIEMPOS DE EXPOSICIÓN

Para determinar si existen diferencias en los efectos causados por las diferentes diluciones de las muestras a diferentes tiempos de exposición. Se compararon los ensayos correspondientes con la prueba U de Mann-Whitney al 95% de confianza. Los resultados se muestran en las siguientes tablas y gráficas: (se muestran sólo los resultados de la prueba 1)

COMPARACIÓN DE LOS TIEMPOS DE EXPOSICIÓN		
INFLUENTE		
DILUCIÓN	TIEMPO DE EXPOSICIÓN EN HORAS	MEDIAS DE LA LONGITUD DE MIGRACIÓN
	2 vs 4	10.8 vs 10.5
1 :100	2 vs 6	10.8 vs 12.34
	4 vs 6	10.5 vs 12.34
1 : 150	2 vs 4	13.48 vs 12.66
	2 vs 6	13.48 vs 12.66
	4 vs 6	12.66 vs 14.38
EFLUENTE		
DILUCIÓN	TIEMPO DE EXPOSICIÓN EN HORAS	MEDIAS DE LA LONGITUD DE MIGRACIÓN
	2 vs 4	10.49 vs 11.63
1 : 50	2 vs 6	10.49 vs 7.9
	4 vs 6	11.63 vs 7.9
	2 vs 4	7.51 vs 6.7
1 : 75	2 vs 6	7.51 vs 6.2
	4 vs 6	6.7 vs 6.2

Tabla 9.- Comparación de los tiempos de exposición.

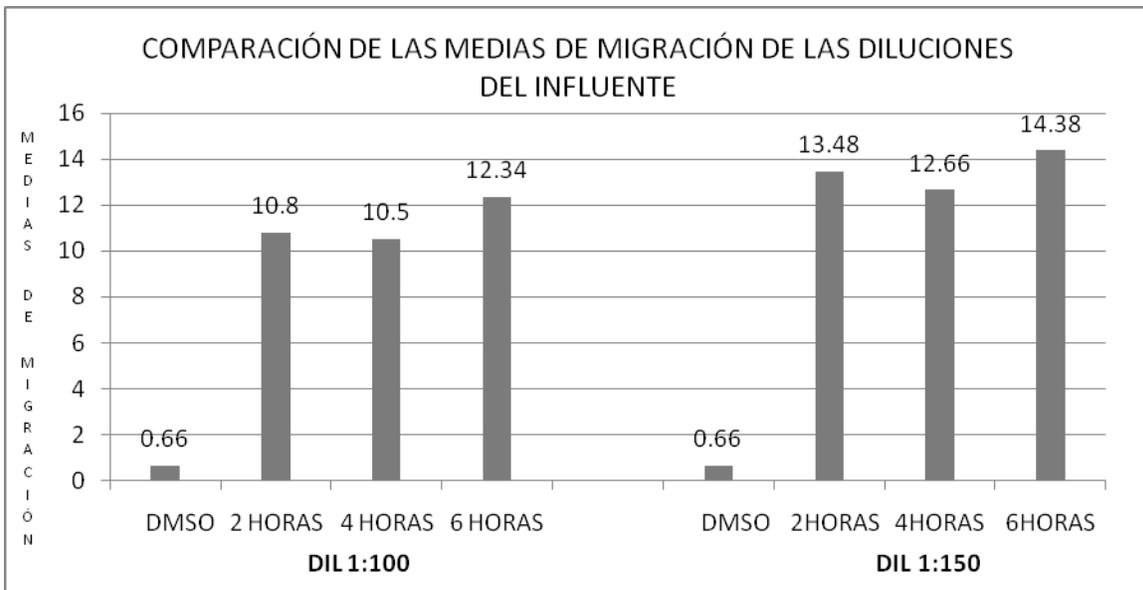


Fig. 8.- Comparación de los tres tiempos de exposición de las diluciones 1:100 y 1:150 del Influyente.

En relación al **Influyente**, los datos nos muestran que para la dilución 1:100 el daño parece aumentar en función del tiempo. Este comportamiento se debe probablemente a la mayor concentración de contaminantes que parecen permanecer en esta dilución que procede del influente, donde además de mayor concentración de contaminantes existe un variedad de compuestos que, a diferencia del efluente, no han sido removidos por los procesos de tratamiento.

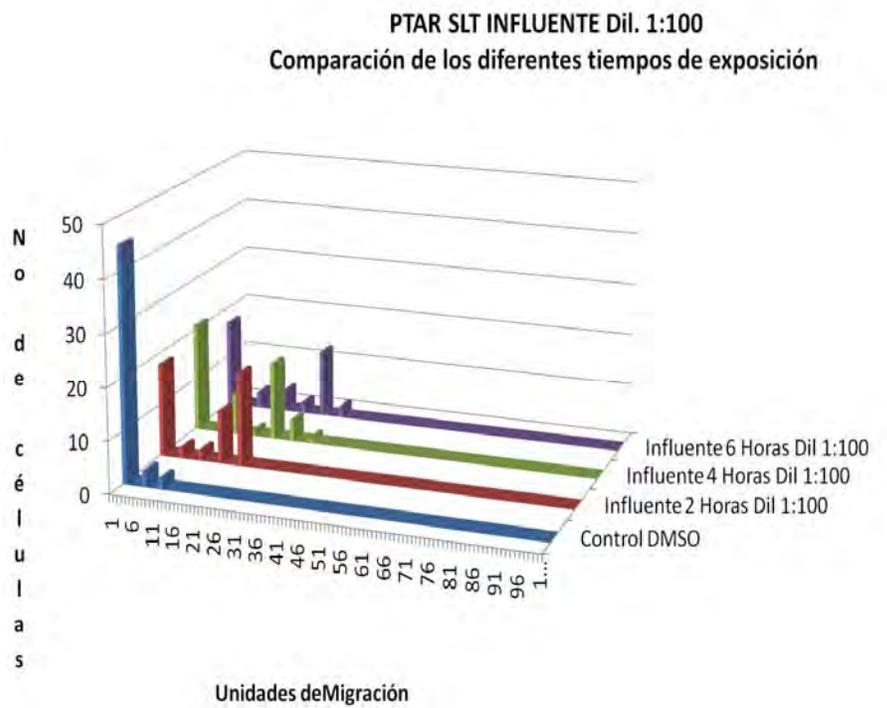
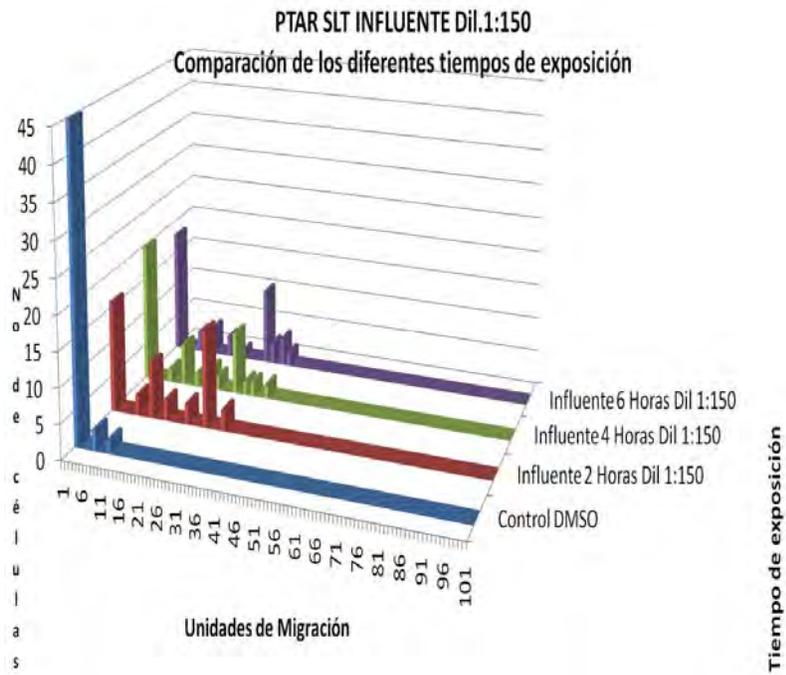


Fig. 9.- Comparación de los tres tiempos de exposición de las diluciones 1:100 y 1:150 para el Influyente.

Para la dilución 1:150 los datos muestran la misma tendencia y aunque al tiempo de 4 horas parece haber una ligera disminución del daño, al tiempo 6 horas el daño alcanza su máximo.

Debe hacerse notar sin embargo que en esta dilución el daño parece mayor en comparación con la dilución 1:100, teniendo esta última supuestamente mayor concentración de contaminantes y los datos muestran mayor daño en la dilución de menor concentración.

Este comportamiento puede ser explicado en función del porcentaje de viabilidad que es 5 a 6 % menor en las diluciones 1:100 comparada con las diluciones 1:150 (ver fig. 6).

Es posible también que el mayor número de células que sobrevivieron en la dilución de menor concentración presenten efecto genotóxico que se ve reflejado en un aumento del nivel de daño y posiblemente algunos de los componentes de la muestra que en mas altas concentraciones producen toxicidad, no permiten evidenciar daño genotóxico, pero, en mas baja concentración si se pueden expresar como agentes genotóxicos.

Debe tenerse siempre en cuenta que en influentes hay mayor concentración y mayor variedad de compuestos que en un efluente.

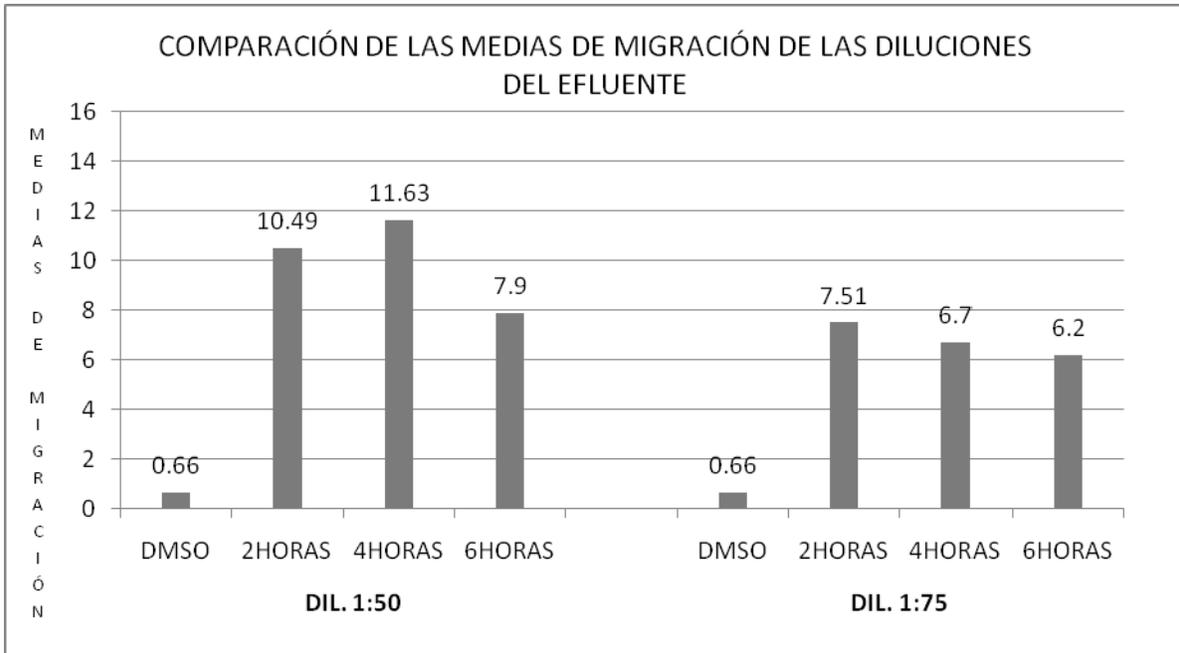


Fig 10. - Comparación de los tres tiempos de exposición de las diluciones 1:50 y 1:75 del Efluente.

Para el **Efluente**, observando la gráfica es evidente que los resultados son muy similares para los tiempos de exposición de 2 y 4 horas, lo que se corroboró con la prueba de "U" que no mostró diferencia significativa, de manera similar las comparaciones entre los tiempos de exposición de 2 y 6 horas, 4 y 6 horas no mostraron diferencia significativa al emplear el estadístico de Mann-Whitney.

No obstante, observando la Fig. 10, en la dilución 1:50, se hace evidente que al tiempo de 4 horas hubo un ligero aumento de la longitud de migración y al tiempo de 6 horas se registró una reducción en la longitud de migración que al 95 % de confianza estuvo en los límites de alcanzar una diferencia significativa con un valor de "U" de 1.946, que bien podría ser considerado en el límite de confianza al comparar los tiempos de 4 y 6 horas

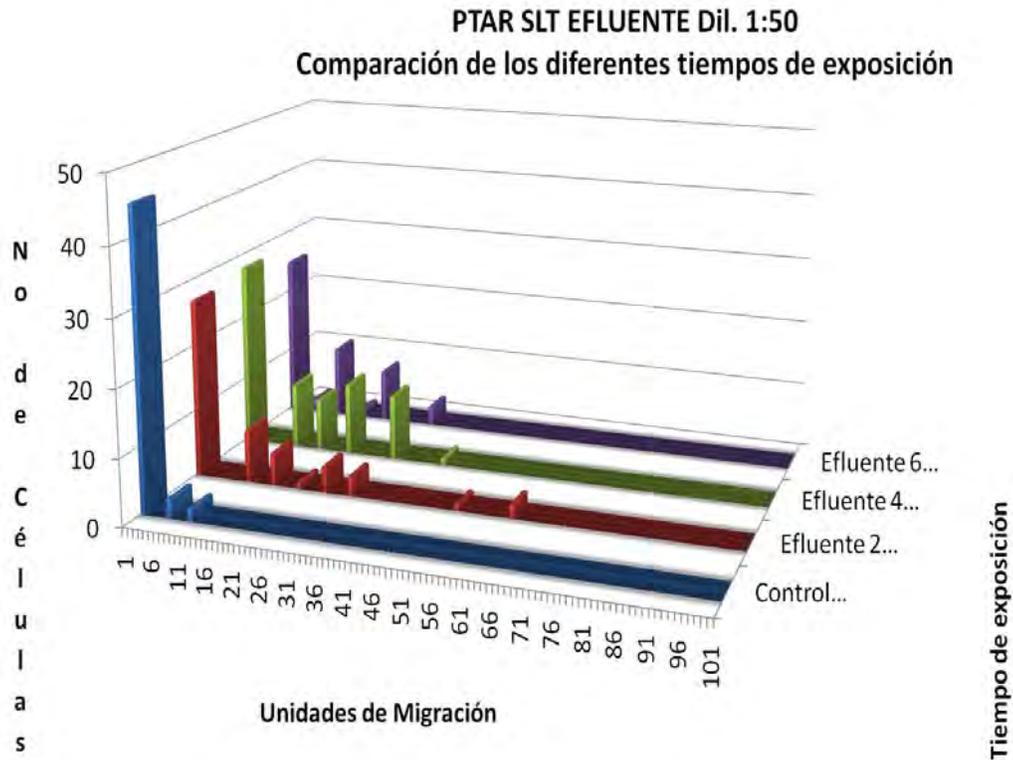


Fig. 11.- Comparación de los tiempos de exposición 2, 4 y 6 horas del Efluente en las diluciones 1:50.

El comportamiento puede ser explicado para los tiempos de exposición de 2 y 4 horas, como un aumento del efecto genotóxico en función del tiempo de exposición, al parecer en este intervalo de tiempo, los contaminantes presentes actúan sobre las células produciendo daño, pero dado que se trata de un efluente, las bajas concentraciones de contaminantes parecería que se agotan y al tiempo de 6 horas ya no se produce mas daño y actúan entonces los procesos de reparación.

El supuesto de reparación parece ser la respuesta para explicar este comportamiento dado que se presenta primero un máximo de genotoxicidad al tiempo de 4 horas y esta parece decaer al tiempo de 6 horas.

Por otra parte la distribución de los datos muestra que, aunque el número de células con daño es prácticamente el mismo para los diferentes tiempos de exposición, es la magnitud del daño la que varía en función de éste.

Este comportamiento refuerza la idea de que al tiempo 2 horas ocurre el daño en un número determinado de células, al tiempo 4 el daño aumenta en magnitud, permaneciendo el mismo número de células dañadas y al tiempo 6 aunque el número de células con daño parece aumentar ligeramente, la magnitud del daño disminuye de manera acentuada presumiblemente por los eventos de reparación.

PTAR SLT EFLUENTE Dil 1:75
Comparación de los diferentes tiempos de exposición

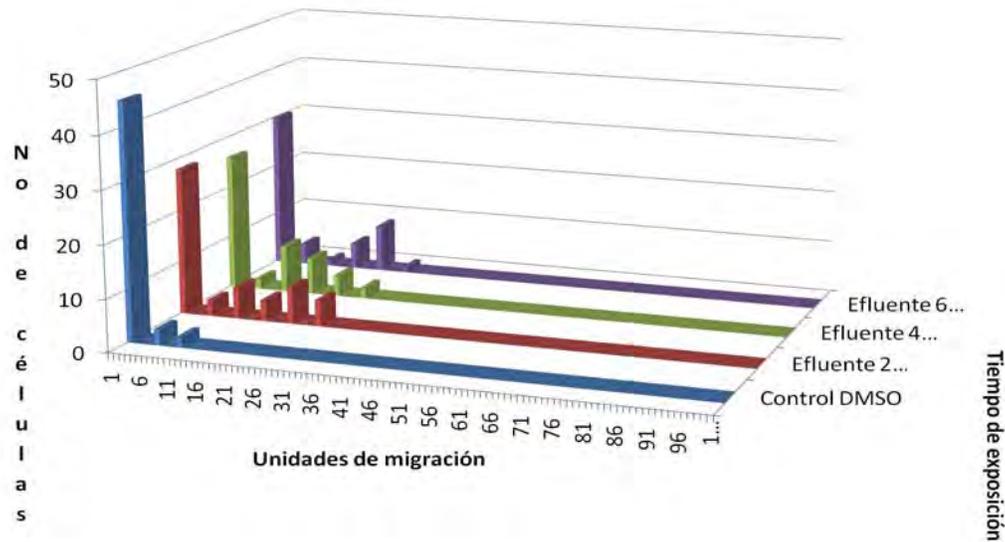


Fig. 12.- Comparación de los tiempos de exposición del Efluente en la dilución 1:75.

Para la dilución 1:75 del Efluente la comparación de los tiempos de exposición no muestra diferencia significativa (al 95% de confianza) presentando datos muy similares, no obstante, observando los valores de las medias (Fig. 12), se observa un daño inicial que va disminuyendo en función del tiempo, lo que indica nuevamente la posibilidad de un evento de reparación, en este caso parece ser que al tiempo de 2 horas se produce un daño inicial y dado que se trata de una dilución mayor del efluente, las concentraciones de contaminantes son aún mas bajas, por lo que al parecer a partir de este tiempo los componentes de la muestra ya no producen mas daño y ocurren eventos de reparación que producen una recuperación relativa de la población celular.

Observando la distribución de los datos (Fig. 10), el número de células sin daño disminuye del tiempo 2 horas al tiempo 4 horas, pero aumenta al tiempo de 6 horas, apoyando el supuesto de reparación.

7.6.- COMPARACIÓN DE LAS DILUCIONES

También se evaluó el efecto de la concentración (diluciones) para cada tiempo de exposición.

PLANTA DE TRATAMIENTO SAN LUIS TLAXIALTEMALCO		
COMPARACIÓN DE LAS DILUCIONES		
INFLUENTE		
DILUCIÓN	TIEMPO DE EXPOSICIÓN EN HORAS	MEDIAS DE LA LONGITUD DE MIGRACIÓN
	2	10.8 vs 13.48
1:100 vs 1:150	4	10.5 vs 12.66
	6	12.34 vs 14.38
EFLUENTE		
DILUCIÓN	TIEMPO DE EXPOSICION EN HORAS	MEDIAS DE LA LONGITUD DE MIGRACIÓN
	2	10.49 vs 7.51
1:50 vs 1:75	4	11.63 vs 6.7 **
	6	7.9 vs 6.2

** Sí existe diferencia significativa al 95% de confianza

Tabla 10.- Comparación de las diluciones.

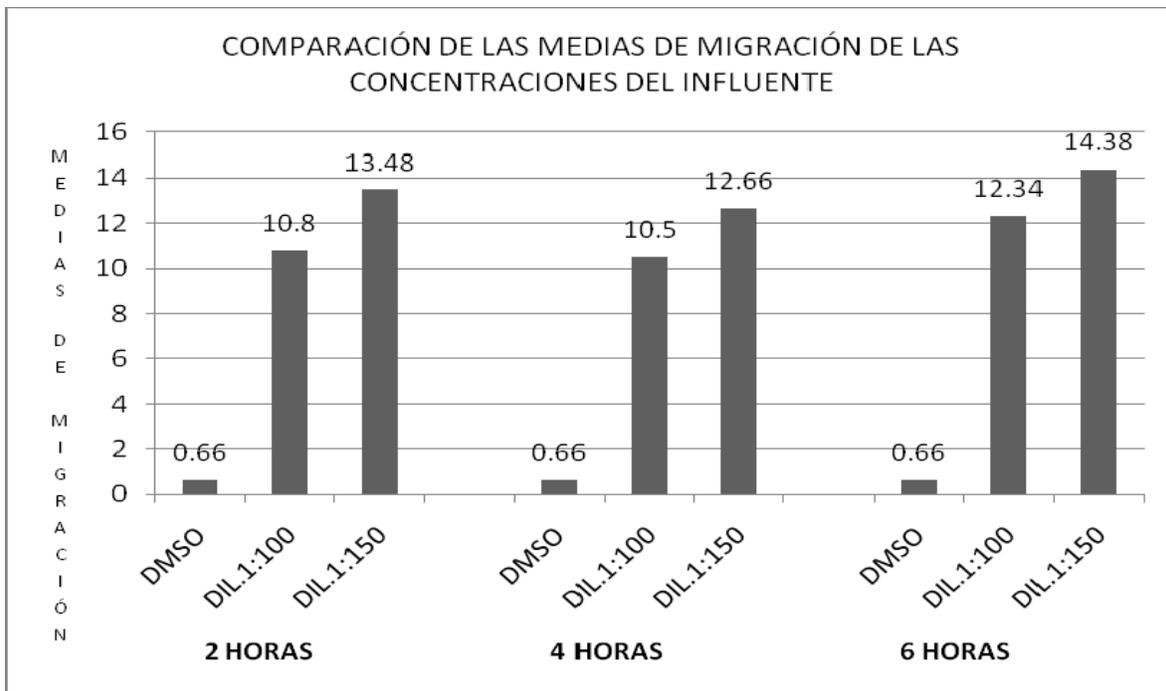
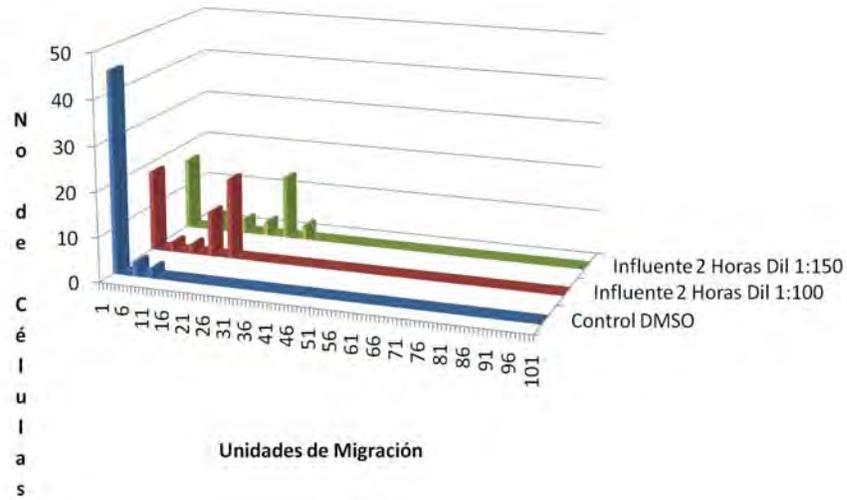


Fig. 13.- Comparación de las Diluciones del Influyente en los tres tiempos de Exposición 2, 4 y 6 horas. En el tiempo de 4 horas sí existe diferencia significativa al 95% de confianza.

En el caso de las diluciones del **Influyente**, como se mencionó antes, se presenta un comportamiento inesperado dado que las muestras de menor concentración presentan mayor nivel de daño. Se ha mencionado que la mayor viabilidad de las muestras menos concentradas pueden contribuir con este aumento del nivel de daño, también se ha considerado el hecho de que la menor concentración de los contaminantes puede evidenciarlos como compuestos genotóxicos.

PTAR SLT INFLUENTE
Comparación de las Diluciones



PTAR SLT INFLUENTE
Comparación de las Diluciones

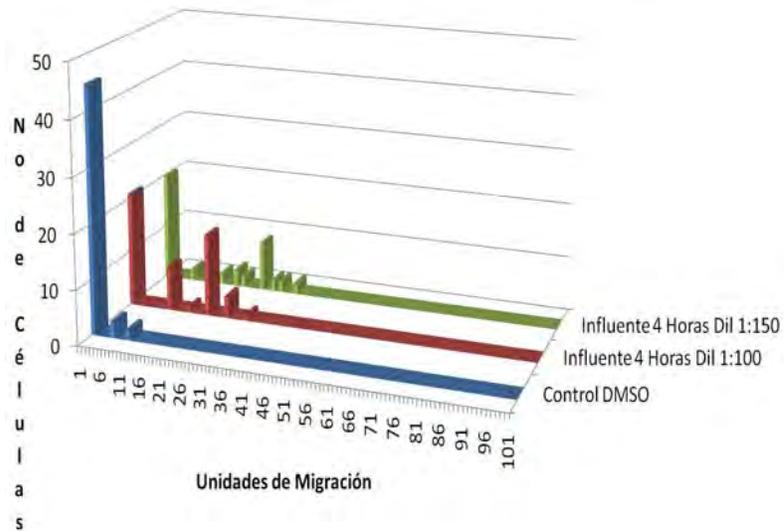


Fig. 14.- Comparación de las diluciones del Influyente a 2 y 4 horas de exposición.

PTAR SLT INFLUENTE
Comparación de las Diluciones

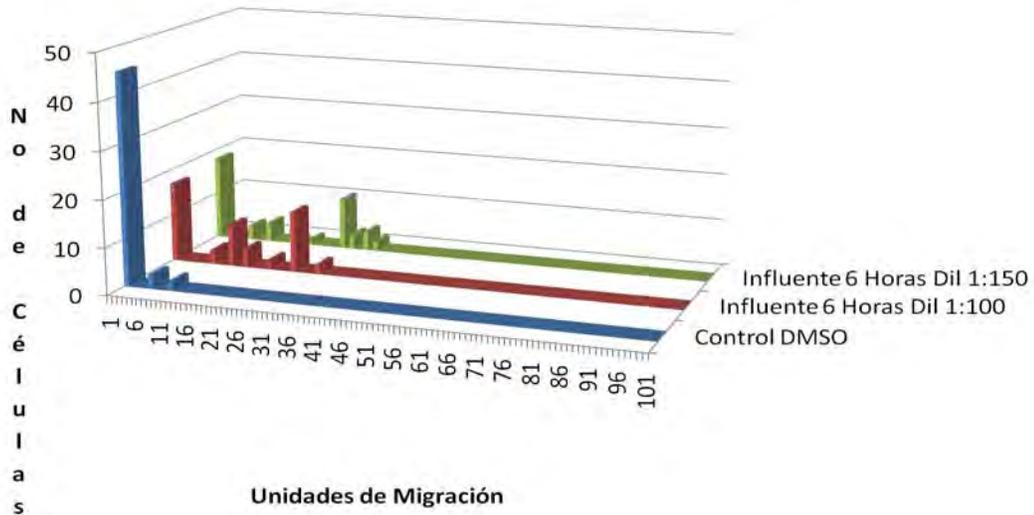


Fig. 15.- Comparación de las diluciones del Influyente a 6 horas de exposición.

Por otra parte observando la distribución de los datos (Fig. 15) se puede notar que las diluciones producen diferentes patrones de migración lo que hace pensar que incluso son diferentes los compuestos que actúan y esto podría deberse bien a que, como ya se mencionó, la menor concentración, permitiría a algunos compuestos tóxicos evidenciarse como genotóxicos o bien a que dentro de la dinámica de los diversos componentes de las muestras, algunos que estaban inhibidos en las concentraciones mayores puedan entonces producir su efecto genotóxico al presentarse en menores concentraciones.

Para el tiempo de 4 y 6 horas el comportamiento es muy similar observándose también las diferencias claras en el patrón de distribución de los datos.

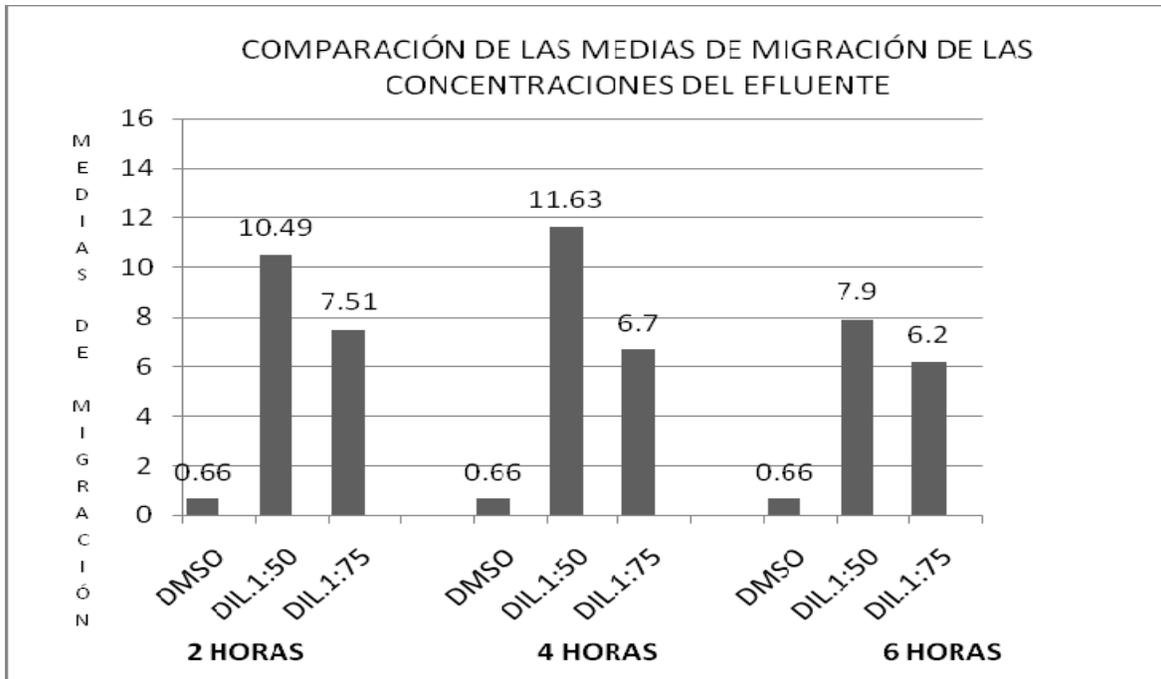


Fig. 16.- Comparación de las Diluciones del Efluente en los tres tiempos de exposición 2, 4 y 6 horas. Sí existe diferencia significativa (al 95% de confianza) a las 4 horas de exposición.

PTAR SLT EFLUENTE
Comparación de las Diluciones

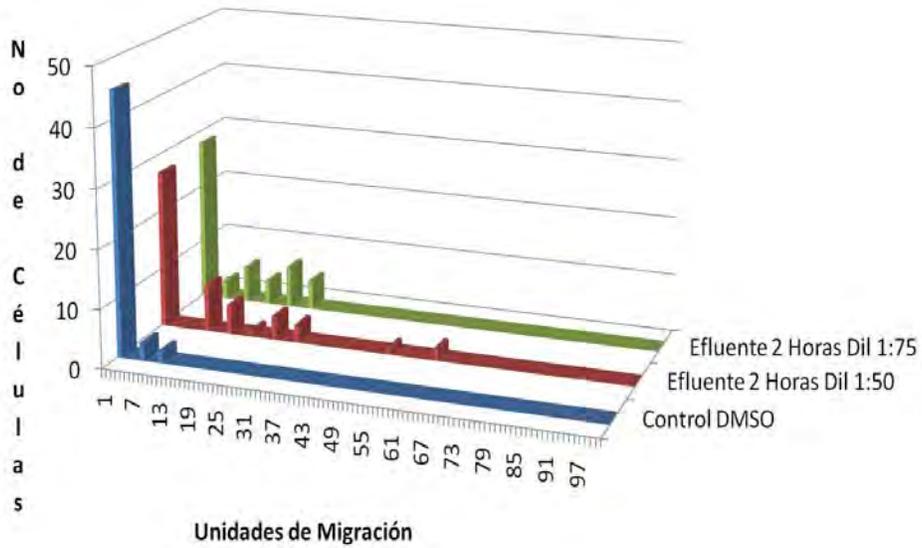


Fig. 17.- Comparación de las diluciones del Efluente a 2 horas de exposición.

Para el **Efluente**, en éstas diluciones 1:50 y 1:75 a 2 horas de exposición, se puede observar que, aunque la prueba de "U" no muestra diferencia significativa los datos dejan ver una disminución del nivel de daño al disminuir la concentración de contaminantes.

PTAR SLT EFLUENTE
Comparación de las Diluciones

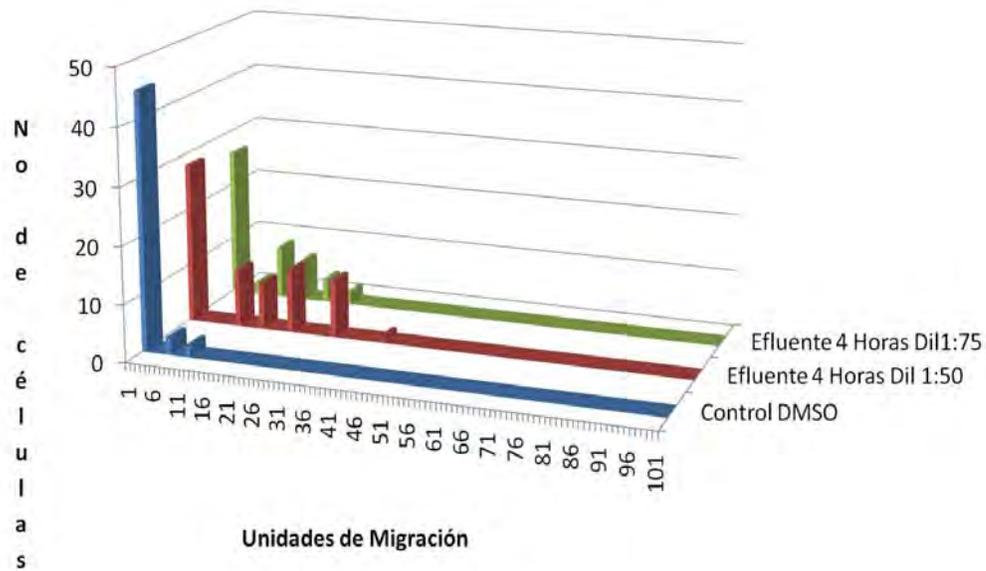


Fig. 18.- Comparación de las diluciones del Efluente a 4 horas de exposición.

Para el tiempo 4 horas el comportamiento fue similar disminuyendo el daño de forma significativa en la dilución de menor concentración.

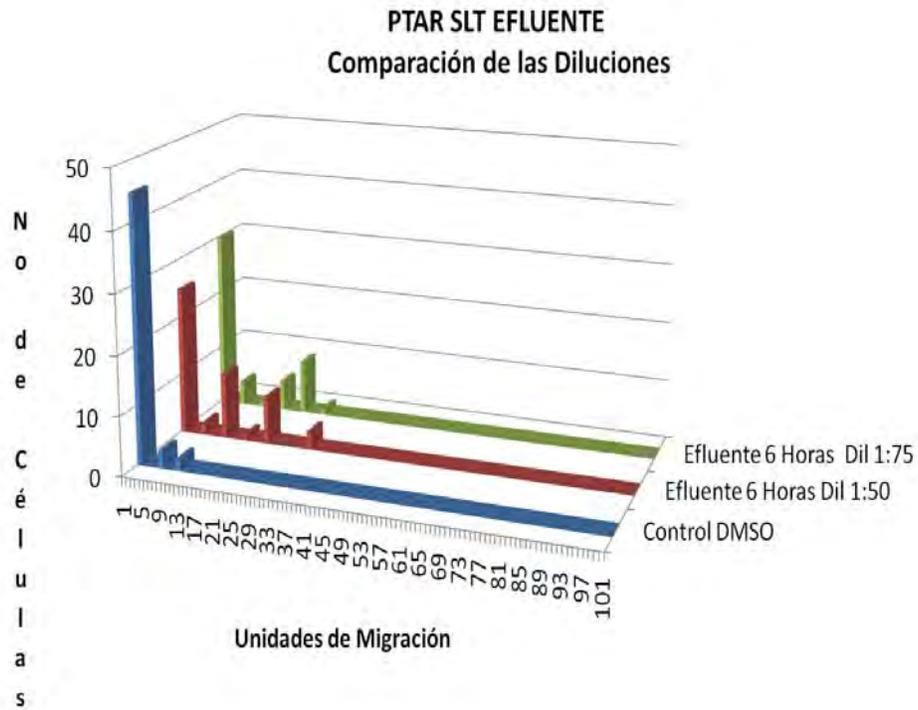


Fig. 19.- Comparación de las diluciones del Efluente a 6 horas de exposición.

Para el tiempo 6 horas puede notarse también una ligera disminución del daño en la dilución más alta, aunque no hay diferencia significativa al 95% de confianza.

7.7.- Comparación de los Procesos de Tratamiento Influyente-Efluente.

Se comparó el efecto de los Procesos de Tratamiento en la Planta, obteniéndose los siguientes resultados.

PLANTA DE TRATAMIENTO SAN LUIS TLAXIALTEMALCO		
COMPARACIÓN POR PROCESO		
INFLUENTE/ EFLUENTE		
DILUCIÓN INFLUENTE/ EFLUENTE	TIEMPO DE EXPOSICIÓN EN HORAS	MEDIAS DE LA LONGITUD DE MIGRACIÓN
	2	10.80 vs 10.49
1: 100/ 1: 50	4	10.50 vs 11.63
	6	12.34 vs 7.90 **
	2	13.48 vs 7.51 **
1: 150/ 1: 75	4	12.66 vs 6.70 **
	6	14.38 vs 6.20 **

****Sí existe diferencia significativa al 95% de confianza**

Tabla 11.- Comparación por proceso Influyente/Efluente.

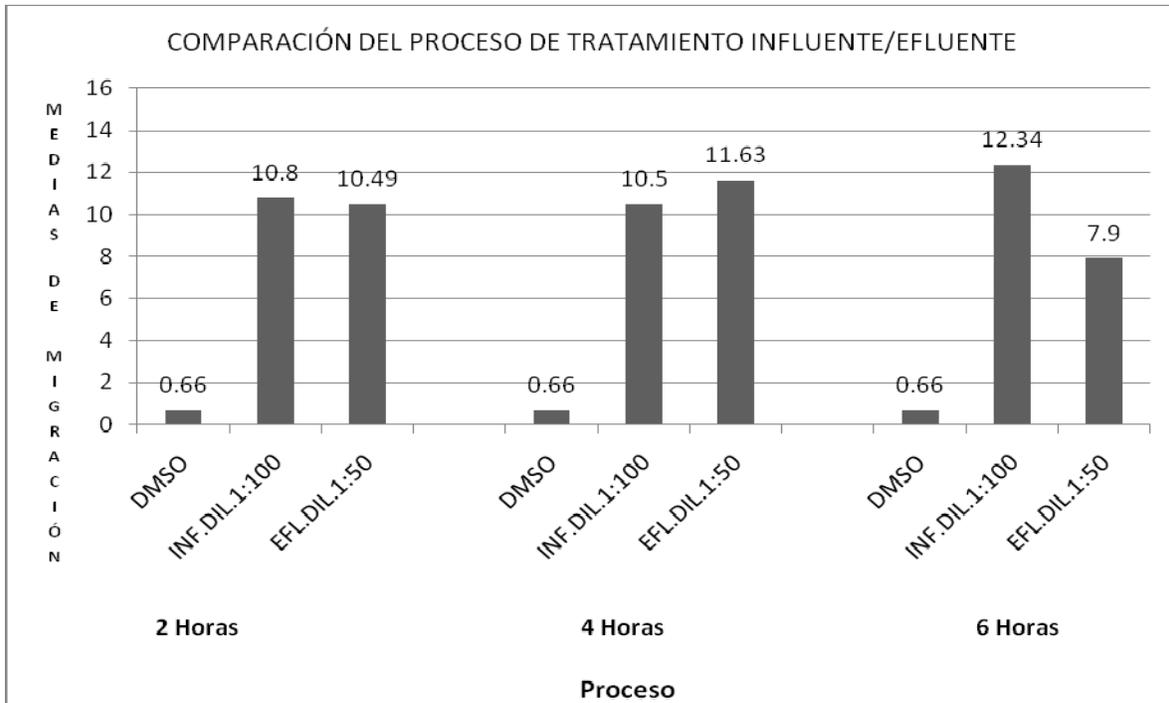


Fig. 20.- Comparación del Proceso Influyente/Efluente en las diluciones 1:100/1:150 en los tres tiempos de exposición 2, 4 y 6 horas. Sí hay diferencia significativa (nivel de confianza al 95%) a las 6 horas.

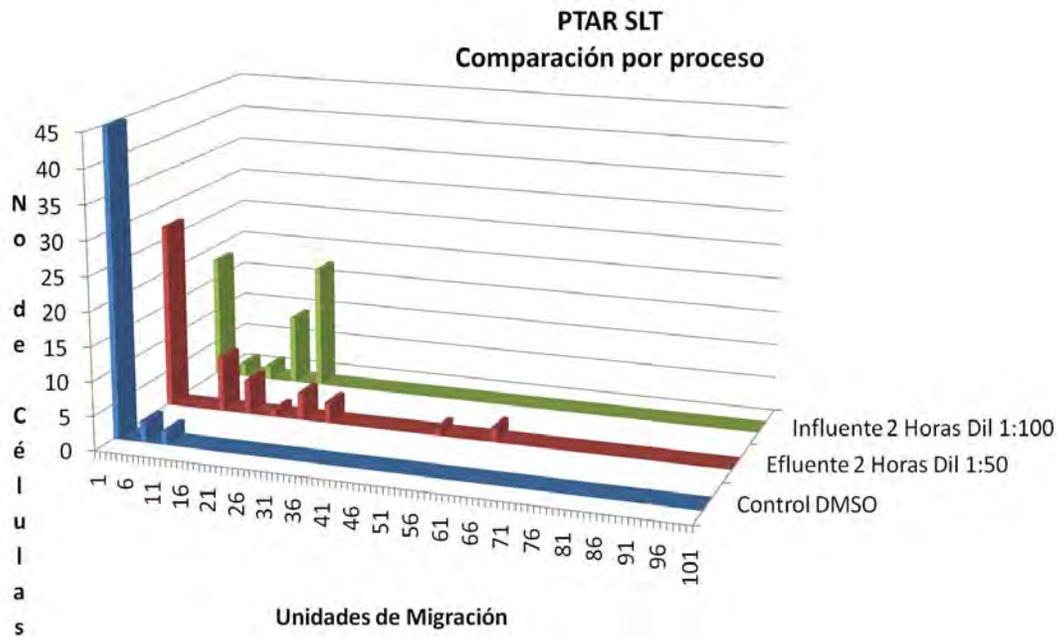


Fig. 21.- Comparación por proceso Influyente/Efluente a 2 horas de exposición.

Al tiempo de 2 horas ambos procesos parecen ser muy similares con un ligero aumento del nivel de daño para el Influyente. Es importante observar que la distribución de los datos (Fig.21) nos muestra que aunque el Influyente presenta un mayor número de células con daño, el Efluente presenta células con una migración mayor.

Para tratar de explicar este comportamiento, debemos recordar que el Efluente, durante el proceso de tratamiento, recibe una dosis de cloro para su desinfección y al reaccionar con la materia orgánica que no se ha eliminado totalmente durante el proceso de tratamiento, conduce a la formación de subproductos de cloración que son genotóxicos (Koivusalo *et al.*, 1998; Kenneth *et al.*, 1999; Villanueva *et al.*, 2000; Yun *et al.*, 2008) y pueden por tanto producir un aumento de la genotoxicidad en comparación con el Influyente que no tiene contacto con el cloro.

Y al tiempo de 2 horas parece ser que los compuestos comienzan a producir su efecto genotóxico, compuestos que no están presentes en el Influyente.

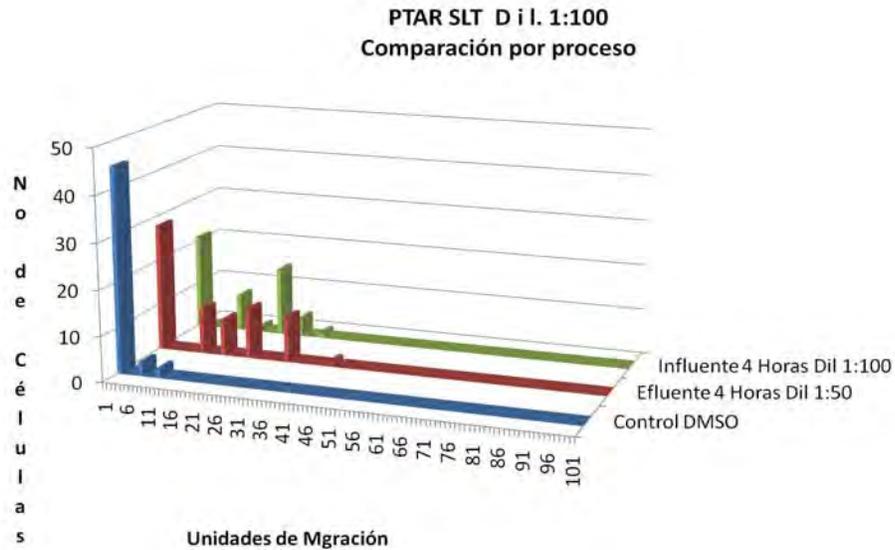


Fig. 22.- Comparación por proceso Influyente/Efluente a 4 horas de exposición.

Al tiempo de 4 horas, aunque no de forma significativa, sí puede observarse un mayor nivel de daño en el Efluente (Fig.22).

Esto parecería un resultado incongruente si tomamos en cuenta que el Influyente tiene una mayor cantidad de compuestos y en mayor concentración que el Efluente y por lo tanto debería causar mas daño. A este tiempo el daño provocado por el Influyente mantiene su nivel inicial, pero el Efluente aumenta su nivel de daño.

Esto provocado probablemente por el efecto de los productos de desinfección formados por el tratamiento con cloro que recibe el Efluente para su desinfección y a al tiempo de 4 horas parece ser que los compuestos alcanzan su mayor efecto.

PTAR SLT
Comparación por proceso

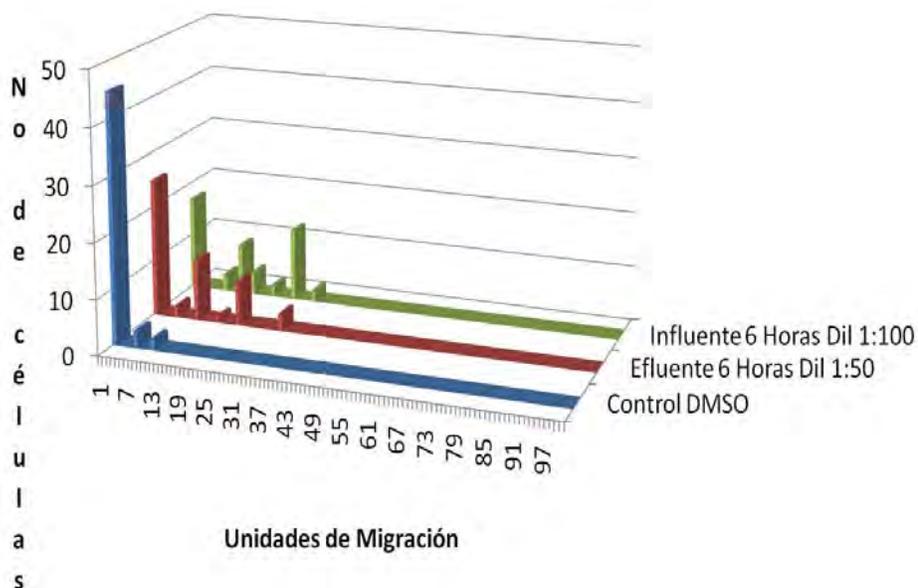


Fig. 23.- Comparación por proceso Influyente/Efluente a 6 horas de exposición.

Al tiempo de 6 horas la mayor concentración de compuestos aun activos en el Influyente parecen provocar un aumento en el nivel de daño mientras que los compuestos del Efluente en menor concentración parecen agotarse y actúan entonces los procesos de reparación que disminuyen el nivel de daño de forma significativa (Fig. 23).

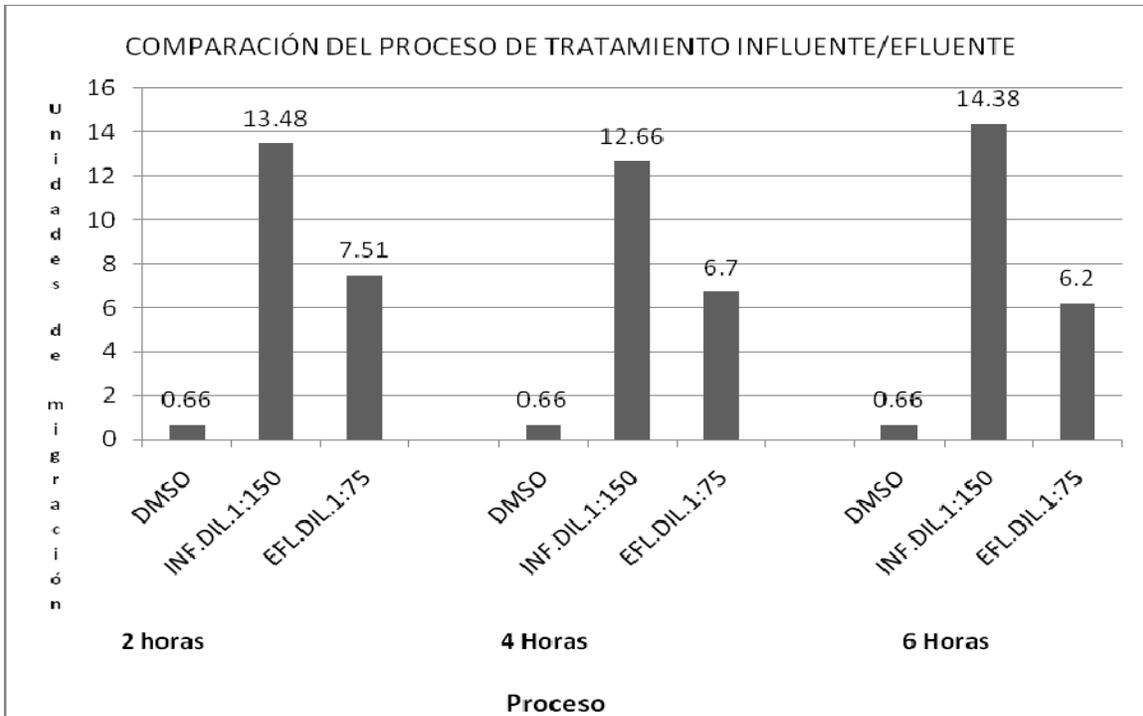
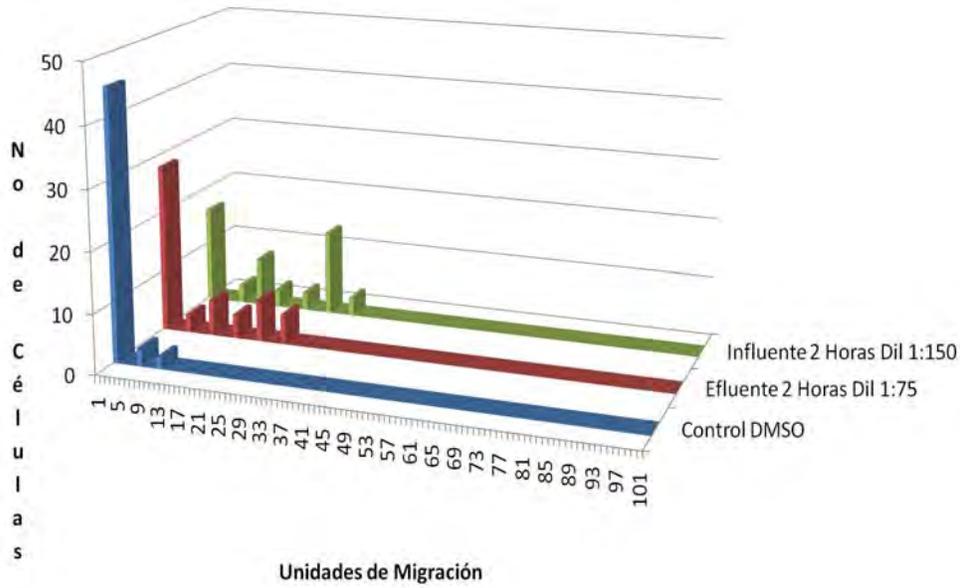


Fig. 24.- Comparación del Proceso Influyente/Efluente en las diluciones 1:150/1:75 en los tres tiempos de exposición 2, 4 y 6 horas. Sí hay diferencia significativa (al 95% de confianza).

Para las diluciones más altas el se presentó la tendencia esperada al comparar los procesos. El la media de las unidades de migración en el Efluente a 2 horas fue significativamente mas bajo que la media del Influyente al mismo tiempo de exposición.

PTAR SLT
COMPARACIÓN POR PROCESOS



PTAR SLT
Dil. 1:150

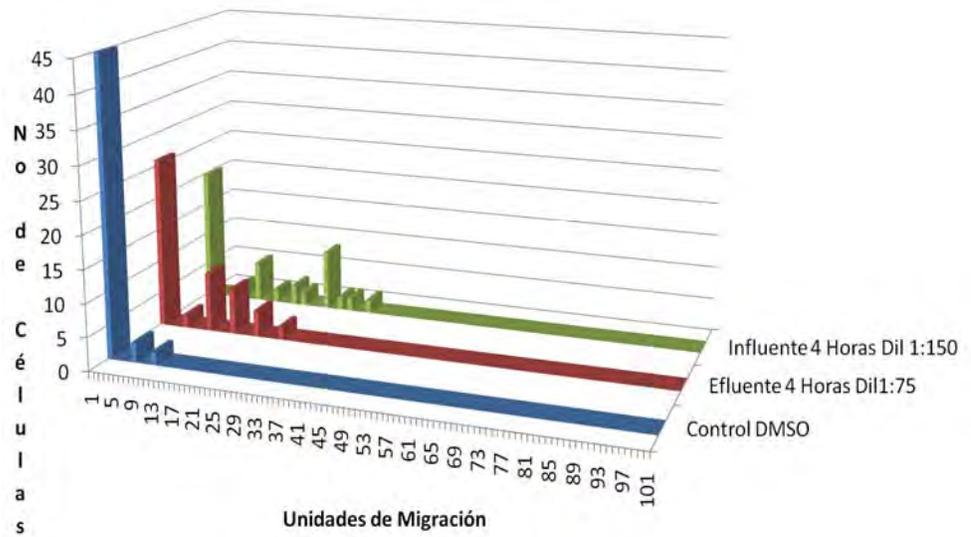


Fig. 25.- Comparación por proceso Influyente/Efluente a los tiempos de exposición 2 y 4 horas.

PTAR SLT
Dil 1:150

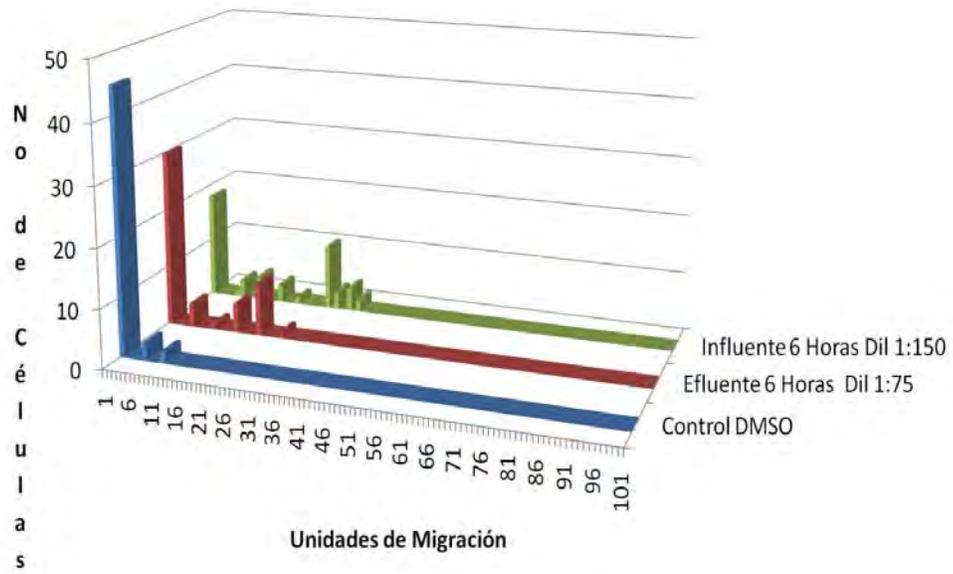


Fig. 26.- Comparación por proceso Influyente/Efluente a las 6 horas de exposición.

8.- DISCUSIÓN

En la Cd. de México desde 1984 el Gobierno del D.F comenzó de manera oficial las actividades de reuso del agua, con el Programa Nacional de Uso Eficiente del Agua. Entre los años 1990-1992 el programa se concentró en actividades que incluyeron protección de zonas naturales de recarga del acuífero con agua de lluvia y aguas residuales municipales recuperados. Así mismo se establecieron las disposiciones para un programa industrial de "pre tratamiento" requisito importante previo para las actividades de recuperación y reuso (National Research Council, 1995).

En el D.F., los $2.62\text{m}^3/\text{s}$ de aguas residuales tratadas y reusadas se distribuyen así: 83% para irrigación del paisaje urbano y depósito de áreas recreativas, 10% para uso industrial, 5% para irrigación agrícola, 2% para usos comerciales por ejemplo el lavado de automóviles (GDF, 2007).

Uno de los proyectos más significativos es el uso de aguas residuales municipales recuperadas que provienen de la Planta de Tratamiento San Luis Tlaxialtemalco, para mejorar el ecosistema lacustre de los históricos Canales de Xochimilco. Esta Planta de Tratamiento al igual que todas las que administra el GDF se encuentra permanentemente monitoreada en cuanto a análisis fisicoquímicos, bacteriológicos, metales pesados y orgánicos (GDF, 2007), sin embargo se recomienda que el tratamiento de aguas residuales debe tener alta prioridad antes de desecharlas, así como incrementar la vigilancia de la salud pública (National Research Council, 1995). Igualmente se sugiere llevar a cabo estudios epidemiológicos necesarios que permitan evaluar el potencial de contaminación.

La técnica que permite la detección sensible de daño y reparación de ADN es críticamente importante en los campos de toxicología y epidemiología es la comúnmente conocida como Ensayo Cometa.

En el presente trabajo se utilizó ésta técnica para evaluar la actividad genotóxica del agua residual y residual tratada de la Planta de Tratamiento de Agua Residual San Luis TLaxialtemalco.

Es conveniente llevar a cabo un ensayo de viabilidad cuando se realizan estudios de actividad genotóxica *in vivo* mediante el Ensayo Cometa (Hartmann et al., 2003).

Por lo que en éste estudio se llevó a cabo el ensayo de viabilidad en las dos diluciones (1:100 y 1:150) del Influyente, presentándose una diferencia entre ambas de 2%. La dilución menos concentrada (1:150) la que presentó la mayor viabilidad: 96%.

Para el Efluente, la viabilidad obtenida para las dos diluciones ensayadas (1:50 y 1:75) mostró también una diferencia de 2 puntos porcentuales: la dilución 1:50 obtuvo un 94%, mientras que la dilución 1:75, un 96% que, al igual que en el Influyente, se obtuvo lo que se esperaba: en las muestras menos concentradas se presentó una viabilidad mayor.

Cabe señalar que el máximo tiempo de exposición para evaluar la viabilidad de las diluciones, tanto del influente como del efluente, fue de 6 horas (Tice et al., 2000; Hartmann et al., 2003).

COMPARACIÓN DE LAS DIFERENTES DILUCIONES.

Influente

Se evaluó el efecto genotóxico de las diluciones de los concentrados de las muestras del Influyente, determinando si existían diferencias en los efectos genotóxicos ocasionados por las diferentes diluciones 1:100 y 1:150.

Para éste caso, la relación concentración-efecto parece ser inversamente proporcional, dado que la menor concentración ensayada (1:150) produce un efecto genotóxico mayor que el producido por la concentración más alta (1:100).

Éste comportamiento se podría explicar tomando en cuenta que la mayor viabilidad de las muestras menos concentradas puede contribuir al aumento del nivel de daño, es decir, que hay un mayor número de células susceptibles de daño.

También se considera que posiblemente la menor concentración de los contaminantes puede disminuir la toxicidad general de algunos compuestos que inhibían el crecimiento o producían muerte celular, pueden a menor concentración, tener un efecto genotóxico.

Por otra parte la distribución de los datos permite ver que las diluciones producen diferentes patrones de migración, lo que hace pensar que hay diferentes compuestos actuando y esto podría deberse, bien a que como ya se mencionó, la menor concentración permite a algunos compuestos tóxicos evidenciarse como genotóxicos o bien, a que la interacción de los diversos componentes de las muestras, evidencie sus efectos a menores concentraciones, es decir que los compuestos que estaban inhibidos en las concentraciones mayores pueden entonces producir su efecto genotóxico, y sumado a esto, una mayor viabilidad, daría como resultado un mayor nivel de daño a menores concentraciones.

Efluente.

En el Efluente, se obtuvo lo esperado, ya que la concentración fue directamente proporcional al efecto genotóxico producido. Se observó además que, la menor concentración (1:75) aunque si bien presenta efecto genotóxico, éste es el de menor nivel y se ve disminuido conforme aumenta el tiempo de exposición, ya que al parecer la concentración de contaminantes se agotó, y se presentaron los procesos de reparación.

COMPARACIÓN DE LOS TIEMPOS DE EXPOSICIÓN.

Cabe señalar que el máximo tiempo de exposición para ambos concentrados de las muestras (Influyente y Efluente) fue de de 6 horas, y a partir de éste tiempo máximo, se consideraron 3 tiempos de exposición (Tice *et al.*, 2000; Hartmann *et al.*, 2003).

Influente.

En relación a los tiempos de exposición, en las diluciones del Influyente se observa un daño inicial que parece disminuir ligeramente de las 2 a las 4 horas de exposición para después alcanzar un máximo a las 6 horas, y esto ocurre para las dos diluciones ensayadas.

Éste comportamiento puede estar relacionado con los diferenciales de concentración mencionados en la comparación de las diluciones al ensayar el Influyente, en los que las menores concentraciones producen daños de mayor nivel.

En este caso, es posible que después de un daño inicial, la concentración total de compuestos disminuya y con ello contribuir a un ligero descenso del nivel de daño, pero después de un tiempo, comiencen a actuar los diferentes compuestos genotóxicos presentes en las muestras que en más altas concentraciones no se agotan y mantienen su efecto hasta el final de la prueba.

Efluente.

Para la dilución de mayor concentración del Efluente (1:50), a las 4 horas de exposición se nota un máximo de daño, observándose un incremento en función del tiempo, en el intervalo de 2 a 4 horas y un posterior decremento a las 6 horas de exposición. Éste comportamiento se relaciona con las relativamente bajas concentraciones de compuestos presentes en el Efluente que parecen agotarse al superar el tiempo de 4 horas.

Después de éste tiempo se hace evidente una recuperación de la población celular, reflejándose en una disminución del nivel de daño que sólo puede explicarse en función de la participación de los procesos de reparación celular.

En la dilución de menor concentración (1:75) se puede observar un ligero decremento del nivel de daño en función del tiempo.

En éste caso la concentración de los compuestos son aún más bajas y el efecto de éstos parece agotarse a partir de las 2 horas de exposición, después de cual, se observa una disminución del nivel de daño que se relaciona posiblemente con los procesos de reparación (Singh *et al.*, 1988).

COMPARACIÓN DE LAS PRUEBAS PARA EVALUAR REPARACIÓN.

Cómo se describió en el método del presente estudio, al llevar a cabo la lisis de las células tratadas con las diferentes diluciones de los concentrados colectados del Influyente y Efluente, se llevó a cabo un ensayo para evaluar el posible proceso de reparación en la población celular expuesta (prueba 2).

Lo anterior, con el propósito de verificar si el daño producido por los concentrados de agua sobre la población celular era o no reparable cuando se tiene tiempo para que suceda este evento. El tiempo para reparación de 30 minutos se efectuó exponiendo las células a luz blanca, ya que se tiene conocimiento que existen microorganismos y diferentes tipos de células que tienen la capacidad de reparar su ADN tras haber sido dañados y algunos necesitan luz para emprender la reparación ("foto reactivación"), mientras que otros pueden reparar su ADN sin luz en un período dado de tiempo. (Fritz T, 1999).

Sin embargo, no se pudieron obtener conclusiones, ya que no hubo una diferencia significativa al hacer la comparación de ambas pruebas con la prueba de U de Mann Whitney al 95% (Prueba 1 y Prueba 2), sino que resultaron muy similares entre sí, ambos procesos.

La reparación pudo evidenciarse en los datos de las diluciones del Efluente, pues se aprecia una disminución del daño a las 6 horas de exposición.

En el Efluente (Dil. 1:50) se registró un aumento del efecto dañino de las 2 a las 4 horas de exposición y un posterior decremento por posible reparación, a las 6 horas.

En la Dil. 1:75 el decremento se observa en una tendencia directamente proporcional al tiempo de exposición.

Dado que la viabilidad permaneció constante a los diferentes tiempos de exposición, la reducción del nivel de daño se atribuyó solamente a los procesos de reparación.

Tomando en cuenta que la disminución del daño se observó en los tiempos de exposición mas prolongados, se piensa que los componentes que provocaron el daño habían disminuido su efecto o se habían agotado.

COMPARACIÓN DEL PROCESO DE TRATAMIENTO INFLUENTE/EFLUENTE.

En general, los resultados nos permiten ver que, por una parte, los procesos de tratamiento disminuyen en efecto la concentración y la variedad de compuestos contaminantes presentes en influentes de las plantas de tratamiento, y con ello contribuyen a disminuir la toxicidad y genotoxicidad de las aguas que componen el efluente.

Pero por otra parte estos mismo procesos (puntualizando los procesos de desinfección con cloro) tienden por el contrario aumentar la genotoxicidad de las muestras, al inducir en ellas la producción de compuestos organoclorados con cualidades genotóxicas (Koivusalo *et al.*, 1998; Kenneth *et al.*, 1999; Villanueva *et al.*, 2000; Yun *et al.*, 2008).

Ante ésta paradoja, es preciso modificar los procesos de tratamiento para eliminar en lo posible, la mayor cantidad de materia orgánica de las aguas, que deberán desinfectarse de tal manera que se evite en lo posible, la formación de compuestos genotóxicos y de ésta forma hacer el proceso más eficiente (McClellan J, 2006).

9.- CONCLUSIONES.

En Base a los resultados se puede concluir que:

- En el influente, la concentración mas baja produce mayor efecto genotóxico.
- En el Efluente el daño genotóxico aumentó de manera proporcional con el incremento de la concentración.
- En el Influyente, en los tiempos de exposición ensayados no se observa reparación.
- En el Efluente en la concentración más baja, los tiempos de exposición más prolongados permiten ver indicios de procesos de reparación.
- En general, los procesos de tratamiento disminuyen la actividad genotóxica de las muestras de agua pero deben tenerse en cuenta los procesos de desinfección con cloro, que tienden a producir compuestos genotóxicos si existen altas concentraciones de materia orgánica.

10.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Akcha F, Vincent Hubert F, Pfhof-Leszkowicz A; 2003; Potential value of the comet assay and DNA adduct measurement in dab (*Limanda limanda*) for assessment of in situ exposure to genotoxic compounds; *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 534 (1-2), 21-32.
- Altamirano-Lozano M, Álvarez-Barrera L, Basurto-Alcántara F, Valverde M, Rojas E; 1996; Reprotoxic and genotoxic studies of vanadium pentoxide in male mice; *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis* 16: 7-17.
- Buschini A, Carboni P, Furlini M, Poli P, Rossi C; 2004; Sodium hypochlorite dioxide- and peracetic acid-induced genotoxicity detected by comet assay and *saccharomyces cerevisiae* d7 test; *Mutagenesis*. Mar; 19(2): 157-62.
- Carabias J, Landa R; 2005; Agua, Medio Ambiente y Sociedad, Hacia la Gestión Integral de los Recursos Hídricos en México; UNAM, COLMEX, FGRA; 12-13, 33 pp.
- CNA (2005b); Saneamiento, calidad del agua y aspectos de salud. En Estadísticas del agua en México 2005 - Síntesis. [en línea]. Comisión Nacional del Agua (México). Consulta el 26/06/2006. URL: http://www.cna.gob.mx/eCNA/Espaniol/Estadisticas/Central/Cap_6_EAM2005.pdf.
- Gobierno del Distrito Federal/Secretaría del Medio Ambiente/Secretaría de Obras y Servicios/Sistema de Aguas de la Ciudad de México; (2007); Programa de manejo sustentable del agua para la Ciudad de México; URL: http://www.sma.df.gob.mx/dgpcp/pdf/ProgAgua_Cd.pdf; 23-42 pp.
- De Ratt W K, Hansweit A O, Kreuk J F; 1985; The role of the mutagenicity testing in the ecotoxicological evaluation of industrial discharges into the aquatic environment. *Fed .Chem. Toxicol.* 23:33-41
- Escalas Cañellas A; 2006, Tecnologías y usos de las aguas residuales en México Centro de Investigación y Estudios de Posgrado Facultad de

Ingeniería, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, S.L.P., México, 1-9.

- Fritz, T; 1999; Induced DNA lesions by photolyase and nucleotide escisión repair; *The EMBO Journal.*; 18, 6585-6598.
- Gamulin M, Garaj-Vrhovac V, Kopjar N; 2007. Evaluation of DNA damage in radiotherapy-treated cancer patients using the alkaline comet assay. *Mutat Res.*; 630(1-2):122-8.
- Gandhi G, Kumar N; 2004; DNA damage in peripheral blood lymphocytes of individuals residing near a wastewater drain and usig underground water resources; *Environ Mol Mutagen* 43 (4):235-42.
- Garcia O, Mandina T; 2004; DNA damage evaluated by the comet assay in lymphocytes of children with ¹³⁷Cs internal contamination caused by the Chernobyl accident; *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 565(2),191-197.
- Giacomini N, Dias A L, Silva-Souza T; 2004; Evaluation of environmental waters using the comet assay in *Tilapia rendalli*; *Environmental Toxicology and Pharmacology*; Vol. 19, 197-201.
- Gobierno del Distrito Federal; 2007; Secretaría del Medio Ambiente, Secretaría de Obras y Servicios, Sistema de Aguas de la Ciudad de México. Programa de Manejo Sustentable del Agua para la Ciudad de México - Diciembre 2007. 2- 48.
- Hartmann A, Agurell E, Beevers C, Brendler-Schwaab S, Burlinson B, Clay P, Collins A, Smith A, Speit G, Thybaud V, Tice RR; 2003; Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline comet assay; *Mutagenesis*, Vol. 18, No. 1, 45-51.
- Higami Y, Shimokawa I, Okimoto T; 1994; An age-related increase in the basal level of DNA damage and DNA vulnerability to oxygen radicals in the individual hepatocytes of male F344 rats; *Mutation Research/DNAging* (316) 2: 59-67.
- Hughes C, Lewis S, McKelvey-Martin V, Thompson W; 1997; Reproducibility of human sperm DNA measurements using the alkaline

single cell gel electrophoresis assay; *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*; (374) (2) : 261 -268.

- Jamil K, Shaik A P, Mahboob M, Krishna D; 2004; Effect of organophosphorus and organochlorine pesticides (monochrotophos, chlorpyriphos, dimethoate, and endosulfan) on human lymphocytes *in vitro*; *Drug Chem Toxicol* (2): 133-44.
- Kenneth P, Lynch C; Hildesheim M, Dosemeci M, Lubin J, Alavanja M, Craun G; 1999; Drinking water source and chlorination byproducts in Iowa. III.Risk of brain cancer; *Am J Epidemiol*; 150:552-560.
- Kiffe M, Christen P; 2003; Characterization of cytotoxic and genotoxic effects of different compounds in CHO K5 cells (The Chinese hamster cell line K5) with the comet assay (single-cell gel electrophoresis assay); *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* (6): 151-168.
- Koivusalo M, Hakulien T, Vartiainen T, Pukkala E, Jaakkila J, Toumisto J; 1998; Drinking water mutagenicity and urinary tract cancers: a population-based case-control study in Finland; *Am J Epidemiol*; 148:704-712.
- Labieniec M, Gabryelak T; 2005; Measurement of DNA damage and protein oxidation after the incubation of B14 Chinese hamster cells with chosen polyphenols; *Toxicology Letters* 155 (1):15-25.
- McClean J; 2006; Comparación de mecanismos de reparación microbiana con lámparas UV de baja y mediana presión; *Agua Latinoamericana*; Vol 6 No. 4: 12-16.
- McDorman K S, Hoot M J, Starr T B, Wolf D C; 2003; Analysis of preneoplastic and neoplastic renal lesions in Tsc2 mutant Long-Evans (Eker) rats follow exposure to a mixture of drinking water disinfection by-products; *Toxicology* 1;187(1):1-12.
- Morillas MJ, Guillamet J, Surrallés J; 2002; Spontaneous and induced genetic damage in T lymphocyte subsets evaluated by the Comet assay; *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 514 (1-2): 39-48.

- Nava V L A; 1994; Selección de una metodología para concentración de contaminantes orgánicos a partir de agua potable, residual y renovada. Determinación mediante bioensayo de la actividad mutagénica de las muestras obtenidas; Tesis Licenciatura, Facultad Estudios Superiores Zaragoza UNAM.
- Nava V L A; 2004; Determinación de actividad genotóxica en aguas residuales, tratadas y potables en el Distrito Federal; Tesis Maestría, Facultad de Ciencias Biológicas, UNAM.
- National Research Council; 1995; El suministro de agua en la Ciudad de México; National Academy Press, Washington DC.
- Ohe T, Watanabe T; Wakabayashi K; 2004; Mutagens in surface waters: a review; Mutation Research/Reviews in Mutation Research, Vol. 567, 109-149.
- Pamdey A K, Bejpayee M, Parmar D, Rastogi SK, Mathur N, Seth P K, Dhawan A; 2006; DNA damage in lymphocytes of indian rickshaw pullers as measured by the alkaline comet assay; Environ Mol Mutagen; 47(1): 25-30.
- Richardson S D., Thruston A D Jr, Rav-Acha C, Groisman L, Popilevsky I, Juaev O, Glezer V, McKaague A B, Plewa M J, Wagner E D. 2003.. Tribromopyrrole, brominated acids and other disinfection by products produced by disinfection of drinking water rich in bromide. Environ Sci Technol. 1;37 (17): 3782-93.
- Singh NP, Mc Coy MT, Tice RR, Scheider EL; 1988; A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Exp. Cell. Res.; 175: 184-191.
- Strauss Gary H S; 1991; Non-random cell killing in cryopreservation: Implications for performance of the battery of leukocyte test (BLT), I. Toxic and immunotoxic effects. Mutation Research, 252, 1-15.
- Tice R; 1996; Protocol for the application of the alkaline single cell gel (SCG) assay to the detection of DNA damage in mammalian cells; Environmental Mutagenesis, Bios Scientific Publishers LTD, Oxford, UK; (16): 315 - 339.

- Tice R, Agurell E; 2000; Single cell/comet assay: guidelines for in vivo and in vitro genetic toxicology testing; *Environ/Mol. Mutagen* 35:206-221.
- Valverde M, Ostrosky-Wegman P, Rojas E; 1999; The application of single cell gel electrophoresis or comet assay to human monitoring studies; *Salud Publica Mex*; 41 suppl 2:S109-S113.
- Van Kooij RJ, De Boer P, De Vreeden-Elbertse J M, Ganga N A, Singh N, Te Velde E R; 2004; The neutral comet assay detects strand DNA damage in selected and unselected human spermatozoa of normospermic donors; Division of Perinatology and Gynaecology, University Medical Center, Utrecht, The Netherlands, *Int J Androl* Jun; 27 (3) :140-6.
- Villanueva CM, Kogevinas M, Grimalt JO; 2000; Cloración del agua potable en España y cáncer de vejiga; *Gac Sanit*; 15(1): 48-53.
- Woods J, O'Leary K, McCarthy R, O'Brien N; 1999; Preservation of comet assay slides: comparison with fresh slides; *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* (429) (2): 181-187.
- Yun S, Xian-wen C, Fei T, Hai-rong D, Ya-zhou Wang, Xiao-qiang Q, Hong-ping Y, Bin L; 2008; In vitro toxicity of surface water disinfected by different sequential treatments; *Water Research* Vol 43, Issue 1, 218-228.