Rev. Int. Contam. Ambient. 6, 55-68, 1990.

ESTUDIO DE GENOTOXICIDAD DE LAS MUESTRAS DE LODO DE UN RÍO CONTAMINADO POR EFLUENTES INDUSTRIALES

Juan MORETTON,[1] Patricio BARO,[1] Adrián ZELAZNY,[1] María A. NUCCETELLI[2] y Miguel D'AQUINO[1]

[1]Orientación Higiene y Sanidad, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. Junín 956, 1113 Buenos Aires, Argentina
[2]Escuela de Especialización en Ambiente y Patología Ambiental, UNLP. Universitá di Siena, Italia

(Recibido junio 1990, aceptado diciembre 1990)

Palabras clave: genotoxicidad, lodo, río, efluentes industriales

RESUMEN

Se evaluó la genotoxicidad de muestras de lodos depositados en el fondo de un curso de agua contaminado por actividades industriales, utilizando el sistema de levaduras *Saccharomyces cerevisiae D7*. Las muestras de lodo fueron sometidas a un proceso de extracción con distintos disolventes orgánicos en forma secuencial. Luego de la evaporación de los disolventes, los extractos remanentes se suspendieron en dimetil sulfóxido para los ensayos biológicos. Los resultados obtenidos mostraron notables incrementos en las frecuencias de conversión génica mitótica y reversión génica inducidas en la cepa por los extractos. Se estudió, además, la toxicidad de los mismos. La extracción secuencial con hexano, éter etílico y metanol demostró ser la más adecuada para la detección de actividad genotóxica en este tipo de muestras.

ABSTRACT

The genotoxicity of sludge samples, obtained from a watercourse contaminated with industrial wastewaters, was tested by means of *Saccharomyces cerevisiae D 7* strain. The dried sludge samples were sequentially extracted either with 1) hexane, ethyl ether and methanol or 2) ethyl ether and methanol. After evaporation to dryness, extracts were suspended in dimethylsulfoxide for biological testing. The results obtained showed an increase in the induced gene conversion as well as the induced genetic reversion frequencies in the tester strain. Toxicity of different extracts was also tested. The sequential extraction 1 (hexane, ethyl ether, methanol) showed the best performance for the detection of genotoxic activity in sludge samples.

INTRODUCCIÓN

La contaminación ambiental produce cambios marcados en los ecosistemas perjudicando en forma directa o indirecta la salud del hombre. La actividad industrial ha dado como resultado la aparición en el ambiente de numerosos compuestos tóxicos. Muchos de éstos han sido asociados con efectos adversos para la salud que incluyen profundas transformaciones celulares relacionadas no sólo con la citotoxicidad sino también con daños cromosómicos, cáncer y anomalías en la reproducción, tanto en el hombre como en

otras especies animales (Hemminki 1990). En todos los casos se trata de agentes químicos que actúan dañando la molécula de ADN. Estos compuestos, conocidos como genotóxicos, son por lo tanto cancerígenos y teratógenos en potencia.

La detección de daños a la molécula de ADN puede realizarse en forma rápida empleando ensayos *in vitro*. Estos ofrecen la ventaja de ser de fácil ejecución, bajo costo, reproducibles, capaces de excluir falsos negativos y razonablemente limitados en el número de falsos positivos (Dunkel 1985). Entre ellos se encuentran los que utilizan cepas mutantes de levaduras.

Una de las ventajas del uso de cepas de levaduras diploides es que permiten la investigación de los fenómenos de recombinación genética y no disyunción inducidos por agentes químicos (De Serres *et al.* 1981). Por otra parte, el contar con un sistema de metabolización de xenobióticos como el de citocromo *P-450*, facilita la detección de metabolitos genotóxicos a partir de sustancias no tóxicas *per se* (Del Carratore *et al.* 1983).

Entre las levaduras utilizadas en los ensayos de genotoxicidad se ha descrito una cepa mutante diploide de *Saccharomyces cerevisiae*, la *D7*, que permite la detección simultánea de diversos fenómenos genéticos, tales como entrecruzamiento mitótico, conversión génica mitótica y mutación reversa (Zimmermann *et al.* 1975), llevando de esta manera a conocer, en un solo ensayo, el efecto de agentes físicos o químicos en la producción de varios tipos de alteraciones del material hereditario y dèterminar si existe un efecto preferencial sobre alguna de ellas.

La conversión mitótica del gen o intercambio no recíproco, puede estudiarse utilizando diploides heteroalélicos. En esta cepa se combinan dos alelos no complementarios del *locus TRP 5, trp 5-12* y *trp 5-27*. La presencia de tales alelos causa un requerimiento nutricional. La reversión a prototrofía se debe principalmente a conversión génica, siendo la reversión de estos marcadores de muy baja frecuencia (Zimmermann *et al.* 1975).

La reversión a prototrofía puede seguirse por la aparición de colonias que no requieren de isoleucina en el medio selectivo. Existen en esta cepa dos copias del alelo *ilv 1-92* que llevan a un requerimiento absoluto de isoleucina para el desarrollo, este requerimiento puede ser aliviado por la reversión a prototrofía de dicho marcador (Zimmermann *et al.* 1975).

Este ensayo ha sido utilizado para la detección de genotoxicidad en mezclas complejas provenientes del ambiente como efluentes industriales (Bronzetti *et al.* 1983) y aguas contaminadas (Moretton *et al.* 1990a). En este trabajo se analizan muestras de lodo del fondo de un curso de agua contaminado por actividades industriales y efluentes domiciliarios.

La elección del curso de agua se efectuó en virtud de sus características particulares de contaminación. El río Matanza-Riachuelo constituye el desagüe natural de una cuenca de 2,240 km^2 de superficie. Su longitud es de 64 km y recibe el aporte de un gran numero de cursos de aguas naturales, arroyos entubados y desagües pluviales. El elevado contenido de contaminantes de las descargas y el volumen de las mismas sobrepasan la capacidad de dilución y autodepuración.

Las muestras de lodo constituyen mezclas complejas que contienen una amplia variedad de compuestos con propiedades físicas, químicas y toxicológicas diversas, los cuales pueden sufrir interacciones generando efectos sinérgicos o antagónicos que dificultan la detección de genotoxicidad. Tal como fue demostrado por otros autores (West *et al.* 1988) se requiere extraer, mediante el uso de disolventes orgánicos de distinta polaridad, los compuestos con actividad mutagénica. En las diferentes fracciones obtenidas podrá eventualmente identificarse, por métodos analíticos, él o los principales compuestos responsables del efecto genotóxico.

En el presente trabajo se ensayó la genotoxicidad de diversos extractos de lodo del Riachuelo utilizando *Saccharomyces cerevisiae D7* como microorganismo de prueba.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras de lodo fueron tomadas por arrastre con un muestreador tipo Cole Parmer R. 5489-0, de dos puntos del Riachuelo: 1) La Salada y 2) Puente Uriburu (Fig. 1), el objetivo fue tomar muestras en dos lugares con diferente índice de contaminación por residuos industriales. En ambos casos la extracción se efectuó los días domingo para evitar bruscas variaciones por descargas de afluentes en los días de actividad fabril.

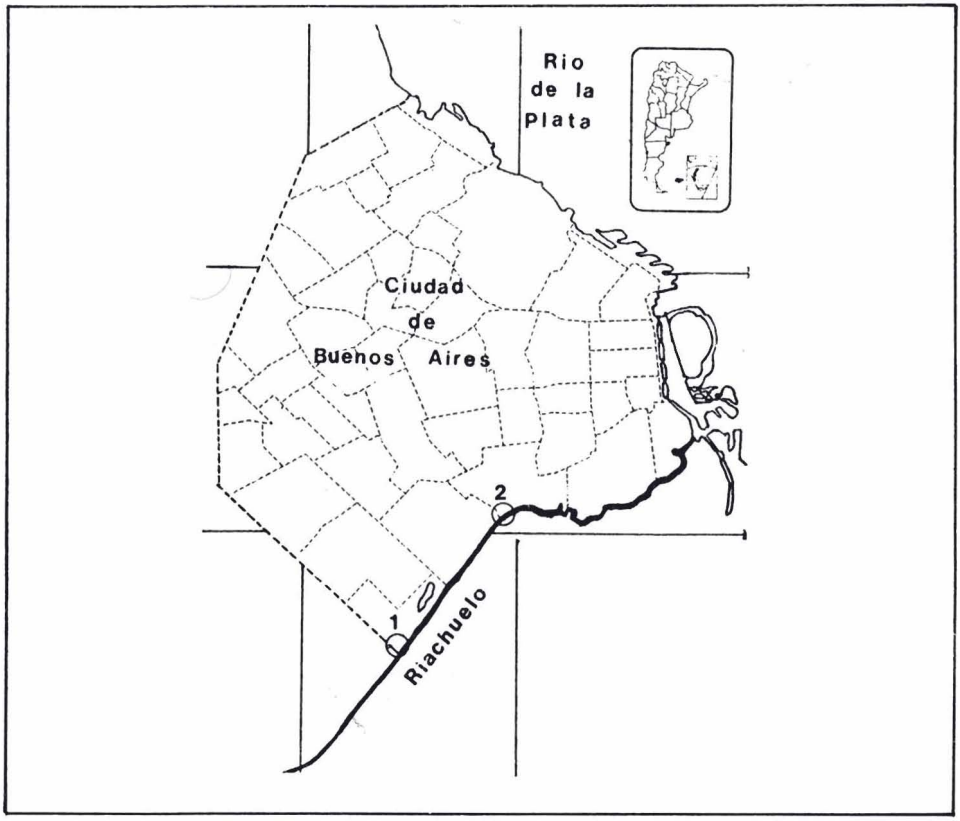

Fig. 1. Localización de las estaciones de muestreo

Las muestras se procesaron dentro de las 24 horas mediante filtración a través de papel Whatman No. 1 en embudo tipo Buchner con vacío. El lodo se dejó secar a temperatura ambiente hasta peso constante. Una vez seco fue pesado y pulverizado en un mortero, 21.5 g de polvo fueron extraídos secuencialmente con hexano, éter etílico y metanol o con éter etílico y metanol.

La extracción se efectuó de acuerdo con la siguiente metodología: el polvo se puso en contacto con 100 ml de disolvente agitando durante 60 min a 28° C. El disolvente se separó por filtración y el residuo sólido se secó a temperatura ambiente para ser sometido a la acción del siguiente disolvente de la serie. Los extractos orgánicos se evaporaron a sequedad en un evaporador rotatorio a presión reducida y temperatura no superior a 30°C. El residuo remanente se disolvió en 6 ml de dimetilsulfóxido (*DMSO*) para ser utilizado en los ensayos biológicos de genotoxicidad.

La cepa empleada fue *Saccharomyces cerevisiae D7*, un diploide desarrollado originalmente por Zimmermann *et al.* (1975), que fue cedido gentilmente por el Dr. Giorgio Bronzetti del Istituto di Mutagénesi e Differenziamento de Pisa, Italia.

La metodología empleada para la detección de inducción de conversión génica mitótica y reversión génica fue la descrita por Zimmermann *et al.* (1975). El ensayo se realizó poniendo en contacto suspensiones de aproximadamente 10^7 células/ml de levaduras en fase estacionaria temprana con distintas diluciones de los extractos en *DMSO* e incubando durante períodos de 2 y 24 h. Alícuotas de 1 ml de esta mezcla se extrajeron a cada tiempo de ensayo y luego de lavar dos veces con amortiguador y resuspender en el mismo volumen, se inocularon por triplicado en placas de los medios correspondientes incubando durante 48 h para la determinación de convertantes y 72 h para la detección de revertantes.

Las frecuencias de conversión o reversión génicas surgieron de la relación unidades formadoras de colonias convertantes o revertantes y totales:

$$\text{Frecuencia} = \frac{\text{U.F.C. revertantes o convertantes/ml}}{\text{U.F.C. totales/ml}}$$

En ningún caso se consideró el resultado de las experiencias en las cuales la viabilidad de las células tratadas hubiese descendido de 20% de los testigos sin tratar.

Los resultados se consideraron positivos cuando las frecuencias de conversión y reversión génicas superaron en más de dos veces la frecuencia del testigo (De Serres 1981). No se incluyeron testigos con *DMSO* ya que nuestros valores históricos con la cepa *D7* (1983-1989) no evidencian variaciones significativas en la inducción de los fenómenos estudiados por este disolvente en las concentraciones empleadas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las figuras 2 y 3 muestran los resultados obtenidos al incubar, durante distintos períodos, concentrados de lodo de la zona de Puente Uriburu con suspensiones de *S. cerevisiae D7.*

La extracción secuencial con disolventes ha generado extractos que difieren entre sí en los componentes tóxicos para la cepa en estudio. Es interesante notar que, mientras el

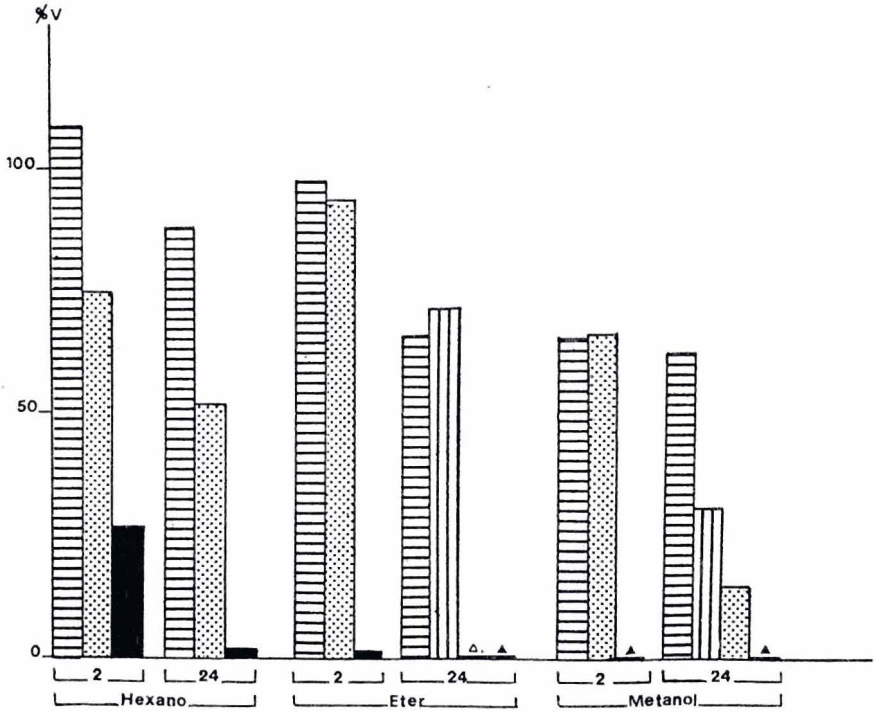

Fig. 2. Sobrevivencia de *S. cerevisiae D7* en extractos obtenidos de lodo de la estación de muestreo Puente Uriburu. Los resultados se expresan como porcentaje del testigo (100% equivalente a 10^7 células/ml). Las muestras obtenidas por extracción secuencial con hexano, éter y metanol fueron ensayadas incubando durante 2 y 24 h sin diluir (▬), diluidas en igual volumen de amortiguador (∴∴∴), en cuatro volúmenes de amortiguador (||||||||), o en nueve volúmenes de amortiguador (▤) con suspensiones de la cepa en estudio. Muestra tóxica sin diluir ▲, muestra tóxica diluida en igual volumen de amortiguador △

extracto 1 (hexano) resulta tóxico sólo después de 24 h de incubación, tanto el 2 (éter) como el 3 (metanol) muestran efecto tóxico en las primeras horas de incubación. Resultó también diferente la toxicidad en las diluciones, manteniéndose aún para las diluciones al medio en los dos últimos extractos mencionados. Estos datos podrían sugerir que los compuestos extraídos en la fase hexano no producen efecto letal inmediato sino que requieren una cierta acumulación (24 h de incubación), mientras en los otros dos extractos sí puede observarse una respuesta a las 2 h de incubación que podría corresponder a la interacción con membranas o proteínas con función enzimática de importancia para la sobrevivencia celular, sin descartar por esto otros agentes que en dilución muestran un efecto acumulativo.

Tanto las respuestas sobre recombinación como aquellas sobre reversión aparecen en estas experiencias asociadas a la toxicidad tardía (24 h de incubación).

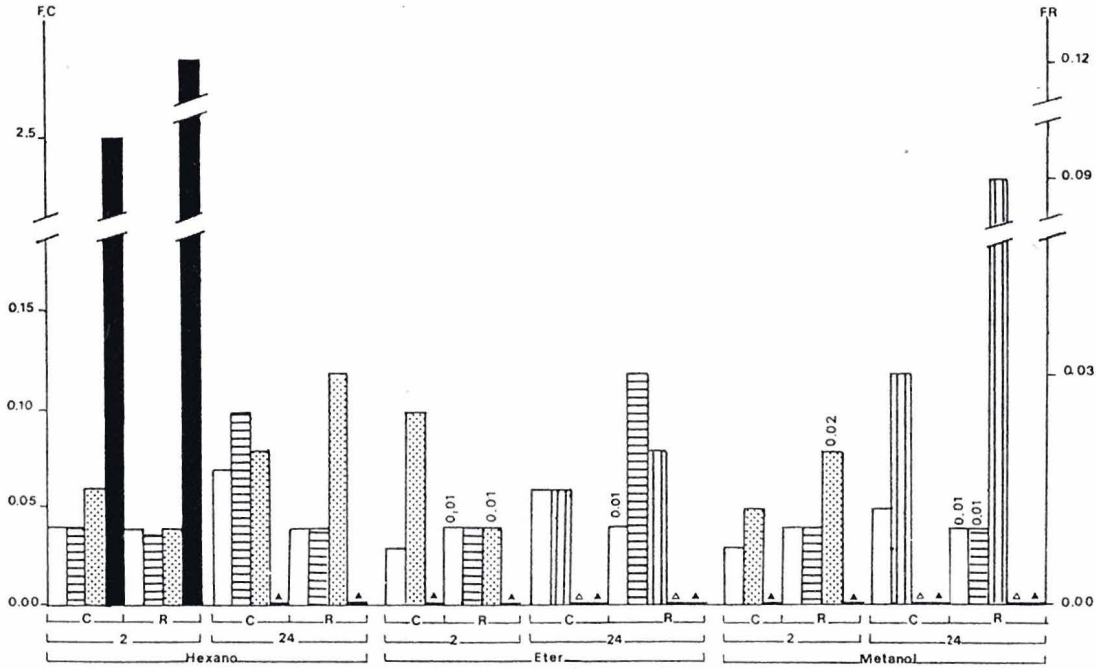

Fig. 3. Genotoxicidad inducida en *S. cerevisiae D7* por extractos de la zona Puente Uriburu. Los resultados se expresan como frecuencias de conversión génica (FC) X 10^4 y reversión génica (FR) X 10^5 obtenidas luego de incubar las muestras secuencialmente extraídas con hexano, éter y metanol sin diluir (▬), diluidas en igual volumen de amortiguador (∴∴∴), en cuatro volúmenes de amortiguador (||||||||) y en nueve volúmenes de amortiguador (≡) durante 2 y 24 h con la cepa en estudio. Testigo no tratado (▭). Muestra tóxica sin diluir ▲, muestra tóxica diluida en igual volumen de amortiguador △, 0.01 indica frecuencia <0.01, 0.02 indica frecuencia <0.02

En el caso de la conversión génica (Fig. 3), ésta aparece en los extractos 1 y 2 en forma temprana con respecto a la toxicidad. La reversión, por su parte, se observa en muestras incubadas durante 24 h y en diluciones no tóxicas. Las diluciones en cuatro y nueve volúmenes de amortiguador que no aparecen en la figura 3 no mostraron diferencias significativas con respecto a los testigos no tratados.

Los resultados muestran que dentro de la extracción secuencial, la toxicidad y particularmente la genotoxicidad parecen incrementarse a medida que se extrae con un solvente más polar lo que demostraría que estos efectos dependen en mayor proporción de agentes con una cierta polaridad más que de los estrictamente no polares.

A fin de demostrar qué ocurriría de suprimirse la extracción 1 (hexano), la misma muestra fue sometida a un proceso de extracción secuencial éter etílico y metanol cuyo resultado se observa en las figuras 4 y 5. El patrón de toxicidad del extracto éter es similar al obtenido con la secuencia anterior. En este caso debido a un sinergismo por compuestos no extraídos previamente por hexano aparece una reversión temprana (2 h de incubación) en las diluciones al medio y al quinto (Fig. 5), la frecuencia de conversión génica no es alterada en forma significativa.

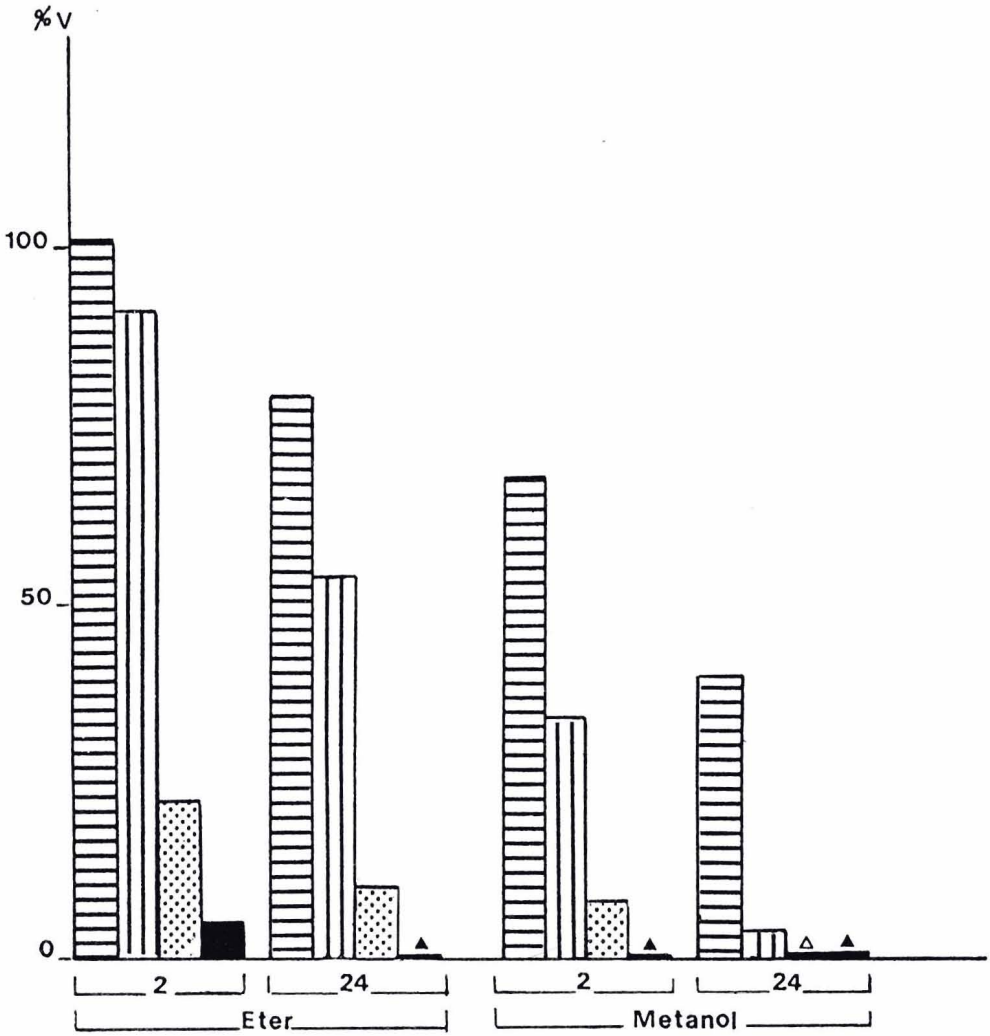

Fig. 4. Sobrevivencia de *S. cerevisiae D7* en extractos de lodo de la estación de muestreo Puente Uriburu. Los resultados se expresan como porcentaje del testigo (100% equivalente a 0.7 X 10^7 células/ml). Las muestras obtenidas por extracción secuencial con éter y metanol fueron ensayadas incubando durante 2 y 24 h sin diluir (■), diluidas en igual volumen de amortiguador (∴∴∴), en cuatro volúmenes de amortiguador (||||||||||) y en nueve volúmenes de amortiguador (≡≡≡) con suspensiones de la cepa en estudio. Muestra tóxica sin diluir ▲, muestra tóxica diluida en igual volumen de amortiguador △

El extracto metanólico presenta en cambio variaciones de interés. Por una parte se incrementa el efecto tóxico llevando la toxicidad a diluciones al quinto, esto parece enmascarar las respuestas sobre conversión génica detectadas con la secuencia anterior y, como en el caso del extracto de éter, la reversión aparece con incubaciones menores (2 h).

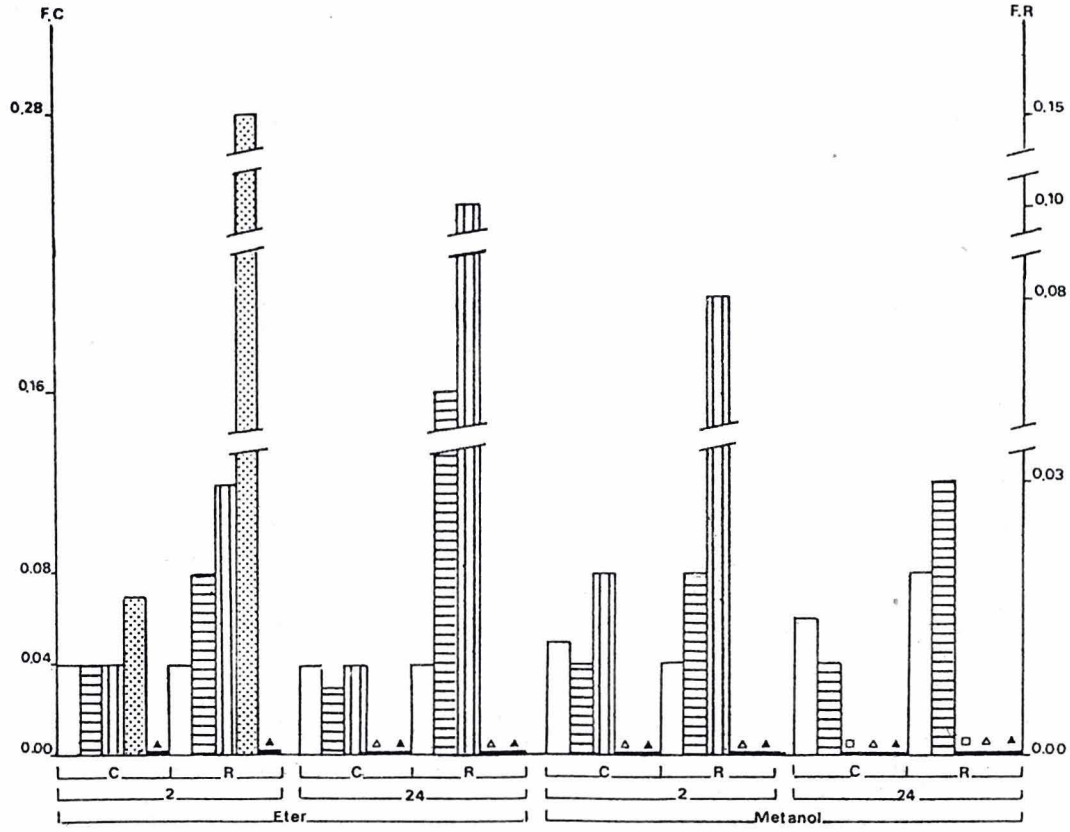

Fig. 5. Genotoxicidad inducida en *S. cerevisiae D7* por extractos de la zona Puente Uriburu. Los resultados se expresan como frecuencias de conversión génica (FC) X 10^4 y reversión génica (FR) X 10^5 obtenidas luego de incubar muestras extraídas secuencialmente con éter y metanol sin diluir (▬), diluidas en igual volumen de amortiguador (∴∴∴), en cuatro volúmenes de amortiguador (||||||) y en nueve volúmenes de amortiguador (≡) durante 2 y 24 h con la cepa en estudio. Testigo no tratado (▭). Muestra tóxica sin diluir ▲, muestra tóxica diluida en igual volumen de amortiguador △, muestra tóxica diluida en cuatro volúmenes de amortiguador □

Los datos obtenidos en esta última experiencia muestran que no es conveniente la supresión de alguna de las fases de extracción ya que esto redunda en una mayor toxicidad que puede enmascarar efectos genotóxicos.

La secuencia hexano, éter etílico, metanol se utilizó para analizar la genotoxicidad de muestras de lodo obtenidas aguas arriba del curso, en el área de La Salada donde los vertidos de efluentes industriales no tratados son menores.

En este caso el extracto 1 (hexano) mostró un comportamiento similar al observado en las muestras obtenidas en la zona de Puente Uriburu, con inducción de conversión génica luego de 2 h de incubación (Fig. 7). El extracto 2 (éter) no mostró toxicidad aún con las muestras puras incubadas 24 h (Fig.6). Tampoco se detectaron efectos sobre la

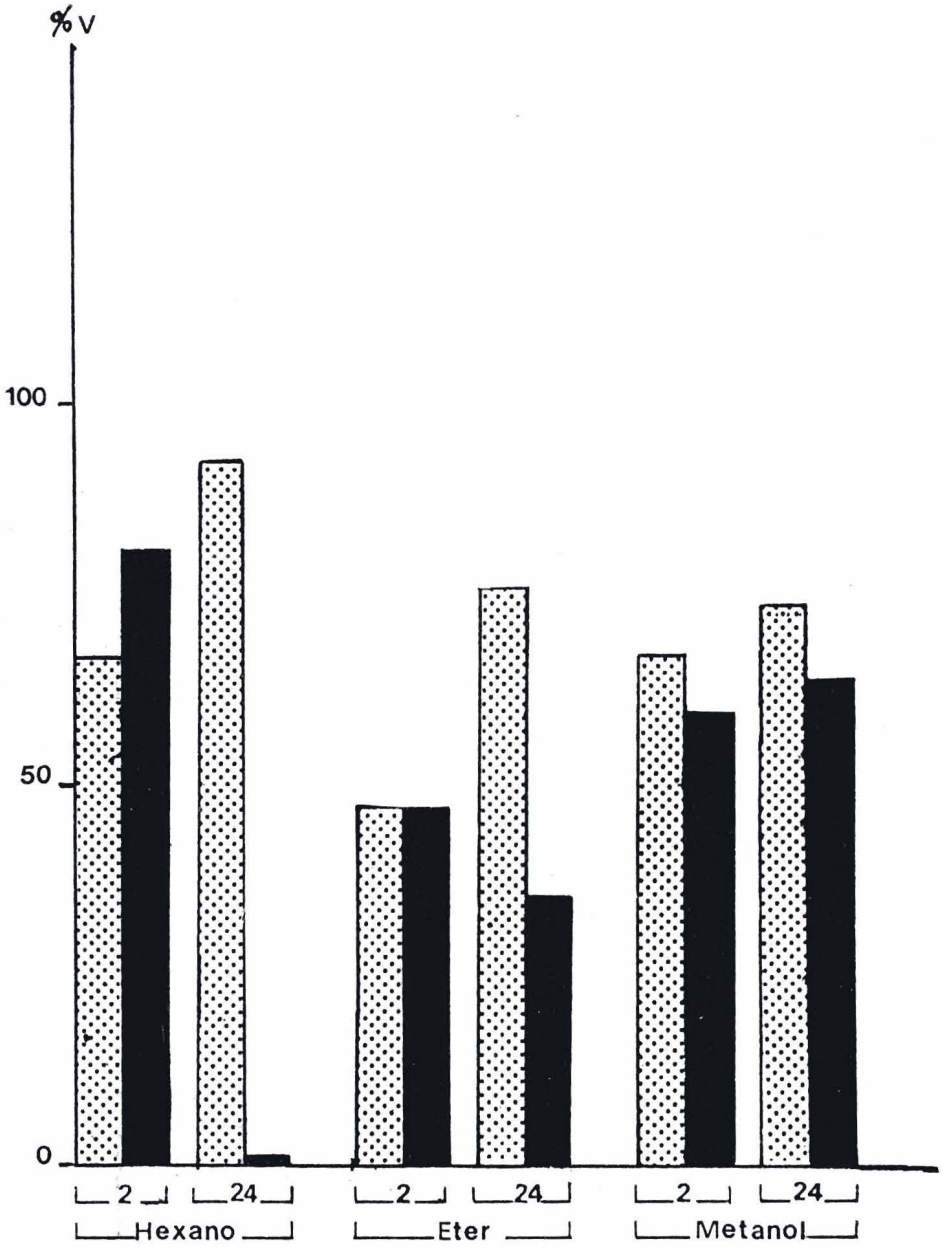

Fig. 6. Sobrevivencia de *S. cerevisiae D7* en extractos de lodo de la estación de muestreo La Salada. Los resultados se expresan como porcentaje del testigo (100% equivalente a 1.2 X 10^7 células/ml). Las muestras obtenidas por extracción secuencial con hexano, éter y metanol fueron ensayadas incubando durante 2 y 24 h sin diluir (■) y diluidas en igual volumen de amortiguador (∴∴) con suspensiones de la cepa en estudio

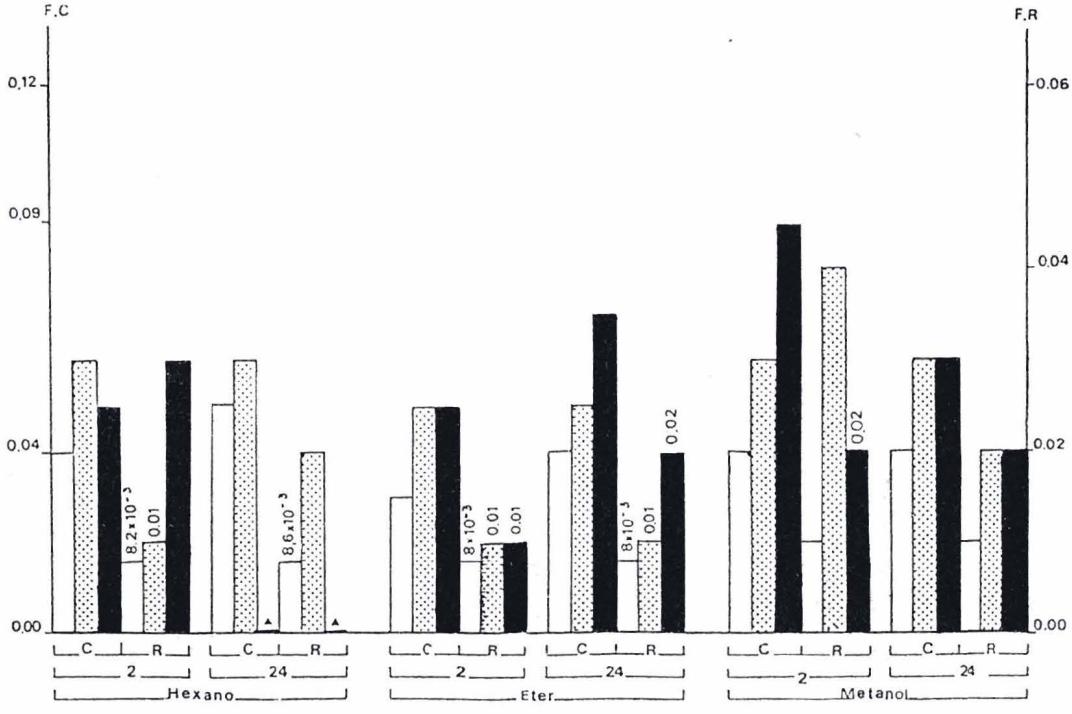

Fig. 7. Genotoxicidad inducida en *S. cerevisiae D7* por extractos de la estación de muestreo La Salada. Los resultados se expresan como frecuencia de conversión génica (FC) X 10^4 y frecuencia de reversión génica (FR) X 10^5 obtenidas luego de incubar muestras extraídas secuencialmente con hexano, éter y metanol sin diluir (■) y diluidas en igual volumen de amortiguador (∴) durante 2 y 24 h con la cepa en estudio. Testigo no tratado (□). Muestra tóxica sin diluir ▲, 8 X 10^{-3} indica frecuencia <8 X 10^{-3}, 8.2 X 10^{-3} indica frecuencia <8.2 X 10^{-3}, 8.6 X 10^{-3} indica frecuencia <8.6 X 10^{-3}, 0.01 indica frecuencia <0.01, 0.02 indica frecuencia <0.02

reversión génica ni sobre la conversión génica (Fig. 7). En estas condiciones no se consideró conveniente ensayar la dilución al quinto. En el caso del extracto 3 (metanol) si bien no pudo determinarse efecto tóxico sí se observó una clara inducción de conversión génica con el extracto puro y reversión al ensayar la dilución al medio (Fig. 7).

En las figuras 8 y 9 se observan los resultados obtenidos en una experiencia realizada con la misma muestra sometida a una extracción éter etílico, metanol. En este caso se demuestra que la primera fase de extracción (éter) no produce efecto tóxico sinérgico como el observado en la muestra de Puente Uriburu, probablemente esto se deba a que los extractos de éter no muestran una toxicidad *per se* o a una incapacidad para extraer algunos compuestos en una concentración suficiente (Fig 8).

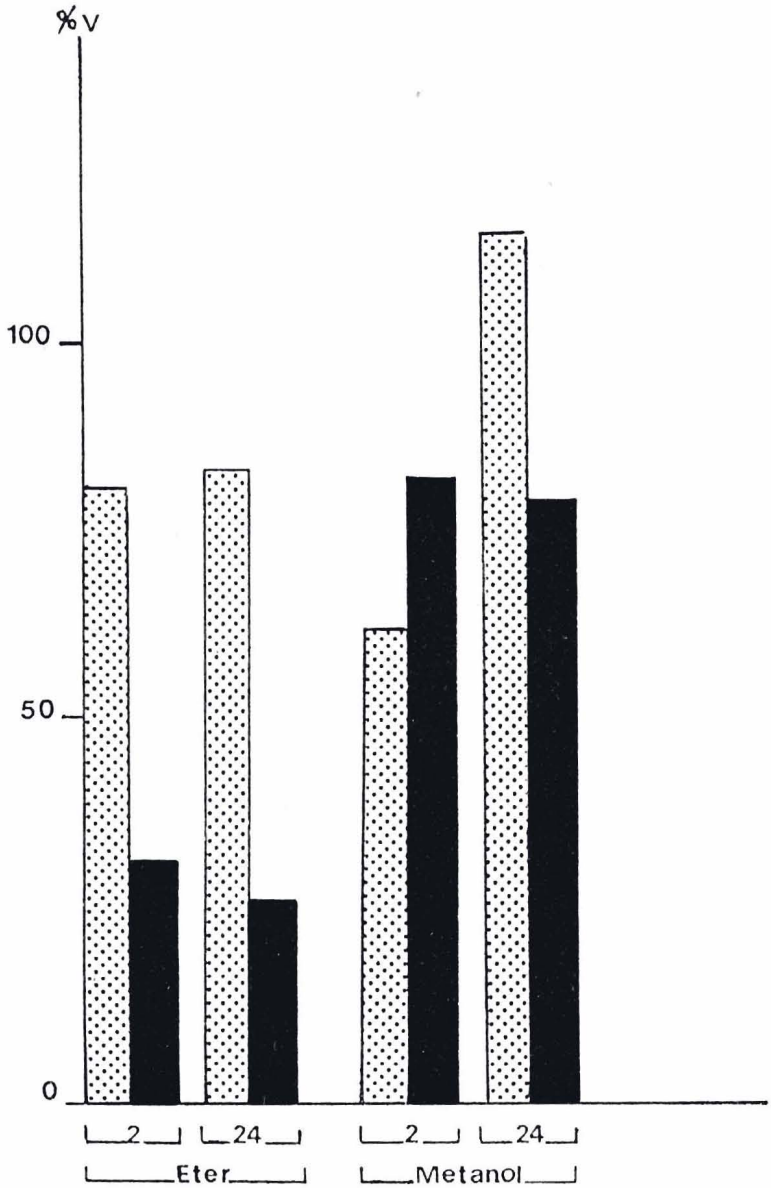

Fig. 8. Sobrevivencia de *S. cerevisiae D7* en extractos de lodo de la estación de muestreo La Salada. Los resultados se expresan como porcentaje del testigo (100% equivalente a 1.1 X 10^7 células/ml). Las muestras obtenidas por extracción secuencial con éter y metanol fueron ensayadas incubando durante 2 y 24 h sin diluir (■) y diluidas en igual volumen de amortiguador (∴) con suspensiones de la cepa en estudio

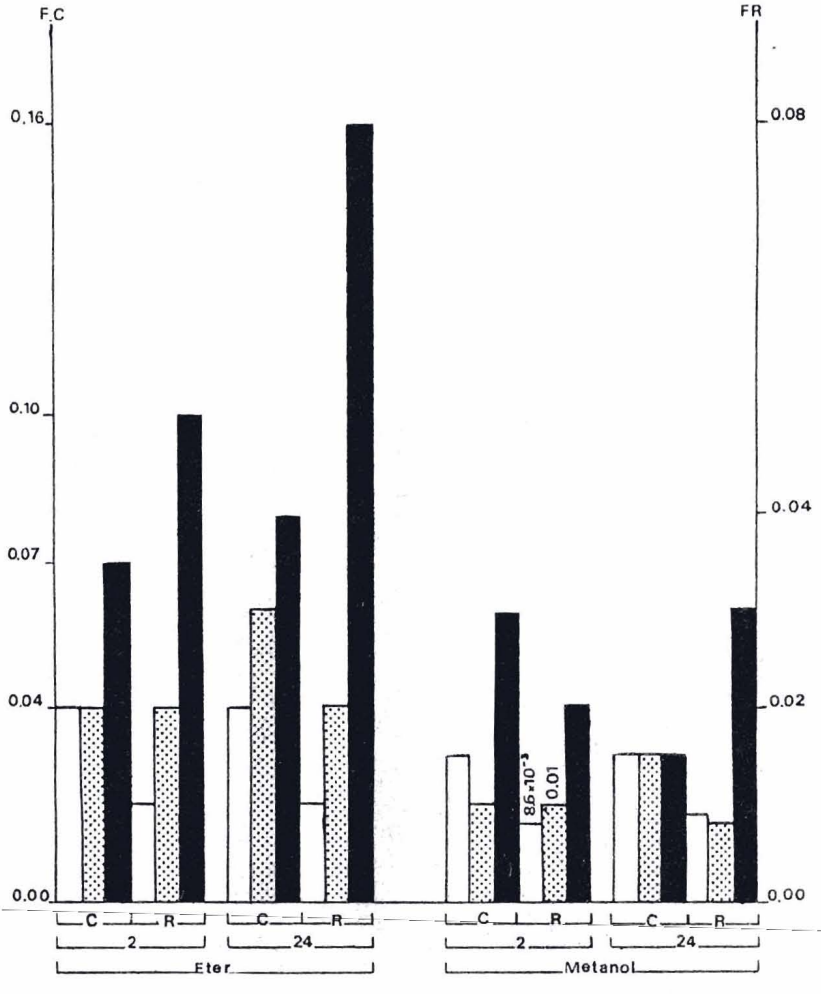

Fig. 9. Genotoxicidad inducida en *S. cerevisiae D7* por extractos de lodo de la estación de muestreo La Salada. Los resultados se expresan como frecuencias de conversión génica (FC) X 10^4 y de reversión génica (FR) X 10^5 obtenidas luego de incubar muestras extraídas secuencialmente con éter y metanol sin diluir (■) y diluidas en igual volumen de amortiguador (⁘) durante 2 y 24 h con la cepa en estudio. Testigo no tratado (□), 8.6 X 10^{-3} indica frecuencia <8.6 X 10^{-3}, 0.01 indica frecuencia <0.01

Es interesante notar que aquí la muestra de éter sí induce reversión génica en condiciones similares a las observadas en el extracto 1 de la serie anterior, demostrando que algunos agentes genotóxicos sí fueron extraídos por éter (Fig. 9).

El extracto metanólico tampoco incrementó su toxicidad con respecto a la serie anterior. En lo referente a conversión génica no se observa un efecto definido, si bien el extracto puro, incubado durante 2 h duplica la frecuencia obtenida para el testigo. Se observa un efecto más definido sobre la reversión génica (Fig. 9). Dados los datos de toxicidad tampoco se consideró conveniente aquí realizar las diluciones al quinto.

En la muestra analizada, que proviene de un área de contaminación relativa menor pero cercana a áreas contaminadas, se obervaron marcadas diferencias en lo referente a compuestos tóxicos extraídos. En ninguno de los dos extractos aparece toxicidad durante las dos primeras horas de incubación, como se observó en la muestra de Puente Uriburu, esto indicaría una virtual ausencia de agentes no polares que interactúen con estructuras básicas para la integridad celular.

Se observa un efecto tóxico luego de 24 h de incubación con el extracto 1, lo que sugiere la presencia de compuestos que actuarían por acumulación en la célula.

En lo referente a la genotoxicidad detectada con esta últim. muestra debe notarse que la ausencia de toxicidad permitió estudiar el efecto de concentraciones mayores (Fig. 9). Los extractos hexano y éter difieren de la muestra de Puente Uriburu por la ausencia de conversión génica y reversión inducidas por el extracto éter. El extracto metanólico, por su parte, mostró un patrón similar en ambas muestras. La detección no mejoró al emplear el sistema de extracción con dos disolventes. Al igual que en el caso de la muestra anterior no resulta conveniente eliminar uno de los disolventes de extracción.

Estudios anteriores realizados por West *et al.* (1988) mostraron la utilidad de técnicas complejas de extracción con disolventes destinados a ensayar un grupo definido de agentes genotóxicos en sedimentos de un río. Uno de los objetivos del presente trabajo es diseñar una metodología de extracción más simple que permitiera, por una parte, mostrar actividad genotóxica inespecífica y por otra ser empleada en futuros estudios con gran cantidad de muestras sin incrementar los costos.

Los datos obtenidos resultan de interés a fin de correlacionar la genotoxicidad detectada en distintas fracciones de agua del curso con aquella generada por los compuestos arrastrados al fondo. En nuestro caso en particular, los extractos de lodo mostraron una clara actividad en la inducción de reversión génica en *S. cerevisiae D7* no observada en las muestras de agua de la misma zona (Moretton *et al.* 1990b).

Los resultados que se presentan permitirían, en el futuro, encarar estudios con el fin de discriminar cuál o cuáles de los compuestos químicos de estas mezclas se hallan involucrados en mayor medida en el efecto genotóxico detectado.

REFERENCIAS

Bronzetti G., Del Carratore R., Bauer C., Corsi C., Nieri R. y Paolini M. (1983). Detection of genotoxicants in the leather and tannery industry using short term tests. Bull. Environ. Contam. Toxicol. *30*, 127-132.

De Serres F.J. (1981). Summary report on the performance of yeast assays. En: *Evaluation of short term tests for carcinogens* (F.J. De Serres and J. Ashby, Eds.). Elsevier, Nueva York, pp. 68-76.

Del Carratore R., Bronzetti G., Bauer C., Corsi R., Niere R., Paolini M. y Giagoni P. (1983). Cytochrome *P-450* factors determining synthesis in strain *D7 Saccharomyces cerevisiae*. Mutat. Res. *121*, 117-123.

Dunkel V.C. (1985). Perspectives on detection of chemical carcinogens as mutagens. En: *Advances in modern environmental toxicology* (M.A. Mehlman, Ed.). Princeton Scientific Pub. Nueva Jersey, Vol. 12, pp. 61-78.

Hemminki K. (1990). Environmental carcinogens. En: *Handbook of experimental pharmacology* (C.S. Cooper and P.L. Crover, Eds.). Springer Verlag, Berlín-Heidelberg, Vol. 94, pp. 33-61.

Moretton J., Baró P., Zelazny A. y D'Aquino M. (1990a). Detection of genotoxicants in a polluted watercourse using a yeast system. Bull. Environ. Contam. Toxicol. *45*, 25-30.

Moretton J., Baró P., Zelazny A. y D'Aquino M. (1990b). Polluted waters concentrates: induction of genetic alterations in *Saccharomyces cerevisiae D7* strain. Bull. Environ. Contam. Toxicol. (en prensa).

West R., Smith P.A., Booth G. y Lee M.L. (1988). Isolation and detection of genotoxic components in a Black River sediment. Environ. Sci. Technol. *22*, 224-228.

Zimmermann F.K. (1973). Detection of genetically active chemicals using various yeast systems. En: *Chemical mutagens: principles and methods for their detection.* (A. Hollaender, Ed.). Plenum Press, Nueva York, Vol. 3, pp. 209-237.

Zimmermann F.K., Kern R. y Rasenberger H. (1975). A yeast strain for simultaneous detection of induced mitotic crossing-over, mitotic gene conversion and reverse mutation. Mutat. Res. *28*, 381-388.