

DETECCIÓN DE AGENTES GENOTÓXICOS EN EFLUENTES DE LA INDUSTRIA GRÁFICA

María Alejandra VÁZQUEZ y Juan MORETTON

Cátedra de Higiene y Sanidad, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Junín 956, 4 piso 1113, Buenos Aires, Argentina

(Recibido mayo 1994, aceptado diciembre 1995)

Palabras clave: genotoxicidad, contaminación, aguas residuales, industria gráfica

RESUMEN

Se estudió la genotoxicidad de las aguas residuales de una industria gráfica en etapas previas y posteriores a su tratamiento de depuración. Las muestras de la primera cámara de tratamiento y de la cámara de toma de muestras fueron extraídas secuencialmente en columnas de resinas XAD2 con los disolventes éter etílico y alcohol metílico, luego de la evaporación de los disolventes, los extractos remanentes fueron suspendidos en dimetilsulfóxido para los ensayos biológicos. El microorganismo de prueba utilizado fue *Saccharomyces cerevisiae* D7 que permitió evaluar en forma simultánea la inducción de conversión génica mitótica y de reversión génica. Los extractos de la fracción no polar (éter) de las muestras de la primera cámara produjeron efectos genotóxicos moderados que también se manifestaron con los extractos de las fracciones éter y metanol obtenidas de la cámara de toma de muestras donde se observó principalmente la inducción de reversión génica. Los resultados logrados indican que el tratamiento fisicoquímico para la depuración de efluentes no fue efectivo en reducir la genotoxicidad de los mismos.

ABSTRACT

The genotoxic potential of samples from a printing office waste water was evaluated by means of mitotic gene conversion and point (reverse and suppressor) mutation induction in *Saccharomyces cerevisiae* D7 strain. Waste samples from two different sites of the waste treatment plant were passed through an XAD2 resin column. The column was sequentially eluted with ethyl ether and methanol. After evaporation to dryness the extracts were suspended in dimethylsulfoxide for their use in biological tests. The result obtained showed a moderate genotoxic response induced by the non-polar fraction (ether extract) obtained from samples of the pre-treatment area. Ether and methanol extracts from samples obtained after waste water purification treatment, induced increases in point mutation frequencies. The results obtained showed that the physico-chemical treatment for waste water purification was ineffective in decreasing genotoxic activity.

INTRODUCCIÓN

Al continuar con la serie de determinaciones realizadas en este laboratorio destinada a la detección de efectos genotóxicos en cursos de aguas contaminadas y en efluentes de distintas industrias (Moretton *et al.* 1990, 1991, 1992), en este trabajo se estudiaron las aguas residuales de una industria gráfica ubicada en la Ciudad de Buenos Aires, dedicada a la impresión de revistas y de material gráfico diverso. Sus líquidos de desecho son mezclas de fijadores, reveladores fotográficos, detergentes, etc. La composición cualitativa declarada por la imprenta para estos líquidos es la siguiente:

-Revelador concentrado positivo EP 31 (Hoechst), solución

acuosa alcalina de óxido de sílice, pH 13-14
-Sensibilizador RN 81 (Hoechst), sales minerales diazotadas
-Solución copiadora RN 82 (Hoechst)
-Laca reveladora RC 55 (Hoechst), solución a base de ciclohexano, ácido acético y propilenglicol
-Corrector de planchas positivas KC 23 (Hoechst)
-Fijador concentrado para películas de acceso rápido G 3330 (Agfa), solución de metanol, hidroquinona, sulfito de sodio, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio con 0.025 ppm de plomo
-Revelador de películas G 101 (Agfa)
-Lavador de mantilla VWM (Primatest)

El pH del efluente es de 6.5 y el volumen diario eliminado

de aproximadamente 0.8 metros cúbicos. Otros productos empleados, tales como tintas para imprimir y agentes para el lavado de rodillos de impresión (Aqualess, Quimeco y Aquagraf, Grafex) no llegan al efluente en estudio. Los efluentes son volcados a una primera cámara de tratamiento donde se mezclan, de allí pasan a una segunda cámara de tratamiento donde se agrega coagulante y se permite la sedimentación. Los barros resultantes de dicha sedimentación son acumulados y desechados periódicamente como residuos sólidos. El agua de la última cámara pasa por rebalse a la cámara de toma de muestras de donde se vuelcan al sistema cloacal de la ciudad.

Del efluente se consiguen muestras de la primera cámara y de la cámara de toma de muestras, ya que el contenido de la segunda cámara no resulta homogéneo y puede proporcionar resultados anómalos por residuos de material coagulado.

El uso de resinas XAD2 permite realizar extracciones secuenciales con disolventes de distintas polaridades. El microorganismo que se emplea para los ensayos biológicos es *Saccharomyces cerevisiae* D7, una levadura usada por distintos autores para estudios de muestras ambientales (Bronzetti *et al.* 1980, Moretton *et al.* 1990, 1991, Houk 1992).

MATERIALES Y MÉTODOS

El microorganismo de prueba permite detectar simultáneamente mutación reversa, conversión mitótica y entrecruzamiento mitótico (Zimmerman *et al.* 1975). La conversión mitótica involucra a los alelos *trp 5-12* y *trp 5-27* y la mutación reversa al par *ilu 1-92/ ilu 1-92*. Para más detalles sobre este ensayo pueden consultarse a Zimmerman *et al.* (1975) y a Sora *et al.* (1979).

Los residuos líquidos se colectaron de los diversos sectores de la planta mencionados en la introducción. Muestras de 500 ml de agua se pasaron por columnas de resinas de intercambio XAD2 (Rohm and Haas, Filadelfia, EUA) purificadas de acuerdo con Dressler (1979). Dichas resinas han sido utilizadas por otros autores para la extracción de compuestos presentes en efluentes industriales (Fracasso *et al.* 1992, Omura *et al.* 1992). La velocidad de flujo a través de una columna de 12 cm de alto por 1 cm de diámetro fue de 2 ml/min. Luego del pasaje de las muestras, las columnas se lavaron con agua destilada para eliminar las fracciones solubles y se procedió a la extracción secuencial con éter etílico (Merck) y alcohol metílico (Merck). Los extractos se evaporaron a sequedad en un evaporador rotatorio con presión reducida a 28-30 grados centígrados. El residuo remanente se redisolvió en dimetilsulfóxido (DMSO) para ser usado en las pruebas de genotoxicidad.

La cepa de levadura empleada pertenece a la colección de cultivos microbianos de la Cátedra de Higiene y Sanidad y fue proporcionada originalmente por el Dr. Giorgio Bronzetti del Istituto di Mutagenesi e Differenziamento CNR, Pisa, Italia. Los cultivos de la levadura, en fase logarítmica tardía de

crecimiento, fueron puestos en contacto con diferentes diluciones de los extractos en medio líquido de amortiguador fosfato 0.1 M pH 7.4, durante 2 y 6 horas, en baño térmico a 28 grados centígrados con agitación. Después de estos períodos se tomaron alicuotas que se lavaron dos veces con igual volumen de amortiguador y se inocularon por triplicado en la superficie de los medios selectivos correspondientes (Sora *et al.* 1979). Las placas se incubaron durante 48 horas para el recuento de totales y de 72 a 96 horas para el registro de revertantes y convertantes. Los resultados se consideraron positivos cuando la frecuencia de conversión o de reversión génica superaron en más de dos veces la frecuencia del testigo (De Serres 1981).

RESULTADOS

En la primera etapa se realizaron pruebas de sobrevivencia de la cepa en estudio con distintas diluciones de los extractos, los porcentajes logrados aparecen en las **tablas I y II**. En todos los casos las muestras de extractos puros provocaron una caída del 50 al 60% en la viabilidad de las levaduras. Con el extracto éter obtenido de aguas de la primera cámara el porcentaje de sobrevivencia se mantuvo bajo al incubar durante 2 horas cualquiera de las diluciones. Al incubar por 6 horas la viabilidad se recuperó a partir de la dilución al 0.5. El extracto metanol del mismo origen solo mostró diferencias significativas entre los porcentajes de viabilidad alcanzados al ensayar la muestra pura y la diluida al 0.5; para las diluciones se pudo observar una menor toxicidad que la encontrada con el extracto éter.

Con los extractos de la cámara de toma de muestras el patrón se invierte resultando más tóxico el metanólico, sin variaciones notables entre las 2 y las 6 horas de incubación.

TABLA I. SOBREVIVENCIA DE *Saccharomyces cerevisiae* D7 EN EXTRACTOS OBTENIDOS DE MUESTRAS DE AGUAS DE LA PRIMERA CAMARA

CC*	SOBREVIVENCIA % **	
	2 horas	6 horas
Extracto éter		
0.0	100	100
0.1	76	100
0.2	66	85
0.5	65	80
1.0	62	48
Extracto metanol		
0.0	100	100
0.1	93	93
0.2	80	80
0.5	90	81
1.0	58	58

CC* 0.0: 4 ml de suspensión de levadura de 10^8 cel./ml (SL) + 1 ml de solución amortiguadora; 1.0, 0.5, 0.2 y 0.1: 4 ml SL + 1 ml de extracto puro o diluido al 50%, 20% ó 10%, respectivamente, con una solución amortiguadora

** Se consideran únicamente aquellos recuentos en los que no se encontró una variación mayor al 5% entre los promedios de experiencias

TABLA II. SOBREVIVENCIA DE *Saccharomyces cerevisiae* D7 EN EXTRACTOS OBTENIDOS DE MUESTRAS DE AGUAS DE LA CAMARA DE TOMA DE MUESTRAS

CC*	SOBREVIVENCIA %	
	2 horas	6 horas
Extracto éter		
0.0	100	100
0.1	100	100
0.2	100	100
0.5	85	80
1.0	54	45
Extracto metanol		
0.0	100	100
0.1	90	79
0.2	65	65
0.5	71	70
1.0	39	60

CC** V₅₀, pie de la tabla I

Debe considerarse que cuando la sobrevivencia cae a valores inferiores al 40% de los obtenidos en los testigos, el efecto genotóxico que pueda hallarse es dudoso ya que podría ser enmascarado por la citotoxicidad.

Los valores de las frecuencias de conversión génica mitótica y reversión génica en *Saccharomyces cerevisiae* D7 pueden verse en las tablas III y IV. En la tabla III se observa que, con el extracto éter de la primera cámara se incrementó notablemente la reversión con respecto al testigo; dicho aumento desapareció

al diluir la muestra así como al incubar durante 6 h. En lo referente a las frecuencias de conversión sólo se lograron valores indicadores de efectos genotóxicos cuando se ensayaron extractos diluidos al 0.2 y al 0.1 e incubando durante 2 horas.

Para el extracto metanol de la primera cámara se demostró genotoxicidad con la muestra pura y con la dilución al 0.2, luego de 2 y 6 horas de exposición, respectivamente. En este caso no se detectaron variaciones significativas en las frecuencias de conversión génica. En el extracto éter de esta cámara se localizó la actividad genotóxica más importante.

El agua residual de la cámara de toma de muestras arrastra componentes de las dos cámaras anteriores. En la tabla IV puede verse que el extracto de éter produjo una elevación en las frecuencias de reversión génica con las diluciones altas ya a las 2 horas de contacto. En las formas menos diluidas de dicho extracto el incremento sólo se detectó con los mayores tiempos de exposición.

El extracto metanol también causó un aumento notorio en las frecuencias de reversión génica que se acentuó (en particular con la dilución al 0.5) al incubar durante 6 horas, en este caso la dilución disminuyó los valores acercándolos a los del testigo. Las frecuencias de conversión génica aumentaron en las primeras horas de contacto con el extracto metanólico puro, dicho aumento desapareció al incrementarse el tiempo de incubación.

TABLA III. ENSAYOS DE GENOTOXICIDAD CON EXTRACTOS DE AGUAS DE LA PRIMERA CAMARA

	CC*	FR ($\bar{X} \pm DE$)	V	FC ($\bar{X} \pm DE$)	V
2 horas					
Extracto éter	0.0	0.15 ± 0.03	1.0	0.22 ± 0.05	1.0
	0.1	0.21 ± 0.03	1.4	0.43 ± 0.06	1.9
	0.2	0.19 ± 0.05	1.3	0.47 ± 0.01	2.2
	0.5	0.43 ± 0.02	2.8	0.28 ± 0.06	1.3
	1.0	0.34 ± 0.04	2.3	0.29 ± 0.06	1.3
Extracto metanol	0.0	0.05 ± 0.02	1.0	0.20 ± 0.03	1.0
	0.1	0.06 ± 0.01	1.2	0.26 ± 0.03	1.3
	0.2	0.07 ± 0.05	1.4	0.24 ± 0.02	1.2
	0.5	0.08 ± 0.02	1.6	0.23 ± 0.03	1.2
	1.0	0.10 ± 0.03	2.0	0.24 ± 0.01	1.2
6 horas					
Extracto éter	0.0	0.22 ± 0.00	1.0	0.26 ± 0.05	1.0
	0.1	0.28 ± 0.03	1.3	0.33 ± 0.05	1.3
	0.2	0.31 ± 0.01	1.4	0.31 ± 0.03	1.2
	0.5	0.37 ± 0.01	1.7	0.28 ± 0.07	1.1
	1.0	0.32 ± 0.02	1.5	0.43 ± 0.06	1.6
Extracto metanol	0.0	0.10 ± 0.01	1.0	0.27 ± 0.08	1.0
	0.1	0.10 ± 0.00	1.0	0.28 ± 0.06	1.0
	0.2	0.21 ± 0.02	2.1	0.32 ± 0.07	1.2
	0.5	0.16 ± 0.01	1.6	0.31 ± 0.05	1.1

* Ver pie de la tabla I; FR frecuencia de reversión génica x 10⁵; FC frecuencia de conversión génica x 10⁴; V frecuencia ensayo/frecuencia testigo; \bar{X} promedio entre frecuencias de experiencias independientes; DE desviación estándar

TABLA IV. ENSAYOS DE GENOTOXICIDAD CON EXTRACTOS DE AGUAS DE LA CAMARA DE TOMA DE MUESTRAS

	CC*	FR ($\bar{X} \pm DE$)	V	FC ($\bar{X} \pm DE$)	V
2 horas					
Extracto éter	0.0	0.12 \pm 0.03	1.0	0.27 \pm 0.07	1.0
	0.1	0.31 \pm 0.02	2.6	0.36 \pm 0.07	1.3
	0.2	0.32 \pm 0.01	2.7	0.27 \pm 0.05	1.0
	0.5	0.21 \pm 0.05	1.8	0.37 \pm 0.06	1.4
	1.0	0.18 \pm 0.00	1.5	0.38 \pm 0.08	1.4
Extracto metanol	0.0	0.15 \pm 0.01	1.0	0.15 \pm 0.05	1.0
	0.1	0.18 \pm 0.01	1.2	0.16 \pm 0.05	1.1
	0.2	0.31 \pm 0.02	2.1	0.26 \pm 0.05	1.7
	0.5	0.28 \pm 0.01	1.9	0.25 \pm 0.03	1.7
	1.0	0.36 \pm 0.01	2.4	0.39 \pm 0.04	2.6
6 horas					
Extracto éter	0.0	0.10 \pm 0.02	1.0	0.26 \pm 0.03	1.0
	0.1	0.30 \pm 0.01	3.0	0.36 \pm 0.03	1.4
	0.2	0.30 \pm 0.02	3.0	0.26 \pm 0.05	1.0
	0.5	0.25 \pm 0.03	2.5	0.38 \pm 0.02	1.5
	1.0	0.29 \pm 0.03	2.9	0.47 \pm 0.03	1.8
Extracto metanol	0.0	0.15 \pm 0.01	1.0	0.20 \pm 0.05	1.0
	0.1	0.19 \pm 0.01	1.3	0.36 \pm 0.05	1.8
	0.2	0.26 \pm 0.03	1.7	0.29 \pm 0.03	1.4
	0.5	0.45 \pm 0.01	3.0	0.36 \pm 0.04	1.8
	1.0	0.41 \pm 0.02	2.7	0.37 \pm 0.04	1.8

* Ver pie de la tabla III

DISCUSIÓN

El sistema empleado por esta industria gráfica para la eliminación de efluentes líquidos es similar al de muchos de los establecimientos medianos de este tipo y se encuentra reglamentado por las autoridades municipales tanto en lo referente a su construcción como a su funcionamiento. El proceso de impresión también guarda semejanza con el utilizado por numerosos talleres que arrojan sus aguas residuales al sistema cloacal de la ciudad. Dadas estas características puede considerarse al efluente estudiado como representativo de los residuos líquidos de miles de empresas semejantes ubicadas en la zona urbana de Buenos Aires.

Las aguas de la primera cámara muestran el efecto del efluente crudo. En estos ensayos la genotoxicidad no desapareció con la dilución, sino que se manifestó en forma de conversión génica antes que reversión génica. En cualquier caso, se trata principalmente de la acción de compuestos no polares lo que se verifica con la baja genotoxicidad evidenciada por el extracto metanólico. La desaparición de efectos genotóxicos, luego de 6 horas de incubación, podría atribuirse a la intervención de sistemas de reparación exentos de error, de la molécula de ADN (Moretton 1986), en una mezcla cuya acción tóxica no depende del tiempo de contacto. Este último punto se demuestra claramente con los datos de sobrevivencia de la **tabla I** que resultaron mayores luego de 6 horas de contac-

to que durante las primeras horas, indicando la presencia en la mezcla de componentes poco polares que penetraron rápidamente en las células.

Al ser sometidas las aguas residuales a un proceso de coagulación en la segunda cámara, el líquido obtenido cambia sus características genotóxicas. Con tiempos cortos de exposición se manifestaron principalmente los efectos de los agentes genotóxicos más polares presentes en el extracto metanólico, estos efectos se mantuvieron a las 6 horas seguramente debido a una penetración más lenta del agente tóxico a las células. Sólo se registraron resultados positivos con el extracto éter al diluirlo, lo que indicaría un posible antagonismo ejercido por ciertos componentes de la mezcla a elevada concentración. Al incubar por más tiempo se incrementó la frecuencia de reversión debido al aumento del contacto. No aparece en este caso la actividad de los sistemas de reparación de la molécula de ADN lo que refuerza el concepto de diferente composición del extracto obtenido de esta cámara.

Debe considerarse que este líquido es eliminado a través del sistema cloacal y que su efecto genotóxico no disminuye luego de los procesos de sedimentación y coagulación a que es sometido. Tampoco es afectado por la dilución así que puede estimarse un importante aporte a los efectos genotóxicos detectados en cursos de agua del área urbana (Moretton *et al.* 1990, 1991).

REFERENCIAS

- Bronzetti G., Corsi C. y Nieri R. (1980). L'impiego del ceppo D7 di *S. cerevisiae* nella determinazione del rischio genetico ambientale. 1) Effetti genetici del tricloroetilene. Boll. Soc. It. Biol. Sper. 61, 1315-1321.
- De Serres F.J. (1981). Summary report on the performance of yeast assays. En: *Evaluation of short term test for carcinogenesis* (F.J. De Serres y J. Ashby, Eds.). Elsevier, Nueva York, pp. 68-76.
- Dressler M. (1979). Extraction of trace amount of organic compounds from water with porous organic polymers. J. Chromatogr. 165, 167-206.
- Fracasso M.E., Leone R., Brunello F., Monastra C., Tezza F. y Storti P. (1992). Mutagenic activity in wastewaters concentrates from dye plants. Mutat. Res. 298, 91-95.
- Houk S.V. (1992). The genotoxicity of industrial wastes and effluents. A review. Mutat. Res. 277, 91-138.
- Moretton J. (1986). Agentes toxicogenéticos: estudio del daño inducido al genoma de *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis de Doctorado. Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.
- Moretton J., Baró P., Zelazny A., Nucchetelli M. y D' Aquino M. (1990). Estudio de la genotoxicidad de las muestras de lodo de un río contaminado por efluentes industriales. Rev. Int. Contam. Ambient. 6, 55-68.
- Moretton J., Baró P., Zelazny A. y D' Aquino M. (1991). Polluted water concentrates: introduction of genetic alterations in *Saccharomyces cerevisiae* D7 strain. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 46, 203-207.
- Moretton J., Baró P. y D' Aquino M. (1992). Genotoxic potential of waste waters from a leather industry. Water, Air, Soil Pollut. 63, 81-85.
- Omura M., Inamasu T. e Ishinishi N. (1992). Mutagenic activity of the leachate of municipal solid waste landfill. Mutat. Res. 298, 125-129.
- Sora S., Panzeri L., Lucchini Bonamini G. y Carbone M.L. (1979). *Saccharomyces cerevisiae*: conversión genica mitotica e crossing over mitotico. En: *Mutagenesi Ambientale. Metodiche de Analisi*. Vol. 1 Test *in vitro*. (G.E. Magni, Ed.). Consiglio Nazionale delle Ricerche ETS Pisa-Roma, pp. 91-138.
- Zimmerman F.K., Kern R. y Rasenberg H. (1975). A yeast strain for simultaneous detection of induced mitotic crossing over, mitotic gene conversion and reverse mutation. Mutat. Res. 28, 381-388.