

ESTUDIOS DE MUTAGENICIDAD, INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO ALGAL Y CONTAMINACIÓN QUÍMICA EN AGUAS SUPERFICIALES DE UN RÍO URBANO DE BUENOS AIRES, ARGENTINA

Laura C. LÓPEZ¹, Anahi MAGDALENO², Laura DE CABO³, María Fernanda NORIEGA⁴, Marcelo BASSI¹, Silvana ARREGHINI^{3*}, Graciela BASSOLS⁴, Marcelo WAGNER⁴ y Juan MORETTON¹

¹Cátedra de Higiene y Sanidad, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA, Junín 956, 1113 Buenos Aires, Argentina

²Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA, Ciudad Universitaria, Pabellón 2, Intendente Cantilo s/n, 1428 Buenos Aires, Argentina

³Museo Argentino de Ciencias Naturales «Bernardino Rivadavia» e Instituto de Investigaciones de Ciencias Naturales, Av. Ángel Gallardo 470, 1045 Buenos Aires, Argentina, ^{3*}Becaria Comisión de Investigaciones Pcia. de Buenos Aires

⁴Cátedra de Farmacobotánica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA, Junín 956, 1113, Buenos Aires, Argentina

(Recibido agosto 1997, aceptado mayo 1998)

Palabras clave: bioensayos, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, *Saccharomyces cerevisiae* D7, *Allium cepa*, *Selenastrum capricornutum*, toxicidad de aguas, contaminación de ríos

RESUMEN

Se analizaron los efectos citotóxicos y genotóxicos de muestras de agua provenientes de un río, Riachuelo, contaminado por efluentes industriales y domésticos. Para dicho estudio se utilizaron diversos sistemas biológicos con el fin de seleccionar un ensayo adecuado para el monitoreo continuo del curso. Paralelamente se determinaron las concentraciones de distintos contaminantes en las mismas muestras y se elaboraron los índices de calidad de agua (ICA). En las muestras de agua cruda no se observaron efectos genotóxicos en los ensayos de Ames, de daño y reparación del ADN en *Bacillus subtilis* y de reversión y conversión génica en *Saccharomyces cerevisiae* D7. En *Allium cepa*, dichas muestras, indujeron un alto porcentaje de aberraciones cromosómicas en los meristemos terminales de la raíz y en el alga *Selenastrum capricornutum* provocaron inhibición del crecimiento. Los extractos de aguas obtenidos por pasaje a través de resinas XAD-2 mostraron respuestas genotóxicas en el ensayo de Ames con activación microsómica y en el de *Saccharomyces cerevisiae*. Los análisis fisicoquímicos de las distintas muestras indicaron que la zona con mayor contaminación era la de Puente Uriburu. Al correlacionar los datos de calidad de agua con los obtenidos con los sistemas biológicos pudo concluirse que fue baja la biodisponibilidad de los contaminantes presentes en el curso. Los efectos genotóxicos fueron notables únicamente en sistemas de células eucarióticas en activa división o al realizar ensayos con los extractos concentrados.

ABSTRACT

Biological activity in terms of genotoxicity and cytotoxicity was estimated in water samples from a river, Riachuelo, exposed to a long pollution process with industrial effluents and sewage. Several biological systems were used for this study in order to choose the appropriate one for further monitoring the river and to determine what kind of pollutants were present in these waters. The concentration of several kind different pollutants found in the water samples were used to calculate the ICAs (Water Quality Index). The highest pollution levels were detected in samples collected in the Puente Uriburu area. Untreated water samples did not result in genotoxicity with the Ames-test, the *Bacillus subtilis* rec-assay or the *Saccharomyces cerevisiae* D7 system, but the *Allium*-test showed a high percentage of chromosome aberrations. Additionally, growth inhibition was obtained in the *Selenastrum capricornutum* test. On the other hand, XAD-2 extracts from the same water samples were genotoxic when the Ames-test with microsomal activation and the yeast system were done. In conclusion: although high pollutant concentrations were determined in the river water samples their biodisponibility enhanced genotoxicity only in eukaryotic cells in active division or when concentrate extracts were tested.

INTRODUCCIÓN

Los ríos que corren a través de áreas urbanas son habitualmente utilizados como receptores finales de residuos líquidos de origen industrial y doméstico. En Latinoamérica, así como en otras regiones, un gran porcentaje de estos residuos llega a los cursos de agua sin tratamiento previo de depuración. Esto genera profundas alteraciones en los ecosistemas fluviales con riesgos para la salud humana. Las autoridades han comenzado, en muchos casos, trabajos destinados al saneamiento de dichos cursos con la recuperación de la biota originalmente presente en ellos. El conjunto de procesos para lograr estos objetivos se conoce como biorrestauración y requiere controles continuos tanto de la concentración de contaminantes como de los efectos biológicos generados por la compleja mezcla de los mismos en las aguas del río.

En Argentina se han estudiado con cierta profundidad los aspectos químicos de la contaminación en algunos ríos (Lacoste y Collasius 1996). Con respecto a los efectos biológicos de dicha contaminación sólo existen datos dispersos de trabajos realizados por diferentes grupos de investigadores (Minotti y Málvarez 1989, Moretton *et al.* 1990b, Andrade y Troccoli 1993, García *et al.* 1996) cuyos resultados no pueden compararse entre sí. Considerando este último punto se decidió llevar a cabo una serie de bioensayos con muestras de agua similares. El objetivo fue buscar los indicadores biológicos que en una forma rápida, sencilla y económica permitieran estimar las consecuencias de la contaminación en la biota de estos ecosistemas.

Para la realización del presente trabajo se seleccionó el último tramo (Riachuelo) de un río contaminado que atraviesa el área metropolitana de Buenos Aires (Fig. 1), teniendo en cuenta la larga y documentada historia de este río como receptor de residuos y la posibilidad de su biorrestauración en un futuro cercano. Se realizaron determinaciones fisico-químicas de los principales parámetros indicadores de contaminación para compararlas con las correspondientes a los últimos 25 años y estimar así en qué medida la situación del río había variado durante dicho período.

Riachuelo es el nombre que recibe el tramo inferior del río Matanza desde Puente de la Noria hasta su desembocadura. En este tramo, el río, actúa como límite natural entre la Ciudad de Buenos Aires y la Provincia del mismo nombre (Fig. 1). El Matanza-Riachuelo es el colector principal de una cuenca que cubre aproximadamente 2,300 kilómetros cuadrados. La longitud total de este colector es de 64 kilómetros. Desde sus nacientes hasta el kilómetro 25, recoge las aguas servidas y los desechos de los partidos menos poblados del Gran Buenos Aires. Entre los kilómetros 25 y 8.5 se encuentra rectificado artificialmente; este tramo cruza zonas densamente pobladas e industrializadas. La última parte del curso se caracteriza por la presencia de gran número de meandros que dificultan la evacuación de sus aguas al Río de la Plata, sumándose a la contaminación industrial y doméstica la generada por los puertos. El río corre por un terreno llano, la pendiente es es-



Fig. 1. Localización de los sitios de muestreo en el Riachuelo

casa y, salvo en zonas dragadas, también lo es su profundidad. Su caudal es muy variable con valores medio mínimo de 2.8 y máximo de 1,000 metros cúbicos por segundo. La influencia de las mareas del Río de La Plata y de los vientos predominantes del sector S.E. produce cambios en las características físicas, químicas y biológicas de las aguas en el tramo inferior del curso. El alto volumen de descargas de líquidos residuales que recibe el Riachuelo supera su capacidad diluyente. Según estudios realizados en 1990 la composición de los vertidos de origen industrial sería la que se esquematiza en la figura 2. A esto se suma el aporte de materia orgánica de los colectores cloacales volcados clandestinamente al curso.

Para estimar las consecuencias de estos vertidos, se elaboraron los índices de calidad de agua (ICA) a partir de la determinación de la concentración de distintos contaminantes. La evolución del proceso de contaminación pudo así estudiarse comparando los valores de ICA obtenidos por el Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Hídrica (INCYTH) durante las décadas del 70 (Berón 1984) y del 80 (CEAMSE 1994) con los del presente trabajo. El efecto genotóxico de esta mezcla compleja de contaminantes se analizó con tres ensayos microbianos, el de Ames (Maron y Ames 1983), el rec con *Bacillus subtilis* (Mazza 1982) y el de reversión y conversión génica con *Saccharomyces cerevisiae* D7 (Zimmermann *et al.* 1975). Se utilizaron además dos ensayos con vegetales para ampliar la información sobre biotoxicidad. Por una parte se ana-

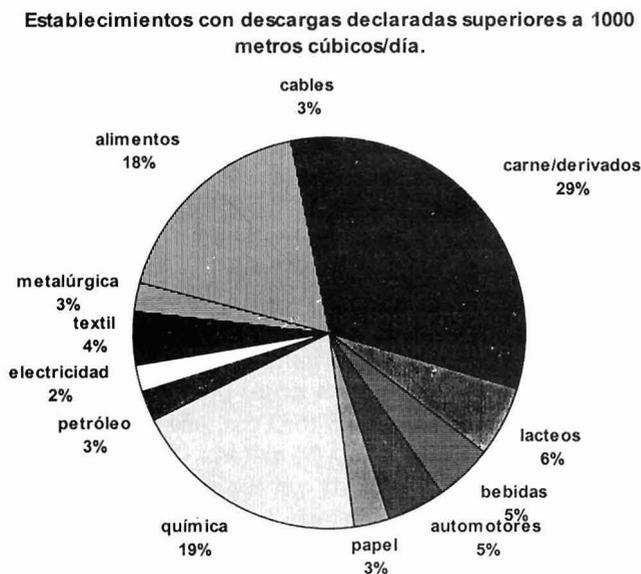


Fig. 2. Descarga de efluentes industriales al Riachuelo

lizó el efecto de las aguas en los cromosomas de las células del extremo apical de la raíz de la cebolla (Fiskesjö 1988) con el fin de detectar la inducción de aberraciones cromosómicas y por otra se usó un bioensayo con el alga *Selenastrum capricornutum* Printz (Miller *et al.* 1978) que proporcionó información sobre los efectos combinados de la estimulación del crecimiento debida a la presencia de nutrientes y de la inhibición causada por contaminantes tóxicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Toma de muestras

Se realizaron muestreos mensuales desde octubre de 1995 hasta julio de 1996 en los siguientes puntos a lo largo del Riachuelo: Puente La Noria (Sitio 1), Puente Uriburu (Sitio 2), Puente Bosch (Sitio 3) y Puente Nicolás Avellaneda (Sitio 4). La localización de dichos sitios se observa en la figura 1. Se tomaron muestras de agua en el centro del curso que fueron filtradas a través de fibra de vidrio Whatman GF/C en el campo o conservadas sin filtrar en frascos estériles. En todos los casos se transportaron en frío (4°C) al laboratorio.

Datos fisicoquímicos

In situ se midieron: pH, conductividad, temperatura y turbidez (disco de Secchi). En el laboratorio se determinó: amonio con el método de indofenol azul descrito por Mackereth *et al.* (1978). La determinación de nitratos (por reducción a nitritos), nitritos (por diazotación) y carbono orgánico particulado (COP) (por oxidación) se hicieron según la metodología descrita en Strickland y Parsons (1960). Para cuantificar los sulfatos (por turbidimetría), los cloruros (por titulación con nitrato de plata), los bicarbonatos (por titulación con heliantina),

el sodio y el potasio (por fotometría de llama), el calcio y el magnesio (por titulación), el oxígeno disuelto (por el método de Winkler) y el fósforo reactivo soluble (PRS) (por el método del ascórbico-molibdato) se utilizaron las metodologías descritas en "Standard Methods for the Examination of Waters and Wastewater" (APHA 1985). Los sólidos suspendidos (SS) fueron estimados por filtración de una cantidad conocida de agua a través de filtros de fibra de vidrio Whatman GF/C prepesados y posteriormente secados y pesados (APHA 1985).

Ensayo con algas

Se utilizó el alga verde *Selenastrum capricornutum* Printz proveniente de "The Culture Collection of Algae and Protozoa, Natural Environment Research Council", Gran Bretaña (CCAP 278/4) en una versión modificada del ensayo descrito por Miller *et al.* (1978). Se inoculó *Selenastrum capricornutum* por triplicado en matraces Erlenmeyer de 125 ml con 30 ml de muestra filtrada con y sin agregado de 1 mg/l de Na₂EDTA·2H₂O para evaluar la presencia de sustancias inhibitorias del crecimiento. La concentración inicial del inóculo en cada frasco fue de 10,000 células/ml. Todos los cultivos fueron incubados durante 96 horas a 26 ± 2°C bajo luz continua, blanca, fría y fluorescente (23 µE/m²/seg) y con agitación manual dos veces al día. La concentración celular final se estimó espectrofotométricamente por turbidez a 750 nm de longitud de onda. Los porcentajes de inhibición del crecimiento se calcularon comparando los cultivos con y sin agregado del complejante.

Ensayos con *Allium cepa*

Se analizaron muestras de la estación Puente Uriburu del Riachuelo tomadas entre octubre de 1995 y julio de 1996. El ensayo se llevó a cabo con bulbos de *Allium cepa* L. (Liliaceae) (2n=16), según lo descrito por Fiskesjö (1985). Como testigo negativo se utilizó agua mineral no carbonatada, con una concentración de calcio y magnesio de 50 ppm y pH neutro. Una solución de dicromato de potasio 2x10⁻⁵ M se usó como testigo positivo (Liu *et al.* 1992). Se emplearon 10 bulbos por tratamiento que se incubaron con las muestras durante 72 horas a temperatura ambiente para medir la longitud de las raíces cada 24 horas. Luego de 48 horas de tratamiento, se retiraron 2 meristemas terminales por bulbo que se sometieron a fijación y maceración y se colorearon con orceína para proceder a los estudios cromosómicos. Para la determinación del índice mitótico se contaron como mínimo 1,000 células (100 células por preparado siempre que fuera posible). Para determinar aberraciones cromosómicas los preparados se observaron en el microscopio recorriendo los campos de derecha a izquierda y de arriba a abajo y se analizaron las primeras 100 células en anafases tempranas y tardías o en metafase.

Ensayo de Ames

Las muestras analizadas fueron las tomadas en la estación Puente Uriburu (sitio 2). Esta estación se seleccionó por ser el

área con mayor concentración de contaminantes en el curso. Un grupo de experimentos fue hecho a partir de diluciones de agua cruda, previamente esterilizada, por filtración con Acrodisc de 0.22 μm . Para otro grupo de ensayos se recurrió a la concentración a partir de 500 ml de agua cruda ó de 500 ml de agua cruda acidificada con HCl hasta un pH 3. Se obtuvieron así los extractos neutros y ácidos, respectivamente, por pasaje de las muestras a través de columnas de resina XAD-2 según lo descrito en Vázquez y Moretton (1995).

El ensayo de Ames se realizó mediante la técnica de incorporación en placa con y sin activación microsómica (Maron y Ames 1983). Las cepas utilizadas fueron *Salmonella typhimurium* TA100 y TA98, gentilmente cedidas por el Dr. Bruce Ames del Departamento de Bioquímica de la Universidad de California, EUA. La fracción microsómica se obtuvo de hígado de rata Whistar macho pretratada con fenobarbital sódico y β -naftoflavona previo al sacrificio (Ong *et al* 1980).

Ensayo rec con *Bacillus subtilis*

Las muestras analizadas fueron de la estación Puente Uriburu y se procesaron en forma similar a lo descrito en el ensayo de Ames. Se usó la técnica de determinación de la eficiencia de placa (EP) de acuerdo con lo propuesto por Mazza (1982). Las cepas de *Bacillus subtilis* PB 1652 (*rec*⁺) y PB 1791 (*rec*⁻) fueron amablemente aportadas por el Dr. Giorgio Mazza del Instituto de Genética de la Universidad de Pavia, Italia.

Ensayo con *Saccharomyces cerevisiae* D7

Se utilizó el mismo material y tratamiento de muestras que el mencionado en el punto anterior. En la detección de conversión génica y reversión génica mitótica con la cepa *Saccharomyces cerevisiae* D7 se siguió la técnica desarrollada por Zimmermann *et al.* (1975). Células de levaduras procedentes de cultivos en fase logarítmica tardía de crecimiento, fueron puestos en contacto con diferentes diluciones de agua cruda o extractos de aguas del Riachuelo en medio líquido de amortiguador fosfato 0.1 M pH 7.4 durante 4, 24 y/o 48 horas, en baño térmico a 28° C con agitación. después de estos períodos se tomaron alícuotas que se lavaron dos veces con igual volumen de amortiguador y se inocularon en la superficie de los medios selectivos correspondientes por triplicado. Las placas se incubaron entre 48 y 96 horas a 28° C.

La cepa empleada en estos ensayos fue gentilmente cedida por el Dr. Giorgio Bronzetti del Instituto de Mutagénesis CNR Pisa, Italia.

Análisis de los datos

Se realizó un análisis de varianza de dos factores (lugar y fecha) para cada uno de los parámetros fisicoquímicos medidos y para los porcentajes de inhibición del crecimiento (% I) en los bioensayos con algas, con un nivel de significación del 5%. En los casos en los cuales no se cumplieran los supuestos para el análisis de varianza se transformaron los datos ($y' = \log y$) y se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (Daniel 1978). Para el tratamiento de los datos se usó el paquete

de programas estadísticos SYSTAT (The system for statistics SYSTAT Inc. 1990 Evanston).

En el ensayo de Ames se aplicaron los criterios de positividad sugeridos por Maron y Ames (1983). Para el ensayo rec con *Bacillus subtilis* los resultados se consideraron positivos cuando la relación de eficiencia de placa [EP=unidades formadoras de colonias de la cepa tratada (N)/unidades formadoras de colonias de la cepa no tratada (N₀)] de la cepa PB 1791 decreció con respecto a la cepa progenitora PB 1652 y dicha disminución guardó una relación con la concentración de la sustancia ensayada (Mazza y Galizzi 1980). Con el fin de cuantificar adecuadamente la positividad de los resultados obtenidos se calcularon las rectas de regresión para cada experimento. La diferencia entre los valores de las pendientes de las rectas correspondientes a la cepa PB 1652 y la cepa PB 1791 indicó la potencia genotóxica (López y Moretton 1997). Los resultados obtenidos en las experiencias con *Saccharomyces cerevisiae* se consideraron positivos cuando la frecuencia de conversión o de reversión génica mitótica superaron en más de dos veces la frecuencia del testigo (Moretton *et al.* 1990 a, 1990b, Vázquez y Moretton 1995).

RESULTADOS

Datos fisicoquímicos

Como se observa en la **tabla I** la única variación entre los sitios de muestreo fue una disminución significativa ($p < 0.05$) en el valor de los datos fisicoquímicos medidos en el sitio 4. A excepción de OD, nitritos, alcalinidad y sólidos suspendidos los datos fisicoquímicos mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las distintas fechas de muestreo.

En la **tabla I** también pueden apreciarse los valores de índice de calidad de aguas (ICA) para cada sitio de muestreo y un promedio general. Según estos ICA, Puente Uriburu (sitio 2) fue la estación con mayor contaminación.

Ensayo con algas

Los bioensayos con *S. capricornutum* tuvieron mayor crecimiento celular en las muestras tratadas con Na₂EDTA.2H₂O con respecto a las no tratadas, lo que indica que estas aguas presentan inhibidores del crecimiento algal, especialmente metales pesados (Joubert 1980). Los porcentajes de inhibición calculados a partir de los tratamientos con y sin agregado de EDTA mostraron diferencias significativas a lo largo del año ($p < 0.05$) y las diferencias entre los cuatro sitios estudiados ($p = 0.728$) resultaron no significativas. Los mayores porcentajes de inhibición del crecimiento algal (**Fig. 3**) se obtuvieron en los meses de enero (48.1 %) y marzo de 1996 (36.8 %), al igual que los valores bajos de ICA (0.57 y 1.14, respectivamente). El menor porcentaje de inhibición se notó en octubre de 1995 (2.4 %) comparable con un alto ICA en esa fecha (2.43).

Ensayo con *Allium cepa*

En la **tabla II** se muestran los resultados obtenidos en la

TABLA I. DATOS FÍSICO-QUÍMICOS DETECTADOS EN LOS CUATRO SITIOS DE MUESTREO DEL RIACHUELO ENTRE OCTUBRE DE 1995 Y JULIO DE 1996

	sitio 1	sitio 2	sitio 3	sitio 4	sitio 1-4
OD (mg/l)	000.41±000.94	000.00±000.00	000.00±000.00	000.18±000.51	000.14±000.54
pH	007.41±000.21	007.28±000.22	007.24±000.18	007.25±000.25	007.29±000.21
Cond. (mS/cm)	001.90±001.02	001.91±000.76	001.72±000.54	001.02±000.60	001.63±000.81
Alc. (mg/l)	570.36±121.43	521.51±088.26	479.06±069.92	259.72±106.52	457.66±099.32
Ca ²⁺ (mg/l)	043.32±011.49	044.79±009.24	042.15±008.11	024.38±007.19	038.66±012.16
Mg ²⁺ (mg/l)	032.80±016.66	027.47±010.71	026.64±007.82	014.48±004.72	025.35±012.48
SO ₄ ²⁻ (mg/l)	067.74±019.30	073.25±016.65	066.36±017.90	038.05±017.64	061.35±022.09
Cl ⁻ (mg/l)	289.53±177.94	301.63±102.21	269.63±063.89	134.77±045.56	248.89±125.40
Na ⁺ (mg/l)	348.00±096.02	339.70±083.81	315.18±052.43	141.30±038.70	286.05±109.06
K ⁺ (mg/l)	022.42±004.04	020.21±002.49	016.96±004.93	010.27±005.09	017.46±006.14
NH ₄ (mg/l)	012.07±004.61	012.41±005.17	012.54±003.65	006.11±002.49	010.78±004.80
NO ₃ (µg/l)	177.32 ± 093.68	113.68 ± 088.05	147.64 ± 123.55	137.42 ± 082.13	000.14 ± 000.09
NO ₂ ⁻ (µg/l)	046.64 ± 048.90	032.30 ± 023.77	024.51 ± 011.18	015.99 ± 008.27	000.03 ± 000.02
PRS (mg/l)	002.24 ± 001.23	002.23 ± 001.37	001.85 ± 001.26	000.99 ± 000.60	001.83 ± 001.28
PT (mg/l)	004.96 ± 002.05	005.35 ± 002.47	004.67 ± 001.52	003.02 ± 001.78	004.50 ± 002.11
COP (mg/l)	009.10 ± 001.66	009.51 ± 001.56	009.54 ± 001.35	007.22 ± 002.58	008.84 ± 002.02
SS (mg/l)	043.55 ± 018.70	062.75 ± 056.19	039.65 ± 001.56	038.00 ± 014.99	045.99 ± 031.50
T °C	020.27 ± 006.01	020.81 ± 005.51	020.54 ± 005.24	020.54 ± 005.46	020.54 ± 000.22
ICA	1.7	1.4	2.0	2.0	2.0

Los datos se expresan como valores promedio ± DE; sitio 1-4: promedio general; ICA: índice de calidad de agua; para el significado de las abreviaturas ver Materiales y Métodos

determinación de la longitud de las raíces de *Allium cepa*. En este caso no se encontraron diferencias significativas entre el testigo y las muestras de agua.

Los datos correspondientes al análisis microscópico se detallan en la tabla III. Hubo diferencias significativas en el índice mitótico entre las raíces de los bulbos tratados con agua de Riachuelo y con agua mineral. La ausencia de puentes y/o fragmentos cromosómicos indicó un bajo efecto clastogénico indu-

cido por las muestras. En cambio, el alto porcentaje de cromosomas con efecto c mitótico leve ("vagrant") (Fiskejö 1985) y de cromosomas con el centrómero inactivado (Gomez-Arroyo y Villalobos-Pietrini 1983) mostró la posibilidad de aneuploidía. Tanto el porcentaje de cromosomas pegajosos como el de c-mitosis intensa fueron bajos.

Ensayos de mutagenicidad

Se realizaron en muestras correspondientes a distintas estaciones del año. Al comparar los datos mediante el análisis de varianza se demostró que no existían diferencias significativas entre dichas muestras. Las características del proceso a que se sometieron las aguas crudas y sus correspondientes extractos, así como las de los sistemas biológicos utilizados generaron gran cantidad de datos. Con el fin de facilitar la interpretación de resultados, en el presente trabajo se incluye únicamente una serie de experimentos representativos para cada sistema.

En la figura 4 se observan los resultados obtenidos al ensayar distintas diluciones de agua cruda del Riachuelo con el sistema de Ames. En los experimentos realizados con dichas diluciones, con y sin el agregado de fracción microsómica, no se detectaron diferencias significativas entre el número de colonias revertantes obtenidas de tratados y de testigos. Un resultado distinto se obtuvo al probar los extractos provenientes del pasaje de agua a través de resinas. La fracción correspondiente a las aguas neutras mostró, en la cepa TA98, un incremento en el número de colonias revertantes relacionado con la concentración únicamente en las experiencias realizadas en presencia de fracción microsómica (Fig. 5 B). Según lo establecido por Maron y Ames (1983) dicho incremento indica un efecto genotóxico. En ausencia de fracción microsómica no se observó con este extracto la inducción de efectos tóxicos ni

TABLA II. DETERMINACIÓN DEL CRECIMIENTO DE LAS RAÍCES DE *Allium cepa*

Muestra	24 h	48 h	72 h
Agua mineral	0.57 ± 0.18	1.31 ± 0.31	1.84 ± 0.61
Dicromato de potasio (2x10 ⁻⁵ M)	0.54 ± 0.21	1.18 ± 0.32	1.80 ± 0.87
Riachuelo	0.53 ± 0.33	1.02 ± 0.08	1.76 ± 0.50

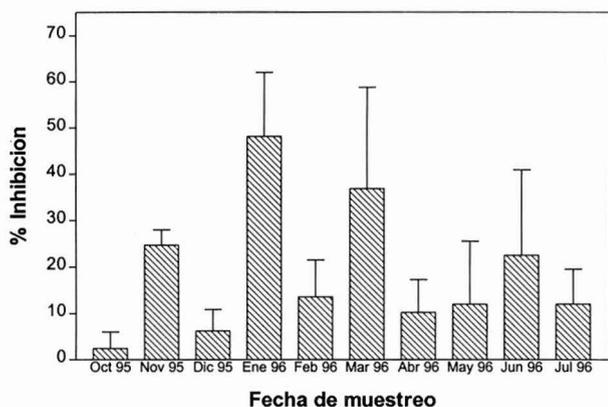


Fig. 3. Porcentaje de inhibición del crecimiento de *S. capricornutum* por muestras de agua del Riachuelo. Cada columna representa el promedio de los sitios de muestreo

TABLA III. EFECTO DEL AGUA DEL RIACHUELO EN EL ENSAYO CON *Allium cepa*

Tratamiento	IM	Número de células en mitosis	Metafasas anormales*	Anafases anormales*	c-mitosis		Cromosomas		
					leves	intensas	pegajosos	con centrómero inactivado	puentes y/o fragmentos
Testigo	91.5	411	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Riachuelo	45.2	567	9.5	74.6	46.0	9.5	9.5	28.6	0.0
K ₂ Cr ₂ O ₇ 2x10 ⁻⁵ M	59.7	323	1.6	30.4	8.6	7.7	1.6	20.2	1.6

* porcentajes del total de mitosis contadas; IM: índice mitótico

genotóxicos. En el extracto obtenido de aguas ácidas (Fig 5 D) si bien se detectó un elevado número de colonias revertantes con la cepa TA98, con el agregado de fracción microsómica, no pudo demostrarse un efecto genotóxico debido a la ausencia de una relación concentración respuesta. Como en el caso anterior, sin el agregado de fracción microsómica, el número de colonias revertantes por placa obtenido al ensayar distintas diluciones del extracto no mostró diferencias significativas con el testigo no tratado. El extracto de aguas neutras fue tóxico para la cepa

de *Salmonella typhimurium* TA100. Cuando las pruebas se realizaron con activación microsómica no se observó toxicidad (Fig. 5 A). El extracto de aguas ácidas no produjo efectos tóxicos ni genotóxicos en dicha cepa (Fig. 5 C).

Los resultados que se muestran en las figuras 6 y 7 se encontraron al ensayar las mismas muestras con el sistema rec de *Bacillus subtilis*. Las aguas crudas no indujeron diferencias significativas en la viabilidad de ambas cepas (Fig. 6). Tampoco se produjeron diferencias entre las pendientes de las rectas de regresión correspondientes a las cepas 1652 y 1791 al probar los extractos (Fig. 7), lo que indicó que la toxicidad observada en los mismos no se debió a un efecto sobre el material genético de estas bacterias.

El sistema de *Saccharomyces cerevisiae* D7, al igual que los anteriormente analizados, no indicó respuestas genotóxicas con las aguas crudas del Riachuelo (Fig. 8) aun con incubaciones de 48 horas. En este caso, ambos extractos, incrementaron la frecuencia de conversión génica mitótica pero no de reversión. Este efecto genotóxico únicamente se observó cuando las muestras se diluyeron lo suficiente como para disminuir la elevada toxicidad de los extractos puros para las células de levadura (Fig. 9).

DISCUSIÓN

Los valores correspondientes a los ensayos fisicoquímicos se mantuvieron casi constantes en los distintos sitios de muestreo. Las únicas variaciones de importancia se detectaron en el sitio de muestreo 4 localizado cerca de la desembocadura donde la influencia de las mareas y de los vientos predominantes del sudeste favorecen la entrada de aguas del Río de la Plata, lo que mejora la calidad de las aguas del Riachuelo. No se encontraron tendencias temporales en los datos fisicoquímicos. Esto se debió a que la causa principal de las variaciones está relacionada con vertidos irregulares de efluentes. En la década 1970-1980, Beron (1984) calculó valores de ICA entre 1.0 y 2.1 para los sitios considerados en el presente trabajo, siendo Puente Uriburu el que tuvo mayor grado de contaminación, lo que coincide con la situación actual. En la siguiente década, los ICA calculados a partir de valores obtenidos por el INCyTH (CEAMSE 1994) manifestaron una disminución en la calidad de agua con valores que variaron entre 0 y 1.0. Los ICA calculados en el pre-

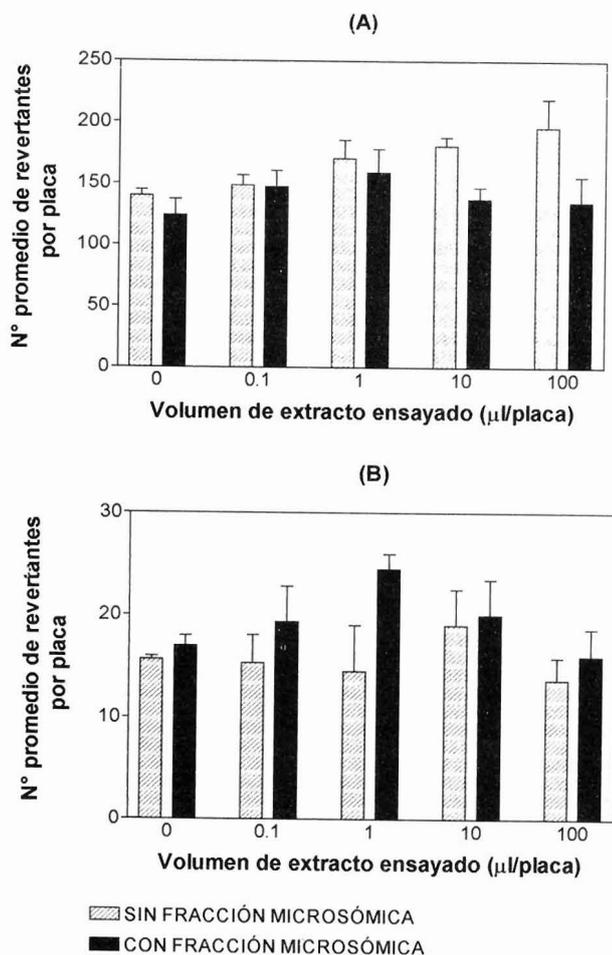


Fig. 4. Ensayo de Ames con agua cruda del Riachuelo, (A) cepa TA100; (B) cepa TA98

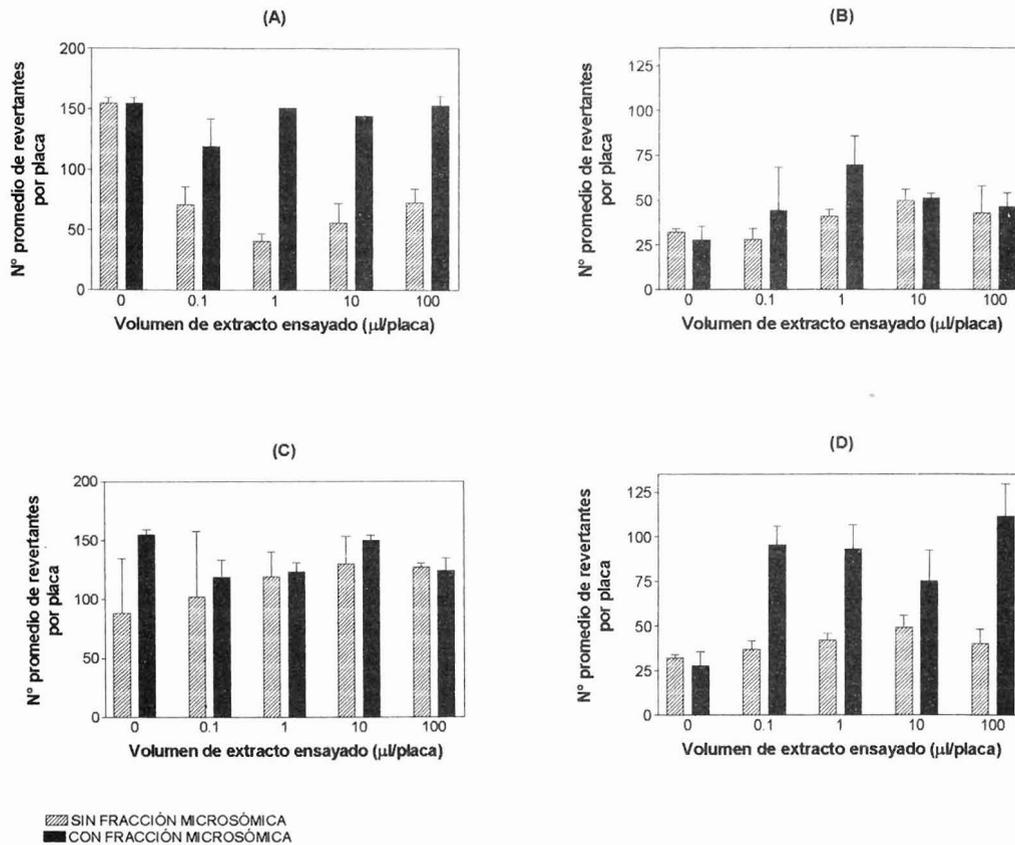


Fig. 5. Ensayo de Ames con extractos de agua del Riachuelo. Extracto neutro, (A) cepa TA100; (B) cepa TA98. Extracto ácido, (C) cepa TA98; (D) cepa TA98

sente trabajo muestran una mejora en la calidad de las aguas, probablemente debido al cierre de industrias en la zona considerada.

Aun cuando se trabajó con muestras de una zona de contaminación máxima los ensayos de mutagenicidad con agua cruda filtrada dieron resultados negativos. Es interesante notar que

con bacterias sumamente sensibles como *Salmonella* en el ensayo de Ames o durante incubaciones prolongadas como en la prueba de *Saccharomyces cerevisiae* D7, no se observó toxicidad en las células microbianas. Los efectos mutagénicos no se habrían registrado por la baja concentración de contaminantes citotóxicos en el curso. En el caso particular de los metales pesados las concentraciones de sales de cromo y mercurio detectados en distintas campañas de muestreo (Tabla IV) resultaron inferiores a las consideradas genotóxicas por otros autores (Sirover 1981, Vainio y Sorsa 1981). Cuando se ensayaron los extractos obtenidos al concentrar la fracción no polar de contaminantes se notó actividad mutagénica con activación microsómica. Dicha actividad fue consecuencia de un corrimiento en el marco de lectura de la molécula de ADN. Si bien no se pudo determinar cuáles de los compuestos presentes en la compleja mezcla fueron los responsables de la actividad observada, nuestros resultados coincidieron con los de otros autores. Abe y Urano (1994) demostraron que para las mezclas de compuestos que pueden formarse en aguas y sedimentos de ríos la cepa TA98 resultó más resistente a la toxicidad que la cepa TA100. En el mismo trabajo se evidenció que la presencia de fenol y derivados incrementó la respuesta mutagénica de compuestos que actúan como promutágenos entre los que se encontraron 3-amino-1,4-di-metil-5H-pirido [4,3-b]indol (Trp P1), 3-amino-1-metil-5H-pirido [4,3b]indol (Trp P2), y benzo[a]pireno. Los au-

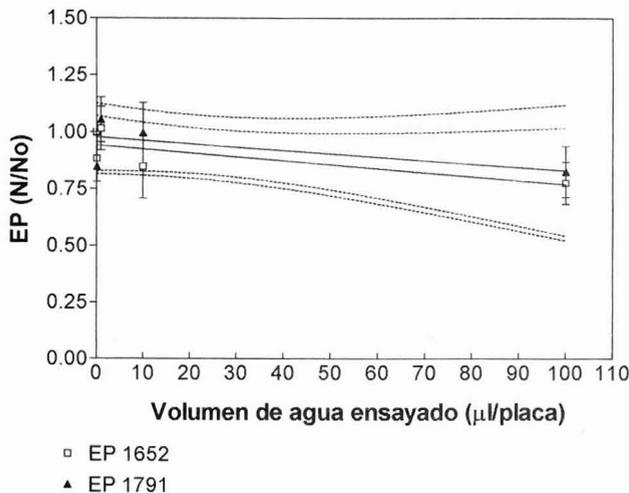


Fig. 6. Ensayo rec con *Bacillus subtilis* con agua cruda del Riachuelo

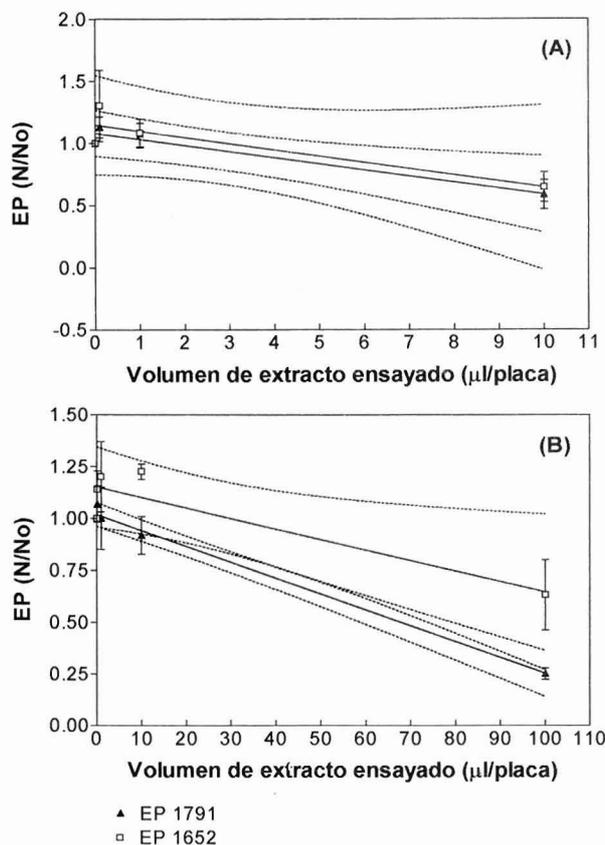


Fig. 7. Ensayo rec con *Bacillus subtilis* con extractos de agua del Riachuelo; extracto ácido (A) y extracto neutro (B)

tores antes citados detectaron que, en estos casos, la respuesta mutagénica se correlacionaba con una baja toxicidad inespecífica en la cepa TA98. En el Riachuelo no se ha estudiado la existencia de compuestos del tipo Trp P pero seguramente existe benzo [a]pireno y ha sido determinada la presencia de fenol y derivados (Tabla IV). La ausencia de respuesta mutagénica en las cepas de *Bacillus subtilis* puede explicarse como se ha postula-

TABLA IV. CONTAMINANTES DETECTADOS EN MUESTRAS DEL RIACHUELO POR EL INCyTH

NT	>20-30
N-NO+N-NO ₂	0-0.5
N-NH ₄	>10-15
OD	0-9
DBO	>60-100
DQO	>80-240
Cadmio	>0.002-0.005
Cromo	<0.05-0.25
Cobre	<0.05-0.1
Plomo	0.02-0.05
Zinc	<0.05
Mercurio	>2-6
Aceites y grasas	>20-40
Fenoles	>0.06-0.09

Los datos se expresan en mg/l y corresponden a los valores más frecuentes mínimos y máximos detectados durante las campañas de muestreo del INCyTH. NT: nitrógeno total; N-NO+N-NO₂: nitros y nitritos; N-NH₄: amonio

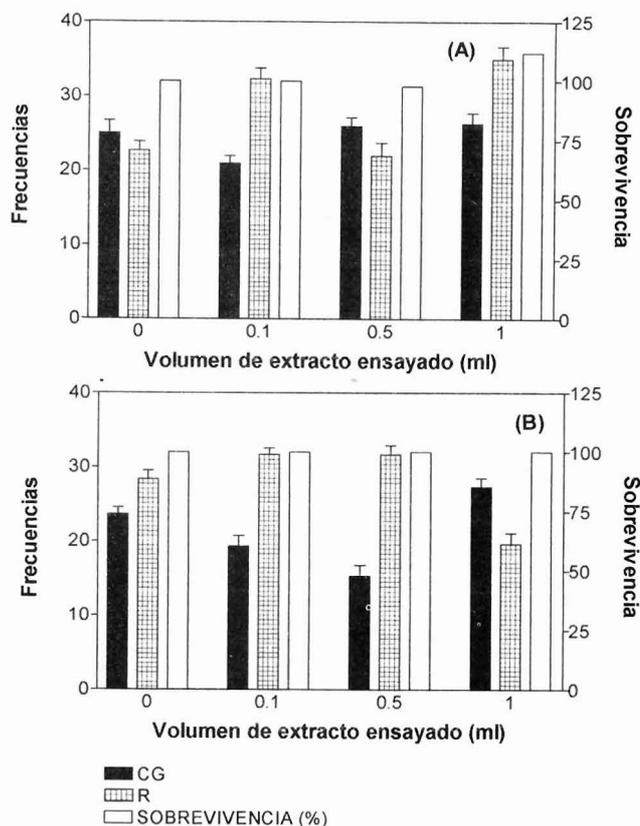


Fig. 8. Ensayo con *Saccharomyces cerevisiae* con agua cruda del Riachuelo, (A) ensayo de 24 h; (B) ensayo de 48 h. Volumen ensayado: 0:4 ml de suspensión de levadura 10^8 células/ml+1 ml de solución amortiguadora; 1, 0.5 y 0.1 ml SL+1 ml de agua pura o diluida al 50% ó 10% respectivamente con una solución amortiguadora. CG: frecuencia de conversión génica $\times 10^4 \pm DS$; R: frecuencia de reversión génica $\times 10^5 \pm DS$

do más arriba como debida a la ausencia de activación microsómica que, según Mazza (1982), no puede utilizarse en este sistema. En *Saccharomyces cerevisiae* D7, los extractos no indujeron reversión génica pero sí conversión génica. Este efecto está relacionado con la eficiencia de los sistemas de reparación de la molécula dañada de ADN (Zimmermann *et al.* 1975) y posiblemente su origen sea similar al de la inducción de corrimiento en el marco de lectura observado en el ensayo de Ames. Debe recordarse que si bien no se utilizó fracción microsómica exógena, las levaduras poseen citocromos similares al P450 humano (Del Carratore *et al.* 1983).

Con respecto al ensayo con *Allium cepa*, el agua de Riachuelo indujo un alto porcentaje de anafases y de metafases anormales. En dichas anomalías predominaron los cromosomas con efecto c mitótico leve (Fiskejő 1985) y los cromosomas con el centrómero inactivado (Gomez-Arroyo y Villalobos-Pietrini 1983). Estos valores indican una toxicidad baja, posiblemente reversible, que no afecta el crecimiento lo que se observa al comparar las longitudes de las raíces con respecto al testigo. En estudios similares, otros autores, han adjudicado este tipo de anomalías a la presencia de metales pesados en efluentes.

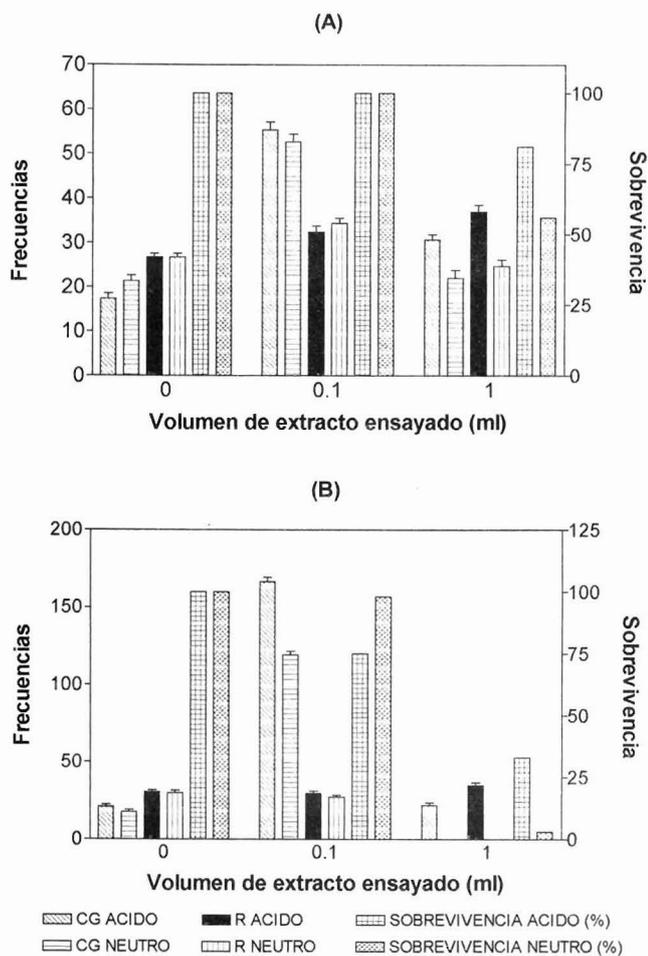


Fig. 9. Ensayo con *Saccharomyces cerevisiae* con extractos del agua del Riachuelo, (A) ensayo de 4h; (B) ensayo de 24 h. Volumen ensayado: 0:4 ml de suspensión de levadura 10^8 células/ml (SL)+1 ml de solución amortiguadora; 1, 0.5 y 0.1:4 ml SL+1 ml de extracto diluido al 50% ó 10% respectivamente con solución amortiguadora. CG: frecuencia de conversión génica $\times 10^4 \pm DS$; R: frecuencia de reversión génica $\times 10^5 \pm DS$

Somashekar y Gowda (1983) utilizando este sistema, atribuyeron la disminución en el índice mitótico y la producción de efectos sobre el huso como c-mitosis, a metales pesados presentes en efluentes de industrias de colorantes. En las aguas del Riachuelo, la concentración detectada de la mayoría de los metales pesados, no es suficiente para producir daño cromosómico. La única excepción es el mercurio (Tabla IV) que debería inducir marcada citotoxicidad e incremento en el número de cromosomas pegajosos (Fiskesjö 1988). La ausencia de estos efectos permite suponer que la mayor parte del mercurio detectado se encuentra en forma combinada no activa biológicamente. Este ensayo resultó más sensible que los microbiológicos para detectar efecto genotóxico en aguas crudas. Un resultado similar fue obtenido por Villalobos-Pietrini *et al.* (1994) quienes determinaron en los meristemos de la raíz de *Vicia faba* la inducción de aberraciones cromosómicas por algunos sedimentos de los ríos del sistema hidrológico Atoyac-Zahuapan en Tlaxcala, México.

Los resultados obtenidos con algas siguen un patrón similar a los de los datos químicos analizados y los ICA calculados, lo que indicó cierta homogeneidad en las características del agua en el tramo del río estudiado con variaciones a lo largo del año. Estas variaciones pueden deberse al régimen del caudal del río, a los efectos de marea y al caudal de descargas industriales en el momento de la toma de las muestras. El ensayo con *S. capricornutum* mostró una particular especificidad para la detección de metales pesados. Keddy *et al.* (1994) encontraron que en este sistema, la CI_{50} para metales como zinc y cromo (VI) era $52.6 \mu\text{g/l}$ y $129.7 \mu\text{g/l}$, respectivamente. La concentración de estos metales detectada en las aguas del Riachuelo fue muy superior a estos valores (Tabla IV) aún así los porcentajes de inhibición (% I) obtenidos con *S. capricornutum* fueron más bajos que lo esperado. Estos datos corroboran lo ya discutido para el ensayo con *Allium cepa* en el sentido de que gran parte de los metales tóxicos se encuentran combinados formando compuestos de baja biodisponibilidad. Por otra parte, Warren y Zimmermann (1994), demostraron que en las aguas de un río contaminado existe una correlación positiva entre la temperatura y el grado de adsorción de metales pesados a partículas lo que se supone debería afectar su actividad biológica. En el presente trabajo no se observaron variaciones en los % I en las muestras tomadas en invierno (temperaturas medias 14.25°C) y en verano (temperaturas medias 26.75°C) lo que descarta este factor como fuente importante de alteraciones en la actividad biológica. Las diferencias en los % I pueden adjudicarse a un conjunto de causas entre las que merecen mencionarse el régimen del caudal del río, los efectos de la marea y el volumen de descargas industriales en el momento de la toma de muestra. Los resultados de un estudio aún no publicado manifestaron una correlación negativa significativa entre el caudal del río, los sólidos en suspensión en agua y el % I para todo el curso Matanza-Riachuelo. Estos datos marcan la importante interacción que existe entre los metales pesados y las partículas en suspensión en las aguas en estudio.

CONCLUSIONES

A pesar de los altos niveles de contaminantes registrados en el Riachuelo las aguas crudas no mostraron efecto genotóxico, los resultados positivos aparecieron únicamente después de la aplicación de técnicas de concentración adicional. Teniendo en cuenta que los microorganismos utilizados en estos ensayos han sido modificados para incrementar su sensibilidad a sustancias genotóxicas puede concluirse que existen pocas probabilidades de que la flora microbiana presente naturalmente en estas aguas pueda sufrir alteraciones en su ADN. La presencia de sustancias en los concentrados que resultan genotóxicas luego de una activación microsómica debe considerarse como un riesgo para los vertebrados. Un caso diferente resultó en los estudios con células eucarióticas en división activa como las de *Allium cepa* donde las aguas de este río indujeron gran cantidad de aberraciones cromosómicas. En particular, el uso de *S.*

capricornutum para la evaluación de agentes tóxicos metálicos permitió comprobar que, si bien el sistema era adecuado, la respuesta biológica obtenida estaba por debajo de lo esperado considerando las concentraciones de metales detectadas en el curso. Resultó así de suma utilidad como marcador de la biodisponibilidad de dichos tóxicos.

Teniendo en cuenta lo expresado pueden recomendarse como ensayos simples, rápidos y económicos para utilizar en muestras de agua cruda los de *Allium cepa* y *Selenastrum capricornutum*. Para obtener mayor información acerca de la evolución de los genotóxicos presentes se deberían realizar periódicamente determinaciones con sistemas microbianos utilizando extractos de agua. Las técnicas biológicas citadas pueden considerarse adecuadas y suficientes para controlar la marcha del proceso de depuración del curso en estudio.

RECONOCIMIENTOS

Este trabajo fue parcialmente financiado con el subsidio FA 092 de la Universidad de Buenos Aires.

REFERENCIAS

- Abe A. y Urano K. (1994). Influence of chemicals commonly found in a water environment on the *Salmonella* mutagenicity test. *Sci. Total Environ.* 153, 169-175.
- Andrade F. J. y Troccoli O. E. (1993). Estudio de la contaminación por cromo en aguas del Río de La Plata. En: Jornadas multidisciplinarias de becarios de investigación, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires.
- APHA, AWWA y WPCF (1985). Standard Methods for the examination of waters and wastewater. American Public Health Association, Washington D. C., 1268 p.
- Berón L. (1984). Evaluación de la calidad de las aguas de los ríos de la Plata y Matanza-Riachuelo mediante la utilización de índices de calidad de agua. Secretaría de Vivienda y Ordenamiento Ambiental, Ministerio de Salud y Acción Social, Buenos Aires, 51 p.
- CEAMSE (1994). Respuesta para el saneamiento de la cuenca del Río Matanza-Riachuelo. Gerencia de Ingeniería, Coordinación Ecológica Area Metropolitana Sociedad del Estado, Buenos Aires, 178 p.
- Daniel W. W. (1978). *Applied non parametric statistics*. Houghton Mifflin, Boston, 513 p.
- Del Carratore R., Bronzetti G, Bauer C., Corsi C., Nieri R., Paolini M. y Giagoni P. (1983). Cytochrome P-450 factors determining synthesis in strain D7 *Saccharomyces cerevisiae*. An alternative system to microsomal assay. *Mutat. Res.* 121, 117-123.
- Fiskesjö G. (1985). The *Allium* test as a standard environmental monitoring. *Hereditas* 102, 99-112.
- Fiskesjö G. (1988). The *Allium* test as an alternative in environmental studies: the relative toxicity of metal ions. *Mutat. Res.* 197, 243-260.
- García M. E., Castañe P.M., Demichelis S. O., Ferrari L. y Topalián M. L. (1996). Indicadores de polución en el agua del río Reconquista monitoreo de otoño. En: Cuencas Hídricas, Gobernación de la Provincia de Buenos Aires, Buenos Aires, pp. 121-123.
- Joubert G. (1980). A bioassay application for quantitative toxicity measurements using the green algae *Selenastrum capricornutum*. *Water Res.* 14, 1759-1763.
- Keddy C., Greene J.C. y Bonnell M.A. (1994). A review of whole organism bioassays for assessing the quality of soil, freshwater sediment, and freshwater in Canada. Scientific Series No. 19. Ecosystem Conservation Directorate. Evaluation and Interpretation Branch, Ottawa, Ontario, Canadá, 185 p.
- Lacoste C. y Collasius D. (1996). Instrumentos de diagnóstico ambiental: índice de calidad de agua. *Gerencia Ambiental* 24, 286-293.
- Liu C., Jiang W. y Li M. (1992). Effects of trivalent and hexavalent chromium on root growth and cell division of *Allium cepa*. *Hereditas* 117, 23-29.
- López L. C. y Moretton J. (1997). Influencia de factores abióticos presentes en el río de La Plata sobre la genotoxicidad del cromo. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 13, 7-13.
- Mackereth F., Heron J. y Talling J. (1978). Water analysis: some revised methods for limnologists. *Freshwater Biological Assoc. Sci. Pub.* 36, Kendal, 117 p.
- Maron D. M. y Ames B. N. (1983). Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.* 113, 173-215.
- Mazza G. y Galizzi A. (1980). Test di danno e riparazione del DNA in *Bacillus subtilis*. En: *Mutagenesi Ambientale. Metodiche di Analisi*. (G. E. Magni, Ed.). Consiglio Nazionale delle Ricerche, Roma, Vol 2, pp 159-178.
- Mazza G. (1982). *Bacillus subtilis* "rec Assay" Test with isogenic strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 43, 177-184.
- Miller W.E., Greene J.C. y Shiroyama T. (1978). The *Selenastrum capricornutum* Printz algal assay bottle test. Experimental design, application, and data interpretation protocol. EPA-600/9-78-018 U.S. Environmental Protection Agency, Washington D.C., 126 p.
- Minotti P. y Málvarez A. Y. (1989). Estructura de las asociaciones de peces del bajo delta como indicadora de los principales condicionantes ambientales. En: Expobeca UBA, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, 47 p.
- Moretton J., Baro P., Zelazny A. y D'Aquino M. (1990a). Detection of genotoxicity in a polluted watercourse using a yeast system. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 45, 25-30.
- Moretton J., Baro P., Zelazny A., Nuccetelli A. y D'Aquino M. (1990b). Estudio de genotoxicidad de las muestras de lodo de un río contaminado por efluentes industriales. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 6, 55-68.
- Ong T., Mukhtar M., Wolf C. y Zeiger E. (1980). Differential effect of cytochrome P-450 inducer on promutagen activation capabilities and enzymatic activities of S9 from rat liver. *J. Environ. Pathol. Toxicol.* 4, 55-65.

- Sirover M. A. (1981). Effects of metals in *in vitro* bioassays. *Environ. Health Perspect.* 40, 163-172.
- Somashekar R. K. y Gowda M. T. G. (1983). Cellular damage induced by food processing industry waste waters in *Allium cepa*. *Cur. Sci.* 52, 317-319.
- Strickland J. y Parsons T. (1960). A practical handbook for seawater analysis. Bulletin 125. J. Fish. Res. Bd. Can., Ottawa, Canadá, 185 p.
- Vainio H. y Sorsa M. (1981). Chromosome aberrations and their relevance to metal carcinogenesis. *Environ. Health Perspect.* 40, 173-180.
- Vázquez M. A. y Moretton J. (1995). Detección de agentes genotóxicos en efluentes de la industria gráfica. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 11, 99-103.
- Villalobos-Pietrini R., Flores-Márquez A. R. y Gómez-Arroyo S. (1994). Cytogenetic effects in *Vicia faba* of the polluted water from rivers of the Tlaxcala hydrological system, Mexico. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 10, 83-88.
- Warren L. A. y Zimmermann A. P. (1994). The influence of temperature and NaCl on cadmium, copper and zinc partitioning among suspended particulate and dissolved phases in an urban river. *Water Res.* 28, 1921-1931.
- 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.