

## ORIGINAL

## EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD MUTAGÉNICA DE AGUAS DE CONSUMO PÚBLICO POR MEDIO DEL TEST DE AMES

Romana Albaladejo Vicente, Rosa Villanueva Orbaiz, Paloma Ortega Molina, Paloma Astasio Arbiza, Angel Gil Miguel, Belén Granados Arroyo, M.<sup>a</sup> Elisa Calle Puron y Vicente Domínguez Rojas

Cátedra de Medicina Preventiva y Salud Pública. Universidad Complutense de Madrid.

## RESUMEN

**Fundamento:** En nuestro medio ambiente existen múltiples fuentes de mutágenos potenciales, pero una de las más importantes es el agua de consumo público, siendo el proceso de cloración de la misma el principal responsable de la aparición de dichos compuestos. Por ello, el objetivo de este trabajo fue comprobar la posible existencia de actividad mutagénica en concentrados orgánicos de aguas de consumo público de Madrid, por medio del test de Ames.

**Métodos:** Se han utilizado varias cepas bacterianas, TA1535, TA1538, TA98 y TA100, de *Salmonella* histidina dependientes, derivadas originalmente de *Salmonella typhimurium* LT2. Cada ensayo se realizó por duplicado, con y sin la incorporación de la fracción microsomal (S9 mix), de acuerdo con el protocolo de Ames. El ensayo de mutagenicidad se llevó a cabo por medio del método de incorporación en placa. Todas las muestras de agua problema fueron procesadas y tratadas con el fin de concentrar los compuestos orgánicos clorados.

**Resultados:** Los mayores índices de mutagenicidad se obtuvieron con la cepa TA1535 y en las experiencias sin fracción microsomal (IM=1,94).

**Conclusiones:** Con respecto a la evaluación mutagénica de los concentrados orgánicos derivados del agua de consumo público, no hemos encontrado actividad mutagénica positiva con ninguna de las cepas de ensayo.

**Palabras clave:** Cloración aguas de consumo. Test de Ames. Test de Mutagenicidad. Derivados clorados. Concentrados aguas de consumo.

## ABSTRACT

## Evaluation of Mutagenic Activity in Drinking Water through Ames Test

**Background:** The sources of potential mutagens in our environment are many, but the most important of these is water for public consumption. This is a result of the chlorinating process which is the main reason for the appearance of these mutagens. With this in mind, the aim of our study was to check a possible mutagenic activity, using the Ames test, in organic concentrates taken from water for public consumption in Madrid.

**Methods:** Several bacterial strains were used, namely *Salmonella* histidine dependent TA1535, TA1538, TA98 and TA100, taken originally from *Salmonella typhimurium* LT2. Each test was performed twice, with or without the introduction of the mammalian-microsome activation (S9 mix), as per the indications in Ames. The plate incorporation assay was used to test the mutagenicity. All samples of the water in question were processed and treated so as to create concentrates of organic chlorinated compounds.

**Results:** The highest levels of mutagenicity appeared in the TA1535 strain and in the tests where the microsome fraction was not used (IM=1,94).

**Conclusions:** With regard to mutagenic evaluation in organic concentrates taken from water for public consumption, no positive activity was found in any of the tester strains.

**Key Words:** Chlorinated Drinking Water. Ames Test. Mutagenicity Test. Chlorination by-Products. Drinking Water Concentrates.

## INTRODUCCIÓN

Desde el año 1973 el Programa de Naciones Unidas para el Medio Ambiente tiene planteado, como uno de sus principales objetivos<sup>1</sup>, la identificación de nuevos riesgos para la salud del hombre mediante el examen de todas las nuevas sustancias que se incorporan al medio ambiente.

Correspondencia:  
Romana Albaladejo Vicente  
Cátedra de Medicina Preventiva y Salud Pública  
Facultad de Medicina  
Universidad Complutense. Ciudad Universitaria  
28040 Madrid. España  
FAX: 341-394152

En este sentido, la prevención de la carcinogénesis ambiental está estrechamente ligada con nuestra capacidad para valorar la posible actividad cancerígena para el hombre de las sustancias químicas.

Por ello, en la actualidad el estudio de carcinogenicidad potencial de un producto químico se basa en la utilización de todos los medios a nuestro alcance, comenzando por ensayos de mutagenicidad para continuar con experimentación en animales y, por último, estudios epidemiológicos sobre poblaciones expuestas al mismo<sup>2</sup>.

Existen múltiples fuentes de mutágenos potenciales, pero una de las más importantes es el agua de consumo público y, en este sentido, en la última década han aparecido en la literatura numerosas publicaciones<sup>3-7</sup>, que indican la presencia de actividad genotóxica en los concentrados orgánicos derivados de aguas potables de consumo público.

En lo que se refiere al problema que nos atañe, el de los derivados clorados, sabemos que el cloro es, desde hace 60 años, el desinfectante químico más utilizado en el mundo occidental para potabilizar aguas de consumo público<sup>8</sup>.

Bajo ciertas condiciones, el cloro libre reacciona con determinados precursores presentes en el agua potable, produciendo un grupo de compuestos que incluyen carcinógenos humanos sospechosos<sup>9</sup> y, por ello, las normativas internacionales exigen su control<sup>10</sup>.

Desafortunadamente, la tarea de atribuir niveles mutagénicos concretos a contaminantes específicos se ha mostrado muy difícil. Actualmente se asume que la actividad mutagénica del agua potable puede ser debida a la acción acumulada de un gran número de compuestos, o puede atribuirse principalmente a unos pocos compuestos, pero de gran potencia<sup>4</sup>.

Una confirmación de la última posibilidad ha venido tras la identificación en los últimos años del 3-cloro-4-(diclorometil)-5-hi-

droxi-2(5H) furanona, conocido como MX, y de su isómero E-2-cloro-3-(diclorometil)-4-ácido oxobutenoico (E-MX)<sup>11,12</sup>.

El MX es un potente y directo mutágeno en el test de Ames y su contribución a la actividad mutagénica total fue de entre el 15% y el 34%, aunque los niveles de hecho del MX presentes en el agua problema fueron sólo de 2-34 ng/l<sup>1</sup>.

Dada la preocupación existente sobre la presencia de mutágenos, considerados como posibles carcinógenos y como agentes inductores de mutaciones hereditarias<sup>13</sup>, ha surgido una importante polémica sobre si la exposición crónica, a lo largo de la vida, a los mutágenos químicos contenidos en el agua de consumo, supone un riesgo real para la salud<sup>14</sup>.

Una revisión de los estudios epidemiológicos publicados sobre el tema, realizada por Craun y otros autores<sup>15-19</sup>, llegaba a la conclusión de que la información aportada por dichos estudios reforzaba la asociación entre el cáncer en general, especialmente el cáncer de vejiga, recto y colon, con el consumo de agua desinfectada con cloro.

Ahora bien, como ya hemos comentado, para valorar la posible actividad mutagénica de estos derivados clorados se pueden utilizar distintos tipos de estudios, entre los que se encuentran los test rápidos *in vivo* e *in vitro*. Dado que los ensayos habituales en animales de experimentación requieren mucho tiempo y dinero<sup>20</sup>, se hacía necesaria otra alternativa. En 1975, Ames y sus colaboradores de la Universidad de Berkeley desarrollaron el ensayo bacteriano *Salmonella*/hígado de mamífero, más conocido como test de Ames<sup>21,22</sup>, que es, a partir de entonces, el test utilizado como criterio referencial y el más usado en los laboratorios de todo el mundo, motivo por el cual lo hemos seleccionado como soporte fundamental de nuestro estudio.

Ante todos los hechos expuestos, nos hemos propuesto, como objetivo de este traba-

jo, comprobar la existencia de actividad mutagénica en concentrados orgánicos derivados de aguas de consumo público de una ciudad mayor de 100.000 habitantes (Madrid capital), utilizando para ello el test de Ames.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### 1. Material biológico

En el test de Ames se utiliza una colección de cepas de *Salmonella* histidina dependientes, que derivan originalmente de *Salmonella typhimurium* LT2 y que poseen un tipo de mutación distinto en el operón histidina<sup>21</sup>, de forma que requieren dicho aminoácido en el medio de crecimiento, porque son incapaces de sintetizarlo.

Todas las cepas de *Salmonella typhimurium*, utilizadas en este ensayo, TA1535, TA1538, TA100 y TA98, han sido cedidas por B. N. Ames, del Departamento de Bioquímica de la Universidad de Berkeley, California.

Las cepas TA1535 y TA100 son mutantes his G46, que presentan una sustitución de pares de bases en el operón histidina; además, son cepas con deficiencias en el mecanismo de escisión/replicación (mutación *uvrB*) y portan la mutación *rfa* que hace que sean más permeables a las macromoléculas. En el caso de la cepa TA100, presenta además el plásmido PKM 101 (factor R), que le confiere resistencia a la ampicilina y aumenta la probabilidad de duplicación con error del ADN<sup>23</sup>.

La cepa TA1538 es un mutante his D3052, resultado de la delección de un par de bases en el operón de la histidina (mutación *frameshift*)<sup>24,25</sup>, presentando también las mutaciones *uvrB* y *rfa*, antes descritas.

Por su parte, la cepa TA98 tiene las mismas características genéticas que la TA1538 de la que deriva, con excepción de la presencia del plásmido PKM 101, que le confiere una mayor susceptibilidad para la reparación con tendencia a error del ADN.

Además, en los ensayos con activación enzimática se utilizó la fracción microsomal de hígado de rata, más conocida como S9 mix. Esta preparación se obtuvo de IFFA CREDO, que la comercializa como "S9 Fraction" y emplea, como inductor enzimático, Aroclor administrado a ratas macho "SD-OFA", a una concentración de 500 mg/Kg de peso.

### 2. Muestras de agua

En primer lugar se realizó un *preensayo*, que abarcó un muestreo de tomas de agua del sistema de distribución del área de estudio y, dado que tras analizar dichas muestras no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la calidad del agua entre las distintas zonas, se decidió realizar el *ensayo* recogiendo el agua de un único punto, en este caso, del distrito de Moncloa.

Las tomas se efectuaron directamente del sistema de distribución y según la normativa legal vigente en nuestro país<sup>26</sup>. El tiempo de recogida abarcó desde octubre de 1991 a junio de 1992.

Las muestras de estudio se concentraron y procesaron como se describe posteriormente y se clasificaron en tres grupos:

- Muestra 1: Concentrado de 5 litros de agua
- Muestra 2: Concentrado de 10 litros de agua
- Muestra 3: Concentrado de 20 litros de agua

### 3. Tratamiento de las muestras problema

Según la reglamentación en vigor<sup>26</sup>, el pH normal del agua potable debe estar en un nivel de 6,5 - 8,5. En nuestro estudio el pH se midió por medio de un indicador en vari-

llas, siendo en todos los casos un pH neutro y dentro de los niveles que marca la legislación, por lo que nuestro experimento se realizó en las condiciones naturales de las aguas de consumo público.

Todas las muestras fueron procesadas, con el fin de concentrar los solventes orgánicos que pudiesen contener, por medio del sistema Sep-Pak de Waters (Millipore), empleando el cartucho C18 Cartridge, diseñado especialmente para muestras disueltas en agua o en disolventes acuosos<sup>27</sup>.

Tras su concentración, se efectuó la extracción de los compuestos retenidos por medio de la aplicación sucesiva de tres tipos de disolventes (agua destilada, metanol y acetonitrilo)<sup>27</sup>, que se recogieron por separado y se procesaron individualmente en un rota-vapor hasta obtener un residuo seco en forma de polvo, que posteriormente se redisolvió en dimetilsulfóxido (DMSO) para su incorporación al ensayo.

#### 4. Métodos del test de Ames

En primer lugar, queremos resaltar que toda la experimentación se realizó de acuerdo con la metodología recomendada por Ames para ensayos básicos de mutagenicidad<sup>21</sup>.

Es esencial verificar antes de su utilización que las características de las cepas no han sufrido modificaciones, es decir, realizar un control de calidad de las bacterias, para lo cual se efectuaron los controles pertinentes, tal y como se detalla en el protocolo de Ames<sup>21,24</sup>.

Se llevaron a cabo dos ensayos de mutagenicidad y, paralelamente a cada uno, se realizó el control de toxicidad por medio del estudio de la supervivencia bacteriana y la respuesta ante testigos positivos o control positivo<sup>21</sup>.

Esta última técnica se realiza para confirmar la sensibilidad de las cepas ante mutáge-

nos conocidos. Se considera que una cepa responde adecuadamente a los controles positivos, cuando el número de revertantes inducidos por el mutágeno estándar duplica, al menos, los valores medios esperados de reversión espontánea de las mismas, que, en nuestro caso, se calcularon de acuerdo con las frecuencias de reversión espontáneas proporcionadas por De Serres y Shelby<sup>28</sup>.

En nuestro estudio se utilizaron como mutágenos estándar Azida sódica (cepas TA1535 y TA100) y 2-Nitrofluoreno (cepas TA98 y TA1538) en los ensayos sin S9 (S9-), y 2-Aminofluoreno en las experiencias con S9 (S9+) con todas las cepas<sup>24</sup>.

En cuanto al *ensayo de mutagenicidad*, se eligió el método de incorporación en placa, técnica recomendada por Ames como sistema de análisis estándar<sup>21</sup>, realizándose además con las dos variantes por él propuestas, con incorporación de activación enzimática (S9+) y sin S9 (S9-)<sup>21</sup>.

El método en síntesis consiste en mezclar la cepa bacteriana con la sustancia problema y en las experiencias con activación enzimática añadir además 0,5 ml de S9 mix; todo ello se vierte en una placa de agar glucosado de acuerdo con el protocolo de Ames<sup>21</sup>.

#### 5. Cuantificación del efecto mutagénico

En primer lugar, se calculó el *índice de mutación*, cociente resultante de dividir el número de colonias revertantes inducidas entre las colonias revertantes espontáneas.

El número de revertantes por placa corresponde en realidad a la media de los recuentos individuales, obtenidos de las tres placas que se siembran por cada nivel dosis, ya que, como describen McCann y Ames<sup>22</sup>, todas las experiencias se realizan por triplicado.

Para evaluar el índice de mutación se empleó la "regla de las dos veces"<sup>21</sup>, que se define como el incremento de dos veces sobre

el valor de la mutación espontánea, con lo que la estimación del índice se correspondería con las distintas anotaciones de cualidad:

- NM No mutagénico (índice menor de 1,5)
- LM Ligera mutación (índice entre 1,5-2)
- MP Mutación positiva (índice mayor o igual a 2)
- T Efecto tóxico

En segundo lugar, se ha utilizado el *análisis de la varianza de los datos (ANOVA)* <sup>29</sup>

para comparar las diferencias entre los grupos de muestras, debidas a las distintas concentraciones de los compuestos problema, y el *análisis de la varianza para medidas repetidas* <sup>29</sup>, con el fin de comprobar si las diferencias obtenidas al ensayar los productos, en ausencia y en presencia de S9, eran o no estadísticamente significativas.

## RESULTADOS

### 1. Cepa TA1535

Los resultados de los ensayos vienen recogidos en las tablas 1 y 2.

TABLA 1

Resultado del ensayo 1 con la cepa TA1535

Muestra	-S9				+S9			
	RV/P	M.R.	I.M.	C	RV/P	M.R.	I.M.	C
1	20	14,0	1,20	N.M.	24	19,3	0,87	N.M.
	10				22			
	12				12			
2	20	20,0	1,76	L.M.	16	19,6	0,89	N.M.
	24				22			
	16				21			
3	22	22,0	1,94	L.M.	38	22,6	1,02	N.M.
	20				16			
	24				44			
DMSO	21	11,3		N.M.	19	22,0		N.M.
	8				17			
	15				30			
ME	20	19,6			20	23,3		
	11				22			
	32				28			

ANOVA

F = 1,035 p = 0,436

F = 1,32 p = 0,33

ANOVA DE MEDIDAS REPETIDAS

F(M) = 1,92 p = 0,1467

F(S9) = 3,59 p = 0,0728

F(C) = 0,51 p = 0,7280

Muestra : Muestras problema.

RV/P : Colonias revertantes/placa.

M.R. : Media tres determinaciones colonias revertantes.

I.M. : Índice de mutación

C : Cualidad: N.M. no mutagénico; L.M. ligera mutación.

DMSO : Control con dimetilsulfóxido.

ME : Mutación espontánea.

**TABLA 2**  
**Resultado del ensayo 2 con la cepa TA1535**

Muestra	-S9				+S9			
	RV/P	M.R.	I.M.	C	RV/P	M.R.	I.M.	C
1	21	15,3	1,12	N.M.	16	11,6	0,71	N.M.
	13				19			
	12				10			
2	24	23,3	1,71	L.M.	20	20,3	1,02	N.M.
	26				25			
	20				16			
3	25	24,3	1,80	L.M.	20	19,6	1,20	N.M.
	24				21			
	24				18			
DMSO	20	13,6		N.M.	21	16,3		N.M.
	10				9			
	11				19			
ME	12	12,3			13	15,0		
	14				17			
	11				15			

ANOVA

F = 7,108 p = 0,0056

F = 1,109 p = 0,404

## ANOVA DE MEDIDAS REPETIDAS

F(M) = 6,30 p = 0,0019

F(S9) = 0,14 p = 0,7190.

F(C) = 1,05 p = 0,4055

Muestra : Muestras problema.

RV/P : Colonias revertantes/placa.

M.R. : Media tres determinaciones colonias revertantes.

I.M. : Índice de mutación

C : Calidad: N.M. no mutagénico; L.M. ligera mutación.

DMSO : Control con dimetilsulfóxido.

ME : Mutación espontánea.

En todas ellas, se especifican los valores de los siguientes parámetros: RV/P, número de colonias revertantes por placa; M.R, media de colonias revertantes; I.M, índice de mutagenicidad; y C, cualidad que refleja el valor del índice.

En las *experiencias sin S9* (-S9), se observa un ligero incremento en el número de revertantes por placa en las muestras que representan las mayores concentraciones, muestras 2 y 3, con respecto a la muestra 1 y a los controles.

Asimismo, se aprecia un aumento de los índices de mutagenicidad conforme lo hace

la concentración de las muestras problema, alcanzando la cualidad "Ligera mutagenicidad" con las muestras 2 y 3 e incluso, en el caso de esta última, rozando la "Mutación positiva" (I.M.=1,94, ensayo 1).

Los resultados de los test estadísticos fueron, como se puede ver en las tablas, variables entre los dos ensayos.

En cuanto a la *experiencia con S9* (+S9), se obtuvieron índices de mutación netamente inferiores, siendo todos ellos "no mutagénicos".

Al realizar el análisis de varianzas para medidas repetidas, con el fin de comparar

los resultados de ambos estudios, con y sin fracción microsomal, éstos fueron no significativos, por lo que podemos afirmar que las distintas concentraciones de las muestras de estudio no influyen de forma estadísticamente significativa en el número de colonias revertantes por placa, en función de la presencia o ausencia de S9.

## 2. Cepa TA100

Los resultados se expresan en las tablas 3 y 4.

En la experiencia sin S9 (-S9) se observa

un aumento en el número de revertantes y en los índices de mutagenicidad conforme aumenta la concentración de las muestras, siendo sin embargo todos ellos "No mutagénicos", excepto en el ensayo 1 (muestra 3), que nos proporcionó un índice de 1,53 ("Ligera mutagenicidad").

En el experimento paralelo con S9 (+S9) se aprecia la disminución de los valores de los índices de mutagenicidad en todos los ensayos.

Los resultados de los test estadísticos fueron variables en los dos ensayos y el análisis de la varianza para medidas repetidas fue no significativo.

**TABLA 3**  
**Resultado del ensayo 1 con la cepa TA100**

Muestra	-S9				+S9			
	RV/P	M.R.	I.M.	C	RV/P	M.R.	I.M.	C
1	94	112,0	1,10	N.M.	94	103,6	0,94	N.M.
	116				81			
	126				136			
2	146	140,0	1,44	N.M.	100	108,3	0,99	N.M.
	136				113			
	138				112			
3	147	148,6	1,53	L.M.	103	113,3	1,03	N.M.
	145				112			
	154				125			
DMSO	83	97,0		N.M.	127	109,3		N.M.
	103				118			
	105				83			
ME	100	110,0			110	106,6		
	110				120			
	120				90			

ANOVA

F = 14,787 p = 0,0003

F = 0,107 p = 0,978

ANOVA DE MEDIDAS REPETIDAS

F(M) = 3,89 p = 0,0171

F(S9) = 6,32 p = 0,0200

F(C) = 2,60 p = 0,0672

Muestra : Muestras problema.

RV/P : Colonias revertantes/placa.

M.R. : Media tres determinaciones colonias revertantes.

I.M. : Índice de mutación

C : Calidad: N.M. no mutagénico; L.M. ligera mutación.

DMSO : Control con dimetilsulfóxido.

ME : Mutación espontánea.

**TABLA 4**  
**Resultado del ensayo 2 con la cepa TA100**

Muestra	-S9				+S9			
	RV/P	M.R.	I.M.	C	RV/P	M.R.	I.M.	C
1	90	108,3	1.09	N.M.	94	102,0	0,94	N.M.
	115				82			
	120				130			
2	138	138,0	1.39	N.M.	100	106,0	0,97	N.M.
	140				110			
	136				108			
3	145	143,3	1.44	N.M.	104	112,3	1,03	N.M.
	146				108			
	139				125			
DMSO	82	99,0		N.M.	115	108,3		N.M.
	110				120			
	105				90			
ME	103	105,6			115	112,6		
	106				109			
	108				114			

ANOVA

F = 12,188 p = 0,0007

F = 0,288 p = 0,8791

ANOVA DE MEDIDAS REPETIDAS

F(M) = 4,47 p = 0,0096

F(S9) = 5,43 p = 0,0303

F(C) = 3,87 p = 0,1740

Muestra : Muestras problema.

RV/P : Colonias revertantes/placa.

M.R. : Media tres determinaciones colonias revertantes.

I.M. : Índice de mutación

C : Calidad: N.M. no mutagénico; L.M. ligera mutación.

DMSO : Control con dimetilsulfóxido.

ME : Mutación espontánea.

### 3. Cepa TA1538

Los resultados de los dos ensayos se recogen en las tablas 5 y 6.

En la *experiencia sin S9* se observó un aumento en el número de los revertantes inducidos en la muestra 3, respecto a las de menor concentración y los controles.

La misma regla siguieron los índices de mutación, resultando todos ellos calificados como "no mutagénicos" al no alcanzar el valor 2.

El ANOVA calculado para comprobar si

las diferencias obtenidas se relacionaban con las distintas concentraciones, resultó en todos los casos no significativo.

En el *estudio con S9* (S9+) se repitieron los resultados anteriores, sin apreciarse grandes diferencias. Tampoco hubo variaciones, en cuanto al número de revertantes inducidos, al comparar el ensayo con y sin la activación metabólica (S9), dato que se confirma al realizar el análisis de la varianza para medidas repetidas, comprobándose que el resultado no varía en función de la presencia o ausencia de S9.

TABLA 5

## Resultado del ensayo 1 con la cepa TA1538

Muestra	-S9				+S9			
	RV/P	M.R.	I.M.	C	RV/P	M.R.	I.M.	C
1	23	27,0	1,09	N.M.	8	13,6	1,08	N.M.
	24				12			
	34				21			
2	34	25,3	1,02	N.M.	12	15,0	1,19	N.M.
	24				14			
	18				19			
3	41	32,6	1,32	N.M.	19	16,3	1,30	N.M.
	26				17			
	31				13			
DMSO	17	24,6		N.M.	22	12,6		N.M.
	23				12			
	34				4			
ME	21	14,6			20	16,0		
	13				22			
	10				6			

ANOVA

F = 2,380 p = 0,12

F = 0,351 p = 0,84

ANOVA DE MEDIDAS REPETIDAS

F(M) = 1,22 p = 0,3300

F(S9) = 16,16 p = 0,0007

F(C) = 1,45 p = 0,2451

Muestra : Muestras problema.

RV/P : Colonias revertantes/placa.

M.R. : Media tres determinaciones colonias revertantes.

I.M. : Índice de mutación

C : Cualidad: N.M. no mutagénico; L.M. ligera mutación.

DMSO : Control con dimetilsulfóxido.

ME : Mutación espontánea.

TABLA 6

## Resultado del ensayo 2 con la cepa TA1538

Muestra	-S9				+S9			
	RV/P	M.R.	I.M.	C	RV/P	M.R.	I.M.	C
1	31	25,3	1,07	N.M.	8	14,6	1,16	N.M.
	21				14			
	24				22			
2	30	26,0	1,10	N.M.	16	16,6	1,31	N.M.
	26				14			
	22				20			
3	35	32,3	1,37	N.M.	20	16,6	1,32	N.M.
	30				15			
	32				15			
DMSO	20	23,6		N.M.	17	16,6		N.M.
	21				10			
	30				11			
ME	20	21,6			13	14,3		
	18				14			
	27				16			

ANOVA

F = 2,857 p = 0,0811

F = 0,518 p = 0,724

ANOVA DE MEDIDAS REPETIDAS

F(M) = 2,32 p = 0,0924

F(S9) = 47,29 p = 0,0000

F(C) = 0,77 p = 0,5583

Muestra : Muestras problema.

RV/P : Colonias revertantes/placa.

M.R. : Media tres determinaciones colonias revertantes.

I.M. : Índice de mutación

C : Cualidad: N.M. no mutagénico; L.M. ligera mutación.

DMSO : Control con dimetilsulfóxido.

ME : Mutación espontánea.

#### 4. Cepa TA98

Como se puede ver en las tablas 7 y 8, en ambos ensayos, con y sin S9, el mayor número de colonias revertantes inducidas se obtuvo con la muestra 2. En cuanto a los índices de mutación, el mayor valor correspondió asimismo a la muestra 2, que se relaciona con la concentración intermedia, siendo todos ellos “no mutagénicos”.

En cuanto al análisis estadístico, se calculó el ANOVA, que fue variable en ambos casos.

No se apreciaron diferencias estadísticamente significativas en los valores, tanto del número de revertantes por placa como de los índices de mutación, al repetir la experiencia añadiendo la fracción microsomal tal y como se refleja en las tablas de resultados.

**TABLA 7**  
**Resultado del ensayo I con la cepa TA98**

Muestra	-S9				+S9			
	RV/P	M.R.	I.M.	C	RV/P	M.R.	I.M.	C
1	33	32,3	0,96	N.M.	11	19,0	0,90	N.M.
	33				21			
	31				25			
2	56	45,0	1,33	N.M.	20	22,0	1,04	N.M.
	40				23			
	39				23			
3	35	32,6	0,97	N.M.	12	14,3	0,68	N.M.
	26				21			
	37				10			
DMSO	34	33,6		N.M.	17	21,0		N.M.
	27				19			
	35				27			
ME	26	29,3			16	18,6		
	32				15			
	30				25			

ANOVA

F = 3,653 p = 0,044

F = 0,886 p = 0,506

ANOVA DE MEDIDAS REPETIDAS

F(M) = 3,21 p = 0,0343

F(S9) = 57,75 p = 0,0000

F(C) = 1,39 p = 0,2727

Muestra : Muestras problema.

RV/P : Colonias revertantes/placa.

M.R. : Media tres determinaciones colonias revertantes.

I.M. : Índice de mutación

C : Cualidad: N.M. no mutagénico; L.M. ligera mutación.

DMSO : Control con dimetilsulfóxido.

ME : Mutación espontánea.

TABLA 8

Resultado del ensayo 2 con la cepa TA98

Muestra	-S9				+S9			
	RV/P	M.R.	I.M.	C	RV/P	M.R.	I.M.	C
1	36	31,3	1,09	N.M.	12	15,3	0,80	N.M.
	26				14			
	32				20			
2	32	34,6	1,21	N.M.	22	20,3	1,07	N.M.
	36				21			
	36				18			
3	36	29,3	1,02	N.M.	16	18,6	0,98	N.M.
	32				18			
	20				22			
DMSO	28	28,6		N.M.	15	19,0		N.M.
	28				16			
	30				26			
ME	38	29,3			19	21,0		
	16				27			
	34				17			

ANOVA

F = 0,377 p = 0,8200

F = 0,752 p = 0,5791

ANOVA DE MEDIDAS REPETIDAS

F(M) = 0,50 p = 0,7364

F(S9) = 31,20 p = 0,0000

F(C) = 0,47 p = 0,7574

Muestra : Muestras problema.

RV/P : Colonias revertantes/placa.

M.R. : Media tres determinaciones colonias revertantes.

I.M. : Índice de mutación

C : Cualidad: N.M. no mutagénico; L.M. ligera mutación.

DMSO : Control con dimetilsulfóxido.

ME : Mutación espontánea.

## 5. Controles positivos

Los resultados de los controles con los mutágenos estándar vienen recogidos en la tabla 9, en la que se expresan los índices medios de mutación con los patrones positivos, en presencia y en ausencia de S9.

Se puede apreciar que todas las cepas respondieron adecuadamente a los mismos, ya que el número de revertantes inducidos por el agente empleado como control positivo duplica, al menos, la media esperada de mutación espontánea.

TABLA 9

Resultados índices medios de mutación con patrones positivos

Cepa	Sin S9+	Con S9+
TA98	25,51	> 63,19
TA100	6,40	> 12,78
TA1535	43,01	> 105,96
TA1538	69,63	> 69,63

## DISCUSIÓN

En la actualidad existen más de 100 ensayos destinados a predecir el riesgo genotóxico de los productos químicos para el hombre. El que exista un número tan elevado de ensayos, indica claramente que ninguno de ellos, por sí solo, puede suministrar todos los datos necesarios para establecer dicho riesgo, siendo indispensable el uso de una batería de tests *in vivo* e *in vitro* <sup>24</sup>.

Los ensayos con *Salmonella typhimurium* constituyen el elemento base en la batería de estudios de mutagenicidad, y se han impuesto en la actualidad, tanto a nivel público como privado, para la realización del estudio básico de todo nuevo producto químico y, por ello, ha sido elegido como soporte de nuestro estudio.

En relación a la evaluación mutagénica de los concentrados orgánicos clorados, procedentes de las aguas de consumo público objeto de estudio, podemos destacar que no hemos encontrado actividad mutagénica positiva en ninguno de los ensayos con ninguna de las muestras problema.

Sin embargo, con la cepa TA1535 se alcanzaron valores de los índices de mutación próximos al valor 2, necesario para calificar a un producto como mutagénico; resultados semejantes, aunque inferiores, se obtuvieron con la otra cepa empleada en el estudio, TA100.

La cepa TA1535 es un mutante hisG46, es decir, que presenta una sustitución de pares de bases que afecta al operón histidina. La cepa TA100 posee las mismas características genotípicas de la TA1535 de la que procede. Ambas son, por tanto, cepas idóneas para detectar mutaciones que produzcan sustituciones de pares de bases <sup>23,25</sup>.

En este sentido, utilizando las otras dos cepas de estudio, TA1538 y TA98, que detectan mutaciones que ocasionan desplazamientos en el marco de lectura o desfase genético, los índices de mutación obtenidos

fueron menores, no alcanzando en ningún caso valores cercanos a 1,5 y no manteniendo, además, la tendencia a aumentar los revertantes con el aumento de la concentración de las muestras.

Ello nos puede hacer pensar que las mutaciones inducidas por los compuestos de ensayo se llevarían a cabo, probablemente, por un mecanismo de sustitución de pares de bases, punto en el cual coincidiríamos con la opinión de los autores <sup>30-33</sup>, que señalan a las cepas TA1535 y, especialmente, a la TA100, como las más sensibles para valorar los mutágenos contenidos en aguas de bebida.

En lo que respecta a la cuantificación de la actividad mutagénica, empleando como criterio la "regla de las dos veces" <sup>21</sup>, podemos afirmar que, con ninguna de las muestras ensayadas, los índices de mutagenicidad alcanzan la calificación "mutación positiva". Dicho criterio puede ser demasiado restrictivo en el caso de sustancias químicas no puras, y quizás sería recomendable repetir la experiencia empleando valores menos estrictos, al tratarse de muestras con muy bajas cantidades de mutágenos.

Otra de las desventajas que tiene el empleo de este baremo para valorar el efecto mutagénico es que, en el caso de cepas de mutación espontánea muy alta, como es el caso de la TA100, el incremento de dos veces sobre el valor de la reversión espontánea podría ser un requerimiento muy restrictivo para determinar el efecto positivo <sup>34</sup>. Por ello, muchos autores proponen aplicar para valorar la cepa TA100 el criterio de 100 revertantes en exceso de los controles, en vez de "la regla de las dos veces".

Quizá esto pueda explicar el hecho de que, en nuestro ensayo, los índices de mutagenicidad obtenidos con la cepa TA100 no hayan alcanzado los niveles de la cepa TA1535, que es de características genéticas muy similares.

No debemos, no obstante, olvidar que puede ocurrir que productos químicos geno-

tóxicos específicos den resultados negativos en estos tests preliminares.

Son numerosos los factores que pueden ser responsables de un falso negativo, entre los que destacaríamos la posible toxicidad de la sustancia<sup>33</sup>, la estructura química del compuesto, un inadecuado sistema de transporte y la imposibilidad del test de Ames para detectar aberraciones cromosómicas<sup>35-38</sup>

En cuanto al problema de toxicidad hemos de destacar que, de acuerdo con el protocolo de Ames, se ha llevado a cabo, paralelamente a cada ensayo, un estudio de la supervivencia bacteriana, no apreciándose toxicidad con ninguna de las muestras ensayadas.

Otro problema que puede disminuir la sensibilidad del test es el hecho de que se han identificado en las aguas de consumo más de 1.000 compuestos, la mayoría presentes en concentraciones inferiores a 1 microgramo/litro. En segundo lugar, más del 90% de ellos son volátiles y por tanto muy difíciles de analizar<sup>3</sup>.

Dada la dificultad de aislamiento de estos compuestos, es muy importante la elección del método de concentración de los mismos. Nosotros, a diferencia de otros autores<sup>39</sup>, hemos elegido el sistema Sep-Pak, debido a que opera como una cromatografía de columna, ahorra tiempo al permitir trabajar a presión, tiene un bajo consumo de disolventes y un bajo coste<sup>27</sup>.

De todas maneras, el sistema Sep-Pack, a pesar de sus ventajas, no deja de ser un sistema de aislamiento global de derivados, fundamentalmente de tipo orgánico. Dado que sabemos que el efecto mutagénico de las aguas cloradas difiere en función de la cantidad y tipo de materiales orgánicos presentes en las mismas, sería necesaria una evaluación exhaustiva del tipo y concentración de los compuestos contenidos en las muestras problema.

Aparte del problema de concentración de las muestras, otra dificultad añadida deriva

del método de ensayo utilizado. Ames propuso, como apoyo al método convencional de incorporación en placa, la utilización de la preincubación en el que la bacteria, la fracción microsomal y el compuesto de ensayo se incuban a una concentración superior, facilitándose la metabolización del agente<sup>21</sup>.

Precisamente en esto último nos basamos para elegir el método convencional en placa, ya que, según los autores que habían tratado el tema<sup>14</sup>, la mutagénesis derivada de aguas de bebida cloradas disminuía en presencia de S9, por lo que nos pareció más adecuado no preincubar los compuestos de ensayo.

Otra posible alternativa es utilizar el test de fluctuación<sup>40</sup>. El ensayo de fluctuación es aplicable, como apoyo al método convencional en placa, principalmente a aquellos productos cuya inestabilidad implique un corto tiempo de actuación sobre las bacterias, así como a los productos que causen un débil incremento sobre la mutación espontánea; sin embargo, este ensayo es más lento y presenta más dificultades de estandarización y realización que el ensayo convencional a la hora de utilizarlo como test de rutina<sup>41</sup>.

De todas maneras, en el caso de productos que incrementan el número de revertantes inducidos, aunque no lleguen a ser mutagénicos como en nuestro estudio, sería recomendable continuar la evaluación de dichos compuestos utilizando el test de fluctuación, empleando distintas concentraciones de S9, obtenido a su vez con distintos inductores enzimáticos, con el fin de aumentar la sensibilidad del experimento ante los mutágenos débiles.

En lo que se refiere a la fracción microsomal (S9), se observó una disminución de la actividad mutagénica, valorada por los índices de mutación en los ensayos con activación enzimática, con respecto a las experiencias sin S9. Este hecho también coincide con lo expresado por los autores que han estudiado el tema<sup>42</sup>, que encuentran resultados si-

milares al ensayar con otras fuentes de agua desinfectadas con cloro, en el sentido de una disminución clara de la actividad mutagénica en presencia de S9, debida a una adecuada metabolización de los compuestos activos hacia metabolitos no mutagénicos, lo que podría, por lo tanto, prevenir que la forma activa del compuesto se distribuya por el organismo y alcance los tejidos corporales.

Otro factor a tener en cuenta al evaluar el ensayo es el pH del agua problema, debido a que varios autores han comprobado que el pH ácido aumenta la actividad mutagénica de las aguas desinfectadas con cloro, ya que es el punto en el que se conseguiría la mayor estabilidad de los mutágenos<sup>43-45</sup>.

Nuestro trabajo se ha realizado a pH neutro, el normal de las aguas de consumo público<sup>26</sup>. En este sentido, quizás sería deseable repetir el ensayo acidificando las muestras antes de su procesamiento, con el fin de aislar un mayor número de compuestos.

En cuanto a la exposición *in vivo*, resulta más difícil hacer una valoración sobre los efectos carcinogénicos potenciales de las fuentes de agua clorada. Los estudios epidemiológicos<sup>46-47</sup> siguen apuntando un riesgo entre 1,1 a 2,0 veces mayor para el cáncer de recto, vejiga y colon en los consumidores de aguas cloradas, pero siguen estando sujetos a graves imprecisiones que deben ser subsanadas para confirmar dicha relación.

Por último, hemos de destacar que las medidas de calidad del agua, usadas en este estudio, han sido muy globales. El efecto de la cloración va a depender siempre de la cantidad y tipo de materiales orgánicos presentes en el agua<sup>46</sup>, y por ello, los efectos mutagénicos potenciales diferirán en función de sus características. Éste es el principal problema con el que nos encontramos en nuestro trabajo, que debe analizarse en profundidad para obtener resultados más precisos.

Por todo ello, dada la importancia del problema, consideramos necesario continuar con la investigación de base y, por supuesto,

la realización de estudios epidemiológicos más complejos con un adecuado tamaño muestral y detallada cuantificación de la exposición individual al agua clorada y que ofrezcan, asimismo, un control válido de los principales factores de confusión.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud. Criterios de salud ambiental, 6. Principios y métodos para evaluar la toxicidad de las sustancias químicas. Parte I. OPS/OMS; 1980. Pub. Cient. n.º 402.
2. Diario Oficial de las Comunidades Europeas. Directiva 86/7454/CE relativa a los programas plurianuales de investigación y desarrollo en el ámbito del medio ambiente. DOCE núm 234. 1986.
3. Meier JR. Genotoxic activity of organic chemicals in drinking water. *Mutat Res* 1988; 196: 211-245.
4. Meier JR. Mutágenos in chlorinated water. *Mutat Environ* 1990: 11-19.
5. Kool HJ, van Kreijl CF, Hrubec J. Mutagenic and carcinogenic properties of drinking water. En: *Water Chlorination: Environmental Impact and Health Effects*. Chelsea: Lewis Publisher, 1984: 187-205.
6. Nestmann ER, Lee EG-H, Mtula TI, Douglas GR, Mueller JC. Mutagenicity of constituents identified in pulp and paper mill effluents using the *Salmonella*/mammalian microsome assay. *Mutat Res* 1980; 79: 203-212.
7. Gasiorowski K, Szyba K, Sawicka J y Gulonowski B. Mutagenic activity of drinking water in Wroclaw, Poland. *Polish J Occup Med Environ Health* 1993; 6: 61-9.
8. Orme J, Mullin CS, Ohanian EV. Health effects of disinfectants and disinfection by-products: a regulatory perspective. En: *Water chlorination: chemistry, environmental impact and health effects*. Chelsea: Lewis Publisher INC, 1987: 75-86.
9. Jolley RL. Conference summary and pers-

- pectives. En: Water chlorination: chemistry, environmental impact and health effects. Chelsea: Lewis Publisher, 1987: 973-975.
10. EPA. Environmental Protection Agency USA. Federation Regional 1982; 47: 45009.
  11. Kromberg L, Vartianen T. Ames mutagenicity and concentration of the strong mutagen 3-chloro-4(dichlorometil)-4-oxo-butenoic acid in chlorine-trated tap waters. *Mutat Res* 1988; 206: 177-182.
  12. Kromberg L, Christman RF. Chemistry of mutagenic by-products of water chlorination. *Science Total Environ* 1989; 81: 219-230.
  13. Mantovani A. Reproductive risks from contaminants in drinking water. *Annali Dell'Istituto Superiore di Sanita* 1993; 29: 317-26.
  14. Loper JC. Mutagenic effects of organic compounds in drinking water. *Mutat Res* 1984; 76: 241-268.
  15. Craun GF. Epidemiologic considerations for evaluating associations between the disinfection of drinking water and cancer in humans. In: *Water Chlorination: Environmental Effects and Health Effects*. Chelsea: Lewis Publisher, 1984: 133-143.
  16. Morris RD, Audet AM, Angelillo IF, Chalmers TC, Mosteller F. Chlorination by-products, and cancer: a meta-analysis. *Am J Public Health* 1992; 82: 955-963.
  17. Cantor KP. Water chlorination, mutagenicity and cancer epidemiology. *Am J Public Health* 1994; 84: 1211-3.
  18. Moller H. Occurrence of carcinogens in the external environment: epidemiological investigations. *Pharmacol Toxicol* 1993; 72 Suppl 1: 39-45.
  19. Flaten TP. Chlorination of drinking water and cancer incidence in Norway. *Int J Epidemiol* 1992; 21: 6-15.
  20. De Serres FJ. The utility of short-term tests for mutagenicity. *Mutation Res* 1976; 38: 1-2.
  21. Ames BN, McCann J, Yamasaki E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella/mammalian* microsome mutagenicity test. *Mutat Res* 1975; 31: 347-364.
  22. McCann J, Ames BN. The *Salmonella/microsome* mutagenicity test: Predictive value for animal carcinogenicity. In: Hiatt HH, Watson JD, Winstein JA. Eds. *Origins of Human Cancer*. Nueva York: Cold Spring Harbor, 1977: 1431-1450.
  23. Ames BN, Lee FD, Durston WE. An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1973; 70: 782-86.
  24. Maron DM, Ames BN. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat Res* 1983; 113: 173-215.
  25. Ames BN, Kammen HO, Yamasaki E. Hair dyes are mutagenic: identification of a variety of mutagenic ingredients. *Proc Natl Acad Sci (USA)*, 1975; 72: 2423-27.
  26. Boletín Oficial del Estado. Real Decreto 1138/1990, sobre reglamentación técnico-sanitaria para el abastecimiento y control de calidad de las aguas potables de consumo público. BOE núm 226/20/09/1990.
  27. Fontane JC. Introducción al Sep-Pak. *Técnic Laboratorio* 1981; 118: 407-414.
  28. De Serres FJ, Shelby MD. Recommendations on data production and analysis using the *Salmonella/microsome* mutagenicity assay. *Mutat Res* 1979; 64: 159-165.
  29. Doménech JM. Análisis de la varianza. En: *Métodos estadísticos en ciencias de la salud*. Barcelona: Signo, 1990: 11.
  30. Bull RJ, Robinson M, Meier JR, Stober J. The use of biological assay systems to assess the relative carcinogenic hazards of disinfection by-products. *Environ Health Perspect* 1982; 46: 215-227.
  31. Forster R, Green MHL, Gwilliam RD, Priestley A, Bridges BA. Use of the fluctuation test to detect mutagenic activity in unconcentrated samples of drinking water in the United Kingdom. In: *Water Chlorination: Environmental Impact and Health Effects*. Ann Arbor Science 1981; 4: 1189-1197.
  32. Jolley RL. Concentrating organics in water

- for biological testing. *Environ Science Technol* 1981; 15: 874-880.
33. Jolley RL. Conference summary and perspectives. In: *Water Chlorination: Chemistry, Environmental Impact and Health Effects*. Chelsea: Lewis Publisher, 1987: 973-975.
  34. Moriya M. Further mutagenicity studies and pesticides in bacterial reversion assay systems. *Mutat Res* 1983; 116: 185-216.
  35. McCann J, Choi E, Yamasaki E, Ames BN. Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella*/microsome test: assay of 300 chemicals. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1975; 72/12: 5135-5139.
  36. Purchase IFH. An appraisal of predictive tests for carcinogens. *Mutat Res* 1982; 99: 53-71.
  37. Rinkus SJ, Legator MS. Chemical characterization of 465 known or suspected carcinogens and their correlation with mutagenic activity in the *Salmonella typhimurium* system. *Can Res* 1979; 39: 3289-3318.
  38. Bartsch H, Malaveille C, Camus AM, Martel-Planche G, Brun G, Montesano R. Validation and comparative studies on 180 chemicals with *Salmonella typhimurium* strains and V79 chinese hamster cells in the presence of various metabolizing systems. *Mutat Res* 1980; 76: 1-50.
  39. Dukta BJ, Jova A, Brechin J. Evaluation of four concentration/extraction procedures on waters and effluents collected for use with the *Salmonella typhimurium* screening procedure for mutagens. *Bull Environm Contam Toxicol* 1981; 27: 758-764.
  40. Hubbard SA, Green MHL, Gatehouse D, Bridges JW. The fluctuation test in bacteria. En: Kilbey BJ, Legator M, Nichols W and Ramel C, editores. *Handbook of mutagenicity test procedures*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1984: 144-160.
  41. Gatehouse DG, Delow GF. The development of a microtitre fluctuation-test for the detection of indirect mutagens and its use in the evaluation of mixed-enzyme induction of the liver. *Mutat Res* 1979; 60: 239-252.
  42. Loper JC. Mutagenic effects of organic compounds in drinking water. *Mutat Res* 1987; 76: 241-268.
  43. Maruoka S, Yamanaka SI. Mutagenic potential of laboratory chlorinated river water. *Sci Total Environ* 1983; 29: 143-154.
  44. Nazar MA, Rapson WH. pH stability of some mutagens produced by aqueous chlorination of organic compounds. *Environ Mutagen* 1982; 4: 435-444.
  45. Clark SW. Key issues for regulation disinfection by-products. In: *Regulation Drinking Water Quality*. Lewis Publishers, 1992: 135-144.
  46. Craun GF. Surface water supplies and health. *J Am Wt Wks Assn* 1988: 40-52.
  47. Morris RD, Audet Am, Angelillo IF, Chalmers TC, Monteller F. Chlorination by-products and cancer: a meta-analysis. *Am J Public Health* 1992; 82: 955-963.