

ESTUDIO DE LA MUTAGENICIDAD CAUSADA POR DE METALES PESADOS EN AGUAS DEL RÍO CAUCA

María A. Arboleda^{1*}, Neyla Benítez-Campo², Fernando E. Larmat¹

1 Departamento de Química, Universidad del Valle, Cali, Colombia

2 Departamento de Biología, Universidad del Valle, Cali, Colombia

fernando.larmat@correionivalle.edu.co, phone 572-3212148, ext. 117

PALABRAS CLAVES: Índice Mutagénico (IM), metales pesados, Test de Ames, Río Cauca, Amberlita XAD-16

RESUMEN: En general los metales pesados son tóxicos incluso en concentraciones muy bajas, influenciando de forma directa y negativa en diversos procesos biológicos lo que los convierte en potenciales cancerígenos. Producto de la minería, la agricultura y otras actividades son depositados metales pesados en diferentes ecosistemas, donde uno de los mayores receptores son los ríos, llegando a concentraciones que exceden los límites permitidos por la ley, por esta razón el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto mutagénico asociado a metales pesados en aguas superficiales del Río Cauca en la zona urbana de Cali, para lo cual se realizaron dos muestreos en temporada lluviosa. A partir de las muestras de agua se concentraron los metales utilizando la resina Amberlita XAD-16, posteriormente se cuantificaron los metales Pb y Cd total por medio de espectrometría de Absorción Atómica por atomización electrotrémica y Hg total mediante la técnica de Vapores Fríos. El efecto mutagénico de los extractos de metales fue determinado por medio del Test de Ames, utilizando las cepas de *Salmonella typhimurium* TA97a y TA100, además se estimó la mutagenicidad de soluciones patrón de Pb, Cd y Hg de 0.1 ppb hasta 1000 ppm, utilizando las cepas TA97a, TA98 y TA100. Los resultados indican que se obtuvo mutagenicidad solamente con la cepa TA97a, en la salida de aguas residuales de la PTAR-Cañavalejo y en la desembocadura del Río Cali en las muestras del segundo muestreo, por su parte las soluciones patrón presentaron una respuesta positiva con esta cepa para concentraciones de 1 y 10 ppm para Pb, 0.1 y 1 ppb para Cd y 100 ppm para Hg, donde esta última también fue mutagénica para TA98 y TA100. Las concentraciones de Hg en la mayoría de los puntos de muestreo superaron el límite admisible para aguas.

INTRODUCCIÓN

El resultado de la masiva industrialización y urbanización ha sido en gran medida la contaminación de diferentes ecosistemas, ya que muchos de los desechos generados con o sin tratamiento previo tienen como destino final suelos, ríos, lagos y aire, ocasionando gran preocupación en diferentes entes gubernamentales, académicos y en la población en general, por el impacto producido en la flora y fauna circundante, incluso en las personas que tienen directa o indirecta exposición a estos compuestos (Vincent-Hubert, Heas-Moisán, Munsch, & Tronczynski, 2012). De aquí nace la necesidad de evaluar el riesgo genotóxico en ambientes naturales, aumentando el interés por el estudio de aquellos compuestos que tienen potencial carcinogénico y/o mutagénico, como lo son los metales pesados, que se caracterizan por ser persistentes, y bioacumulables. (Rossman & Waalkes, 2003).

Las pruebas que evalúan la capacidad mutagénica de un compuesto o una muestra ambiental, han tomado gran importancia ya que muchos carcinógenos que son mutágenos dan una respuesta positiva en el ensayo de mutagenicidad permitiendo identificar muchos carcinógenos que actúan por mecanismos mutagénicos, además de algunos mutágenos que no han demostrado ser cancerígenos (Koedrith, Kim, Weon, & Rok, 2013; Warren et al., 2015). El Test de Ames ha sido ampliamente aceptado y utilizado para identificar sustancias genotóxicas en muestras ambientales, tales como sedimentos, aguas superficiales y potables, suelos, muestras ambientales atmosféricas y sustancias químicas puras, este es uno de los sistemas de prueba bacterianas más fiables debido a que han sido extensamente validados (Chen, Liu, Wun, & Ran, 2015; Warren et al., 2015; Kwasniewska, Nałęcz-Jawecki, Skrzypczak, Plaza, & Matejczyk, 2012) y además tiene la habilidad para identificar los efectos mutagénicos rápidamente. Como desventaja se tiene que no permite una directa extrapolación a humanos (Szendi, Gerencsér, Murányi, & Varga, 2012). Este ensayo evalúa la capacidad que tiene una sustancia para revertir una mutación existente en las bacterias de prueba, la mutación consiste en la

modificación del operón de histidina de tal manera que las bacterias no pueden sintetizar este aminoácido necesario para su crecimiento, requiriéndolo del medio (Mortelmans & Zeiger, 2000). En medios mínimos de histidina la formación de colonias implica que se ha revertido la mutación lo que restaura la síntesis de la histidina, permitiendo el crecimiento de las bacterias; la cantidad de colonias dependerá de la suficiencia mutagénica del ambiente al que se han expuesto los microorganismos, por esta razón el test se conoce como Test de Reversión (Maron & Ames, 1983). Además de la dependencia a histidina, estas cepas tienen mutaciones adicionales que las hacen más sensibles a los mutágenos, estas alteraciones son: mutación *rfa* que genera una capa lipopolisacárida defectuosa, propiciando una mayor permeabilidad a moléculas de considerable tamaño; mutación *uvrB* que elimina el mecanismo de reparación del ADN por escisión, debido a la delección del gen *uvrB* y la inserción del plásmido *pkM101* lo que le proporciona resistencia a ampicilina y mejora el mecanismo de reparación de ADN (ácido desoxirribonucleico) propenso a errores lo que incrementa la mutagénesis. Existen una variedad de cepas de *Salmonella typhimurium* usadas para esta prueba, cada una con un tipo de mutación diferente en el operon de histidina, lo que da información del tipo de mutación génica que está sufriendo la cepa que está revertiendo, esta mutación puede ser por sustitución de pares de bases o por el cambio en el marco de lectura ya sea por adición o delección de una o más bases. Las cepas de prueba estándar son las TA97, TA98, TA100 y TA102, donde las más utilizadas son las TA98 y la TA100, sin embargo la TA97 es la cepa más indicada para evaluar la mutagenicidad de metales pesados (da Costa et al., 2012).

Con gran preocupación ha surgido el interés por la conservación de los ecosistemas acuáticos que son los más amenazados dado que muchos de ellos reciben aguas residuales de origen urbano, agropecuario e industrial, que liberan productos químicos en el agua superficial, en su mayoría cancerígenos que se convierten en parte de mezclas ambientales complejas (da Costa et al., 2012). Se tiene evidencia de que algunos ríos en el mundo especialmente en Europa, Asia y Suramérica son contaminados con potenciales directos e indirectos mutágenos tipo *frameshift* y sustitución de bases, como lo indican diversos estudios realizados desde los años 90 y recopilados por Ohe, Watanabe, & Wakabayashi (2004). Esto ha incrementado la tendencia por parte de muchos laboratorios a hacer estudios mutagénicos; por ejemplo el cuerpo regulatorio en São Paulo, Brasil, ha monitoreado rutinariamente la capacidad mutagénica de sus ríos durante más de 20 años (Pereira et al., 2007), y a esta iniciativa se suman los estudios que recientemente se han realizado en la Nación Penobscot Indio (PIN), Estados Unidos (Warren et al., 2015). En Colombia en el 2001 se empezó evaluando la actividad mutagénica de aguas de consumo humano antes y después de clorar el agua en la planta de Villa Hermosa, Medellín y desde el 2009 se realizan estos mismos estudios en el Río Cauca (Idrobo, 2008) (Táquez, 2011) (Sierra, 2012) (Vivas, 2013). Este río abastece las plantas de tratamiento de agua potable (PTAP) de Puerto Mallarino y Río Cauca, suministrando agua potable al 75 % de la población caleña (Navarro, 2004), sin embargo el Río Cauca es sometido al vertimiento de lixiviados del basurero de Navarro, aguas residuales domésticas e industriales, escorrentías superficiales y desechos agropecuarios del Cauca y sur del Valle, donde los contaminantes principales son pesticidas, hidrocarburos aromáticos y metales pesados que se caracterizan por ser potenciales mutágenos, además estos últimos hacen parte de un importante grupo de conocidos carcinógenos. De esta manera el objetivo de este estudio es evaluar el efecto mutagénico en aguas superficiales del Río Cauca en la zona urbana de Cali, enfocando el estudio a los metales pesados plomo, cadmio y mercurio.

MÉTODOLÓGIA

Zona de estudio

El área de estudio se ubicó sobre el Río Cauca a la altura entre el puente del Hormiguero y la Desembocadura del Río Cali, como se muestra en la **Figura 1**, los puntos de muestreo seleccionados y sus respectivas coordenadas geográficas se proporcionan en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Coordenadas de las estaciones de muestreo en el Río Cauca.

PUNTO DE MUESTREO	COORDENADAS GEOGRÁFICAS	
Puente El Hormiguero (P1)	N 3° 18' 09,2"	W 76° 28' 50,8"
Desembocadura del Canal CVC-Sur (P2)	N: 3° 22' 40,2"	W: 76° 28' 17,7"
Bocatoma de la PTAP de Puerto Mallarino (P3)	N: 3° 26' 45,4"	W: 76° 28' 30,4"
Puente de Juanchito (P4)	N: 3° 26' 59"	W: 76° 28' 32,1"
Salida de aguas residuales de la PTAR-Cañavalejo (P5)	N 3° 28' 13,94"	W 76° 28' 33,40"
Desembocadura del Río Cali (P6)	N: 3° 30' 20,9"	W: 76° 29' 29,8"



Figura 1. Mapa de las estaciones de muestreo en el Río Cauca en la zona urbana de Cali (obtenido de <http://www.geocvc.co/visor/>)

Recolección y pretratamiento de las muestras

Los dos muestreos de aguas superficiales del Río Cauca se realizaron en octubre y diciembre del 2012, ambos en época de lluvias, llevando a cabo la NTC-ISO 5667-6 (Calidad del Agua. Muestreo. Guía para el Muestreo de Aguas de Ríos y corrientes).

Se realizó un muestreo aleatorio, tomando 2 L de muestra ubicada sobre la columna superficial de agua a una profundidad de 50cm, aproximadamente en el centro del cauce del río, como lo indica Junk (1974); las muestras se almacenaron en recipientes de polietileno de alta densidad y se depositaron en neveras portátiles para su traslado al laboratorio del Grupo de estudios Ambientales para el Desarrollo Sostenible (GEADES) de la Universidad Autónoma de Occidente. Cada muestra fue dividida en dos fracciones para realizar 1) el procedimiento utilizado en la determinación de Hg total, para lo cual se fijó el contenido metálico adicionando 2.0 mL de ácido nítrico concentrado por cada litro de muestra y 2) el procedimiento utilizado para especiar los metales como metales en sólidos suspendidos (SS), metales iónicos libres (ML) y metales asociados a sustancias húmicas (MH), descrito por TOKALIOGLU, KARTAL, & ELÇİ, (2000)

Extracción y concentración de muestras

La concentración de los metales pesados de las muestras de aguas se realizó utilizando columnas de resina Amberlita XAD-16 (copolímero de poliestireno y divinilbenceno) previamente activadas con lavados sucesivos de agua desionizada/metanol/agua desionizada/HNO₃ 1M en acetona/agua desionizada/NaOH 1M/agua desionizada. La extracción de los metales se logró eluyendo en medio ácido, el procedimiento completo se resume en la obtención de SS, ML y MH, como se describe a continuación:

- SS: Se filtraron 250 mL de muestra, utilizando membrana de poro de 0.45 µm, posteriormente se adicionaron 15 mL de HNO₃ concentrado, a la membrana que contenía los sólidos filtrados haciendo digestión de los mismos, por último se evaporó a cercana sequedad, y se enrasó a 10 mL con HNO₃ 2M.
- MH: El filtrado obtenido anteriormente se pasó por una columna de vidrio que contenía 400 mg de Amberlita XAD-16, a una velocidad de 2-2.5 mL/min, a continuación se eluyeron los metales pasando por la resina 25 mL de HCl 1M en acetona, utilizando un flujo de 1-1.5 mL/min, para finalizar se evaporó a cercana sequedad y se enrasó a 10 mL con HNO₃ 2M.
- ML: Se adicionó 1.39 g de tetraborato de sodio al efluente obtenido en el paso anterior, se pasó nuevamente por una columna de Amberlita XAD-16, seguida de la elución con HCl, como se describió anteriormente.

El extracto final utilizado en el Test de Ames consta de la mezcla de los extractos de SS, MH y ML, los cuales fueron evaporados, neutralizados y reconstituídos con dimetilsulfóxido (DMSO) hasta un volumen final de 5.0 mL.

Tratamiento de muestras para determinación de Hg total

Se determinó la concentración de mercurio mediante el método estándar ASTM D3223-12 (Standard Test Method for Total Mercury in Water), el cual consta de la oxidación y digestión de la muestra usando KMnO₄, K₂S₂O₈, HNO₃ y H₂SO₄.

Cuantificación de metales pesados

La cuantificación de metales en las muestras de las aguas del Río Cauca se desarrolló en el Laboratorio de Análisis Industriales de la Universidad del Valle (LAI); cuantificando Pb y Cd total por medio de espectrometría de absorción atómica por atomización electrotrémica y Hg total mediante la técnica de Vapores Fríos.

Cepas bacterianas

Los ensayos de mutagenicidad se desarrollaron en el Laboratorio de Investigaciones Microbiológicas (LIM) del Departamento de Biología de la Universidad del Valle para lo cual se utilizaron tres cepas de *Salmonella typhimurium* dependientes de histidina: TA97a, TA98 y TA100, sus características genotípicas (Vijayan, Pathak, & Meshram, 2014) se resumen en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Genotipos de las cepas TA97, TA98 y TA100

CEPA	ALELO BLANCO	TIPO DE MUTACIÓN	DEFECTO LPS	REPARACIÓN	PLÁSMIDO
TA97	his6610/hisO1242	Cambio de marco de lectura	rfa	uvrB	pKM101
TA98	hisD3052	Cambio de marco de lectura	rfa	uvrB	pKM101
TA100	hisG46	Cambio de pares de bases	rfa	uvrB	pKM101

A partir de las cepas conservadas por liofilización, se procedió a reactivarlas en medio líquido para preparar los cultivos congelados permanentes, usando como agente crioconservante DMSO (Cf = 10 %), de estos cultivos se prepararon cajas maestras de las cuales se tomaron inóculos para hacer purificaciones sembrando en agar-glucosa mínimo complementado con histidina (GM+). Por cada cepa se confirmaron las marcas genotípicas descritas en la **Tabla 2**, de tres colonias obtenidas en la última purificación,

posteriormente se prepararon tubos inclinados de trabajo, sembrando inóculos de la colonia que presentó el mejor número de revertantes espontáneos.

Determinación de dosis empleada en Test de Ames

Siguiendo las recomendaciones de Mortelmans & Zeiger (2000) se determinó a que concentraciones, se obtendría la mejor respuesta mutagénica a la hora de tomar datos; para llevar a cabo esta dosis-respuesta se evaluaron 9 dosis diferentes variando la concentración de los extractos obtenidos a partir de las muestras de agua (X100, x10-1, x10-2, x10-3, x10-4, x10-5, x10-6, x10-7 y x10-8).

Evaluación de mutagenicidad- Test de Ames

Se utilizó el método de concentración directa (Vargas et al., 2001) empleando el ensayo de preincubación con las cepas TA97a y TA100 para tres concentraciones que se escogieron aleatoriamente considerando que la prueba de dosis-respuesta mostró un comportamiento uniforme, es decir, no hubo diferencias en el Índice Mutagénico (IM) por acción de la concentración.

Evaluación mutagénica de Pb, Cd y Hg

Con el propósito de determinar la concentración a la cual los metales en estudio pudieran ser mutagénicos se prepararon soluciones de 0.1 ppb, 1 ppb, 10 ppb, 100 ppb, 1 ppm, 10 ppm, 100 ppm y 1000 ppm, de Cd, Pb y Hg, que posteriormente fueron evaluadas con las cepas TA97a, TA98 y TA100 utilizando el método de concentración directa (Vargas et al., 2001) y el ensayo de preincubación.

Interpretación de resultados

Para establecer el índice mutagénico (IM) se siguió la regla del *two-fold increase*, que considera una muestra mutagénica si la relación entre las revertantes espontáneas obtenidas de la muestra y las del control negativo (DMSO) es igual o superior a 2; de esta manera se consideran levemente mutagénicos aquellos IM inferiores a 2, pero significativamente diferentes de 1. El control positivo utilizado fue la azida de sodio (AZ), por ser un mutágeno comprobado (Mortelmans & Zeiger, 2000).

Diseño experimental

Teniendo en cuenta la dosis de la muestra como una covariable, se escogió un diseño completamente aleatorio con estructura factorial de 2x6x2 en el que se establecieron como factores la época del muestreo, los puntos de muestreo, y las cepas de prueba de *Salmonella typhimurium*. Los niveles respectivamente son: los meses de octubre y diciembre del 2012; los puntos P₁, P₂, P₃, P₄, P₅ y P₆ descritos en la **Tabla 1**; y las cepas de prueba TA97a y TA100.

El modelo propuesto, se describe en la ecuación 1.

$$Y_{i,j,k} = \mu + \tau_i + \beta_j + Z_k + (\tau\beta)_{ij} + (\tau Z)_{ik} + (\beta Z)_{jk} + (\tau\beta Z)_{ijk} + \varepsilon_{ijk} \quad (1)$$

En donde:

$$i = 1, 2 \quad j = 1, 2, 3, 4, 5, 6 \quad k = 1, 2$$

μ = Media general

τ_i = Efecto del mes de muestreo

β_j = Efecto del punto de muestreo

Z_k = Efecto de la cepa de prueba

$(\tau\beta)_{ij}$ = Interacción de segundo orden mes del muestreo – punto de muestreo

$(\tau Z)_{ik}$ = Interacción de segundo orden mes del muestreo – cepa

$(\beta Z)_{jk}$ = Interacción de segundo orden punto de muestreo – cepa

$(\tau\beta Z)_{ijk}$ = Interacción de tercer orden mes del muestreo – punto de muestreo – cepa

ε_{ijk} = error aleatorio

Análisis estadístico

Se realizó un análisis de covarianza para establecer la significancia de la dosis de la muestra en los resultados obtenidos, posteriormente se comparó y comprobó la significancia estadística de las medias de los diferentes tratamientos llevando a cabo un análisis experimental del IM, donde se implementó la metodología de una análisis ANOVA y post-ANOVA con la prueba estadística Tukey las cuales se realizaron en el software Minitab 14, en el cual se contrastan las pruebas de hipótesis que se muestran a continuación frente a un nivel de significancia del 5%.

- Interacción de tercer orden

$H_0: (\tau\beta Z)_{ijk} = 0$ para todo ijk (No hay interacción entre los factores época de muestreo, punto de muestreo y cepa de prueba)

$H_a: (\tau\beta Z)_{ijk} \neq 0$ para todo ijk (Si hay interacción entre los factores época de muestreo, punto de muestreo y cepa de prueba)

- Interacciones de segundo orden

$H_0: (\tau\beta)_{ij} = 0$ para todo ij (No hay interacción entre los factores época de muestreo y punto de muestreo)

$H_a: (\tau\beta)_{ij} \neq 0$ para todo ij (Si hay interacción entre los factores época de muestreo y punto de muestreo)

$H_0: (\tau Z)_{ik} = 0$ para todo ik (No hay interacción entre los factores época de muestreo y cepa de prueba)

$H_a: (\tau Z)_{ik} \neq 0$ para todo ik (Si hay interacción entre los factores época de muestreo y cepa de prueba)

$H_0: (\beta Z)_{jk} = 0$ para todo jk (No hay interacción entre los factores punto de muestreo y cepa de prueba)

$H_a: (\beta Z)_{jk} \neq 0$ para todo jk (Si hay interacción entre los factores punto de muestreo y cepa de prueba)

- Efectos principales

$H_0: \tau_1 = \tau_2$ vs. $H_a: \tau_1 \neq \tau_2$

$H_0: \beta_1 = \beta_2 = \beta_3 = \beta_4 = \beta_5 = \beta_6$ vs. $H_a: \beta_j \neq \beta_{j'} \text{ para todo } j \neq j'$

$H_0: Z_1 = Z_2$ vs. $H_a: Z_1 \neq Z_2$

RESULTADOS

La evaluación de mutagenicidad con las cepas de *Salmonella typhimurium* TA97a y TA100 de los extractos obtenidos evidenciaron toxicidad en su mayoría, dado que se observó adelgazamiento del “césped de fondo” acompañado de una disminución en el número de colonias revertantes; por lo que fue necesario realizar para cada uno de estos curvas de dosis-respuesta como las correspondientes a los puntos P4 y P5 del segundo muestreo (denotado con la letra B) que se muestran en la **Figura 2**. Se puede observar que con la cepa TA97a el IM aumenta al incrementarse la concentración de la dosis del punto 5 (B5 TA97a) lo que indica una respuesta mutagénica positiva ya que alcanzó un IM = 2.01 y se observó un comportamiento de linealidad en las respuestas obtenidas en las primeras 6 dosis evaluadas (Kutlu et al., 2004), caso contrario sucede con la TA100, donde el IM en el mismo punto tiende a una oscilación insignificante alrededor de 1, independientemente de la concentración.

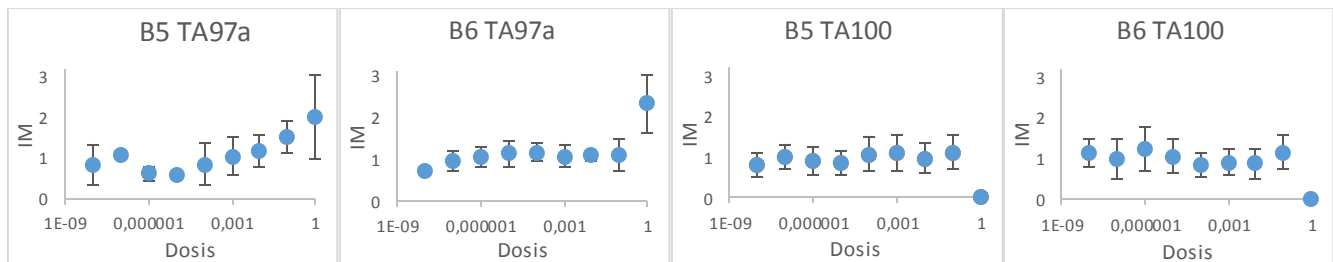


Figura 2. Curvas de dosis-respuesta en la salida de aguas residuales de la PTAR-Cañaveralejo (P5) y en la desembocadura del Río Cali (P6), ambos puntos del segundo muestreo (B), utilizando las cepas de *Salmonella typhimurium* TA97a y TA100.

En general el IM en estas pruebas preliminares tiende a ser constante lo que corresponde en un principio a una respuesta no mutagénica de la muestra en las concentraciones evaluadas, por lo que se procedió a valorar nuevamente la mutagenicidad usando las tres dosis que aleatoriamente se escogieron para llevar a cabo el Test de Ames, estos resultados se encuentran en la **Tabla 2**, donde se clasifica el IM en tres categorías: no mutagénico (NM), levemente mutagénico (LM) y mutagénico (M).

Tabla 2. Resultados del ensayo de Ames en los diferentes puntos de muestreo del Río Cauca, realizado con las cepas TA97a y TA100 de *Salmonella typhimurium*.

PUNTO DE MUESTREO	TA97a						TA100					
	Primer Muestreo			Segundo Muestreo			Primer Muestreo			Segundo Muestreo		
	D ^a	IM ^b	C ^c	D ^a	IM ^b	C ^c	D ^a	IM ^b	C ^c	D ^a	IM ^b	C ^c
Puente El Hormiguero	10 ⁻³	1.09 ± 0.33	NM	10 ⁻⁴	0.78 ± 0.17	NM	10 ⁻⁴	1.20 ± 0.14	LM	10 ⁻⁴	1.40 ± 0.17	LM
	10 ⁻⁴	1.06 ± 0.24	NM	10 ⁻²	1.00 ± 0.18	NM	10 ⁻³	0.95 ± 0.12	NM	10 ⁻³	0.97 ± 0.11	NM
	10 ⁻⁵	1.31 ± 0.38	LM	10 ⁻³	1.14 ± 0.19	NM	10 ⁻⁵	1.01 ± 0.13	NM	10 ⁻⁵	1.08 ± 0.14	NM
Desembocadura del Canal CVC-Sur	10 ⁻¹	1.19 ± 0.19	NM	10 ⁻¹	1.27 ± 0.23	LM	10 ⁻¹	1.00 ± 0.11	NM	10 ⁻¹	0.99 ± 0.16	NM
	10 ⁻²	1.42 ± 0.27	LM	10 ⁻²	0.97 ± 0.17	NM	10 ⁻³	0.76 ± 0.16	NM	10 ⁻³	0.77 ± 0.14	NM
	10 ⁻³	1.19 ± 0.19	NM	10 ⁻³	1.10 ± 0.22	NM	10 ⁻⁵	0.86 ± 0.11	NM	10 ⁻⁵	0.85 ± 0.10	NM
Bocatoma de la PTAP de Puerto Mallarino	10 ⁻⁶	1.17 ± 0.22	NM	10 ⁻³	1.21 ± 0.25	LM	10 ⁻¹	1.08 ± 0.21	NM	10 ⁻¹	1.10 ± 0.16	NM
	10 ⁻⁷	1.20 ± 0.31	LM	10 ⁻⁶	0.99 ± 0.17	NM	10 ⁻³	1.01 ± 0.12	NM	10 ⁻³	0.87 ± 0.14	NM
	10 ⁻⁸	1.12 ± 0.26	NM	10 ⁻⁷	1.01 ± 0.25	NM	10 ⁻⁵	1.24 ± 0.25	LM	10 ⁻⁵	1.05 ± 0.14	NM
Puente de Juanchito	10 ⁻¹	1.01 ± 0.27	NM	10 ⁻⁴	1.04 ± 0.18	NM	10 ⁻¹	0.97 ± 0.14	NM	10 ⁻¹	1.02 ± 0.21	NM
	10 ⁻²	1.01 ± 0.34	NM	10 ⁻⁵	0.89 ± 0.23	NM	10 ⁻⁴	0.79 ± 0.10	NM	10 ⁻⁴	1.01 ± 0.16	NM
	10 ⁻³	1.09 ± 0.25	NM	10 ⁻⁶	1.17 ± 0.23	NM	10 ⁻⁵	0.84 ± 0.14	NM	10 ⁻⁷	0.99 ± 0.24	NM
Salida de aguas residuales de la PTAR-Cañaveralejo	10 ⁻²	1.15 ± 0.21	NM	10 ⁻¹	1.23 ± 0.25	LM	10 ⁻¹	0.83 ± 0.17	NM	10 ⁻¹	1.00 ± 0.14	NM
	10 ⁻³	1.11 ± 0.31	NM	10 ⁻²	1.18 ± 0.51	NM	10 ⁻³	0.90 ± 0.12	NM	10 ⁻⁴	1.16 ± 0.13	NM
	10 ⁻⁴	0.91 ± 0.19	NM	10 ⁻³	1.32 ± 0.19	LM	10 ⁻⁵	0.93 ± 0.17	NM	10 ⁻⁷	0.92 ± 0.16	NM
Desembocadura del Río Cali	10 ⁻³	0.75 ± 0.22	NM	10 ⁻³	0.97 ± 0.34	NM	10 ⁻¹	0.88 ± 0.15	NM	10 ⁻¹	1.07 ± 0.12	NM
	10 ⁻⁴	1.15 ± 0.19	NM	10 ⁻⁴	1.14 ± 0.17	NM	10 ⁻³	0.96 ± 0.16	NM	10 ⁻³	0.85 ± 0.16	NM
	10 ⁻⁵	1.14 ± 0.26	NM	10 ⁻⁵	1.31 ± 0.21	LM	10 ⁻⁶	1.06 ± 0.13	NM	10 ⁻⁵	1.03 ± 0.26	NM

^a Dosis de la muestra seleccionada del preliminar realizado en la dosis-respuesta

^b Promedio del índice mutagénico ± desviación estándar

^c Clasificación del índice mutagénico: no mutagénico (NM), levemente mutagénico (LM) y mutagénico (M)

Dando uso a las metodologías estadísticas implementadas para el análisis de los datos, se obtienen los resultados de la prueba ANOVA para determinar la significancia de los factores involucrados en el aumento del IM presentes en las aguas del Río Cauca, los cuales se consignan en la **Tabla 3**.

Tabla 3. ANOVA para determinar la significancia del modelo implementado en la ecuación (1).

	GL ^a	SC ^b	MC ^c	Valor F	Valor p
Época de muestreo	1	0.00430	0.004299	0.13	0.720
Punto de muestreo	5	0.20933	0.041866	1.25	0.287
Cepa de prueba	1	0.60823	0.608233	18.20	0.000
Muestreo – Punto de muestreo	5	0.41785	0.083571	2.50	0.033
Muestreo – Cepa	1	0.05028	0.050280	1.50	0.222
Punto de muestreo – Cepa	5	0.58551	0.117101	3.50	0.005
Muestreo – Punto de muestreo – Cepa	5	0.17387	0.034774	1.04	0.396
Error	157	5.24609	0.033415		
Total	180	7.32214			

^a Grados de libertad

^b Desviación estándar ajustada

^c Mínimos cuadrados ajustado

Resumen del modelo: Desviación estándar de 0.182797 y R² del 28.35%

Dentro del análisis ANOVA podemos observar que los factores que presentan una alta significancia en la presencia de mutagenicidad de los puntos medibles del Río Cauca son mesde muestreo y punto de muestreo en una interacción de segundo orden de igual forma se observamayor significancia para la interacción entre punto de muestreo y cepa de prueba. Además, se observó que las demás interacciones de factor triple y los efectos asociados a los factores de forma independiente son no significativos dentro del modelo, como se muestra en la **Figura 3**.

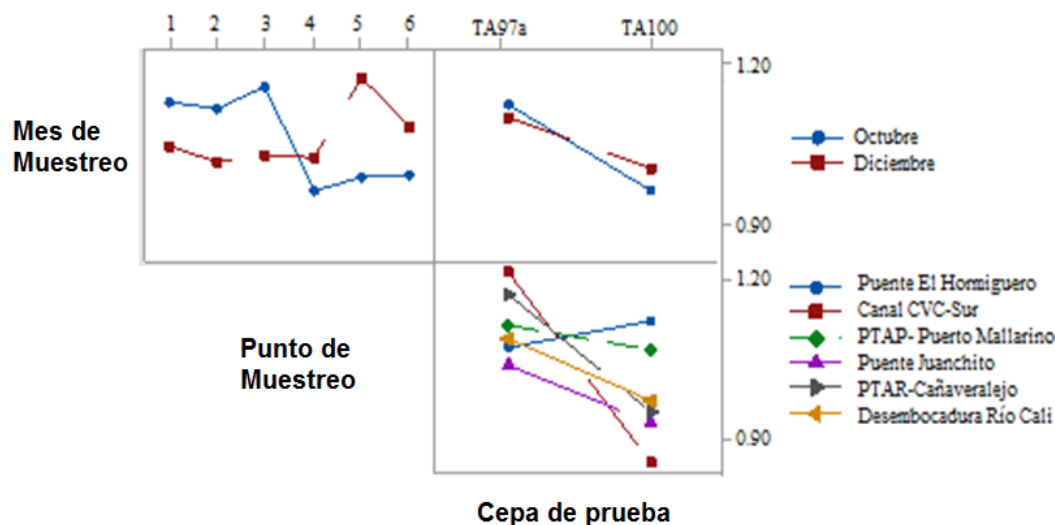


Figura 3. Interacciones para el IM con los factores mes de muestreo, punto de muestreo y cepa de prueba.

Por otro lado, se realizaron pruebas de mutagenicidad evaluando soluciones patrón de los metales en estudio, esto con el fin de obtener información de la respuesta mutagénica de cada uno de ellos frente a tres cepas de *Salmonella typhimurium*: TA97a, TA98 y TA100. La respuesta mutagénica de las soluciones patrón se reportan en la **Tabla 4**; donde se determina que el Pb es mutagénico para las concentraciones de 1 y 10 ppm con la cepa TA97a, mientras que el Cd presenta una respuesta positiva con esta misma cepa en concentraciones de 0.1 y 1 ppb. Por su parte, se determinó que el Hg es potencialmente mutagénico en concentraciones de 100 ppm, presentando una respuesta positiva para mutagenicidad en las tres cepas evaluadas.

Tabla 4. Resultados del ensayo de Ames de las soluciones patrón de metales pesados, realizado con las cepas TA97a, TA98 y TA100 de *Salmonella typhimurium*.

METAL	Concentración	TA97a		TA98		TA100	
		IM ^a	C ^b	IM ^a	C ^b	IM ^a	C ^b
Pb	0.1 ppb	1.19 ± 0.35	NM	1.00 ± 0.17	NM	1.10 ± 0.17	NM
	1 ppb	1.22 ± 0.38	LM	0.75 ± 0.12	NM	1.33 ± 0.20	LM
	10 ppb	1.36 ± 0.75	LM	0.86 ± 0.43	NM	1.23 ± 0.23	LM
	100 ppb	1.59 ± 0.40	LM	1.11 ± 0.32	NM	1.32 ± 0.34	LM
	1 ppm	4.14 ± 1.33	M	1.02 ± 0.21	NM	1.34 ± 0.21	LM
	10 ppm	9.87 ± 1.9	M	1.02 ± 0.17	NM	1.27 ± 0.22	LM
	100 ppm	Toxicidad		0.86 ± 0.34	NM	1.15 ± 0.25	NM
	1000 ppm	Toxicidad		0.88 ± 0.15	NM	1.17 ± 0.22	NM
Cd	0.1 ppb	242 ± 88.1	M	1.20 ± 0.51	NM	1.23 ± 0.19	LM
	1 ppb	228 ± 53.7	M	0.92 ± 0.15	NM	1.21 ± 0.19	LM
	10 ppb	1.48 ± 2.20	LM	0.89 ± 0.14	NM	1.13 ± 0.22	NM
	100 ppb	0.17 ± --	NM	1.16 ± 0.18	NM	1.43 ± 0.36	LM
	1 ppm	1.36 ± 0.40	LM	0.94 ± 0.25	NM	1.05 ± 0.16	NM
	10 ppm	0.75 ± 0.38	NM	1.05 ± 0.17	NM	1.13 ± 0.25	NM
	100 ppm	1.45 ± 0.79	LM	0.83 ± 0.19	NM	1.34 ± 0.23	LM
	1000 ppm	Toxicidad		1.04 ± 0.23	NM	1.11 ± 0.21	NM
Hg	0.1 ppb	1.20 ± 0.19	LM	0.92 ± 0.43	NM	1.20 ± 0.19	LM
	1 ppb	1.19 ± 0.34	LM	0.88 ± 0.28	NM	1.19 ± 0.34	NM
	10 ppb	1.38 ± 0.35	LM	0.78 ± 0.32	NM	1.38 ± 0.35	LM
	100 ppb	1.14 ± 0.24	NM	0.84 ± 0.36	NM	1.14 ± 0.24	NM
	1 ppm	1.28 ± 0.25	LM	0.99 ± 0.18	NM	1.28 ± 0.25	LM
	10 ppm	1.66 ± 0.67	LM	0.91 ± 0.21	NM	1.66 ± 0.67	LM
	100 ppm	109 ± 23.2	M	25.5 ± 5.7	M	8.65 ± 1.36	M
	1000 ppm	Toxicidad		Toxicidad		Toxicidad	

^a Promedio del índice mutagénico ± desviación estándar

^b Clasificación del índice mutagénico: no mutagénico (NM), levemente mutagénico (LM) y mutagénico (M)

Además de las pruebas microbiológicas realizadas, se evaluó la contaminación de las aguas del Río Cauca por Pb, Cd y Hg que se caracterizan por ser tres de los metales pesados considerados más tóxicos y potencialmente mutagénicos. El resultado de la cuantificación se muestra en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Concentraciones de metales en las muestras de agua del Río Cauca^a

PUNTO DE MUESTREO	Primer Muestreo			Segundo Muestreo		
	Pb	Cd	Hg	Pb	Cd	Hg
Puente El Homiguero	3,88	0,092	13.1	3,08	0,123	10.9
Desembocadura del Canal CVC-Sur	4,60	0,072	5.93	3,32	0,109	7.48
Bocatoma de la PTAP de Puerto Mallarino	2,36	0,081	11.9	2,12	0,082	10.5
Puente de Juanchito	1,28	0,06	ND ^b	0,6	ND ^b	4.92
Salida de aguas residuales de la PTAR-Cañaveralejo	3,24	0,096	5.83	2,56	0,044	9.36
Desembocadura del Río Cali	3,48	0,064	3.76	4,68	0,052	2.5
Límites permisibles ^c	10,0	3,00	1,00			

^a Resultados expresados en µg/L.

^b No detectado.

^c Límites establecidos por el ministerio de ambiente para aguas superficiales.

DISCUSIÓN

Los metales pesados como el arsénico, cadmio, cromo, plomo, mercurio y níquel son contaminantes ambientales generalizados que causan efectos perjudiciales para la salud, en particular varios tipos de cáncer, por lo que han sido clasificados como carcinógenos humanos por la *International Agency for Research on Cancer* (Koedrith et al., 2013). Esto ha llevado a una creciente regulación por parte de organismos ambientales internacionales tales como la EPA (*Environmental Protection Agency*) y locales como la CVC (Corporación Autónoma Regional del Valle del Cauca) y el DAGMA (Departamento Administrativo de Gestión del Medio Ambiente). A nivel nacional el Ministerio de Ambiente es quien ejerce la máxima autoridad en Colombia estableciendo normas, reglamentos, resoluciones, etc, que son aplicados por las entidades locales en el área de su jurisdicción.

El Reglamento Técnico del Sector de Agua Potable y Saneamiento Básico RAS – 2000, de acuerdo al decreto 475/98, establece que para fuentes de abastecimiento de aguas entre las que se encuentran aguas superficiales y por ende los ríos, no deben de superar los máximos permitidos que se muestran en la tabla 5; teniendo en cuenta que el Río Cauca abastece dos plantas de tratamiento de agua potable y que además proporciona agua para las necesidades básicas de las personas ubicadas en diferentes asentamientos a lo largo del río, es indispensable que cumpla con esta reglamentación, sin embargo las concentraciones de Hg obtenidas en este estudio superan ampliamente el límite admisible, incluso en la bocatoma de la PTAP-Puerto Mallarino. Por otra parte en la Resolución 0631 de 17 de marzo de 2015 se instauró los parámetros y los límites máximos permisibles en los vertimientos puntuales a cuerpos de aguas superficiales, estableciendo que la concentración de Hg vertida no puede ser superior a 0.02 mg/L, lo cual no se cumple en la desembocadura del Canal CVC-Sur, ni en la salida de aguas residuales de la planta de tratamiento de aguas residuales PTAR-Cañaveralejo, ni siquiera en la desembocadura del Río Cali.

En la Resolución N° 1096 de 17 de noviembre de 2000, se determinó que es necesario que se realicen estudios de tratabilidad y/o toxicidad en las aguas residuales municipales que se encuentran en tratamiento, entre estos estudios se debe incluir la medición de metales pesados ya que en altas concentraciones son tóxicos para los organismos degradadores y para el cuerpo de agua receptor. Específicamente los metales que se deben evaluar de acuerdo a esta resolución son Cr, Pb, Ni, Hg, Cd, Cu y Zn los cuales no deben

superar una concentración total acumulada de 2 mg/L, de lo contrario se considera tóxica. En los puntos muestreados se observa que la suma de las concentraciones de los metales en estudio (Pb, Cd y Hg) no superan los 0,017 mg/L, lo que corresponde a menos del 1% del límite superior ofreciendo un leve indicio de que las aguas del Río Cauca, al menos en los sitios muestreados, no llegan a ser tóxicas, sin embargo es importante tener en cuenta que la toxicidad de los metales varía de un metal a otro, donde el aporte significativo se puede hacer desde cantidades muy bajas sobre todo considerando que los metales en estudio hacen parte de los cuatro metales considerados como altamente tóxicos (Das, 2015). Por esta razón además de la cuantificación de los metales como índice de contaminación, se incluyó una prueba de mutagenicidad para tener información del riesgo genotóxico de las muestras, determinando de esta manera que del segundo muestreo las muestras correspondientes a la salida de aguas residuales de la PTAR-Cañaveralejo y la desembocadura del Río Cali presentan una respuesta positiva frente a la cepa TA97a, presentando índices mutagénicos de 2.01 y 2.3 respectivamente, como se indicó en las pruebas preliminares (Curvas de dosis-respuesta de la **Figura 2.**). Este resultado positivo sugiere la posibilidad de que el agua en estas muestras puede contener agentes mutagénicos potenciales, sin embargo los resultados negativos para el resto de los puntos solo significa que bajo las condiciones del sistema de prueba no generó actividad mutagénica (Warren et al., 2015).

El análisis estadístico del Test de Ames realizado con las dosis seleccionadas para cada muestra permitió evidenciar que no había una linealidad entre la dosis y el IM a una significancia del 91.1 %, por lo que las dosis utilizadas no fueron un factor determinante en la respuesta mutagénica, esto posiblemente se debe a que las concentraciones de los metales en las muestras no se encontraban en los rangos en los que las cepas presentan una respuesta positiva a mutagenicidad. Por otra parte se determinó la existencia de dos interacciones de segundo orden. El primer caso para los factores época de muestreo y punto de muestreo, del cual se observó mediante el análisis post-ANOVA que en los puntos de un mismo muestreo no había una diferencia significativa en la respuesta mutagénica obtenida, caso contrario se presentaba entre un muestreo y otro, lo que indica que el IM tiene una mayor contribución por parte del componente temporal, es decir, la época de muestreo; que del componente espacial o sea los diferentes puntos de muestreo, tal como lo concluyó Vivas (2013). El segundo caso corresponde a los factores cepa de prueba y punto de muestreo, siendo esta la interacción de mayor significancia en el modelo, lo que se puede explicar por la diferencia en la sensibilidad de las cepas frente a la exposición de los metales pesados como se mostró en la **Figura 3.** Se puede observar que en general los puntos presentan un IM más alto con la TA97a que con la TA100, siendo la primera una cepa que revierte para mutaciones tipo *frameshift* lo que implica una alta tendencia de las muestras evaluadas a generar un cambio en el marco de lectura ya sea por adición o delección de una o más bases.

La categoría levemente mutagénico atribuida a varias de las dosis evaluadas es de gran importancia a nivel biológico debido a que los metales pesados son bioacumulables alcanzando concentraciones crecientes a medida que se avanza en los niveles tróficos de la cadena alimenticia, por ende las concentraciones a la que los organismos vivos estarían expuestos, serían más elevadas que las detectadas en las muestras de agua, pudiendo alcanzar niveles peligrosos de mutagenicidad; se recomienda evaluar el efecto mutagénico en los diferentes escalafones de la cadena trófica, especialmente organismos como peces y algunos invertebrados, los cuales serían consumidos por seres humanos y otros vertebrados.

Las pruebas realizadas con las soluciones patrón de los metales permitió confirmar que la cepa con mayor sensibilidad frente a los metales pesados es la TA97a (da Costa et al., 2012), obteniendo respuestas positivas para concentraciones de 0.1 y 1 ppb de Cd, 1 y 10 ppm de Pb y 100 ppm de Hg. Por su parte las cepas TA98 y TA100 solo presentaron respuesta mutagénica para el Hg de 100 ppm, lo cual indicaría que se requieren muestras con una concentración muy elevada de este metal para obtener una respuesta positiva para mutagenicidad; esta concentración difícilmente se encontrará en aguas superficiales de ríos por lo que no es recomendable el uso de estas cepas, si lo que se requiere es evaluar la mutagenicidad debida a los tres metales en estudio.

AGRADECIMIENTOS

A los profesores Enrique Bravo, Alejandro Soto, Luis Muñoz y Marisol Gordillo, por la asesoría brindada.

A la Universidad del Valle y la Universidad Autónoma de Occidente por la financiación del proyecto.

A los laboratorios de investigación del Grupo de electroquímica (GE), de Investigaciones Microbiológicas (LIM), del Grupo de estudios Ambientales para el desarrollo sostenible (GEADES), y de Análisis Industriales (LAI)

A la Corporación Autónoma Regional del Valle (CVC) por el apoyo logístico en los muestreos.

REFERENCIAS

American Society for Testing and Materials. ASTM D3223-12. Standard Test Method for Total Mercury in Water.

- Chen, P.-W., Liu, Z.-S., Wun, M.-J., & Ran, C.-L. (2015). Evaluating the mutagenicity of leachates obtained from the bottom ash of a municipal solid waste incinerator by using a Salmonella reverse mutation assay. *Chemosphere*, 124, 70–76. <http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.11.013>
- Da Costa, T. C., de Brito, K. C. T., Rocha, J. A. V., Leal, K. A., Rodrigues, M. L. K., Minella, J. P. G., ... Vargas, V. M. F. (2012). Runoff of genotoxic compounds in river basin sediment under the influence of contaminated soils. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 75(1), 63–72. <http://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.08.007>
- Das, T. (2015). A solid phase extraction procedure for the determination of Cd (II) and Pb (II) ions in food and water samples by flame atomic absorption spectrometry, 174, 591–596.
- Idrobo, G. (2008) “*Detección de la actividad mutagénica en aguas del Río Cauca en el municipio de Cali mediante la aplicación del Test de Ames*”. Tesis de Pregrado, Universidad del Valle, Cali.
- Instituto Colombiano de Normas Técnicas, Norma Técnica Colombiana. NTC-ISO 5667-6. Calidad del Agua. Muestreo. Guía para el Muestreo de Aguas de Ríos y corrientes.
- Junk, G. A., Richard, J. J., Griesel, M. D., Witiak, D., Witiak, J. L., Arguello, R., vick, H. J., Svec, J. S. Fritz y Calder, G. V. (1974), “Use of macroreticular resins in the analysis of water for trace organic contaminants”, *Journal of Chromatography*, 99, pp. 745 – 762.
- Koedrith, P., Kim, H., Weon, J., & Rok, Y. (2013). International Journal of Hygiene and Toxicogenomic approaches for understanding molecular mechanisms of heavy metal mutagenicity and carcinogenicity. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 216, 587–598. <http://doi.org/10.1016/j.ijheh.2013.02.010>
- Kutlu, M., Aydoğan, G., Susuz, F., Özata, A., Aydoğan, G., & Ozata, A. (2004). The Salmonella mutagenicity of water and sediments from the Porsuk River in Turkey. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 17(2), 111–116. <http://doi.org/10.1016/j.etap.2004.03.005>
- Kwasniewska, J., Nalecz-Jawecki, G., Skrzypczak, a, Plaza, G. a, & Matejczyk, M. (2012). An assessment of the genotoxic effects of landfill leachates using bacterial and plant tests. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 75(1), 55–62. <http://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.08.020>
- Maron, D. M., & Ames, B. N. (1983). Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Research*, 113(3-4), 173–215. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6341825>
- Mortelmans, K., & Zeiger, E. (2000). The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutation Research*, 455(1-2), 29–60. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11113466>
- Navarro, E. y Sabater, S. (2004), “*Contaminación de los ríos por metales pesados*”, Investigación y Ciencia. No. 336 – 337, pp. 26 – 31.
- Ohe, T., Watanabe, T., & Wakabayashi, K. (2004). Mutagens in surface waters: A review. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, 567(2-3), 109–149. <http://doi.org/10.1016/j.mrev.2004.08.003>
- Pereira, T. D. S., Rocha, J. A. V., Duccatti, A., Silveira, G. A., Pastoriza, T. F., Bringuenti, L., & Vargas, V. M. F. (2007). Evaluation of mutagenic activity in supply water at three sites in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Mutation Research*, 629(2), 71–80. <http://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2006.12.008>
- Rossmann, T. G., & Waalkes, M. P. (2003). Special issue: Metals and human cancer. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 533, 1–2. <http://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2003.09.005>
- Sierra, J. C., Benítez, C. N., Bravo, M. E., Soto, D. A. y Lamat, G. F. E. (2012), “*Evaluation of mutagenic activity of waters collected from the Cauca River in the city of Cali, Colombia by using the Salmonella/microsome assay*”, *Revista de Ciencias*, Vol. 16, pp. 131– 143.
- Szendi, K., Gerencsér, G., Murányi, E., & Varga, C. (2012). Mutagenic activity of peloids in the Salmonella Ames test. *Applied Clay Science*, 55, 70–74. <http://doi.org/10.1016/j.clay.2011.09.015>
- Táquez, M. (2011) “*Evaluación de la mutagenicidad por metales pesados (Cr, Cd, Pb y Hg) en aguas del Río Cauca en la ciudad de Cali, utilizando el Test de Ames*”. Trabajo de Pregrado, Universidad del Valle, Cali, Colombia.
- TOKALIOGLU, S., KARTAL, S., & ELÇI, L. (2000). Speciation and Determination of Heavy Metals in Lake Waters by Atomic Absorption Spectrometry after Sorption on Amberlite XAD-16 Resin. *Analytical Sciences*, 16(November), 1169–1174. Retrieved from [http://japanlinkcenter.org/JST/JST AGE/analsci/16.1169?from=Google](http://japanlinkcenter.org/JST/JST%20AGE/analsci/16.1169?from=Google)

- Vargas, V. M., Migliavacca, S. B., de Melo, a C., Horn, R. C., Guidobono, R. R., de Sá Ferreira, I. C., & Pestana, M. H. (2001). Genotoxicity assessment in aquatic environments under the influence of heavy metals and organic contaminants. *Mutation Research*, 490(2), 141–58. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11342240>
- Vijayan, V., Pathak, U., & Meshram, G. P. (2014). Mutagenicity and antimutagenicity studies of DRDE-07 and its analogs against sulfur mustard in the in vitro Ames Salmonella/microsome assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 773, 39–45. <http://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2014.08.003>
- Vincent-Hubert, F., Heas-Moisán, K., Munsch, C., & Tronczynski, J. (2012). Mutagenicity and genotoxicity of suspended particulate matter in the Seine river estuary. *Mutation Research*, 741(1-2), 7–12. <http://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2011.09.019>
- Vivas, A. (2013) “Variación espacio temporal del efecto mutagénico por metales pesados en el Río Cauca, año 2013”. Trabajo de Pregrado, Universidad del Valle, Cali, Colombia.
- Warren, S. H., Claxton, L. D., Diliberto, J., Hughes, T. J., Swank, A., Kusnierz, D. H., ... Demarini, D. M. (2015). Chemosphere Survey of the mutagenicity of surface water, sediments, and drinking water from the Penobscot Indian Nation, 120, 690–696.