

MUTAGENICIDAD Y GENTOXICIDAD DE AGUAS QUE SURTEN UNA PLANTA DE POTABILIZACIÓN

José Oñate-Garzón

Iván Meléndez Gelvez

Ary Fabián Paruma Velasco

Hector Hugo Cardenas

Margarita Zuleta

Carlos Alberto Peláez

Abstract: Waters that supply waters treatment plants for human consumption are usually contaminated by industrial, agricultural and waste water, which contribute to the presence of compounds with mutagenic properties. In this work the mutagenic and genotoxic activity of water extracts obtained using XAD2 and XAD7 resins, from an affluent that supplies a water treatment plant and from the untreated water that arrives to the plant, were evaluated through the Ames test and the comet assay, respectively. A concentration-response effect between water extracts and mutagenic effect was evidenced, exhibiting that TA98 strain in presence of microsomal fraction S9 had the most number of revertants. Besides the mutagenic activity exhibited by the affluent and plant extracts was different being 12% more mutagenic than affluent water. The genotoxicity results showed that the different quantities of the extracts of the water samples can induce different levels of damage in the DNA of human lymphocytes, independently of the sample site. The most tail length of the Comet observed was 75.8 μm at 1.5mg, the maximum concentration evaluated. Results suggest that a con-

siderable amount of mutagenic and genotoxic contaminants that are discharged into the effluent can arrive to the plant.

Keywords: Mutagenicity, Genotoxicity, Raw water, Ames test, Comet assay.

Resumen: Las aguas que surten las plantas de potabilización para luego ser tratadas para el consumo humano, generalmente son contaminadas por desechos industriales, agrícolas y aguas negras, los cuales contribuyen a la presencia de compuestos con propiedades mutagénicas. En este trabajo se evaluó la mutagenicidad y genotoxicidad de extractos de aguas concentrados mediante resinas XAD2 y XAD7. Las aguas fueron tomadas de un afluente que abastece una planta de potabilización y del agua de dicha planta sin tratar. Las actividades mutagénicas y genotóxicas se estudiaron usando el ensayo de Ames y el ensayo cometa, respectivamente. Se evidenció un efecto concentración-respuesta entre los extractos de agua y el efecto mutagénico, prevaleciendo el número de revertantes en la cepa TA98 en presencia de enzimas metabólicas. Además, la actividad mutagénica exhibida por los extractos del afluente y de la planta fue diferente, siendo las aguas de la planta 12% más mutagénicas. Los resultados de genotoxicidad mostraron que las distintas cantidades de los extractos de las muestras de agua, pueden inducir diferentes niveles de daño en el ADN de linfocitos humanos, independiente del sitio de muestreo. La máxima longitud de cola observada fue de 75.8 μm en la máxima concentración de extracto de agua, 1.5mg.

Palabras claves: Mutagenicidad, Genotoxicidad, Aguas negras, Test de Ames, Ensayo cometa.

1. INTRODUCCIÓN

Un ambiente acuático, como un río, es un depositario de descargas antropogénicas, domésticas, agrícolas e industriales, constituyéndose así en reservorios potenciales de mutágenos, los cuales pueden ser usados para alimentar plantas de potabilización de aguas. Diversos estudios han revelado que las aguas superficiales pueden contaminarse con componentes genotóxicos y mutagénicos a través de diferentes fuentes como desechos industriales, aguas negras, lixiviados agrícolas con agroquímicos, entre otros [1, 2]. Consecuentemente, la contaminación del agua puede ser un serio problema para los ecosistemas acuáticos y para la salud humana, ya que muchos de estos compuestos son transportados por el agua y transformados en subproductos activos por los tratamientos de desinfección, hasta llegar a aguas domiciliarias [3, 4]. Compuestos mutagénicos como las aminas heterocíclicas (AHs), formadas en las partes quemadas de carnes fritas y asadas; hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA) formados por la combustión incompleta del material orgánico, entre otros desechos, pueden llegar a los ríos por distintos tipos de desechos contaminantes [5].

Existen diversos tipos de desechos industriales que presentan efecto mutagénico y son frecuentemente vertidos a las aguas de quebradas y ríos. Por ejemplo, el benceno es ampliamente usado como materia prima en la síntesis de plásticos, hules, resinas, nylon, anilina, detergentes, medicamentos, colorantes e insecticidas, por lo tanto, está contenido en muchos residuos industriales y está asociado con un incremento en la incidencia de leucemias y aneuploidías en células madre hematopoyéticas [6]. Compuestos como los ftalatos también han mostrado ser mutagénicos [7], entre ellos están: dibutilftalato (DBP) y diidobutilftalato (DiBP), los cuales son usados para mejorar el procesamiento químico de materiales plásticos, de lacas, de cauchos, cosméticos, juguetes de niños y lubricantes. Las plantas de colorantes trabajan a base de arilaminas, que son compuestos mutagénicos y carcinogénicos [8] capaces de permanecer intactos por mucho tiempo en el agua cuando son arrojados a los ríos o pueden ser absorbidos por los sedimentos [9]. Los benzotriazoles, tales

como 2-fenil-benzotriazol, son productos de la industria de colorantes, pesticidas y caucho y se ha observado que inducen una alta mutagenicidad [10].

Las aguas negras, procedentes de domicilios, hospitales, fabricas, estaciones de gasolina, e.t.c contienen aminos heterocíclicas (AHs), con alta potencialidad mutacarcinogénica. Las AHs ya sea en forma libre o en mezclas complejas, llegan a las aguas negras por medio de la orina y heces fecales de personas que consumen dichos alimentos [11]. Dichas aminos se forman en la costra quemada de alimentos proteicos ricos en creatina, como carnes, pescado fritos y asados. Entre las AHs están las amino-imidazo azarenas (AIA) que han demostrado ser potentes mutágenos. Los niveles de producción de los AIA en la costra quemada varían en bajos rangos de p.p.b, dependiendo del tiempo de calor y temperatura, pero también son influenciados por el contenido de agua, proporción de aminoácidos y tipo de carne [1]. En general, las aminos heterocíclicas pueden dividirse en dos grupos: aminos polares que contienen el anillo imidazo y las aminos no polares que tienen en común una molécula Piridoindol o Dipiridoimidazol. La mayoría de aminos heterocíclicas son formadas de la mezcla creatinina, aminoácidos y carbohidratos, expuesta a altas temperaturas [12].

Investigaciones hechas con sistemas modelo, muestran que la creatina juega un papel importante en la formación de mutágenos que contienen el anillo imidazo como IQ, IQx (2-amino-3 metilimidazo [4,5-f] Quinolina), MeIQx (2-amino-3-metil-3h-imidazo(4,5f) quinolina), y DiMeIQx (2-amino-3,4-dimetil-3h-imidazo(4,5f)quinolina) [13]. Por la cocción de la carne también se pueden originar moléculas piridoindol tal como el 2-amino-1-metil-6-fenilimidazo [4-5-b] piridina (PhIP). Estudios han demostrado que el PhIP incrementa la proliferación del receptor estrogénico ER, obteniendo una respuesta mitogénica por activación de proteínas kinasas (MAPK) [14], aumentando así la promoción y progresión de enfermedades neoplásicas. Todas las aminoarenas formadas en alimentos expuestos a altas temperaturas (fritos y asados) son potentes mutágenos y se ha evidenciado que pueden inducir cáncer en ratas, ratones y si-

mios en diferentes órganos como hígado, pulmón, estómago, mama, intestino, páncreas, colon, vejiga y próstata [15].

Las aguas negras también contienen hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA) que en su mayoría son también mutacarcinogénicos, por ejemplo, el benzo (a) pireno. Los HPA carcinogénicos se forman por combustión incompleta y pirolisis de material orgánico, por lo tanto se encuentran en el humo, cenizas, hollín y aceites quemados que son vertidos en el agua [16]. Los mutágenos del humo también llegan a las quebradas y ríos al ser arrastrados por el viento y precipitados a las aguas a través de la lluvia. La mayoría de los HPAs también son pre-mutágenos indirectos que requieren oxidación por citocromo p450 para ser convertidos en forma activa y tener efecto carcinogénico [17]. Existen HPAs que pueden transformarse en mutágenos directos por fotoreactivación en los cuerpos de agua [18].

Existe una estrecha relación entre la exposición crónica a bajas dosis de mutágenos y la incidencia de cáncer, a través de la fijación de mutaciones [19]. Debe tenerse en cuenta que la exposición crónica a pequeñísimas dosis de mutágenos puede resultar en la acumulación de mutaciones en células blanco, hasta convertirlas en iniciadoras del proceso carcinogénico. Aunque las dosis de mutágenos contenidas en el agua son muy pequeñas, del orden de partes por billón (p.p.b), al llegar continuamente al organismo y no causar muerte celular, el daño genético puede acumularse en una sola célula hasta convertirla en cancerosa. Por lo tanto, es de suma importancia conocer las vías por las cuales llegan los mutágenos al organismo y así poderlos evitar.

Una planta de potabilización, ubicada al suroriente de Medellín (Colombia), que distribuye agua potable a más de 1.500.000 habitantes de la parte sur de Medellín y municipios aledaños, potabiliza agua del afluente y de otros ríos que pueden estar contaminados con agroquímicos, desechos industriales y aguas negras domiciliarias. El afluente, además recibe aguas negras provenientes de un corregimiento, de algunas veredas y de expendio de carnes fritas y asadas, así como de carpinterías ricas en solventes y de bombas de gasolina. Los mutágenos disueltos en el agua pueden encontrarse en pequeñas

concentraciones las cuales pueden ser imperceptibles por ensayos mutagénicos de rutina. Por lo tanto, es necesaria la extracción de la materia orgánica de estas aguas usando resina XAD. Esta resina es un copolímero de estireno-divenilbenzeno de baja polaridad que posee características macrorreticulares, esenciales para su alta capacidad de adsorción de químicos polares y apolares potencialmente efectivos en pruebas tóxicas y genotóxicas.

El ensayo de mutagenicidad de Ames, que consiste en usar cepas auxotrofas de *Salmonella typhimurium* con mutación en el operón histidina, determinan si algún compuesto o mezcla es mutagénica o no, dependiendo de la cantidad de colonias revertantes de his- a his+. Este ensayo, ha sido ampliamente usado para detectar actividad mutagénica en mezclas complejas ambientales, así como de agua de río. Cepas altamente sensibles responden a aminos aromáticas y/o nitrocompuestos que también han sido encontrados ambientalmente en algunas aguas superficiales [20]. El ensayo de cometa permite cuantificar la cantidad de daño en el ADN como resultado de la interacción con agentes genotóxicos contenidos en las aguas que se están evaluando. En este trabajo se logró determinar la actividad mutagénica y genotóxica de extractos de aguas que alimentan una planta de potabilización, cuyos resultados evidencian un potencial riesgo para los habitantes expuestos a estas aguas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Muestras.

Las muestras de agua fueron colectadas en un afluente y en una planta de tratamiento de aguas antes de tratar, de acuerdo al *Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water* [21]. 100 litros de agua fueron tomados en el afluente a 1 metro de profundidad, mientras que los 100L de agua antes de tratar se tomaron en el laboratorio de la planta de tratamiento de agua. Ambas muestras se

tomaron en 3 ocasiones distintas con igualdad de condiciones climatológicas. Posteriormente los 100L de agua de cada uno de los sitios muestreados se pasaron por un filtro de gasa con el fin de retener cualquier material sólido.

2.2. Extracción del material orgánico.

Las muestras de agua se ajustaron a un pH 7, muy similar al natural. Luego se procedió a concentrar el material orgánico de cada muestra; para esto, el agua (100L) se pasó por una columna de vidrio que contenía 100 gramos de resina XAD-7 y 100 gramos de resina XAD-2. El agua se pasó por gravedad a una velocidad aproximada de 15 ml/mm. El material orgánico de la columna fue consecutivamente eluído con 4 volúmenes de acetona seguida de tres volúmenes de dietil éter. Los solventes se retiraron por rota evaporación a baja presión y 50°C hasta alcanzar la sequedad para poder pesarlos y etiquetarlos. En la parte inferior y superior de la columna se colocó algodón que también se lavó con metanol. Las concentraciones que se trabajaron se obtuvieron diluyendo 0.5; 1; 1.5; 2; 2.5 y 3 mg de extracto en un mililitro de DMSO al 50%.

2.3. Mutagenicidad por el test de Ames.

El efecto mutagénico de los extractos del material orgánico del agua obtenidos por resinas se evaluó por medio del test de Ames, usando el protocolo descrito por Maron y Ames [22]. Se trabajó con dos cepas mutantes auxotrofas de *Salmonella typhimurium*, TA-98 y TA-100, con mutaciones en el operón histidina por pérdida/ganancia de bases y por sustitución de bases, respectivamente. Se evaluó la mutagenicidad de cada extracto usando concentraciones que no sean tóxicas o solo lleguen a $LC_{10} \cdot 10^8$ bacterias mutantes contenidas en caldo nutritivo fueron mezcladas con las distintas concentraciones de los extractos previamente mencionadas, en presencia o ausencia de enzimas activadoras contenidas en un homogenizado de hígado (mezcla S9) de rata macho, con el fin de activar algunos mutágenos indirectos de manera metabólica. La mezcla se pre-incubó a 37°C por una hora y luego se sembró en agar mínimo. El conteo de colonias se realizó luego de 48 horas de incubación a 37°C. Para el control positivo se utilizó 2-aminofluoreno (2-AF). Como control negativo

se usaron agua desionizada y bi-destilada, y como control interno se usó DMSO al 7%. Para cuantificar la mutagenicidad se determinó el índice mutagénico (IM), el cual es la proporción entre el número de revertantes inducidas por el tratamiento con respecto a las revertantes espontáneas del control negativo. Los resultados de cada concentración se expresaron como el promedio de tres experimentos independientes, cada uno por duplicado.

2.4. Evaluación de la citotoxicidad por azul de tripán y de la genotoxicidad mediante el ensayo Cometa.

La muestra de sangre fue colectada de un voluntario (saludable, no fumador, de 22 años de edad) en vacuntainer estéril con heparina como anticoagulante. Los linfocitos fueron aislados de las muestras de sangre a base de ficoll, mediante centrifugación a 2000rpm por 30'. Fueron lavados con Buffer fosfato salino (PBS) y tratados independientemente a distintas concentraciones: 0.25; 0.5; 0.75; 1; 1.25; 1.5 mg/ml DMSO (1%). Las células fueron rutinariamente chequeadas por viabilidad celular mediante azul de tripan, antes y después de una hora de tratamiento. Posteriormente el ensayo cometa fue llevado a cabo y se procesó según la metodología propuesta por Singh et al., [23]. Las células tratadas, mezcladas con agarosa de bajo punto de fusión (LMA) al 0.5%, se pipetearon sobre portaobjetos previamente impregnados con agarosa de punto de fusión normal (NMA), inmediatamente se cubrieron con cubreobjetos para sumergirlo en solución de lisis fresca, por mínimo una hora. Después, los portaobjetos se colocaron en una cámara de electroforesis horizontal con tampón alcalino (pH >13) (NaOH 10N y EDTA 200mM) a 4°C por 20 min para que el pH alcalino desnaturalice el ADN y optimice las rupturas de los sitiosapurínicos (AP) ocasionados por los genotóxicos. Al cumplirse este tiempo, se corrió la electroforesis a 25 V, 300mA por 30 min. Los portaobjetos se lavaron con tampón neutralizante y se tiñeron con bromuro de etidio. Las células se observaron de manera manual en un microscopio marca Nikon con un filtro verde de una longitud de onda de 540nm, con un aumento de 400X y un micrómetro ocular de 20X con un valor máximo de medición de 100µm. Se hicieron tres experimentos independientes y se analizaron 100 células por cada tratamiento (50 células por placa) en cada

experimento. El daño del ADN se midió con base en la longitud en μm de la migración de los fragmentos de ADN (cola) de los cometas (a mayor longitud de cola, hay más fraccionamiento del ADN) [24]. Para medir el daño también se tiene en cuenta la frecuencia de células dañadas. Los linfocitos, cuyas colas sean mayores a dos veces la longitud promedio del control, se clasificaron como células dañadas.

2.5. Análisis estadístico.

Los resultados del test de Ames se analizaron mediante la variable de índice mutagénico (IM), que significa la cantidad de revertantes inducidas por el tratamiento sobre las revertantes espontáneas. El análisis se hizo mediante pruebas no paramétricas de Mann Whitney y análisis de correlación de Spearman. Para los datos de genotoxicidad evaluada mediante el ensayo cometa solo se tomó el parámetro de (longitud de cola en μm) por que la lectura se hizo manual según Rajaguru, Vidya et al. [25], se promediaron (medianas) con base en los datos de 50 células por cultivo de linfocitos (unidad experimental) se analizaron mediante ANOVA factorial. El análisis se hizo con el programa estadístico SPSS 19.0 (IBM Software, NY, USA), con un nivel de significancia máximo de 0.05. En todas las tablas, N se refiere al número de platos o cajas de petri.

3. RESULTADOS

3.1. Ensayo de Salmonella.

En la Tabla 1 se resumen los resultados promedio (Media y desviación estándar) de la mutagenicidad expresada como índice mutagénico (IM) obtenida con el test de Ames, para cada uno de los cuatro factores incluidos en el estudio (*sitio de muestreo, cepa, activación metabólica y concentración del extracto*).

Los resultados demostraron que las aguas de la planta tuvieron una influencia significativamente mayor sobre el IM ($p < 0.05$) en comparación con las aguas del afluente, exhibiendo un incremento de la mutagenicidad alrededor del 12%. Por otro lado, la cepa de *S. typh-*

imurium TA-98 y la presencia de enzimas metabólicas, extracto S9, influyen significativamente en el IM con respecto al control negativo ($p < 0.05$). El incremento promedio del número de revertantes de la cepa TA-98 respecto a la cepa TA-100 es del 70%, mientras que el incremento promedio de la mutagenicidad de los extractos de agua en presencia de S9 es del 77%.

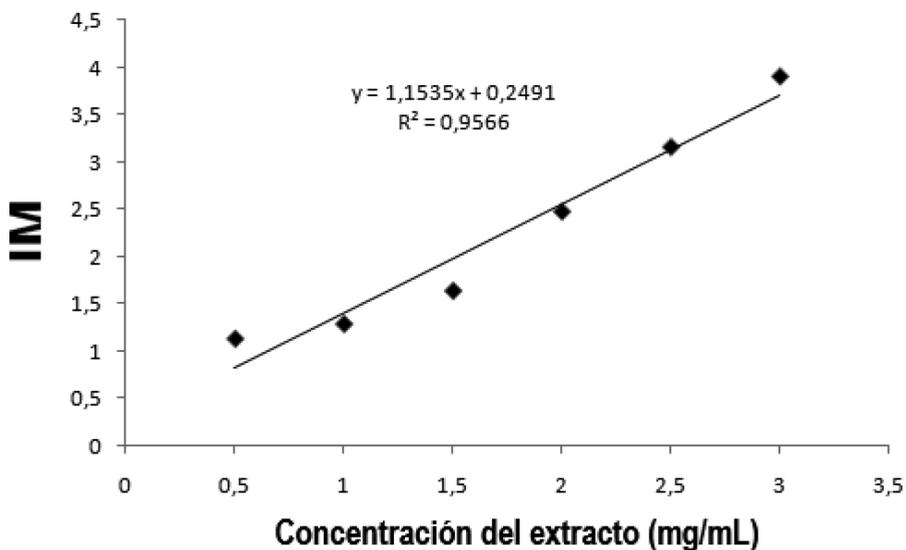
Se observó un efecto claro de concentración-respuesta entre los extractos y la actividad mutagénica mediante la prueba no paramétrica de correlación de Spearman, identificando una asociación lineal positiva, significativa estadísticamente ($p < 0.05$), entre las concentraciones del extracto y el IM (tabla 1). Desde la concentración más baja de extracto (0.5mg/mL) se observa una influencia significativa sobre el IM con respecto al control negativo ($p < 0.05$), y el IM incrementa dependiendo directamente de la concentración mostrando así, mayor promedio de IM en la concentración más alta (3mg/ml) y el menor promedio de IM es exhibido por la concentración más baja (0.5mg/ml).

Tabla 1. Valores del índice de mutagenicidad de acuerdo al sitio de muestreo, a la cepa, a la presencia y ausencia de enzimas metabólicas y a las Concentraciones. Los resultados son expresados como el promedio de 3 experimentos independientes, cada tratamiento por duplicado.

Índice de Mutación				
FACTORES		*X ± DE	N	Prueba; p = sig-nificancia es-tadística
SITIO	Afluente	2.029 ± 0.074	168	U = 11742.000 ^a p = 0.007
	Planta	2.145 ± 0.074	168	
CEPA	TA-98	2.622 ± 0.074	168	U = 10682.500 ^a p = 0.000
	TA-100	1.552 ± 0.074	168	
ACTIVACIÓN METABÓLICA	CON S-9	2.671 ± 0.074	168	U = 9422.000 ^a p = 0.000
	SIN S-9	1.503 ± 0.074	168	
CONCENTRACIÓN DE EXTRACTO EN mg/mL	0.5	1.140 ± 0.037	56	Rho = 0.825 ^b p = 0.000
	1	1.296 ± 0.037	56	
	1.5	1.644 ± 0.037	56	
	2	2.476 ± 0.037	56	
	2.5	3.154 ± 0.037	56	
	3	3.896 ± 0.037	56	

En la Figura 1 se observa el análisis de regresión entre la concentración de los extractos de agua de ambos sitios y el IM, indicando que la concentración es directamente proporcional al IM. El coeficiente de determinación ($R^2 = 0.95$) permite inferir que la variabilidad observada en el índice de mutación depende en un 95% de la concentración de los extractos acuosos. El 5% restante, posiblemente depende de otros factores tales como el sitio de muestreo, de la cepa y de la activación metabólica.

Figura 1. Asociación lineal positiva entre la concentración de los extractos del afluente y la planta, y el promedio de los índices mutagénicos (IM) exhibidos por ambos sitios de muestreo.



3.2. Ensayo Cometa.

En la tabla 2, se resume el efecto genotóxico en linfocitos humanos por los extractos de agua de los dos sitios de muestreo, evaluado mediante el ensayo Cometa. El biomarcador de genotoxicidad es la “longitud de cola” en μm y entre mayor longitud más es el daño en el material genético. Mediante análisis de varianza factorial univariado, se detecta un débil incremento en la longitud de cola en los linfocitos tratados con el extracto del agua del afluente ($57.4 \pm 15.1 \mu\text{m}$) respecto de la longitud de cola de los linfocitos tratados con agua de la planta ($54.2 \pm 14.5 \mu\text{m}$); no obstante, la diferencia no alcanza a ser significativa al nivel del 5% ($p = 0.06$) (Ver tabla 2).

Tabla 2. Longitud de cola como resultado de la fragmentación del ADN, inducida por los extractos de los dos sitios de muestreo e interacción entre concentración y sitio de muestreo. También se observa la F y la p de ANOVA para cada caso.

Concentración (mg/mL)	Longitud de cola *X (µm) ± e. e.		Longitud en función de la concentración	
	Afluyente	Planta		
DMSO	31.1 ± 2.8	32.9 ± 2.8	32 ± 4.9	F= 53.8 p ^a = 0.00
0.5	48.9 ± 2.8	46.5 ± 2.8	47.7 ± 2.3	
0.75	58 ± 2.8	54.3 ± 2.8	56.1 ± 6.3	
1	59.5 ± 2.8	58.5 ± 2.8	59 ± 6.5	
1.25	70 ± 2.8	64.6 ± 2.8	67.3 ± 7.9	
1.5	75.8 ± 2.7	68.1 ± 2.8	72 ± 10.4	
Longitud en función del sitio	57.2 ± 15.1	54.2 ± 14.5	55.7 ± 14.8	
	F= 3.36; p ^b = 0.08		F= 0.71; p ^c = 0.6	

p^a= Significancia estadística al comparar las concentraciones.

p^b= Significancia estadística al comparar los sitios de muestreo.

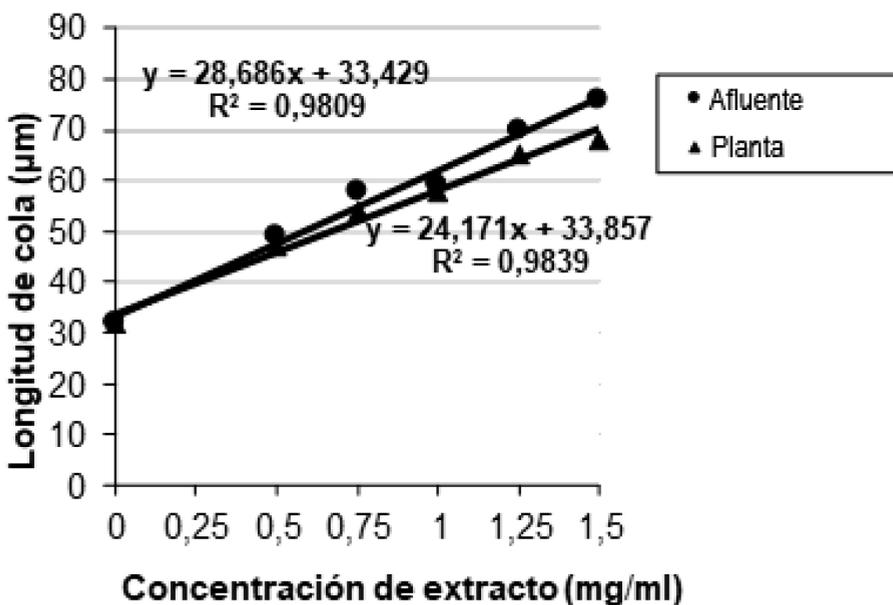
p^c= Significancia estadística de la interacción entre concentración y sitios de muestreo.

*Media ± error estándar (Tamaño de muestra)

En consecuencia, se puede afirmar que las aguas de ambos sitios se asemejan en función a la genotoxicidad. Cuando se comparan las medias de longitud de cola de las diferentes concentraciones, incluido el control negativo, se determina diferencia significativa de todas las concentraciones respecto al control negativo (F = 53.81; p < 0.05). La diferencia en el efecto genotóxico de los extractos de agua, resultó ser independiente del sitio de origen, pues la interacción entre los dos factores (sitio y concentración) no fue significativa estadísticamente (F = 0.71; p = 0.6). Ambos sitios de muestreo no presentaron diferencias significativas en función a la genotoxicidad (F = 3.36; p = 0.08). Mediante análisis de correlación y regresión se identificó una

asociación lineal positiva significativa estadísticamente (afluente: $r^2=0.98$, $p<0.05$; planta: $r^2=0.98$, $p<0.05$), entre la concentración de los extractos y la longitud de la cola de las 300 células evaluadas por cada concentración (figura 2). El coeficiente de determinación (r^2) permite inferir que la variabilidad de la longitud de cola depende en un 98% de la concentración del extracto, para ambos sitios de muestreo.

Figura 2. Asociación lineal positiva entre longitud de cola y la concentración del extracto de dos sitios de muestreo: afluente y la planta, promediado a partir de 300 datos por cada concentración.



3.3. Ensayo de viabilidad celular mediante azul de tripan.

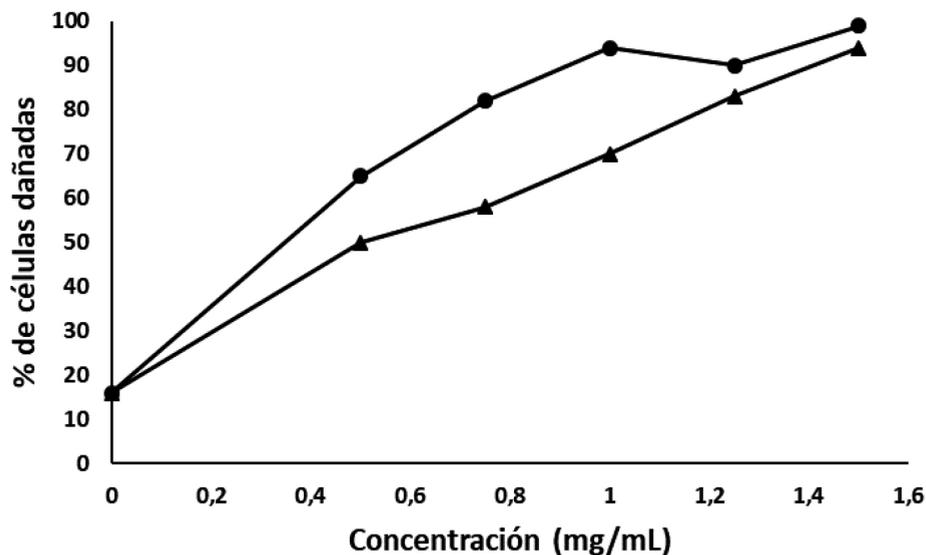
La viabilidad de los linfocitos humanos en el pre - tratamiento osciló entre 97 y 99%. En la tabla 3 y figuras 3 y 4, se presenta el porcentaje de viabilidad celular de los eritrocitos y el porcentaje de células dañadas (son las células con longitud de cola mayor al promedio del control) como resultado a más de una hora de exposición a los extractos de las aguas de ambos sitios. Se realizaron registros en 300 células por cada concentración, en cada sitio.

Tabla 3. Porcentaje de viabilidad y porcentaje de daño en eritrocitos, inducido por los extractos de las aguas del afluente y de la planta a diferentes concentraciones evaluadas.

Sitio	Concentración (mg/ml)	% Viabilidad post-tratamiento	% de daño
Afluente	DMSO	96	16
	0.5	92	65
	0.75	87	82
	1	90	94
	1.25	86	90
	1.5	85	99
Planta	DMSO	96	16
	0.5	89	50
	0.75	85	58
	1	87	70
	1.25	85	83
	1.5	80	94

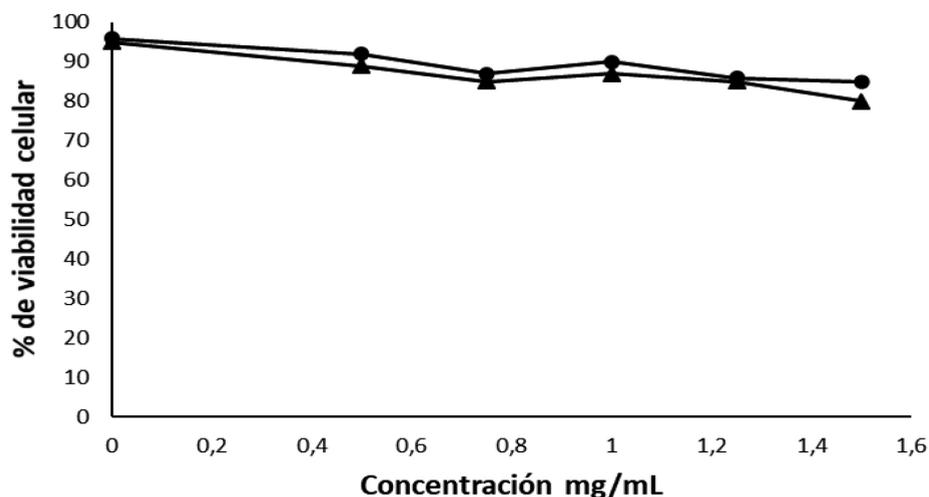
El porcentaje de células dañadas como consecuencia del efecto de los extractos de agua fue directamente proporcional a la concentración. De hecho en la figura 3, se puede observar un daño considerable a partir de las concentraciones más bajas para ambas muestras de agua. De manera general, las aguas del afluente mostraron un porcentaje de daño mayor en las concentraciones más bajas en comparación con las aguas de la planta. No obstante, en las concentraciones máximas de los extractos, el efecto genotóxico inducido por los dos sitios de muestreo es muy similar.

Figura 3. Porcentaje de linfocitos humanos dañados, expuestos por una hora a cinco concentraciones de los extractos de las aguas del afluente (●) y del agua cruda al entrar a la planta (▲).



La viabilidad de los linfocitos humanos post-tratamiento disminuyó en función del aumento de la concentración de los extractos de agua de ambos sitios de muestreo. Bajo la influencia de las aguas del afluente, la viabilidad disminuyó del 96% al 85% en forma dosis dependiente, mientras que las aguas de la planta disminuyeron la viabilidad desde el 96% hasta el 80% en la máxima concentración evaluada.

Figura 4. Viabilidad de linfocitos humanos después de una hora de tratamiento con cinco concentraciones de extractos de agua del afluyente (●) y de agua cruda al entrar a la planta (▲) mediante coloración con azul de tripan.



4. DISCUSIÓN.

Los estudios nacionales e internacionales sobre mutágenos en cuerpos de aguas contaminadas con residuos industriales, agroquímicos y aguas negras, demuestran una asociación lineal positiva entre el aumento de la concentración de los extractos de agua y el IM junto con la longitud de cola de los cometas [2, 26-29], en concordancia con nuestros resultados, en donde se evidenció un incremento del número de revertantes en las cepas TA 98 y TA 100 con y sin activación metabólica, mostrando predominancia de la actividad mutagénica en la TA98, debido a que la mayoría de las mezclas complejas ambientales a excepción del agua clorada, tienen mayor actividad en la cepa TA98 en comparación con la TA100 [30]. Diversos estudios han utilizado estas dos cepas para evaluar la mutagenicidad de distintas muestras complejas ambientales [31-34].

Los mayores valores de IM se evidenciaron en presencia de S9, indicando que estas aguas se encuentran influenciadas por desechos de zonas urbanas, zonas agrícolas e industriales (carpintería y bombas de gasolina), arrojando mutágenos al afluente y transportándolos hasta la planta. El agua de la planta mostró mayor efecto mutagénico que el agua del afluente. Este incremento en la mutagenicidad es debido a que en la planta se acumulan mutágenos provenientes del afluente y de otros cuerpos de agua que la surten. Según Vargas et al., [35], algunos mutágenos orgánicos polares desechados por las industrias, son transportados por el agua conservando sus características físicas y químicas.

La mayor actividad mutagénica observada en los dos sitios de muestreo fue de acción indirecta en presencia de enzimas metabólicas para ambas cepas analizadas, TA98 y TA100. Esto indica que en estas aguas hay mayor concentración de mutágenos indirectos ó sea que necesitan ser metabolizados para activarse y así poder interactuar con el ADN bacteriano. Entre estos compuestos, los más comunes que se han encontrado en estudios similares son: aminas heterocíclicas [36], hidrocarburos policíclicos aromáticos [37] y nitrosaminas [38]. Los mecanismos para que estos compuestos se activen son los siguientes: El primero es llevado a cabo por citocromo P450 (CYP1A2) y el segundo es llevado a cabo por o-acetyltransferasa y sulfotransferasa, ocasionando así especies altamente reactivas capaces de unirse al ADN [39, 40].

En este trabajo la mayor actividad mutagénica fue observada en la cepa TA98, la cual detecta mutágenos que actúan por pérdida y/o ganancia de bases. El incremento en el número de revertantes de esta cepa puede ser debido a la presencia de aminas heterocíclicas en estas aguas, ya que son mutágenos indirectos muy comunes en aguas negras residuales, que inducen mutación por pérdida o ganancia de bases [41]. Las aminas heterocíclicas son formadas en la costra quemada de alimentos proteicos fritos y asados [42] y pueden llegar a las aguas de los ríos por medio de la orina y heces fecales de las personas que las consumen. Las aminas más abundantes encontradas en los cuerpos de agua que presentan este tipo de contaminación son las arilaminas, las cuales son compuestos altamente mutagénicos y

eventualmente carcinogénicos [43]. Estas sustancias se encuentran generalmente en desechos industriales; que en el caso particular de las aguas de la planta y las del afluente, vienen en desechos de colorantes usados en la carpintería. Algunos colorantes, cuando son descargados dentro del río, pueden permanecer suspendidos en el agua o pueden ser absorbidos por el botón de sedimentos o bioconcentrados [44, 45].

Otros compuestos también son muy comunes en cuerpos de aguas tales como los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA), que provocan mutación por pérdida o ganancia de bases y son formados por la combustión incompleta de material orgánico [46]; pueden llegar a las aguas muestreadas por desechos industriales, residuos domiciliarios, lluvias, escorrentías o procesos atmosféricos [47, 48]. El benzo a pireno es uno de los HPA más comunes en el ambiente, ya sea libre o mezclado con otra sustancia [49] y por lo tanto uno de los más estudiados. El mecanismo de acción del benzo- a -pireno en la cepa TA 98 ha sido determinado [50] y consiste en una mutación inducida en una secuencia de bases repetidas consistente en la delección de bases (CG ó GC) en la secuencia CGCGCGCG.

La baja actividad mutagénica de la cepa TA100 con y sin activación metabólica, en comparación con la TA98, tanto en el afluente como en la planta, puede ser atribuido a varios procesos de interacción entre metabolitos y blancos genéticos en la cepa TA100 (*HisG46*, G-C) [51]. Las aguas estudiadas, son alimentadas principalmente con desechos domiciliarios y no han sido sometidas a procesos de cloración, por lo tanto, no hay productos de cloración como trihalometanos y furanonas, que son mutágenos que revierten la cepa TA100 [52].

En esta investigación se identificó una relación concentración-respuesta entre las concentraciones de los extractos de ambos sitios y la mutagenicidad (IM) y el daño genético (Longitud de cola). La asociación lineal positiva entre las concentraciones y los biomarcadores de mutagenicidad y genotoxicidad puede deberse a la sumatoria entre compuestos intrínsecos de cada extracto de agua como mezcla

compleja, que expresa las sumas de las respuestas mutagénicas con respecto al incremento proporcional de la concentración. Además, Taylor y colaboradores [53], afirmaron que las interacciones entre dos mutágenos similares no tienden a reaccionar entre sí por sus características electrofílicas, sino que reaccionan con otras moléculas presentes en el extracto, macromoléculas celulares o de la mezcla S9.

Los resultados del ensayo cometa, demuestran que los extractos acuosos del afluente y de la planta, inducen diferentes niveles de daño del ADN en linfocitos humanos. Generalmente, resultados así son relacionados con la presencia de mutágenos en el agua tales como hidrocarburos policíclicos aromáticos, aminas heterocíclicas y nitrosaminas, que forman aductos con el ADN [54-56], ocasionando sitiosapurínicos que fragmentan e incrementan la cola de los cometas [57].

Con respecto a la genotoxicidad los dos sitios, afluente y planta, no presentaron diferencia significativa estadísticamente, lo que sugiere que las sustancias genotóxicas que llegan a la planta son las mismas que aporta el afluente, omitiendo las contribuciones genotóxicas de otros afluentes y contrastando con los resultados obtenidos con la actividad mutagénica, en donde se observó que las aguas de la planta tenían un mayor efecto mutagénico en comparación con las del afluente. Se debe tener en cuenta que los principios fisiológicos y bioquímicos de ambos ensayos no son iguales, y que la tasa de revertancia en una célula procariota en función a un fenómeno de mutación, y la longitud de cola en una eucariota como resultado de un evento genotóxico, no deben ser necesariamente correlacionados, ya que un efecto genotóxico se origina primariamente y de no ser reparado se establece una mutación. De hecho, cada resultado del biomarcador obtenido es inherente al modelo biológico en el que se evalúa.

Además, no se puede ignorar que las aguas que llegan en la planta se encuentran represadas. Esto puede promover la sedimentación de algunas sustancias genotóxicas ya sea en forma libre o unidas al material orgánico tales como ácidos húmicos y fúlvicos [58], impidiendo así su solubilidad en las aguas superficiales de la planta que fue

en donde se tomó la muestra. La viabilidad disminuyó en presencia de los extractos de agua. Este efecto se debe a la presencia de varios contaminantes que pueden llegar a cuerpos de agua tales como pesticidas, metales, hidrocarburos policíclicos aromáticos, entre otros contaminantes orgánicos, los cuales tienen efectos tóxicos disminuyendo la viabilidad en varios tipos de células [59, 60].

CONCLUSIÓN

Con los resultados, se puede concluir que las aguas que llegan a la planta contienen mutágenos en su gran mayoría, aquellos que inducen pérdida o ganancia de bases en el ADN, y que además necesitan activación metabólica para su acción. De acuerdo a la literatura estos compuestos podrían ser hidrocarburos policíclicos aromáticos, aminas heterocíclicas, ptalatos, y benzotriazoles, los cuales se han evidenciado estar presentes en aguas influenciadas por intervención antrópica. Las prácticas agrícolas, el estilo de vida y los procesos industriales de esta región colombiana, contribuyen a la contaminación de estos cuerpos de agua que surten una planta de potabilización de Medellín. Además, se evidenció que los compuestos que constituyen estas aguas, tienen la capacidad de interactuar con el ADN en linfocitos humanos, lo que indica que muchos de estos compuestos pueden ser potencialmente peligrosos.

Agradecimientos:

Agradecimientos a COLCIENCIAS, EPM, Aguas de Rionegro, CORNARE, Universidad de Antioquia. Agradecimientos a Silvio Carvajal por su asesoría estadística. Cómo no agradecer a nuestra maestra Margarita Zuleta, pionera de la mutagénesis en Colombia.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] M. Muz, J. P. Dann, F. Jäger, W. Brack, and M. Krauss, "Identification of Mutagenic Aromatic Amines in River Samples with Industrial Wastewater Impact," (in eng), *Environ Sci Technol*, vol. 51, no. 8, pp. 4681-4688, Apr 2017.
- [2] J. M. de Castro E Sousa *et al.*, "Cytotoxicity and genotoxicity of Guaribas river water (Piauí, Brazil), influenced by anthropogenic action," (in eng), *Environ Monit Assess*, vol. 189, no. 6, p. 301, Jun 2017.
- [3] Q. Zeng *et al.*, "Evaluation of genotoxic effects caused by extracts of chlorinated drinking water using a combination of three different bioassays," (in eng), *J Hazard Mater*, vol. 296, pp. 23-9, Oct 2015.
- [4] X. Nie, W. Liu, L. Zhang, and Q. Liu, "Genotoxicity of drinking water treated with different disinfectants and effects of disinfection conditions detected by umu-test," (in eng), *J Environ Sci (China)*, vol. 56, pp. 36-44, Jun 2017.
- [5] M. Muz, M. Krauss, S. Kutsarova, T. Schulze, and W. Brack, "Mutagenicity in Surface Waters: Synergistic Effects of Carboline Alkaloids and Aromatic Amines," (in eng), *Environ Sci Technol*, vol. 51, no. 3, pp. 1830-1839, Feb 2017.
- [6] P. J. Kerzic and R. D. Irons, "Distribution of chromosome breakpoints in benzene-exposed and unexposed AML patients," (in eng), *Environ Toxicol Pharmacol*, vol. 55, pp. 212-216, Oct 2017.
- [7] Y. J. Chang, C. Y. Tseng, P. Y. Lin, Y. C. Chuang, and M. W. Chao, "Acute exposure to DEHP metabolite, MEHP cause genotoxicity, mutagenesis and carcinogenicity in mammalian Chinese hamster ovary cells," (in eng), *Carcinogenesis*, vol. 38, no. 3, pp. 336-345, Mar 2017.
- [8] P. D. Josephy, M. Zahid, J. Dhanoa, G. B. de Souza, H. Groom, and M. Lambie, "Potent mutagenicity in the Ames test of 2-cy-

- ano-4-nitroaniline and 2,6-dicyano-4-nitroaniline, components of disperse dyes,” (in eng), *Environ Mol Mutagen*, vol. 57, no. 1, pp. 10-6, Jan 2016.
- [9] N. Mathur, P. Bhatnagar, P. Nagar, and M. K. Bijarnia, “Mutagenicity assessment of effluents from textile/dye industries of Sanganer, Jaipur (India): a case study,” (in eng), *Ecotoxicol Environ Saf*, vol. 61, no. 1, pp. 105-13, May 2005.
- [10] I. Briguglio *et al.*, “Benzotriazole: An overview on its versatile biological behavior,” (in eng), *Eur J Med Chem*, vol. 97, pp. 612-48, Jun 2015.
- [11] P. Viberg, K. G. Wahlund, and K. Skog, “On-line capillary based quantitative analysis of a heterocyclic amine in human urine,” (in eng), *J Chromatogr A*, vol. 1133, no. 1-2, pp. 347-52, Nov 2006.
- [12] M. A. Shabbir, A. Raza, F. M. Anjum, M. R. Khan, and H. A. Suleria, “Effect of thermal treatment on meat proteins with special reference to heterocyclic aromatic amines (HAAs),” (in eng), *Crit Rev Food Sci Nutr*, vol. 55, no. 1, pp. 82-93, 2015.
- [13] E. M. John, M. C. Stern, R. Sinha, and J. Koo, “Meat consumption, cooking practices, meat mutagens, and risk of prostate cancer,” (in eng), *Nutr Cancer*, vol. 63, no. 4, pp. 525-37, 2011.
- [14] N. J. Gooderham, S. Creton, S. N. Lauber, and H. Zhu, “Mechanisms of action of the carcinogenic heterocyclic amine PhIP,” (in eng), *Toxicol Lett*, vol. 168, no. 3, pp. 269-77, Feb 2007.
- [15] M. G. Knize and J. S. Felton, “Formation and human risk of carcinogenic heterocyclic amines formed from natural precursors in meat,” (in eng), *Nutr Rev*, vol. 63, no. 5, pp. 158-65, May 2005.
- [16] Y. Liu *et al.*, “Particulate matter, gaseous and particulate polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in an urban traffic tunnel of China: Emission from on-road vehicles and gas-particle partitioning,” (in eng), *Chemosphere*, vol. 134, pp. 52-9, Sep 2015.

- [17] A. Hakura *et al.*, “Use of human liver S9 in the Ames test: assay of three procarcinogens using human S9 derived from multiple donors,” (in eng), *Regul Toxicol Pharmacol*, vol. 37, no. 1, pp. 20-7, Feb 2003.
- [18] J. Yan, L. Wang, P. P. Fu, and H. Yu, “Photomutagenicity of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons from the US EPA priority pollutant list,” (in eng), *Mutat Res*, vol. 557, no. 1, pp. 99-108, Jan 2004.
- [19] S. A. Langie *et al.*, “Causes of genome instability: the effect of low dose chemical exposures in modern society,” (in eng), *Carcinogenesis*, vol. 36 Suppl 1, pp. S61-88, Jun 2015.
- [20] L. D. Claxton, G. e. A. Umbuzeiro, and D. M. DeMarini, “The Salmonella mutagenicity assay: the stethoscope of genetic toxicology for the 21st century,” (in eng), *Environ Health Perspect*, vol. 118, no. 11, pp. 1515-22, Nov 2010.
- [21] “Standard methods for the examination of water and wastewater,” vol. 19th ed. American Public Health Association, , ed. Washington, DC, 8/27-8/32,, 1995.
- [22] D. M. Maron and B. N. Ames, “Revised methods for the Salmonella mutagenicity test,” (in eng), *Mutat Res*, vol. 113, no. 3-4, pp. 173-215, May 1983.
- [23] N. P. Singh, M. T. McCoy, R. R. Tice, and E. L. Schneider, “A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells,” (in eng), *Exp Cell Res*, vol. 175, no. 1, pp. 184-91, Mar 1988.
- [24] A. Azqueta and A. R. Collins, “The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair,” (in eng), *Arch Toxicol*, vol. 87, no. 6, pp. 949-68, Jun 2013.
- [25] P. Rajaguru, L. Vidya, B. Baskarathupathi, P. A. Kumar, M. Palanivel, and K. Kalaiselvi, “Genotoxicity evaluation of polluted ground water in human peripheral blood lymphocytes using the comet assay,” (in eng), *Mutat Res*, vol. 517, no. 1-2, pp. 29-37, May 2002.

- [26] B. C. Manzano, M. M. Roberto, M. M. Hoshina, A. A. Menegário, and M. A. Marin-Morales, "Evaluation of the genotoxicity of waters impacted by domestic and industrial effluents of a highly industrialized region of São Paulo State, Brazil, by the comet assay in HTC cells," (in eng), *Environ Sci Pollut Res Int*, vol. 22, no. 2, pp. 1399-407, Jan 2015.
- [27] E. Bianchi *et al.*, "Monitoring the Genotoxic and Cytotoxic Potential and the Presence of Pesticides and Hydrocarbons in Water of the Sinos River Basin, Southern Brazil," (in eng), *Arch Environ Contam Toxicol*, vol. 72, no. 3, pp. 321-334, Apr 2017.
- [28] N. J. Batista *et al.*, "Genotoxic and mutagenic evaluation of water samples from a river under the influence of different anthropogenic activities," (in eng), *Chemosphere*, vol. 164, pp. 134-141, Dec 2016.
- [29] J. C. Sierra, N. Benitez, E. Bravo, A. Soto, and F. Larmat, "Evaluation of the mutagenic activity of waters collected from the cauca river in the city of Cali, Colombia by using the salmonella/microsome assay," *Revista de Ciencias, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas Universidad del Valle*, vol. 16, pp. 131-143, 2012.
- [30] D. M. DeMarini, "Induction of mutation spectra by complex mixtures: approaches, problems, and possibilities," *Environmental health perspectives*, vol. 102, no. Suppl 4, p. 127, 1994.
- [31] A. T. Lemos, D. P. Rosa, J. A. Rocha, and V. M. Vargas, "Mutagenicity assessment in a river basin influenced by agricultural, urban and industrial sources," (in eng), *Ecotoxicol Environ Saf*, vol. 72, no. 8, pp. 2058-65, Nov 2009.
- [32] S. Tabrez and M. Ahmad, "Mutagenicity of industrial wastewaters collected from two different stations in northern India," (in eng), *J Appl Toxicol*, vol. 31, no. 8, pp. 783-9, Nov 2011.
- [33] D. Balabanič, M. Filipič, A. Krivograd Klemenčič, and B. Žegura, "Raw and biologically treated paper mill wastewater effluents and the recipient surface waters: Cytotoxic and genotoxic

- activity and the presence of endocrine disrupting compounds,” (in eng), *Sci Total Environ*, vol. 574, pp. 78-89, Jan 2017.
- [34] J. Oñate, A. Arenas, A. Ruiz, K. Rivera, and C. Peláez, “Evaluation of Mutagenic and Genotoxic Activity in Vinasses Subjected to Different Treatments,” *Water Air Soil Pollut*, vol. 226, pp. 144-154, 2015.
- [35] V. M. Vargas *et al.*, “Genotoxicity assessment in aquatic environments under the influence of heavy metals and organic contaminants,” (in eng), *Mutat Res*, vol. 490, no. 2, pp. 141-58, Feb 2001.
- [36] M. A. D. Silveira, D. L. Ribeiro, G. M. Vieira, N. R. Demarco, and L. P. G. d’Arce, “Direct and Indirect Anthropogenic Contamination in Water Sources: Evaluation of Chromosomal Stability and Cytotoxicity Using the *Allium cepa* Test,” (in eng), *Bull Environ Contam Toxicol*, vol. 100, no. 2, pp. 216-220, Feb 2018.
- [37] C. M. Gallampo, E. L. Schymanski, M. Krauss, N. Ulrich, M. Bataineh, and W. Brack, “Multicriteria approach to select polyaromatic river mutagen candidates,” (in eng), *Environ Sci Technol*, vol. 49, no. 5, pp. 2959-68, Mar 2015.
- [38] X. Wang, Z. Liu, C. Wang, Z. Ying, W. Fan, and W. Yang, “Occurrence and formation potential of nitrosamines in river water and ground water along the Songhua River, China,” (in eng), *J Environ Sci (China)*, vol. 50, pp. 65-71, Dec 2016.
- [39] M. Stiborová *et al.*, “Cytochrome b5 increases cytochrome P450 3A4-mediated activation of anticancer drug ellipticine to 13-hydroxyellipticine whose covalent binding to DNA is elevated by sulfotransferases and N,O-acetyltransferases,” (in eng), *Chem Res Toxicol*, vol. 25, no. 5, pp. 1075-85, May 2012.
- [40] F. P. Guengerich, “Cytochrome p450 and chemical toxicology,” (in eng), *Chem Res Toxicol*, vol. 21, no. 1, pp. 70-83, Jan 2008.

- [41] I. Shamovsky *et al.*, “Explanation for main features of structure-genotoxicity relationships of aromatic amines by theoretical studies of their activation pathways in CYP1A2,” (in eng), *J Am Chem Soc*, vol. 133, no. 40, pp. 16168-85, Oct 2011.
- [42] W. Pfau, K. Rosenvold, and J. F. Young, “Formation of mutagenic heterocyclic aromatic amines in fried pork from Duroc and Landrace pigs upon feed supplementation with creatine monohydrate,” (in eng), *Food Chem Toxicol*, vol. 44, no. 12, pp. 2086-91, Dec 2006.
- [43] L. Peng and R. J. Turesky, “Capturing labile sulfenamide and sulfinamide serum albumin adducts of carcinogenic arylamines by chemical oxidation,” (in eng), *Anal Chem*, vol. 85, no. 2, pp. 1065-72, Jan 2013.
- [44] R. O. Alves de Lima, A. P. Bazo, D. M. Salvadori, C. M. Rech, D. de Palma Oliveira, and G. de Aragão Umbuzeiro, “Mutagenic and carcinogenic potential of a textile azo dye processing plant effluent that impacts a drinking water source,” (in eng), *Mutat Res*, vol. 626, no. 1-2, pp. 53-60, Jan 2007.
- [45] G. e. A. Umbuzeiro, D. A. Roubicek, C. M. Rech, M. I. Sato, and L. D. Claxton, “Investigating the sources of the mutagenic activity found in a river using the Salmonella assay and different water extraction procedures,” (in eng), *Chemosphere*, vol. 54, no. 11, pp. 1589-97, Mar 2004.
- [46] K. H. Kim, S. A. Jahan, E. Kabir, and R. J. Brown, “A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects,” (in eng), *Environ Int*, vol. 60, pp. 71-80, Oct 2013.
- [47] J. Li, X. Shang, Z. Zhao, R. L. Tanguay, Q. Dong, and C. Huang, “Polycyclic aromatic hydrocarbons in water, sediment, soil, and plants of the Aojiang River waterway in Wenzhou, China,” (in eng), *J Hazard Mater*, vol. 173, no. 1-3, pp. 75-81, Jan 2010.
- [48] Zuleta M, Uribe Y, Valencia C, Vargas H, Orozco L Y, and L. C., “Contribución de la contaminación y cloración en la mu-

tagenicidad, genotoxocidad y presencia de mutágenos en agua potable,” *actualidades biológicas*, vol. 26, no. 81, pp. 125-136, 2004.

- [49] K. Krishnamurthi, S. S. Devi, and T. Chakrabarti, “The Genotoxicity of Priority Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) Containing Sludge Samples,” (in eng), *Toxicol Mech Methods*, vol. 17, no. 1, pp. 1-12, 2007.
- [50] D. A. Bell, Levine, J.G., and D. M. DeMarini, “DNA sequence analysis of revertants of the *hisD3052* allele of *Salmonella typhimurium* TA98 using the polymerase chain reaction and direct sequencing: Application to 1-nitropyrene-induced revertants,” *Mutation Research*, vol. 252, pp. 23-44, 1991.
- [51] D. E. Levin, Yamasaki, E., and B. N. Ames, “A new *Salmonella* tester strain, TA97, for the detection of frameshift mutagens : A run of cytosines as a mutational hot-spot,” *Mutation Research*, vol. 94, no. 2, pp. 315-330, 1982.
- [52] L. Sujbert, G. Rácz, B. Szende, H. C. Schröder, W. E. G Müller, and G. Török, “Genotoxic potential of by-products in drinking water in relation to water disinfection: survey of pre-ozonated and post-chlorinated drinking water by Ames-test,” (in eng), *Toxicology*, vol. 219, no. 1-3, pp. 106-12, Feb 2006.
- [53] M. S. Taylor, R. W. Setzer, and D. M. DeMarini, “Examination of the additivity assumption using the spiral and standard *Salmonella* assays to evaluate binary combinations of mutagens,” (in eng), *Mutat Res*, vol. 335, no. 1, pp. 1-14, Aug 1995.
- [54] F. Henkler, K. Stolpmann, and A. Luch, “Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: bulky DNA adducts and cellular responses,” (in eng), *EXS*, vol. 101, pp. 107-31, 2012.
- [55] M. Bellamri, L. Le Hegarat, L. Vernhet, G. Baffet, R. J. Turesky, and S. Langouët, “Human T lymphocytes bioactivate heterocyclic aromatic amines by forming DNA adducts,” (in eng), *Environ Mol Mutagen*, vol. 57, no. 9, pp. 656-667, 12 2016.

- [56] L. A. Peterson, "Formation, repair, and genotoxic properties of bulky DNA adducts formed from tobacco-specific nitrosamines," (in eng), *J Nucleic Acids*, vol. 2010, Sep 2010.
- [57] A. R. Collins, "Measuring oxidative damage to DNA and its repair with the comet assay," (in eng), *Biochim Biophys Acta*, vol. 1840, no. 2, pp. 794-800, Feb 2014.
- [58] M. Kutlu, G. Aydoğan, F. Susuz, and A. Ozata, "The Salmonella mutagenicity of water and sediments from the Porsuk River in Turkey," (in eng), *Environ Toxicol Pharmacol*, vol. 17, no. 2, pp. 111-6, Jun 2004.
- [59] N. Cedergreen, "Quantifying synergy: a systematic review of mixture toxicity studies within environmental toxicology," (in eng), *PLoS One*, vol. 9, no. 5, p. e96580, 2014.
- [60] P. Myllynen, T. Kurttila, L. Vaskivuo, and K. Vähäkangas, "DNA damage caused by benzo(a)pyrene in MCF-7 cells is increased by verapamil, probenecid and PSC833," (in eng), *Toxicol Lett*, vol. 169, no. 1, pp. 3-12, Feb 2007.