

Valoración de genotoxicidad en lodos de estaciones depuradoras de aguas residuales de Blanes, Vilaseca y Mataró. Barcelona - España

Genotoxicity assessment in sewage treatment plants of
sludge wastewater of Blanes, Vilaseca and Mataró.
Barcelona - Spain

José González Cabeza^{1,6}, Montserrat Llagostera Casas²,
María Elena León Marrou³, Armando Araujo Jiménez⁴,
Lennis Reyna López⁵

RESUMEN

La generación de grandes volúmenes de fangos de depuradora ha conducido a valorar este subproducto de las Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales; siendo el más atractivo, el empleo como abono orgánico o enmienda de suelos. Si bien existe un marco legislativo bastante extenso que garantizaría el uso seguro de estos fangos; éstos no dejan de ser bastante limitado.

La presencia de compuestos mutagénicos puede constituir la mayor desventaja para la selección de ésta alternativa; por esta razón, es que se efectuó la presente valoración de mutagenicidad empleando como sistema, el Ensayo de Retromutación en *Salmonella typhimurium*, ensayado con las cepas TA98 (y cepas isogénicas YG1024, YG1041) y TA100 (y cepas isogénicas YG1029 y YG1042). Las muestras de fangos (deshidratado, térmico y compostado) han procedido principalmente de la Estación Depuradora de Aguas Residuales de Blanes y otras estaciones (Vilaseca, Mataró), de los cuales se efectuaron lixiviados con agua, así como extracciones con solventes orgánicos, durante 2000-2002. Los resultados obtenidos son muy diversos en los tres tipos de fangos; todos, en algún periodo del estudio, han mostrado actividad mutagénica y/o toxicidad, derivados mayormente de lixiviados con agua, aunque debiendo ser optimizados aún los procesos de extracción y concentración orgánica. Asimismo, se hallaron diferencias de mutagenicidad procedentes de un mismo tipo de muestra, como de los procesos de secado térmico y compostaje.

Palabras clave: Genotoxicidad, reversión mutacional, reparación de DNA.

¹ Biólogo. Doctor en Biotecnología. Grupo de Microbiología Molecular y Biotecnología. Departamento de Ciencias-UPAO.

² Bióloga. Doctor en Biotecnología. Grupo de Genética y Microbiología Molecular. Universidad Autónoma de Barcelona.

³ Ingeniera en Industrias Alimentarias. Laboratorio de Microbiología. Universidad César Vallejo.

⁴ Microbiólogo. M.Sc. Gestión Ambiental. Grupo de Microbiología Molecular y Biotecnología. Departamento de Ciencias-UPAO.

⁵ Microbiólogo. M.Sc. Microbiología Clínica. Grupo de Microbiología Molecular y Biotecnología. Departamento de Ciencias-UPAO.

⁶ Correspondencia: gonzalezbiotec@hotmail.com

ABSTRACT

The generation of large volumes of sewage sludge has led to value this byproduct of wastewater treatment plants wastewater, being the most attractive, the use as organic fertilizer or soil amendment. While there is a rather extensive legislative framework that would ensure the safe use of sludge, they do not cease to be quite limited. The presence of mutagenic compounds may be the biggest disadvantage for the selection of this alternative, therefore, is that this assessment was made using mutagenicity as a system, the reverse mutation assay in *Salmonella typhimurium* strains TA98 tested with (and strains isogenic YG1024, YG1041) and TA100 (and YG1029 and YG1042 isogenic strains). The sludge samples (dehydrated, heat and compost) have proceeded mainly from the Wastewater Treatment Station and other stations Blanes (Vilaseca, Mataro), which were made with water leaching and extraction with organic solvents, in 2000 -2002. The results obtained are very different in the three types of sludge, all in a period of study have shown mutagenic and /or toxicity, derived mostly from leached with water, but still must be optimized extraction processes and organic concentration. Also found differences in mutagenicity from the same type of sample, and the processes of thermal drying and composting.

Key words: Genotoxicity, reverse mutation, DNA repair.

1. INTRODUCCIÓN

Cataluña posee una población de unos 6 millones de habitantes (15% de la población Española) y una superficie correspondiente al 6,4 % del Estado español, de unos 32000 km². Actualmente, genera una gran cantidad de residuos orgánicos biodegradables. El desarrollo de los planes de saneamiento ha generado durante los últimos años, un incremento del número de Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDAR) y con ello un crecimiento en la producción de lodos. Existen más de 250 depuradoras urbanas en servicio de las 300 planeadas en el plan de saneamiento, asegurando de esta manera dar cumplimiento a la Directiva Europea de Depuración de Aguas 271/CEE (1991) que prevee el saneamiento de aguas residuales de las poblaciones de más de 2000 habitantes antes del 2005. Estas depuradoras han de tratar las aguas residuales de más de 700 municipios y en la actualidad la población saneada es de más de 4 millones de habitantes, de los 6 millones censados^[1,2].

Se dispone de pocas estadísticas o datos cuantificados sobre la generación de lodos en España; sólo algunas comunidades autónomas han hecho estimaciones acerca del volumen de lodos producidos y de su gestión. Haciendo una extrapolación aproximada en base a los datos existentes, puede estimarse que en España se generaron en 1998 alrededor de 800000 tm de lodos, expresados en materia seca^[3], siendo esta cifra superior a la que figura en el Registro Nacional de

Lodos de EDAR que elabora el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, según el cual, en 1998 se habrían generado en España 689.488 t de materia seca.

Consecuentemente, uno de los principales problemas a los que se enfrentan las Juntas de Saneamiento y en general, de la administración pública, es el gran volumen de lodos que se generan. Paralelamente, la necesidad de conseguir abonos a bajo costo ha despertado el interés por residuos orgánicos de diversos orígenes como son el compostado producto de la industria agroalimentaria, y los lodos de depuradoras de aguas residuales. Concretamente, la aplicación de lodos, debido a su alto contenido de materia orgánica y nutrientes (nitrógeno y fósforo principalmente) es el potencial más atractivo debido a que produce mejoras físicas y químicas en el suelo.

En el citado Registro Nacional de Lodos de las EDAR se estima que un 22% aproximadamente de lodos se depositan en vertederos, un 51% se destina a usos agrícolas y un 4% son incinerados. Sin embargo, el uso de lodos en aplicación agrícola tiene sus riesgos, como es la contaminación del medio ambiente, especialmente del suelo^[3]. Si bien están fijados los requisitos establecidos en las Legislaciones Española y Europea, para el uso agrícola de los lodos, no consta que los requisitos o controles de aplicación y analíticas químicas sean las idóneas y se cumplan en todos los casos, hecho que debe evaluarse a fin de evitar daños irreparables a nuestro medio ambiente. Desde el año 1973,

Cuadro 1
CEPAS DE *Salmonella typhimurium* EMPLEADAS EN EL PRESENTE TRABAJO

Cepa	Genotipo	Procedencia
LT2	Silvestre	B. N. Ames
TA 98	<i>hisD3052, ΔuvrB, gal, bio, chl1008, rfa1004 / pKM101 (mucAB, Ap^R).</i>	B. N. Ames
TA 100	<i>hisG46, ΔuvrB, gal, bio, chl1005, rfa 1001 / pKM101 (mucAB, Ap^R).</i>	B. N. Ames
YG 1024	<i>hisD32, ΔuvrB, gal, bio, chl008, rfa 1004 / pKM101 (mucAB, Ap^R / pYG219 (sobreproducción de O-acetiltransferasa).</i>	T. Nohmi
YG 1029	<i>his46, ΔuvrB, gal, bio, chl005, rfa 1001 / pKM101 (mucAB, Ap^R) / pYG219 (sobreproducción de O-acetiltransferasa).</i>	T. Nohmi
YG 1041	<i>hisD3052, ΔuvrB, gal, bio, chl008, rfa 1004 / pKM101 (mucAB, Ap^R) / pYG219 (sobreproducción de O-acetiltransferasa y nitroreductasa).</i>	T. Nohmi
YG 1042	<i>hisG46, ΔuvrB, gal, bio, chl 1005, rfa 1001 / pKM101 (mucAB, Ap^R) / pYG219 (sobreproducción de O-acetiltransferasa y nitroreductasa).</i>	T. Nohmi

el Programa de las Naciones Unidas para el medio ambiente, tiene planeado como uno de sus principales objetivos la identificación de riesgos para la salud del hombre; siendo uno de ellos la presencia de mutágenos y/o carcinógenos ambientales, que traen como consecuencia enfermedades genéticas, cáncer, malformaciones congénitas y otras; los cuales deben ser detectados a través de la ejecución de análisis exhaustivos de todas las nuevas sustancias que se incorporan al medio ambiente ^[4].

El riesgo de incorporar mezclas complejas como son los lodos de depuradora al medio ambiente posibilita la exposición a promutágenos y/o mutágenos (y/o carcinógenos). En el presente trabajo se pretendió realizar una aproximación al problema asociado con la presencia de este tipo de compuestos en lodos de depuradora, teniendo como referencia los distintos tipos de lodos producidos principalmente en la EDAR Blanes, así como la de otras EDAR (Vilaseca, Mataró), empleando para ello el Ensayo de Retromutación de *Salmonella typhimurium*, el cual ha sido seleccionado como soporte fundamental de este estudio.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

Las muestras fueron obtenidas principalmente de la estación depuradora de Blanes, donde el tratamiento del agua residual se realiza mediante el proceso de fangos activos. Esta planta posee además, un tratamiento completo de los fangos, ya que son tratados en un diges-

tor metálico de 4000 m³ de capacidad y, posteriormente, son compostados mediante un sistema de túneles.

2.1. Obtención de lixiviados

Las muestras de fangos fueron remitidas al laboratorio, e inmediatamente almacenadas a -70 °C para su posterior tratamiento. La proporción del contenido en peso seco para el fango deshidratado, térmico y compostado fue de 0,2, 0,86, 0,69, respectivamente.

Extracciones con Solventes Orgánicos. Consistió en resuspender los fangos en 4 mezclas distintas de solventes orgánicos en las siguientes proporciones.: 1) DMSO al 10% 2) DMSO + Etanol (10%), 3) Metanol (10%), 4) Acetona + Tolueno + Metanol = 10%.

2.2. Métodos microbiológicos

2.2.1. Cepas Bacterianas. Las cepas bacterianas de *Salmonella typhimurium* empleadas son descritas en la Cuadro 1.

2.3. El ensayo

Método de incorporación en placa. Consistió en la combinación del tampón fosfato y/o mezcla de activación S9, la muestra problema, la cepa de ensayo escogida, con el agar de superficie licuado a 48 °C, previamente suplementado con trazas de histidina y biotina. Todo esto es agitado en vórtex y vertido en la superficie de placas de medio mínimo *Vogel Bonner E.* ^[5,6]. Para su realización es necesario proveerse de 2 sistemas de tubos de ensayo de polipropileno, con los contenidos siguientes:

Sistema I. Conjunto de tubos conteniendo las distintas preparaciones durante el ensayo de Ames.

	CE	C(+)	C(0)	A	B	C	D	E
Nº de Tubos	1	2	5	5	5	5	5	5
TP/mixS9 (mL)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
H ₂ O (mL)	0,1		0,1					
Mutageno (mL)		0,1						
Muestra (mL)	0,1			2	1,5	1	0,5	0,1
Cepa (mL)		0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1

Sistema II. Conjunto de tubos con agar de superficie a 48 °C, suplementado con trazas de histidina/biotina.

	CE	C(+)	C(0)	A	B	C	D	E
Nº de Tubos	1	2	5	5	5	5	5	5
TA 1X (mL)	3	3	3					3
TA1,5X (mL)							2,5	
TA 2X (mL)						2		
TA 2,5X (mL)					1,5			
TA 3X (mL)				1				

donde: CE = Control de Esterilidad.
 C(+) = Control Positivo
 C(0) = Control Negativo
 A-E = Tubos con diferentes volúmenes de muestra a ensayar
 TP/Mix S9 = Tampón Fosfato /Mezcla de activación metabólica S9.

El contenido de cada uno de los tubos del sistema I se añadieron a su correspondiente tubo del sistema II; agitándose en vórtex por 3 segundos y vertiendo el contenido sobre la superficie de las placas con medio mínimo Vogel Bonner E, de modo que con ligeros movimientos quede homogéneamente distribuido. Al término de esto; se espera unos minutos hasta la completa solidificación del agar y protegidas de la luz con papel. Las placas son incubadas a 37 °C por 66-72 h, al término de la cual se efectúa la cuantificación de revertantes de cada una de ellas.

Evaluación de Resultados

Los resultados son expresados cuantitativamente de distintas formas, la que se ha optado en este trabajo es la expresada como *índice mutagénico* (IM).

$$MR = \frac{\text{Nº de revertientes de la muestra problema}}{\text{Nº de revertientes del control negativo}}$$

Si el MR es menor de 2, la muestra es considerada negativa; y si es dos veces superior, se considera una respuesta mutagénica positiva^[5,6].

Ensayo efectuado en otro laboratorio [CETSB-Sao Paulo]

En el laboratorio de la Compañía de Tecnología de Saneamiento Ambiental (CETSB-Sao Paulo), se emplearon las cepas de *Salmonella typhimurium* TA98 y YG1042, ambas con y sin activación metabólica. El rango de dosis fue de 6,25 a 100 mg equivalente de muestra por placa. El ensayo se realizó por triplicado, mientras que los controles positivos se realizaron con 4-nitroquinolina-1-oxido (4NQO) y 2-Nitrofluoreno, para TA98 y YG1042 respectivamente, sin activación metabólica, y 2-amino antraceno (2AA) durante el ensayo con activación metabólica. Para el control negativo se utilizó DMSO.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la actualidad, existen más de cien ensayos destinados a predecir el riesgo genotóxico de los productos químicos para el hombre; esto indica que ninguno de ellos por sí sólo puede suministrar toda la información necesaria para establecer dicho riesgo; siendo indispensable por tanto el uso de test *in vivo* e *in vitro*^[4,7].

El ensayo de retromutación en *Salmonella typhimurium* (Test de Ames) constituye un elemento base en estudios de mutagenicidad y se han impuesto en la actualidad para la realización de estudios básicos de todo nuevo producto. Así, cerca del 60% de los estudios emplean el ensayo de retromutación en *Salmonella*, un 22% en otro tipo de ensayos mutacionales, un 10% en ensayos cromosómicos y aproximadamente 7% son ensayos en animales *in vivo*. Las razones de su amplio uso son posiblemente la confiabilidad que brinda, así como el costo relativamente económico que demanda. Adicionalmente, el ensayo puede ser usado durante la evaluación de mezclas complejas^[8], permitiendo la identificación de grupos químicos definidos que contienen actividad genotóxica.

El método de ensayo fue el sistema *in vitro* de retromutación en *S. typhimurium*. La metodología seguida ha sido incorporada por la CE en la Directiva 2000/32/CE publicada el 19 de mayo del 2000. La cepa de *S. typhimurium* que principalmente se ha empleado en este trabajo es la TA98 (*his D3052, rfa, uvrB/pKM101*), que es la más sensible en la detección de mutágenos ambientales, así como ciertas cepas isogénicas como la YG1024 y YG1041; y las cepas YG1029 y YG1042, isogénicas de *S. typhimurium* TA100. Asimismo, se efectúan los ensayos sin y con sistema de activación metabólica (S9⁺), producto de la fracción microsomal S9 de hígado de rata inducida con Aroclor 1254. La adición de la fracción microsomal S9 de mamífero pretende reproducir el metabolismo de un sistema de mamífero, por medio del cual se pretende detectar la actividad promutagénica^[9].

Mutagenicidad de lodos de la EDAR-Blanes, durante el Año 2000

De los lodos procedentes de la EDAR-Blanes del 2000, se obtuvieron lixiviados en agua, así como extracciones orgánicas con cloruro de metilo y meta-

nol, mediante soxhlet, los cuales fueron ensayados con *S. typhimurium* TA98 y TA100.

En cuanto a los lixiviados con agua no existió un aumento significativo del número de revertientes sin activación metabólica (Cuadro 2). Similares resultados se aprecian con activación metabólica para el lodo deshidratado; sin embargo, se detectó un aumento significativo del número de revertientes por placa en el lodo térmico, con un incremento del MR = 4,46 por encima de los revertientes espontáneos con el sistema de activación metabólica S9.

Este resultado positivo con la muestra de lodo térmico sugiere que el lixiviado debe contener sustancias promutagénicas solubles en agua y que en presencia del sistema de activación metabólica se originan biotransformaciones y consecuentemente la aparición de metabolitos mutagénicos.

Por otra parte, el lixiviado del lodo compostado también muestra un pequeño incremento del número de revertientes, ya sea en ausencia o presencia de la fracción S9, lo que hace sospechar que también existirían compuestos de ser metabolizados; aunque no llegando a las magnitudes del lodo térmico.

Los productos que generarían estos resultados, podrían ser miembros de la familia de hidrocarburos policíclicos aromático (PAH) o aminas aromáticas, ya que la cepa TA98 es especialmente sensible a este tipo de compuestos; por presentar un blanco mutacional (-C-G)₈ sensible a deleciones de un par -CG- o -GC-, siendo mayormente ocasionado por compuestos como el 2-nitrofluoreno (NF), el óxido N-nitroquinolina (NQ), N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NG).^[10,11,12,13]

Para obtener mayor información, se efectuaron extracciones orgánicas de los tres tipos de lodos mediante Soxhlet, empleando como solvente cloruro de metilo, metanol y resuspendidos en dimetil sulfóxido (DMSO) el cual es un solvente compatible con el ensayo de mutagénesis. Los resultados se muestran en la Cuadro 3, donde se observa que no se encontró un aumento significativo en el número de revertientes en ninguna de las muestras; no obstante, a dosis equivalente a 1 MOE/g de lodo, los extractos de cloruro de metileno de los lodos térmico y compostado resultaron tóxicos, observándose también un descenso en el número de revertientes por placa en el extracto del lodo deshidratado. Todo ello sugiere la presencia de compuestos orgánicos tóxicos en los lodos, y la generación de una mayor toxicidad

Cuadro 2
ACTIVIDAD MUTAGÉNICA EN *S. typhimurium* TA98, DE LIXIVIADOS EN AGUA DE LODOS DESHIDRATADOS, TÉRMICO Y COMPOSTADO, DE LA EDAR-BLANES (Año 2000)

Cepa TA98	Sin activación metabólica				Con activación metabólica			
	Deshidratado				Deshidratado			
	Número de revertientes/placa C(0)*	Número de revertientes/placa (g fango seco/placa)			Número de revertientes/placa C(0)*	Número de revertientes/placa (g fango seco/placa)		
	0	0,05	0,1	0,2	0	0,05	0,1	0,2
Media	29,67	29,5	29,22	31,11	42,33	54	45,67	40
D.E.	4,03	4,51	3,99	6,03	4,32	10,12	5,43	12,57
MR		0,99	0,98	1,04		1,27	1,08	0,94
		Térmico				Térmico		
Media	31,44	41,67	48,33	46,5	34,17	61,17	94,08	152,33
D.E.	5,13	3	3,64	4,46	8,15	18,71	20,3	60,75
MR		1,33	1,53	1,48		1,79	2,75	4,46
		Compostado				Compostado		
Media	32,33	49	41	40	37	59	62	58
D.E.	4,92	2,16	2,83	3,56	2,16	5,1	4,32	3,74
MR		1,51	1,27	1,24		1,59	1,67	1,56

* Control Negativo.

Cuadro 3
ACTIVIDAD MUTAGÉNICA EN *S. typhimurium* TA98, DE EXTRACTOS ORGÁNICOS CON CLORURO DE METILO DE LODOS DESHIDRATADOS, TÉRMICO Y COMPOSTADO, DE LA EDAR-BLANES (Año 2000)

Cepa TA98	Sin activación metabólica				Con activación metabólica			
	Deshidratado				Deshidratado			
	Número de revertientes/placa C(0)*	Número de revertientes/placa (g fango seco/placa)			Número de revertientes/placa C(0)*	Número de revertientes/placa (g fango seco/placa)		
	0	0,025	0,1	0,2	0	0,025	0,1	0,2
Media	28,83	27,27	27,27	17,33	36,17	33,67	47,17	25,33
D.E.	4,26	4,07	7,08	3,2	3,49	4,32	6,05	6,77
MR		0,94	0,94	0,6		0,93	1,3	0,7
		Térmico				Térmico		
Media	26,83	27,67	26	Tóxico	37,33	33,17	37,17	Tóxico
D.E.	4,67	4,89	4,89		4,89	5,95	4,12	
MR		1,03	0,93			0,88	0,99	
		Compostado				Compostado		
Media	31,5	31,67	31	Tóxico	39,5	42	41,17	Tóxico
D.E.	3,27	4,89	4,05		3,15	4,34	3,49	
MR		1,0	0,98			1,06	1,06	

* Control Negativo.

sea resultante de los procesos de secado térmico y compostaje.

Dado que en el lixiviado del lodo tratado térmicamente se había detectado una clara respuesta mutagénica, se evaluó el extracto orgánico en metanol con la cepa TA100. dicha cepa se caracteriza por poseer una mutación en el locus *hisG46* que resulta de la sustitución (transición) de un par de bases de una leucina (GAG / CTC) por una prolina (GGG / CCC) en el codon 69 de *hisG46*, siendo reversible por transiciones y transversiones en el codon mutado; aunque debemos señalar que los mutantes que acarrean arginina por la posición 69 no pueden ser detectados^[6,14,15]. Esta cepa, al igual que TA98 es poseedora del plásmido pKM101, que posibilita el incremento de la mutagénesis^[14].

Como se observa en el Cuadro 4, no se detectó indicios de mutagenicidad, con y sin fracción S9; pero fue evidente en ambos ensayos la aparición de toxicidad con concentraciones mayores de 0,001 mL de extracto/placa. Estos resultados refuerzan los obtenidos con la cepa TA98, en el sentido de la generación de compuestos tóxicos durante el proceso de tratamiento térmico de los lodos.

Mutagenicidad de Lodos de la EDAR-Blanes y durante el Año 2001

Similarmente al período anterior, se evaluaron los lodos procedentes de la EDAR-Blanes; así como de otras localidades como Vilaseca y Mataró. A partir de ellos, se obtuvieron lixiviados en agua, extracciones por Soxhlet con distintos solventes y extracciones con mezclas de compuestos orgánicos como metanol, DMSO, etanol+DMSO y acetona+tolueno+ metanol (ATM).

Referente a la valoración de los lixiviados en aguas de lodos de la EDAR-Blanes con TA98, observamos en el Cuadro 5 que son portadores de compuestos promutagénicos el lodo deshidratado con un RM=2,71 para la dosis más alta con sistema de activación metabólica; de otro lado, el fango térmico presenta actividad mutagénica (RM=2,13), pero en este caso sin el sistema de activación metabólica; mientras el lodo compostado carece de toda actividad. Dado esto, se creyó conveniente ensayar las muestras con cepas de *S. typhimurium* mucho más sensibles como la YG1024, YG1029 y Yg1041.

Como habíamos señalado, YG1024 y YG1041 se trata de cepas isogénicas de TA98; en la primera de

Cuadro 4
ACTIVIDAD MUTAGÉNICA EN *S. typhimurium* TA100, DE EXTRACCIONES ORGÁNICAS CON METANOL DEL LODO TÉRMICO, DE LA EDAR-BLANES (Año 2000)

Cepa Ta100	Sin activación metabólica					
	C(0)*	Térmico				
		Número de revertientes/placa mL extracto/placa				
	0	0,00025	0,0005	0,001	0,01	0,1
Media	106,6	117,2	109,6	93,4	66,6	67,6
D.E.	7,2	10,7	8,7	7,3	7,4	4,7
MR		1,1	1,03	0,88	0,62	0,63
Con activación metabólica						
	Térmico					
Media	128,4	113,4	121,8	116,8	88,2	68,4
D.E.	14,9	7,1	11,5	14,1	10,1	6,7
MR		0,88	0,95	0,91	0,69	0,53

* Control Negativo.

ellas se trata de una cepa hiperproductora de acetiltransferasa; mientras que la segunda, tanto de acetiltransferasa como de nitroreductasa, las cuales son enzimas involucradas en la activación metabólica intracelular de nitroarenos y aminas aromáticas. Los nitroarenos, mayormente los ubicamos en partículas emitidas por motores de combustión (petróleo y gasolina), condensado en el humo de cigarrillos y en la atmósfera urbana^[16,17,18]; entre ellos podemos citar al 2-Nitrofluoreno (2-NF), 1-Nitrofluoreno (1-NF) y el 1,8-Dinitrofluoreno (1,8-DNP), que son poderosos mutágenos^[19]. Mientras que las aminas aromáticas son empleadas como materia prima en la industria química, textil, de gomas, papel, colorantes etc.^[17]. De igual modo; la cepa YG1042 es también hiperproductora de acetiltransferasa y nitroreductasa, pero en este caso deriva de la cepa TA100^[16].

En los Cuadros 6, 7 y 8, correspondiente al lodo deshidratado muestra un resultado positivo con YG1024 sin sistema de activación metabólica, sugiriendo que la acetiltransferasa de esta cepa condicionaría la formación de compuestos mutagénicos a partir de aminas aromáticas y/o nitroarenos, dado que ninguno de ellos interactúa con el DNA per se, ellos

requieren conversiones metabólicas y de este modo ocasionar mutagénesis; pero sin embargo, la fracción microsomal detoxificaría dichos compuestos. Asimismo, estos compuestos mutagénicos tendrían gran afinidad por un blanco mutacional (-C-G-)8, de TA98 y YG1024; es decir, originando deleciones y no sobre otra diana como la de YG1029 en ausencia de sistema de activación metabólica.

En cuanto al lodo térmico, parece ser que presenta compuestos mutagénicos, aunque no siendo tan evidente en éstas tres cepas ensayadas. Teniendo el antecedente de haber resultado positivo con TA98 (S9), estas mezclas ocasionarían una mutagénesis directa siendo factible su detoxificación por la fracción S9.

De lo expuesto, resulta evidente que la naturaleza química tanto del fango deshidratado como del fango térmico es diferente, posiblemente debido al tratamiento que recibe este último, que es producto de un secado a través de aire caliente o una corriente de gas, cuya temperatura oscila alrededor de los 200 °C (secado indirecto) a 400 °C (secado directo), habiéndose reportado a través del análisis molecular que procesos de esta naturaleza generan nuevos productos como nitroarenos y dioxinas^[14].

Cuadro 5
ACTIVIDAD MUTAGÉNICA EN *S. typhimurium* TA98, DE LIXIVIADOS EN AGUA DE LODOS DESHIDRATADOS, TÉRMICO Y COMPOSTADO, DE LA EDAR-BLANES (Año 2001)

Cepa	Sin activación metabólica						Con activación metabólica						
	Deshidratado						Deshidratado						
	C(0)*	Número de revertientes/placa					C(0)*	Número de revertientes/placa					
TA100	0	0,1	0,5	1	1,5	2	0	0,1	0,5	1	1,5	2	
Media	20	24,5	22,8	34,3	34	37	27	33	50,4	26,5	50,6	73,3	
D.E.	2,6	4,1	2,8	7,8	9,6	4,4	2,9	3,2	8,9	4,1	7,2	8	
MR		1,23	1,14	1,71	1,7	1,85		1,22	1,86	0,98	1,87	2,71	
		Térmico						Térmico					
Media	24,6	44	45,4	45	52,4	43,8	40	37,6	41,6	40,4	34,2	43,4	
D.E.	2,3	6,8	8,7	2,3	5,8	5,3	4,8	2,1	6,5	6,21	7,4	3,5	
MR		1,79	1,85	1,83	2,13	1,78		0,94	1,04	1,01	0,855	1,085	
		Compostado						Compostado					
Media	26,8	29,8	25,2	34,5	26,4	26,8	34,8	34,3	34	36,5	32	31,5	
D.E.	3,8	4,3	5	7,3	2,1	2,7	6,4	3	5,6	6,1	4	6,8	
MR		1,11	0,94	1,29	0,99	1		0,98	0,98	1,05	0,92	0,91	

* Control Negativo.

Cuadro 6
ACTIVIDAD MUTAGÉNICA EN *S. typhimurium* YG1024, DE LIXIVIADOS EN AGUA DE LODOS DESHIDRATADOS Y TÉRMICO, DE LA EDAR-BLANES (Año 2001)

Cepa	Sin activación metabólica						Con activación metabólica							
	Deshidratado						Deshidratado							
	Número de revertientes/placa						Número de revertientes/placa							
YG1024	C(0)*	mL de lixiviado/placa					C(0)*	mL de lixiviado/placa						
	0	0,1	0,5	1	1,5	2	0	0,1	0,5	1	1,5	2		
Media	24,4	36	37,3	36,5	46,8	61,3	45,5	63,6	70,8	75	81,8	74		
D.E.	3,5	7,8	4,3	7,1	2,2	5,1	4	7,7	7,5	6,9	10,6	7		
MR		1,48	1,53	1,5	1,92	2,51		1,4	1,55	1,65	1,8	1,63		
		Térmico							Térmico					
Media	24	28,8	31,8	33,5	NR	NR	30,8	30,8	45,8	34,2	NR	NR		
D.E.	2,9	5,2	3,1	4,7			4,6	7,8	6,3	5,4				
MR		1,2	1,33	1,4				1	1,49	1,1				

* Control Negativo.

Cuadro 7
ACTIVIDAD MUTAGÉNICA EN *S. typhimurium* YG1029, DE LIXIVIADOS EN AGUA DE LODOS DESHIDRATADOS, TÉRMICO, DE LA EDAR-BLANES (Año 2001)

Cepa	Sin activación metabólica						Con activación metabólica							
	Deshidratado						Deshidratado							
	Número de revertientes/placa						Número de revertientes/placa							
YG1029	C(0)*	mL de lixiviado/placa					C(0)*	mL de lixiviado/placa						
	0	0,1	0,5	1	1,5	2	0	0,1	0,5	1	1,5	2		
Media	129,6	149,7	163,8	173,7	183,3	176	52,5	88,5	89	103,5	100	104		
D.E.	10,3	22,5	6	4,5	4,9	9,3	9,5	4,5	5	5,3	13,1	7		
MR		1,15	1,26	1,34	1,41	1,36		1,69	1,7	1,97	1,9	1,98		
		Térmico							Térmico					
Media	103,8	131,2	127,8	160,4	172,4	188,6	120,6	140,6	124,6	140	150	174,6		
D.E.	4,4	10	3,6	11,2	7,5	14,8	12,6	12	13,3	14,7	12	19,6		
MR		1,26	1,23	1,55	1,66	1,82		1,17	1,03	1,16	1,24	1,45		

* Control Negativo.

Haciendo uso de solventes orgánicos (DMSO, DMSO + etanol, Metanol, Acetona + Tolueno + Metanol) y no el agua; con el fin de incrementar la polaridad de ciertos componentes^[11] y pretender evidenciar actividad mutagénica en el lodo térmico; mostramos los resultados en la Cuadro 9, donde todos ellos resultaron negativos, solo registrándose pequeños indicios de mutagenicidad con la extracción de DMSO + etanol y ATM sin sistema de activación metabólica;

mientras, que con metanol y ATM, cuando fueron procesados con sistema de activación metabólica. Aunque debemos precisar que en este caso las concentraciones empleadas fueron mucho menores a las empleadas con lixiviados en agua; estas estuvieron dentro del rango de los 0,0125 µl/placa – 100 µl/placa.

Producto de los resultados obtenidos, se propuso efectuar otro tipo de extracción orgánica, mediante una mezcla de cloruro de metileno/metanol de los

Cuadro 8
ACTIVIDAD MUTAGÉNICA EN *S. typhimurium* YG1041, DE LIXIVIADOS EN AGUA DE LODOS DESHIDRATADOS, TÉRMICO, DE LA EDAR-BLANES (Año 2001)

Cepa YG1041	Sin activación metabólica						Con activación metabólica					
	Deshidratado						Deshidratado					
	Número de revertientes/placa						Número de revertientes/placa					
C(0)*	mL de lixiviado/placa					C(0)*	mL de lixiviado/placa					
0	0,1	0,5	1	1,5	2	0	0,1	0,5	1	1,5	2	
Media	57,8	80,3	73,5	88,5	84,5	90,8	60,8	71,8	90,2	97,8	100,8	106,4
D.E.	5,1	9	7	12,8	8,5	2,1	12,5	8,3	3,4	8,6	18,2	4,2
MR		1,39	1,27	1,53	1,46	1,57		1,18	1,48	1,61	1,66	1,75
	Térmico						Térmico					
Media	78,6	70,8	76,4	87	85,6	89,8	76,2	64,3	74,8	75,4	86,6	85,2
D.E.	6,8	4,9	8,5	11,5	8,2	10,3	14,2	6,2	8,5	7,1	10,1	0,6
MR		0,9	0,97	1,11	1,09	1,14		0,84	0,98	0,99	1,16	1,12

* Control Negativo.

Cuadro 9
ACTIVIDAD MUTAGÉNICA EN *S. typhimurium* TA98, DE EXTRACCIONES CON DIFERENTES SOLVENTES ORGÁNICOS DEL LODO TÉRMICO, DE LA EDAR-BLANES (Año 2001)

Cepa TA98	Sin activación metabólica					Con activación metabólica				
	DMSO + Etanol					DMSO + Etanol				
	Número de revertientes/placa					Número de revertientes/placa				
C(0)*	mL de lixiviado/placa				C(0)*	mL de lixiviado/placa				
0	0,012 mL	0,025 mL	0,05 mL	0,1 mL	0	0,012 mL	0,025 mL	0,05 mL	0,1 mL	
Media	21,3		23,5	25,3	36,5	25		21,2	20,8	26,8
D.E.	6,7		3,9	3,4	8,3	2,6		0,8	5,4	6,1
MR			1,1	1,19	1,71			0,85	0,83	1,07
	Metanol					Metanol				
Media	23,4	20,7	19,7	22,7	20,3	27,2	31,3	34,3	33	43
D.E.	4,4	2,9	2,1	2,1	3,2	5,3	5,5	3,2	7,9	2,6
MR		0,88	0,84	1,01	0,87		1,15	1,26	1,21	1,58
	ATM					ATM				
Media	21	28	25,8	27,5	33,6	30,4		38	36,8	46
D.E.	5,7	7,3	1,7	5,6	5	5,3		3,6	6,3	8
MR		1,33	1,23	1,31	1,6			1,25	1,21	1,51
	DMSO					DMSO				
Media	25,2	26	24	21,5	26,4					
D.E.	6,9	3,5	4,7	2,6	2,7					
MR		1,03	0,95	0,85	1,05					

* Control Negativo.

lodos térmico y compostado; los cuales fueron procesados en el CETESB (Sao Paulo-Brasil), cuyos resultados los tenemos en el Cuadro 10, siendo negativas ambas muestras para las cepas TA98 y YG1042; pero reportándose toxicidad en la cepa TA98 de la muestra de lodo compostado.

Mutagenicidad en lodos de las EDARs Vilaseca y Mataró

Durante este mismo periodo se abordó el estudio sobre el comportamiento de lodos deshidratados de

otras localidades como Vilaseca y Mataró; de los cuales se obtuvieron lixiviados en agua y ensayados con *S. typhimurium* TA98. Como aparece en el Cuadro 11, existe solo indicios de mutagenicidad en la muestra de Mataró, pero detectándose compuestos mutagénicos en el lodo procedente de Vilaseca con un MR = 2,13; lo que motivo el ensayo en YG1024 y YG1029 sin activación metabólica, no registrándose mutagenicidad en estas cepas, por lo que el resultado positivo podría haberse debido a algún otro tipo de mutágeno.

Cuadro 10
ACTIVIDAD MUTAGÉNICA EN *S. typhimurium* TA98 y YG1042, DE EXTRACCIONES CON CLORURO DE METILENO / METANOL DE LODOS TÉRMICOS Y COMPOSTADOS, DE LA EDAR-BLANES (Año 2001)

Cepa	Sin activación metabólica						Con activación metabólica					
	Térmico						Térmico					
	Número de revertientes/placa	mg Equiv. fango/placa					Número de revertientes/placa	mg Equiv. fango/placa				
TA98	C(0)*	6,25	12,5	25	50	100	C(0)*	6,25	12,5	25	50	100
Media	23,5	35,6	20,5	23,5	34	22	30,2	33,7	43	31,3	27,5	27
D.E.	1,73	4,04	0,71	6,36	3,61	1,73	5,72	4,62	2,65	8,33	2,12	2
MR		1,5	0,9	1,2	1,4	0,9		1,1	1,4	1	0,9	0,9
		Compostado					Compostado					
Media	23,5	33,7	28,5	36,3	30,7	31,7	30,2	29,7	27,7	32,3	Tóx.	Tóx.
D.E.	1,73	2,08	0,71	5,13	4,04	4,93	5,72	4,93	2,52	4,04		
MR		1,4	1,2	1,5	1,3	1,3		1	0,9	1		

Cepa	Sin activación metabólica						Con activación metabólica					
	Térmico						Térmico					
	Número de revertientes/placa	mg Equiv. fango/placa					Número de revertientes/placa	mg Equiv. fango/placa				
YG1042	C(0)*	6,25	12,5	25	50	100	C(0)*	6,25	12,5	25	50	100
Media	81,2	70,3	59,3	56,3	87,3	78,3	84,4	84,3	89,3	87,3	76,3	84,7
D.E.	7,16	10,5	2,08	1,53	8,5	16,5	2,88	6,03	4,04	13,8	13,65	10,79
MR		0,9	0,7	0,7	1,1	1		1	1	1	0,9	1
		Compostado					Compostado					
Media	81,2	69,7	94,5	92,3	104	102	84,4	81,7	80,7	81,7	81,7	111
D.E.	7,16	8,5	2,12	7,37	1	2,65	2,88	13,05	7,09	19,14	19,14	14
MR		0,9	1,2	1,1	1,3	1,3		1	1	1	1	1,3

* Control Negativo.

Cuadro 11
ACTIVIDAD MUTAGÉNICA EN *S. typhimurium* TA98 y YG1024 y YG1029 DE LIXIVIADOS EN
AGUA DE LODOS DESHIDRATADOS DE LA EDAR-VILASECA Y MATARÓ (Año 2001)

Cepa TA98	Sin activación metabólica						Con activación metabólica					
	Mataró						Mataró					
	Número de Colonias revertientes/placa C(0)*	mL lixiviado/placa					Número de Colonias revertientes/placa C(0)*	mL lixiviado/placa				
	0	6,25	12,5	25	50	100	0	6,25	12,5	25	50	100
Media	20,6	23,8	26,2	26,8	29,6	34	27,8	29	40,8	45	44	47,3
D.E.	0,9	5,3	2,9	5,8	3,4	5,8	5,7	7	6,2	5,7	8,7	3,4
MR		1,16	1,27	1,3	1,44	1,65		1,04	1,47	1,62	1,58	1,7
		Vilaseca						Vilaseca				
Media	26,3	41	38,4	52	50,4	56	37,2	39,2	38,8	39,4	43,8	44,2
D.E.	3,2	2,9	6,9	7,1	6,8	4,4	4,9	9,8	4,5	4,6	5,5	8,5
MR		1,56	1,46	1,98	1,92	2,13		1,05	1,04	1,06	1,18	1,19

Sin activación metabólica							
Cepa YG1024	Mataró						
	Número de Colonias revertientes/placa C(0)*	mL lixiviado/placa					
		0	6,25	12,5	25	50	100
Media	25,8	26	31,4	30,4	36	31	
D.E.	4,7	4	2,1	4	4,2	6,8	
MR		1,01	1,22	1,18	1,4	1,2	
	Vilaseca						
Cepa YG1029	Número de Colonias revertientes/placa						
	Número de Colonias revertientes/placa C(0)*	mL lixiviado/placa					
		0	6,25	12,5	25	50	100
Media	131	138,4	140	129,8	121,8	130,6	
D.E.	5	15,4	14,1	7,6	10,4	9,3	
MR		1,06	1,07	0,99	0,93	1	

* Control Negativo.

Mutagenicidad de lodos de la EDAR-Blanes durante el Año 2002

Respecto a la valoración de mutagenicidad de lodos del año 2002, se efectuaron lixiviados en agua de los tres tipos de lodos de la EDAR-Blanes, cuyos resultados los exponemos en la Cuadro 12; guardando solo similitud con los del periodo anterior el lodo deshidratado, en el cual se reitera la existencia de compuestos

promutagénicos (MR = 2,1) a la dosis más alta; y a diferencia de muestras anteriores existe solo cierta mutagenicidad en el fango térmico con y sin sistema de activación.

Es notorio apreciar la aparición de compuestos mutagénicos en el fango compostado sin exposición a la fracción microsomal S9, con un MR = 2,62, alcanzado con una concentración de 1,5 ml. de muestra; y

solo habiendo indicios de mutagenicidad (MR= 1,83) con activación metabólica. Paralelamente se presenta toxicidad acompañando a la mutagénesis, que se manifiesta por un crecimiento de fondo en las placas de ensayo Este último resultado sugiere una serie de posibles explicaciones.

Conceptualmente el compostaje es considerado como una tecnología de biorremediación tanto de lodos como de suelos, que consiste en una descomposición en los digestores de los residuos orgánicos por efecto de los microorganismos presentes, creándose un ambiente caracterizado por elevadas temperaturas (>50 °C), alta concentración de nutrientes, oxígeno y un pH neutro. Sin embargo ésta tecnología, puede ser muy efectiva como ineficaz en la reducción de genotoxicidad^[9,20], siendo ya citada en estudios de biorremediación de que el compostaje y otros tratamientos pueden disminuir la genotoxicidad, aunque al cabo de unas semanas esta vuelve a aparecer y/o, por lo que es

válido cuestionarse en que medida este tipo de proceso post lodo deshidratado pueden ser efectivos en disminuir un posible efecto mutagénico.

De todo lo anteriormente expuesto, es preciso poner en relevancia de que a través de los lixiviados con agua, estos han resultados adecuados para valorar la mutagenicidad de los lodos de depuradoras, aunque en nuestro caso posiblemente ha existido un inadecuado sistema de extracción y concentración orgánica de las muestras que no resultaron fehacientemente mutagénicas.

Por otra parte, en varias oportunidades se efectuaron repeticiones con determinadas muestras (resultados no descritos), donde se evidenció que los RM diferían uno de otro a la misma concentración y siendo de la misma procedencia; en todos los casos se presentaron mayores RM en ensayos que fueron efectuados inmediatamente comprobada la esterilidad del lixiviado.

Cuadro 12
ACTIVIDAD MUTAGÉNICA EN *S. typhimurium* TA98 DE LIXIVIADOS EN AGUA DE LODOS DESHIDRATADOS DE LA EDAR-BLANES (Año 2002)

Cepa TA98	Sin activación metabólica						Con activación metabólica						
	Deshidratado						Deshidratado						
	Número de Colonias revertientes/placa C(0)*	mL lixiviado/placa					Número de Colonias revertientes/placa C(0)*	mL lixiviado/placa					
	0	0,1	0,5	1	1,5	2	0	0,1	0,5	1	1,5	2	
Media	20,3	24,3	24,8	26	25,8	25,6	25,8	39,5	41,4		39,8	54,2	
D.E.	2,1	4,9	1,6	2,4	3	4	4	4,7	5,9	5,2	9,1	4,9	
MR		1,2	1,22	1,28	1,27	1,26		1,53	1,61	1,96	1,54	2,1	
		Térmico						Térmico					
Media	24,2	31	31,2	32	34	36,8	34	33	46,4	47	48,6	51,2	
D.E.	2,2	5,3	3,9	2,61	5,3	3,7	2,2	14,2	6,1	10,5	9,4	4,7	
MR		1,28	1,29	1,32	1,4	1,52		0,97	1,36	1,38	1,42	1,5	
		Compostado						Compostado					
Media	24,2	22,5	42,2	58,6	63,5	46,8	34	29,6	33,8	55	62,2	57,6	
D.E.	2,2	4,5	4,4	7,2	5,1	10,1	2,2	5,4	9,6	7,6	3,4	9,6	
MR		0,92	1,74	2,42	2,62	1,93		0,87	0,99	1,62	1,83	1,69	
			(+)	(++)	(++)	(+++)							

(+) = Poco Tóxico
(++) = Medianamente Tóxico
(+++)= Muy Tóxico

* Control Negativo.

Haciendo un balance de lo hallado, se deduce que existe una gran variabilidad en la composición química de éstos lodos, que se traduce en los diversos tipos de respuesta obtenidos para cada uno de ellos durante estos tres años.

Cierto es que los lodos de depuradora presentan una serie de potencialidades y resolverían muchos problemas; sin embargo, parece ser que no soluciona el problema del vertido de componentes peligrosos para el hombre, como son los compuestos genotóxicos. Si bien este tipo de mezclas cuando son aplicadas (especialmente al suelo) están sujetas a una serie de transformaciones de tipo físico, químico y biológico (fenómenos de absorción, adsorción sobre suelos y plantas, volatilización, fotólisis, y de degradación química y biológica) es posible que puedan conducir a la generación de metabolitos mutagénicos, hecho que deben de valorar las administraciones competentes y de esta manera fomentar y promover actuaciones encaminadas a una racionalización en su utilización.

4. CONCLUSIONES

El lodo térmico del año 2000 contiene compuestos orgánicos (posiblemente miembros de la familia de PAH y aminas aromáticas) capaces de ser biodisponibles y ser metabolizados por enzimas presentes en la fracción S9 y consecuencia de ello generar metabolitos mutagénicos. El lodo compostado (año 2000) también podría presentar este tipo de compuestos, si bien la sensibilidad del ensayo no ha sido suficiente para detectarlo claramente. Asimismo; la extracción con cloruro de metilo y metanol de lodos térmico y compostado podría haber generado un aumento de compuestos tóxicos, dado que presentan toxicidad durante el ensayo con *S. typhimurium* TA98 y Ta100.

Los lodos deshidratado y térmico durante el periodo 2001, presentaron mutagenicidad en cepas distintas de *S. typhimurium*, posiblemente debido a la diferente naturaleza química resultante del proceso de secado térmico.

Lodos deshidratados procedentes de otras EDARs, también presenta actividad mutagénica o indicios de ella, tal es el caso de las EDAR Vilaseca y Mataró.

El lodo compostado (Año 2002) mostró ser tóxico, y a la vez presentar actividad mutagénica sin exposición a la fracción microsomal S9, lo que resulta cuestionable si ésta tecnología (compostaje) podría reducir el riesgo del empleo de fangos.

La elevada variabilidad en el potencial mutagénico y/o tóxico de los lodos durante el periodo 2000-2002, son un reflejo de la diversidad en compuestos orgánicos que deben contener cada uno de ellos.

La obtención de lixiviados en agua resultan adecuados en la detección de mutagenicidad de lodos de EDARs, aunque el sistema de extracción a través de compuestos orgánicos no ha permitido evidenciar claramente la presencia de compuestos genotóxicos.

Por existir respuesta mutagénica diferencial a partir de un mismo tipo de muestra, es recomendable realizar los ensayos de los lixiviados, al poco tiempo de ser obtenidos; ya que en el curso del tiempo (entre 15 días y dos meses) disminuye su potencial mutagénico.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Molins, J. Depuradoras de Aguas Residuales en Cataluña en el Año 1998. Revista del Colegio de Ingenieros de Caminos, Canales y Puertos. N°33 (1995). Saneamiento II.
- 2 Pous, M.; Simo, J. 2001. La Gestión de Lodos y de Residuos Orgánicos en Cataluña. I Encuentro Internacional de Gestión de residuos Orgánicos en el Ambiente Rural Mediterraneo.
- 3 Ministerio del Medio Ambiente/Dirección General de Calidad y Evaluación Ambiental. 2001. Plan Nacional de Lodos de Depuradora de Aguas Residuales-EDAR (2001-2006). Secretaria General de Medio Ambiente. Madrid.
- 4 Albadalejo, R.; Villanueva, R.; Ortega, P.; Astasio, P.; Gil, A.; Granados, B.; Calle, M.; y Dominguez, V. 1995. Evaluación de la actividad Mutagénica de Aguas de Consumo Público por medio del Test de Ames. Revista Española de Salud Pública N°5. Set. Oct.
- 5 Maron. D.; Ames, B. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. Mutation Research 113(1983) 173-215.
- 6 Mortelmans, K.; Zeiger, E.: The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity Assays. Mutation Research 455(2000) 29-60.
- 7 Friedber, E.; Walker, G.; Siede, W. 1995. DNA Repair and Mutagenesis. ASM Press. Washington D.C. 535 p.p.
- 8 Randerath, K.; Randerath, E.; Zhou, G.; Supunpong, N.; He, L.; McDonald, T.; Donnelly, K. Genotoxicity of Complex PAH Mixtures Recovered from Contaminated Lake Sediments as Assessed by three Different Methods. Environmental and Molecular Mutagenesis 33:303-312 (1999).
- 9 Callendar, R.; Mackay, J.; Clay, P.; Elcombe, C. Elliott, B. Evaluation of phenobarbital /-naphthoflavone as an alternative S9-induction regime to aroclor 1254 in the rat for use *in vitro* genotoxicity assays. Mutagenesis Vol. 10 N°6 pp. 517-522. 1995.
- 10 Cebula, T.; Koch, W. Sequence Analysis of *Salmonella thypimurium* Revertants. Mutation and the Environmental. Part D. 366-377 (1990).
- 11 De Marini, D. Influence of DNA repair on mutation spectra in *Salmonella*. Mutation Research 450 (2000) 5-17.

- 12 Hartman, P.; Ames, B.; Roth, J.; Barnes, W.; Levin D. Target Sequences for Mutagenesis in *Salmonella* Histidine-Requiring Mutants. 1986 Alan R. Liss, Inc.
- 13 Ohe, T.; Shaughnessy, D.; Landi, S.; Terao, Y.; Sawanishi, H.; Nukaya, H.; Wakabayashi, K.; DeMarini, D. Mutation Spectra in *Salmonella* TA98, TA100 of the phenylbenzotriazole mutagens (PBTA-1 and PBTA-2) Detected in the Nishitakase River in Kyoto, Japan. *Mutation Research* 429(1999) 189-198.
- 14 DeMarini, David. Mutation Spectra of Complex Mixtures. *Mutation Research* 411(1998) 11-18.
- 15 Koch, W.; Henrikson, E.; Kupchella, E.; Cebula, T. *Salmonella typhimurium* strain TA100 differentiates several classes of carcinogens and mutagens by base substitution specificity. *Carcinogenesis*, Vol.15, N°1, pp.79-88, 1984.
- 16 Hagiwara, Y.; Watanabe, M.; Oda, Yoshimitsu,; Sofuni, T.; Nohmi, T. Specificity and sensitivity of *Salmonella typhimurium* YG1041 and YG1042 strains possessing elevated levels of both nitroreductase and acetyltransferase activity. *Mutation Research*, 291(1993) 171-180.
- 17 Watanabe, M.; Ishidate, M.; Nohmi, T. Sensitive method for the detection of mutagenic nitroarenes and aromatic amines: new derivatives of *Salmonella typhimurium* tester strains possessing elevated O-acetyltransferase levels. *Mutation Research* 234(1990) 337-348.
- 18 Sera, N.; Fukuhara, K.; Miyata, N.; Tokiwa, H. Mutagenicity of nitrophenanthrene derivatives for *Salmonella typhimurium*: effects of nitroreductase and acetyltransferase. *Mutation Research* 349(1996) 137-144.
- 19 Einistö P.; Watanabe, M.; Ishidate, M.; Nohmi, T. Mutagenicity of 30 chemicals in *Salmonella typhimurium* strains possessing different nitroreductase or O-acetyltransferase activities. *Mutation Research* 259 (1991) 95-102.
- 20 Claxton, L.; Houk, V.; Hughes, T. Genotoxicity of Industrial Wastes and Effluents. *Mutation Research* 410(1998) 237-243.