

DETECCIÓ D'ACTIVITAT GENOTÒXICA A L'AIGUA

per

MONTSERRAT LLAGOSTERA *, RICARD GUERRERO, ISIDRE GIBERT,
SALVADOR GARRIDO I JORDI BARBÉ

Departament de Microbiologia, Facultat de Ciències,
Universitat Autònoma de Barcelona

RESUM

Ha estat estudiada l'activitat genotòxica d'extrets orgànics d'aigües del riu Llobregat durant l'època primaveral. Per a aquest estudi han estat desenvolupades les condicions de treball òptimes amb soques d'*Escherichia coli* portadores de fusions entre el gen *lacZ* i els gens *recA*, *sfiA* i *umuC* del sistema SOS. Ha estat valorada, mitjançant la quantificació de l'enzim β -galactosidasa, la inducció d'aquets tres gens SOS, i hom ha pogut determinar així la capacitat genotòxica i la mutagènesi dependent del sistema SOS dels extrets orgànics d'aigües. Així mateix, ha estat dut a terme complementàriament l'assaig d'Ames en aquelles mostres en les quals no havia estat detectada mutagenicitat seguint l'assaig SOS.

Hom discuteix els avantatges d'emprar conjuntament ambdós mètodes així com l'aplicació a l'estudi de la genotoxicitat i de la mutagènesi ambiental.

SUMMARY

The genotoxic activity of organic extracts of Llobregat River was studied using two bacterial methods for the assay of mutagenicity. The SOS-dependent genotoxicity and mutagenesis has been determined measuring the β -galactosidase activity; a *lacZ* gene fusion under the control of different SOS genes (*recA*, *sfiA* and *umuC*) was used. The Ames' test has been also employed as a complement when the samples were negative in the induction of the SOS-dependent mutagenesis.

The advantages of using both methods and their application to the study of environmental genotoxicity are discussed.

Introducció

La presència de contaminants orgànics amb activitat genotòxica a les aigües naturals, així com llur possible incidència en la salut humana, és un fet que preocupa cada còp més els diferents organismes que s'ocupen de vetllar per la con-

* Autora de la Ponència

servació del medi i per la salut.¹ Darrerament, el treball de recerca dins aquesta problemàtica s'ha intensificat mitjançant el desenvolupament, d'una banda, de diferents mètodes de concentració d'aigües i d'identificació de contaminants orgànics,² i, d'una altra, perfeccionant i aplicant mètodes biològics de detecció de l'activitat mutagènica en els extrems orgànics d'aigües.

Arreu del món, els mètodes d'estudi de l'activitat genotòxica són centrats actualment en dues línies principals d'investigació: els assaigs a llarg termini (tècniques d'experimentació amb animals de laboratori, fonamentalment mamífers), i els assaigs a curt termini (utilització de sistemes biològics més simples, principalment microorganismes).

Bé que d'una gran fiabilitat, els primers, equivalents a proves de toxicitat en animals, comporten un gran cost econòmic, en ésser necessari un gran nombre d'animals i un llarg temps d'experimentació i comprovació. Aquest elevat cost en temps, animals i material, ha encoratjat la recerca de sistemes biològics que, si bé allunyats del nivell fisiometabòlic humà, poden donar resultats comparables. En aquest sentit, els mètodes que utilitzen microorganismes ofereixen una excel·lent alternativa per l'elevada rapidesa i claredat dels resultats, fàcilment quantificables, i, a més, per llur baix cost. És així com actualment són utilitzats al món dos sistemes microbians principals: la prova de mutagenicitat retrògrada en *Salmonella typhimurium* (assaig d'Ames) i diferents proves basades en l'estudi de la inducció del sistema SOS en *Escherichia coli*.

En la prova de mutagenicitat retrògrada, els agents potencialment carcinogènics són detectats per llur activitat mutagènica, convertint cèl·lules auxotròfiques en prototròfiques, les quals són identificades pel fet de formar colònies sobre plaques de Petri. Les soques de l'assaig presenten mutacions en l'operó histidina (*his*). Bàsicament són utilitzades tres mutacions *his* diferents: carència d'un parell de bases, addició d'un parell de bases, i substitució d'un parell de bases per un altre. Per tal d'augmentar la sensibilitat de les soques, aquestes presenten una mutació en la coberta bacteriana que les fa més permeables, cosa que permet de disminuir la dosi i, per tant, els resultats negatius a conseqüència de la possible toxicitat. Per tal d'augmentar la resposta mutagènica, en totes les soques manca un mecanisme fonamental de reparació de les mutacions. Així, en posar en contacte els bacteris amb el producte objecte d'assaig, hom observa la freqüència retrògrada basal de cada mutació, i obté, a més, informació sobre el tipus de mutació que origina el producte que hom prova. Així mateix, el mètode d'Ames comprèn un assaig per a conèixer la toxicitat inherent al producte amb un sistema similar a la inhibició del creixement pels antibiòtics (antibiograma). Recentment, hom ha determinat que la correlació existent entre muta-

1. CRUMP, K. S. i GUESS, M. A. 1980. Council of Environmental Quality. EPA 906/10-74-002, Washington.

2. TABOR, M. W. i LOPER, J. C. 1985. Inter. J. Environ. Anal. Chem., 19: 281-318.

gènesi (és a dir, resultat positiu en l'assaig d'Ames) i carcinogènesi és aproximadament del 83 %.³ Aquesta correlació ha estat millorada amb la introducció de noves soques de *Salmonella typhimurium* detectores de mutagènesi.⁴ Així, doncs, la seva utilitat i significació estan ben demostrades per la gran quantitat de treballs que han estat duts a terme en diferents laboratoris de tot el món.

Els mètodes de detecció de la genotoxicitat basats en la inducció del sistema de reparació d'emergència del DNA (o sistema SOS) en *Escherichia coli*, es fonamenten en l'estudi de les diferents manifestacions de la resposta SOS en la cèl·lula bacteriana, quan per l'acció d'algun agent genotòxic es lesiona el DNA. Com hom pot veure en la figura 1, quan per qualsevol causa s'atura la replicació del DNA bacterià, ja sigui per lesions en els àcids nucleics o per la introducció de DNA lesionat en la cèl·lula,⁵ es genera un senyal molecular capaç d'activar a la proteïna RecA, conferint-li activitat proteàsica. Aquesta proteïna activada és aleshores capaç de trencar la proteïna repressora LexA, que actua reprimint el mateix gen de la proteïna RecA i d'altres gens anomenats «gens SOS», com ara *umuC*, *sfiA*, *uvr*, etc. La proteïna RecA activada és també la responsable del trencament dels repressors que mantenen els virus en estat temperat, és a dir sense donar lloc a un cicle lític. Tots aquests fenòmens moleculars tenen com a conseqüència que en la cèl·lula bacteriana es manifestin una sèrie de funcions que són anomenades resposta SOS, i que, entre altres efectes, dóna lloc a mutagènesi, inducció de pròfags, inhibició de la respiració cel·lular, inhibició de la divisió cel·lular i síntesi en massa de la proteïna RecA.

El primer assaig basat en la inducció del sistema de reparació SOS fou l'Inductest (o inducció del bacteriòfag Lambda), desenvolupat per Devoret.⁶ En aquest mètode hom quantifica el nombre de bacteriòfags que, des de llur estat integrat en el genòfor bacterià, són desreprimits, tot donant lloc a un cicle lític com a conseqüència de l'acció d'un agent genotòxic sobre el DNA. El mètode de Devoret és de quantificació ràpida, ja que resulta fàcil de conèixer l'increment de la inducció de bacteriòfags generada pel tractament, essent, a més, més ràpid que el mètode d'Ames (24 hores en el primer, per 48-72 hores en el segon). El mètode de l'Inductest també comprèn un assaig per tal de conèixer l'efecte del producte sobre la replicació dels bacteriòfags. En aquest cas hom disposa d'un bacteriòfag sensible a la temperatura, de manera que en condicions restrictives presenten un repressor inactiu. De la mateixa manera que en el mètode d'Ames, també hi són utilitzades soques molt permeables i amb algun mutant amb un sistema de reparació no funcional.

3. AMES, B. N. i McCANN, J. 1981. *Cancer Res.*, 41: 4192-4196.

4. MARON, D. M. i AMES, B. N. 1983. *Mut. Res.*, 113: 173-215.

5. BARBÉ, J., VILLAVARDE, A. i GUERRERO, R. 1982. *FEMS Microbiol. Letters*, 15: 291-294.

6. MOREAU, P., BAILONE, A. i DEVORET, R. 1976. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73: 3700-3704.

Malauradament, ambdós mètodes presenten una sèrie de limitacions. D'una banda, han estat portats a terme nombrosos estudis sobre l'efectivitat del mètode d'Ames respecte a una sèrie de productes mutagènics, i han donat resultats poc comparables quantitativament en diferents laboratoris europeus i dels EUA; com a conseqüència, hi ha certes limitacions estadístiques en la interpretació dels assaigs. D'una altra banda, bé que la major part de productes carci-

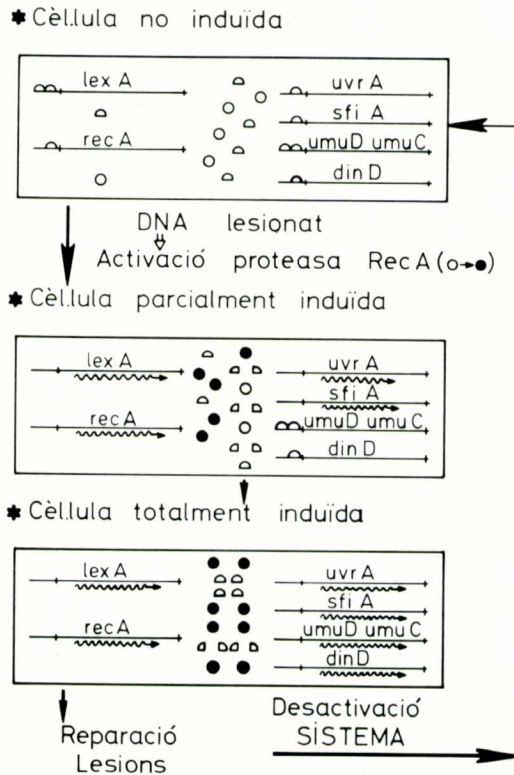


Fig. 1. - Esquema del procés d'inducció del sistema SOS. En el plafó superior hom mostra l'estat normal de la cèl·lula sense induir. En el plafó del mig hom presenta l'estat cellular corresponent a una inducció parcial d'aquest sistema, després d'haver-se activat la proteïna RecA, com a conseqüència de l'atur de la replicació del DNA produït per un agent genotòxic. En el plafó inferior hom mostra l'estat total d'activació amb la manifestació d'una resposta cellular completa. Finalment, i un cop reparades les lesions, algunes cèl·lules bacterianes són capaces de recuperar llur situació inicial.

nogènics donen positiu en ambdós assaigs, una important minoria només dóna positiu en un d'ells o en cap. Així, el mètode d'Ames ofereix més garantia en el cas de detecció d'agents que generen lesions molt localitzades, com ara les transicions, transversions o bé mutacions per desfase, per addició o delecció d'al-

gunes poques bases. Per contra, l'Inductest no és capaç de respondre adequadament enfront dels agents que produeixen aquests darrers tipus d'alteracions, sinó que és sensible a lesions molt més generalitzades. Treballs portats a terme en el nostre laboratori han demostrat que les funcions induïdes per aquesta última classe d'agents presenten una inducció no pas del tipus del tot o res, sinó que el mecanisme és diferencial,^{7,8} ja que existeix una discriminació en el moment de manifestar un o un altre procés SOS (vegeu la figura 1). Aquest fenomen sembla estar lligat al tipus concret de lesió que ha estat originat en el DNA.⁹ Una tercera limitació addicional d'ambdós sistemes resideix en la possible toxicitat inherent al producte, que pot impedir o bé la multiplicació dels microorganismes utilitzats o bé la replicació dels pròfags, tot disminuint el nombre de possibles resultats positius.

Taula 1

DIFERENTS GENS D'*ESCHERICHIA COLI* QUE SÓN INDUIBLES
PER L'ACCIÓ DE PRODUCTES GENOTÒXICS

Gen bacterià	Funció cel·lular
<i>recA</i>	— Inducció del sistema de reparació d'emergència (o SOS) — Amplificació de la proteïna RecA
<i>sfIA</i>	— Inhibició de la divisió cel·lular
<i>umuC</i>	— Mutagènesi indirecta

Aquest conjunt de fets ens ha conduït durant aquests darrers anys a detectar l'activitat genotòxica de diferents mostres mitjançant l'estudi de la inducció de diferents soques d'*Escherichia coli* lisogèniques pel bacteriòfag Lambda portador d'una fusió entre el gen *lacZ* i els gens *recA* i *sfIA* del sistema SOS, així com la inducció d'una soca d'*Escherichia coli* portadora d'un plasmidi amb una fusió entre el gen *lacZ* i el gen *umuC* del sistema SOS. D'aquesta manera ha pogut ésser avaluada l'expressió d'aquests tres gens SOS (vegeu la taula 1) com a conseqüència de l'acció de productes carcinogènics mitjançant la quantificació de l'enzim β -galactosidasa,¹⁰ determinant ensem la genotoxicitat (gens *recA* i *sfIA*), i la mutagènesi dependent del sistema SOS (gen *umuC*). També han estat estudiades les condicions de cultiu en les quals aquestes soques d'*Escherichia coli* presenten una inducció òptima dels gens SOS.^{11, 12}

7. GUERRERO, R. i BARBÉ, J. 1982. *Antonie van Leeuwenhoek*, 48: 159-167.

8. BARBÉ, J., VERICAT, J. A. i GUERRERO, R. 1983. *Mut. Res.*, 120: 1-5.

9. BARBÉ, J., VERICAT, J. A. i GUERRERO, R. 1983. *J. Gen. Microbiol.*, 129: 2079-2089.

10. BARBÉ, J., VERICAT, J. A., CAIRÓ, J. i GUERRERO, R. 1985. *Mut. Res.*, 146: 23-32.

11. BARBÉ, J., VILLAVARDE, A. i GUERRERO, R. 1983. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 117: 556-561.

12. LLAGOSTERA, M., GUERRERO, R., VILLAVARDE, A. i BARBÉ, J. 1985. *J. Gen. Microbiol.*, 131: 113-118.

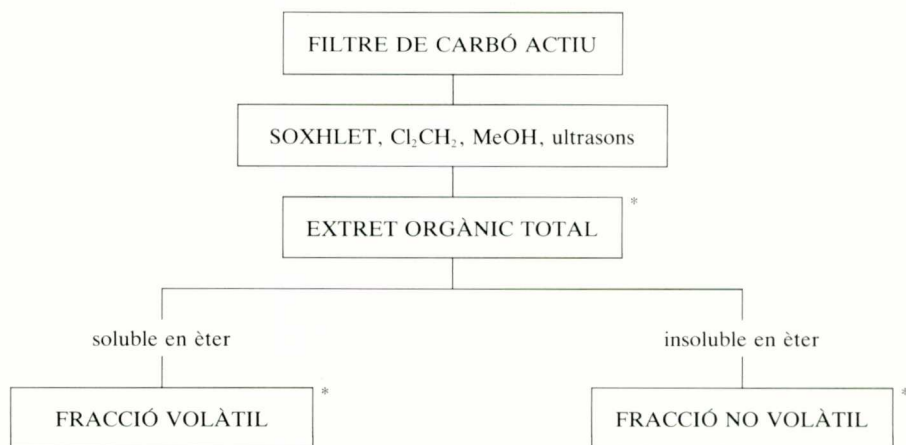
En el treball que presentem, mostrem un exemple de l'aplicació combinada dels dos mètodes bacterians esmentats (assaig d'Ames i inducció de tres gens del sistema SOS) per a detectar l'activitat genotòxica en mostres d'extrets orgànics d'aigües naturals. Aquest treball té com a objectiu de demostrar els avantatges de l'aplicació d'ambdós mètodes bacterians en estudis de genotoxicitat en mescleres complexes de productes químics, així com d'assenyalar la necessitat de dur a terme estudis coordinats, biològics i químics, per tal d'esbrinar quin és l'estat de contaminació genotòxica no tan sols de les aigües naturals, sinó també d'altres components del nostre entorn.

Condicions experimentals

Estacions de mostreig i obtenció d'extrets orgànics d'aigües

Les mostres d'aigua estudiades foren recollides a l'estació d'Abrera i a la de Sant Joan Despí, del riu Llobregat.

La concentració i posterior estudi químic dels extrets orgànics fou duta a terme en col·laboració amb el Laboratori d'Espectrometria de Masses, Centre d'Investigació i Desenvolupament del CSIC de Barcelona (vegeu la ponència de J. Caixach en aquest mateix volum) segons l'esquema següent:



* Avaluació de la genotoxicitat i de la mutagènesi.

Les mostres d'extret total, fracció volàtil i fracció no volàtil per a l'avaluació de la genotoxicitat foren preparades evaporant i redissolvent en dimetil sulfòxid (DMSO) alíquotes de cada un dels diferents extrets.

*Avaluació de la genotoxicitat*A. Sistema de reparació SOS d'*Escherichia coli*

Les soques bacterianes emprades són mostrades en la taula 2, essent totes derivades d'*Escherichia coli*.

Taula 2
SOQUES BACTERIANES EMPRADES EN AQUEST TREBALL

Soca	Genotip	Procedència
<i>Escherichia coli</i>		
AB1157	salvatge	(10)
GC2375	AB1157, però lisogènica per λ d (<i>recA::lac</i>) <i>cI</i> nd	(18)
UA4202	AB1157 pSE140 (Km ^r <i>umuC::lacZ</i>)	(10)
PQ30	<i>trp::Muc⁺ sr1300::Tn10 lac U169 galE galY pho^c sfiA::Mud (Aplac) cts</i>	(19)
<i>Salmonella typhimurium</i>		
TA98	<i>rfa uvrB hisD3052 amp^R</i>	(4)
TA100	<i>rfa uvrB hisG46 amp^R</i>	(4)

L'avaluació de la genotoxicitat fou duta a terme deixant créixer les diferents soques bacterianes a 37 °C en medi LB¹³ fins a una A₅₅₀ de 0,150. Seguidament foren distribuïdes alíquotes de 3 ml en tubs d'assaig contenint 20 μ l de cada una de les mostres a estudiar més una mescla de la fracció microscòmica S9 al 4 %⁴ quan hom analitzà la genotoxicitat de les diferents mostres amb activació metabòlica. La incubació fou duta a terme a 37 °C durant 2 h amb agitació, hom determinà posteriorment l'A₅₅₀ i l'activitat β -galactosidasa.¹⁰ Per al càlcul de l'activitat genotòxica, hom normalitzà l'activitat β -galactosidasa obtinguda pel valor de l'A₅₅₀ i pel de l'activitat enzimàtica del control negatiu de l'experiment.

B. Assaig d'Ames

Fou dut a terme emprant les soques TA98 i TA100 de *Salmonella typhimurium*, indicades en la taula 2, segons la metodologia descrita per Maron i

13. MILLER, J. 1972. Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor, Nova York.

Ames,⁴ amb preincubació durant 30 min a 37 °C, amb fracció microsòmica S9 al 4 % i sense.

Resultats

Inducció dels gens SOS d'*Escherichia coli*

L'activitat genotòxica d'extrets orgànics del riu Llobregat en dues estacions de mostreig fou mesurada segons la seva capacitat d'induir tres gens SOS (*recA*, *sfiA* i *umuC*) amb activació per la fracció microsòmica S9 i sense. Els resultats obtinguts són mostrats en la taula 3.

Taula 3
ACTIVITAT GENOTÒXICA D'EXTRETS ORGÀNICS D'AIGUA

Estació	Mostra (2 1)	Gens provats					
		<i>recA</i>		<i>sfiA</i>		<i>umuC</i>	
		— S9	+ S9	— S9	+ S9	— S9	+ S9
Abrera	Extret total	0,98	0,77	0,97	4,46	0,96	0,87
	Fracció volàtil	1,00	1,14	0,60	1,04	0,86	0,95
	Fracció no volàtil	1,14	1,06	0,85	1,63	0,78	0,86
Sant Joan Despí	Extret total	1,00	1,37	1,50	1,20	1,63	0,78
	Fracció volàtil	1,01	2,31	1,20	0,50	1,18	1,00
	Fracció no volàtil	0,87	2,48	1,62	0,73	1,30	1,00

Resultats superiors a la unitat indiquen la presència de productes genotòxics.

Hom pot observar que els extrets procedents de l'estació d'Abrera foren incapaçs d'induir cap gen SOS provat sense activació amb fracció microsòmica S9. Resultats similars foren obtinguts en l'estudi de la inducció del gen *recA* pels extrets orgànics de Sant Joan Despí. Per contra, aquests darrers extrets foren inductors dels gens *sfiA* i *umuC* sense activació per la fracció microsòmica S9, essent la fracció no volàtil més inductora que la volàtil.

Quan hom dugué a terme aquests experiments en presència de fracció microsòmica S9, observà que l'extret total d'Abrera era un potent inductor del gen *sfiA*, i que aquesta activitat genotòxica era localitzada en la fracció no volàtil de l'extret total.

Resultats diferents foren obtinguts amb les mostres de Sant Joan Despí, ja que hom hi observà una capacitat inductora del gen *recA* en presència de fracció microsòmica S9, mentre que es perdé pràcticament la capacitat d'inducció dels gens *sfiA* i *umuC* en presència de fracció microsòmica S9.

Assaig d'Ames

Per a determinar la mutagenicitat dels extrems de l'estació d'Abdera fou emprat l'assaig d'Ames. En la taula 4 mostrem els resultats obtinguts. Hom pot observar que només la mostra corresponent a l'extret total és capaç de produir un augment significatiu en el nombre de revertents de la soca TA98 en presència de fracció microscòmica S9. En les mostres restants, l'augment detectat en la reversió no és suficientment elevat per a considerar que els extrems estudiats tenen activitat mutagènica.

Taula 4
ASSAIG D'AMES (ESTACIÓ D'ABRERA)

Mostra (1 litre)	Nombre de revertents per placa			
	TA98		TA100	
	— S9	+ S9	— S9	+ S9
Control negatiu	56	59	246	252
Control positiu	425	1.324	3.000	1.029
Extret total	62	112	253	255
Fracció volàtil	53	64	246	250
Fracció no volàtil	71	61	260	289

Hom no considerarà necessari d'analitzar la mutagenicitat per l'assaig d'Ames dels extrems de l'estació de Sant Joan Despí per tal com ha estat mostrat (taula 3) que són inductors del gen *umuC* i per consegüent contenen productes químics amb activitat mutagènica dependent del sistema de reparació SOS.

Discussió

Els resultats obtinguts mostren que durant el període primaveral les aigües del riu Llobregat presenten una clara activitat genotòxica en les dues estacions estudiades per tal com són capaces d'induir algun dels gens SOS estudiats en la presència de fracció microscòmica S9.

Les variacions observades en la inducció dels diferents gens SOS per l'acció de les mostres estudiades estan plenament d'acord amb estudis anteriors, duts a terme en el nostre Departament,^{7, 8, 14} on hom mostrarà que la inducció del sistema SOS no és un fenomen de tot o res, sinó que hi ha situacions d'activació

14. BARBÉ, J., GIBERT, I., i GUERRERO, R. 1986. Mut. Res. (Acceptat per a la publicació, i en premsa).

parcial i que aquest procés pot estar directament relacionat amb el tipus de lesió que produeix sobre el DNA un agent genotòxic donat.⁹ Aquests resultats indiquen, per consegüent, que al llarg del riu es troben agents genotòxics diferents.

D'altra banda, l'efecte que la fracció microsòmica S9 té sobre els extrems d'Abrera o de Sant Joan Despí, augmentant o disminuint respectivament llur capacitat mutagènica, es correspon amb resultats trobats per altres autors en estudis similars,^{15, 16, 17} i és alhora una indicació addicional del fet que les mostres estudiades contenen composts genotòxics diferents entre ells.

Per tant, podem concloure que al llarg del riu Llobregat es troben diferents agents genotòxics. Així, al nivell de l'estació d'Abrera, els productes genotòxics presents són potents inductors del gen *sfiA*, prèvia metabolització per la fracció microsòmica S9, i no són capaços d'induir el gen *umuC*, malgrat que l'extret total, segons l'assaig d'Ames amb presència de fracció microsòmica S9, és mutagènic. Durant el curs del riu fins a l'estació de Sant Joan Despí, hom observa una dilució o inactivació d'aquests agents genotòxics, alhora que hom detecta una aportació d'altres composts que presenten una activitat genotòxica diferent. Dins aquests darrers agents, n'hi ha de mutagènics sense necessitat d'ésser metabolitzats (inductors del gen *umuC*), d'inductors del sistema SOS després d'ésser metabolitzats (inductors del gen *recA*) o sense metabolització (inductors del gen *sfiA*).

Finalment, els resultats obtinguts mostren la utilitat de combinar ambdues metodologies emprades en aquest treball, per a determinar la genotoxicitat de mostres complexes i variables en el contingut de composts químics com ara els extrems d'aigua estudiats o bé d'altres mostres del medi. Així, amb l'aplicació d'estudis d'aquests tipus, hom pot aconseguir en una primera fase no tan sols de determinar la capacitat mutagènica i genotòxica, sinó de disposar també d'indicacions indirectes sobre les variacions qualitatives i/o quantitatives en el contingut d'agents genotòxics. Això permetrà, en una segona fase, d'abordar en profunditat l'estudi d'identificació química dels composts (vegeu la ponència de J. Caixach en aquest mateix volum) que siguin els principals responsables de l'activitat genotòxica i mutagènica en el medi, amb l'objectiu final que tots aquests treballs puguin contribuir a la millora de l'estat sanitari del nostre entorn i a la localització dels focus més importants de contaminació genotòxica.

15. KOOL, H. J., VAN KREIJL, C. F. i VAN OERS, H. 1984. Toxicol. Environ. Chem., 7: 111-129.

16. LOPER, J. C. 1980. Mut. Res., Rev. Genet. Toxicol. 76: 241-246.

17. KFIR, R., GRABOW, W. O. K. i HILNER, C. A. 1982. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 28: 641-646.

18. CASAREGOLA, S., D'ARI, R. i HUISMAN, O. 1982. Mol. Gen. Genet., 185: 430-439.

19. QUILLARDET, P., HUISMAN, O., D'ARI, R. i HOFNUNG, M. 1982. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79: 5971-5975.

AGRAÏMENTS

Aquest treball és finançat per un ajut de la Comissió Interdepartamental de Recerca i Innovació Tecnològica de la Generalitat de Catalunya i parcialment per un ajut de la Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica.