

MESA 1: Dragado y disposición de lodos del Riachuelo

DR. JUAN MORETTON

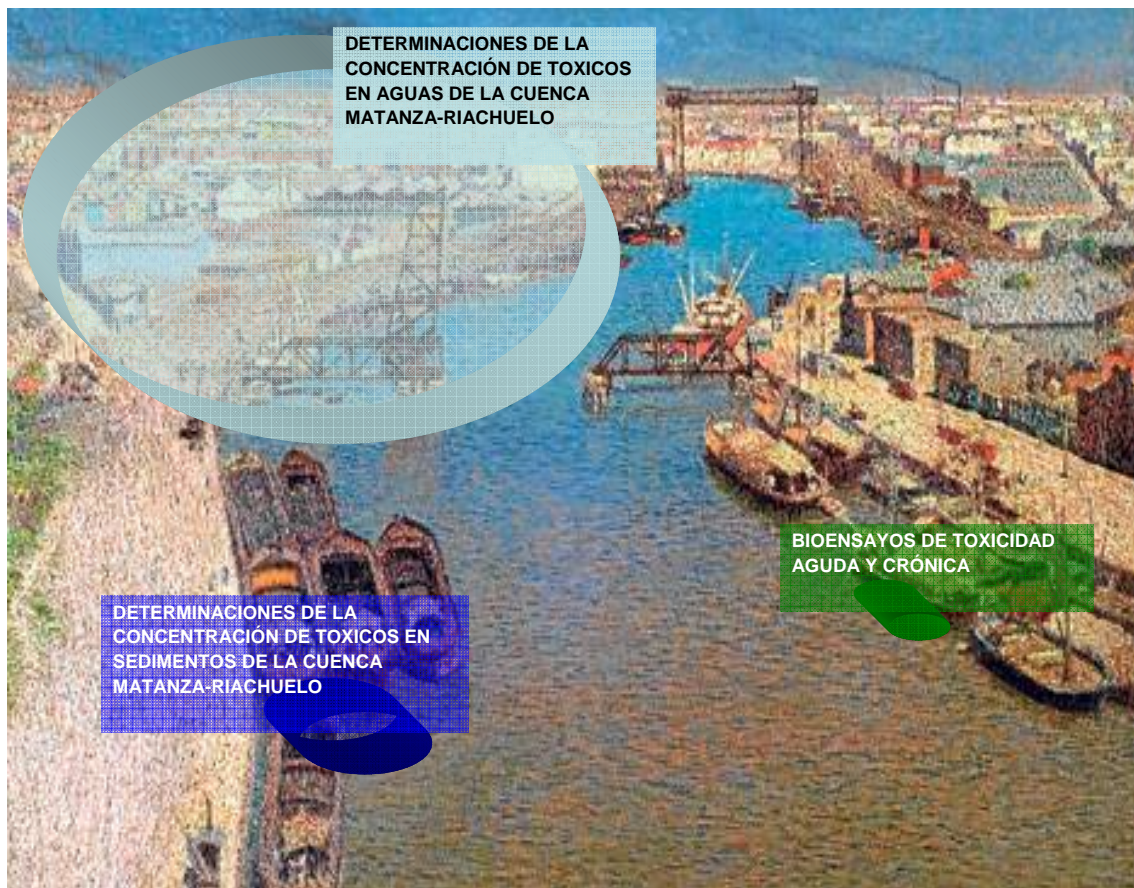
Doctor en Bioquímica y Farmacia - Profesor titular de la Cátedra de Higiene y Sanidad.

Exposición:

Desde hace muchos años participo y dirijo grupos de trabajo orientados al estudio de la contaminación ambiental. Hemos realizado determinaciones de contaminación de aire en la zona urbana de Buenos Aires, estudios de riesgo sanitario en asentamientos precarios y de contaminación de aguas, particularmente en la Cuenca Matanza Riachuelo. Todos estos proyectos han dado lugar a publicaciones en revistas científicas nacionales e internacionales y han permitido mejorar las labores de docencia que realizo en la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires.

Gran parte de la información a la que se hará referencia está relacionada con datos obtenidos durante el desarrollo de un proyecto conjunto en el que participan el Museo Argentino de Ciencias Naturales, la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires, la Facultad de Farmacia de la Universidad de Buenos Aires y en algún momento la Comisión de Energía Atómica. Dicho proyecto tiene como objetivo, desde 1997, el estudio de la Cuenca Matanza Riachuelo. Entre las variadas líneas investigación que ha generado esta actividad en esta oportunidad voy a referirme, brevemente, a la toxicidad de los sedimentos que se depositan en distintos cursos de agua de la Cuenca Matanza Riachuelo. El tema es técnicamente bastante complejo por lo que intentaré simplificarlo.

La Cuenca fluvial a la que me refiero ha sido analizada en forma discontinua y por distintos grupos de trabajo, durante los últimos 50 años. Esta actividad ha generado una gran cantidad de datos. En este gráfico he resumido la situación actual de este cúmulo de información.



Se han realizado muchas determinaciones destinadas a estimar la presencia y la concentración de sustancias tóxicas en muestras de agua. La mayor parte de estos muestreos se han localizado espacialmente en el Riachuelo, es decir en la última porción de la Cuenca. Los datos obtenidos son importantes, pero presentan una gran dispersión espacio temporal. Si se quisiera realizar un metaanálisis, es decir un estudio basado en la integración estructurada y sistemática de la información obtenida en diferentes ensayos utilizando éstos datos, nos encontraríamos con algunas dificultades. En primer lugar los distintos grupos de trabajo han utilizado distintos puntos para toma de muestras. También hay importantes variaciones en las metodologías que se han utilizado para analizar los compuestos tóxicos. Otra variación a tomar en cuenta es los períodos durante los cuales se han tomado las muestras que van de semanas a años. Esta dispersión no permite integrar eficientemente la información compilada durante años.

Los sedimentos acumulados en los distintos cuerpos de agua de la Cuenca Matanza Riachuelo han sido menos analizados. Como en el caso de las aguas. Se encuentran más datos referidos al Riachuelo que al resto de la Cuenca.

Hasta aquí la referencia acerca de la información sobre determinaciones químicas de compuestos. Si se rastrea la información acerca de bioensayos de toxicidad, es decir aquellos que emplean seres vivos para determinar el efecto tóxico de las aguas o sedimentos, se encuentran muy pocos datos. Escasos han sido hasta el momento los esfuerzos por aplicar estos bioensayos para caracterizar la toxicidad pese a que la mayoría de ellos se han desarrollado hace más de 40 años e incluso están incorporados en la legislación de países europeos y en algunos estados de Estados Unidos.

Quienes trabajamos en toxicología podemos definir sedimentos como sigue

- **Mezclas complejas cuya composición cuali cuantitativa es parcialmente conocida.**
- **Presentan una variedad de compuestos orgánicos, inorgánicos y biota. A menudo contienen sustancias poco solubles, volátiles, inestables, coloreadas y/o a veces partículas coloidales capaces de mantenerse suspensión cuando se mezclan con agua. Pueden ser sustrato de biopelículas.**
- **Sus efectos tóxicos se deben generalmente a una baja proporción de sus componentes.**
- **La complejidad y heterogeneidad de los compuestos de estas mezclas dan lugar a una variedad de problemas experimentales cuando se realizan determinaciones cuali-cuantitativas para establecer su composición**

Para nosotros se trata de una mezcla compleja, cuya composición cuali-cuantitativa es parcialmente conocida. En general estas mezclas involucran una gran variedad de compuestos a tal punto que resulta sumamente complejo analizarlas para determinar su composición. Esta característica corresponde tanto al Riachuelo como a la mayoría de los ríos contaminados del mundo. Esto lleva a que no exista referencia acerca de la presencia de todos los compuestos potencialmente tóxicos en muestras de aguas o de sedimentos. No tendría tampoco sentido conocer dicha composición por el costo y la variabilidad que se encontraría entre muestra y muestra. Sí sabemos que se encontrarán, en todos los casos, compuestos orgánicos, compuestos inorgánicos y biota.

Consideramos que la biota, entendida como virus, bacterias, hongos y protozoarios, que se encuentran habitualmente o que son agregados al curso por descargas de distinto tipo, es parte de esta mezcla compleja porque su actividad biológica genera importantes biotransformaciones, en particular en los sedimentos. La mayor parte de lo que uno

detecta en los cursos contaminados y en particular en el Riachuelo no es tóxico, hay una pequeña parte que sí.

La proporción de componentes tóxicos en las mezclas complejas que se generan en aguas o sedimentos contaminados no es grande, pero sí puede ser importante. Pueden encontrarse sustancias solubles, sustancias volátiles, sustancias inestables, coloreadas. Las partículas sólidas que son transportadas por los cursos de agua constituyen un componente de las mezclas a las que hacíamos referencia. Se encuentran partículas de distintos tamaños, desde las más grandes que sedimentan rápidamente y forman los lodos de fondo de los ríos, hasta las más pequeñas, coloidales, pueden mantenerse en suspensión en las aguas indefinidamente. Sobre la superficie de estas partículas se forman biopelículas, complejos ecosistemas de microorganismos que se adhieren a las superficies y que contribuyen a la biotransformación de estos sedimentos.

Un último concepto importante es que la composición cuali-cuantitativa de las mezclas ambientales no es constante, varía con el tiempo. Estas variaciones que aparecen por nuevos aportes de tóxicos o de compuestos inertes, por dilución de los compuestos presentes en volúmenes de agua no contaminada o por biotransformaciones, pueden estimarse mediante el uso de modelos matemáticos, siempre que se cuente con una importante cantidad de información acerca del curso de agua contaminado.

Desde el punto de vista toxicológico cuando se pone en contacto un compuesto químico tóxico con otro pueden aparecer.

| | |
|----------------|--|
| Efecto de suma | En una combinación de dos o más compuestos químicos, la respuesta biológica es la suma de las respuestas individuales de cada compuesto. |
| Antagonismo | La exposición a un agente químico lleva a una disminución en la actividad biológica de otro agente químico en la mezcla. |
| Potenciación | La exposición a un agente químico lleva a un incremento en la respuesta biológica de otro agente. |
| Sinergismo | La exposición a un agente químico causa un dramático incremento en el efecto de otro compuesto presente en la mezcla. |

--**efectos de suma** cuando la actividad biológica resultante corresponde a la suma de las actividades que cada compuesto tendría por separado

--**antagonismo**, cuando la actividad biológica de un agente impide o disminuye la actividad tóxica del otro compuesto presente en la mezcla y como resultado el efecto observado es inexistente.

--**potenciación y sinergismo** (efectos relacionados, algunos autores ni siquiera consideran la potenciación y hablan de sinergismos), cuando se mezclan los 2 componentes, su actividad biológica es muy superior al efecto de suma.

Estas posibilidades son bastante conocidas por los toxicólogos y pueden encontrarse referencias para muchas mezclas binarias de los compuestos tóxicos que aparecen como contaminantes ambientales.

| TIPO DE INTERACCION | EFEECTO TÓXICO DEL COMPUESTO A | EFEECTO TÓXICO DEL COMPUESTO B | EFEECTO COMBINADO A + B |
|---------------------|--------------------------------|--------------------------------|-------------------------|
| EFEECTO SUMA | 20 | 30 | 50 |
| ANTAGONISMO | 20 | 30 | 5 |
| POTENCIACIÓN | 0 | 20 | 50 |
| SINERGISMO | 5 | 10 | 100 |

Un ejemplo muy sencillo, **Efecto suma**, si un compuesto tuviera una actividad tóxica arbitraria de 20 y otro de 30, la suma, por supuesto en partes iguales, de los compuestos daría una actividad 50.

Antagonismo: en una mezcla con las mismas características y actividades que la anterior la actividad resultante es de 5, es decir se inhibió la actividad tóxica.

Potenciación: en este caso vemos que uno de los componentes de la mezcla no tiene actividad tóxica y el otro tiene una actividad de 20, la actividad resultante es mucho mayor al efecto suma.

Para la mayoría de las mezclas binarias de tóxicos conocidos estos efectos tienen una explicación bioquímica muy clara que no vamos a discutir ya que no es el objetivo de

esta presentación. Sí es importante considerar que el ejemplo elegido es muy elemental y aplicable únicamente a mezclas de dos compuestos. En los sistemas naturales contaminados pueden identificarse decenas de sustancias tóxicas. Cada una de ellas puede tener un efecto antagónico con algún componente pero al mismo tiempo potenciar la toxicidad de otro. Se genera así un efecto resultante que podría representarse como una matriz compleja de decenas de sustancias interactuando entre sí. Técnicamente, ni siquiera con nuestra capacidad de computación actual podemos realizar modelos de efectos combinados en mezclas de más de 10 compuestos. Aunque pudiese conocerse cuali-cuantitativamente la composición de la mezcla ambiental y la actividad tóxica de cada componente resultaría muy difícil llegar a entender la toxicidad resultante.

Esta es la razón por la que se han diseñado los bioensayos como herramientas de diagnóstico para determinar cuál es la acción biológica resultante sobre organismos de prueba de estas mezclas complejas que nos es muy difícil modelizar. Siempre se trabaja bajo condiciones experimentales específicas y controladas, con organismos de prueba estandarizados. Si se cumplen estas condiciones pueden utilizarse estos bioensayos para comparar nuestros datos con los de otros investigadores, otros cursos de agua, otros sedimentos. Para estas determinaciones el primer paso es seleccionar cual será el organismo vivo para ensayar la toxicidad, puedo evaluar sobre este organismo efectos tóxicos de las muestras ambientales efecto más utilizado a observar es la muerte, pero también puedo determinar alteraciones en el crecimiento, o cambios morfológicos. Los organismos más utilizados son especies que van de microorganismos a peces y cuyas características biológicas son conocidas por tratarse de especies que sobreviven y se multiplican en el laboratorio. Se utilizan los mismos organismos en todo el mundo con el objeto de estandarizar los ensayos.

En algunos se ha propuesto utilizar como organismos para bioensayos especies locales con el argumento de que se trata de especies más representativas de la real situación del ecosistema, pero en estos casos la comparación del efecto tóxico con otros sitios contaminados es muy difícil.

Estas recomendaciones se formularon en la *International Conference on Chemical Mixtures*, Atlanta, realizada en 2002 es decir hace 10 años y desde entonces han sido seguidas por los laboratorios especializados en el tema:

CONDICIONES PARA BIOENSAYOS AMBIENTALES

- **Estudiar la exposición en las condiciones del mundo real**
- **Realizar ensayos toxicológicos a niveles ambientales**
- **Los modelos de toxicidad deben basarse en evidencia biológica**

Desde la década de 1980 varios grupos de investigación enfocaron el tema de los bioensayos aplicados a mezclas y se reunió una interesante cantidad de material analítico. Considerando que hacia el año 2000 los bioensayos comenzaron a ser exigidos por la legislación de distintos países, los especialistas reunidos en esta Conferencia recomendaban que cada vez que se haga un bioensayo se estudien las exposiciones en las condiciones del mundo real, es decir alterando en la menor medida posible la muestra ambiental. Esta recomendación era importante porque muchos investigadores trabajaban en bioensayos con sustancias puras (conociendo que estas sustancias estaban en la muestra ambiental, las aislaban y las ensayaban) y usaban concentraciones en sus estudios que no tenían relación con el ambiente para demostrar efectos tóxicos en sistemas biológicos. Esto en cierta forma es falsear la información de la toxicidad de mezclas en el entorno ambiental.

Existen modelos matemáticos que permiten describir la posible toxicidad de mezclas ambientales de contaminantes conocidos presentes en aire, agua o sedimentos. Lo que se recomendaba era que estos modelos de toxicidad debían basarse en evidencia biológica. Como dijo un biólogo famoso: en Dios creemos, todos los demás tienen que traer los datos del laboratorio. El modelo debe ser validado realizando ensayos de biotoxicidad con varios sistemas biológicos.

En el grupo de investigación de la Facultad de Farmacia y Bioquímica bajo mi dirección nos hemos dedicado a los ensayos biológicos un área muy particular: la toxicidad a largo plazo mediante la evaluación de la capacidad de inducir daños sobre la molécula de ADN por mezclas ambientales.

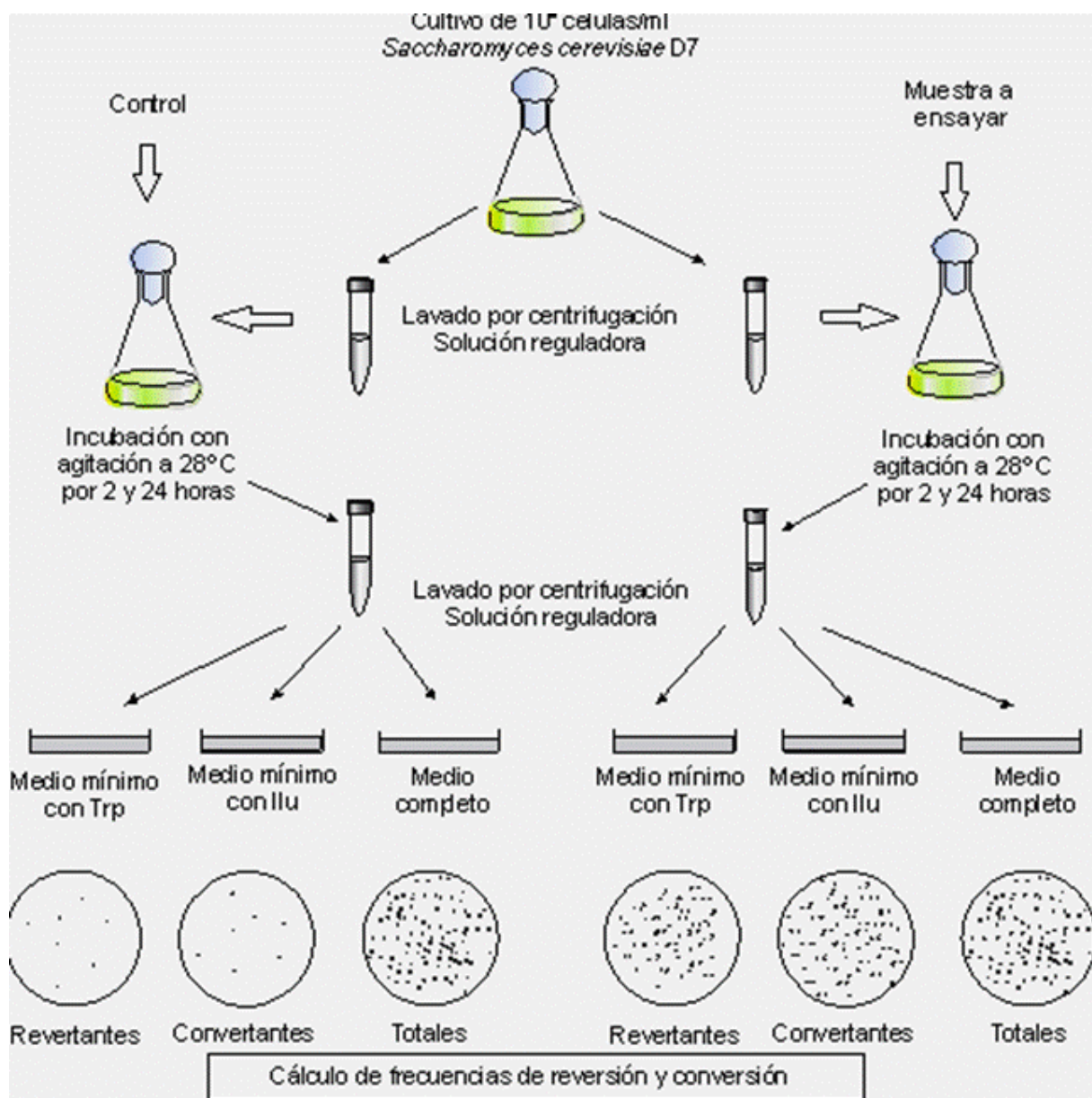
Bioensayos de genotoxicidad

- **Diseñados para evaluar el daño que pueden inducir agentes químicos sobre el ADN.**
- **Pueden utilizar una gran variedad de organismos siempre que su crecimiento pueda ser controlado en un laboratorio.**
- **Para aquellos que se utilicen como bioensayos ambientales se requiere la producción de resultados de manera rápida y económica**

La molécula de ADN es una molécula muy particular presente en el organismo de todos los seres vivos, no solo porque transmite la información a la descendencia, sino porque es la única molécula conocida de la naturaleza que se autorrepara. Hay una instancia de daño y una instancia de reparación, cuando la inducción de alteraciones es de tal magnitud que supera la capacidad para reparación aparece la toxicidad para la molécula de ADN, es decir los daños genéticos.

Para realizar bioensayos de genotoxicidad se debe seleccionar un organismo sobre el que actuará el tóxico que tenga la capacidad de mostrar, mediante algún cambio macroscópico o fisiológico, las consecuencias del daño a la molécula de ADN. Se ha propuesto una gran variedad de organismos para estos ensayos, desde virus a ratones. En los últimos años se ha dado prioridad a aquellos cuyo crecimiento pueda ser controlado por el laboratorio sobre aquellos de los que puedan obtenerse resultados de forma rápida y económica. Dentro de estos bioensayos se prefieren los que emplean microorganismos ya que permiten un manejo relativamente sencillo dentro del laboratorio.

En este caso quiero mostrar los resultados que ha obtenido nuestro grupo de trabajo empleando el ensayo con levaduras. Las levaduras son células eucariontes (como las de los mamíferos) que presentan la ventaja de crecer en medios de cultivo sencillos como los usados para bacterias. Se tiene entonces por una parte la ventaja de que son células que tienen cromosomas y por otra que se cultivan como las bacterias. Nuestros ensayos son relativamente simples, no han sido diseñados por nosotros sino que fueron creados por investigadores europeos. Se utilizan cepas de levadura genéticamente modificadas, estandarizadas que se ponen en contacto con las muestras. Después se siembran sobre placas, las placas se cultivan y se cuentan las colonias. Es un sistema relativamente simple que permite determinar varios efectos sobre la misma cepa de levadura, que a su vez corresponden a distintos tipos de daños inducidos por los genotóxicos sobre el material genético. Esquemáticamente:



Rev. Int. Contam. Ambient. 6, 55-68, 1990.

**ESTUDIO DE GENOTOXICIDAD DE LAS MUESTRAS DE LODO
DE UN RÍO CONTAMINADO POR EFLUENTES INDUSTRIALES**

Juan MORETTON,¹ Patricio BARO,¹ Adrián ZELAZNY,¹ María A. NUCETELLI²
y Miguel D'AQUINO¹

¹Orientación Higiene y Sanidad, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA, Junín 956, 1113 Buenos Aires, Argentina

²Escuela de Especialización en Ambiente y Patología Ambiental, UNLP, Università di Siena, Italia
(Recibido junio 1990, aceptado diciembre 1990)

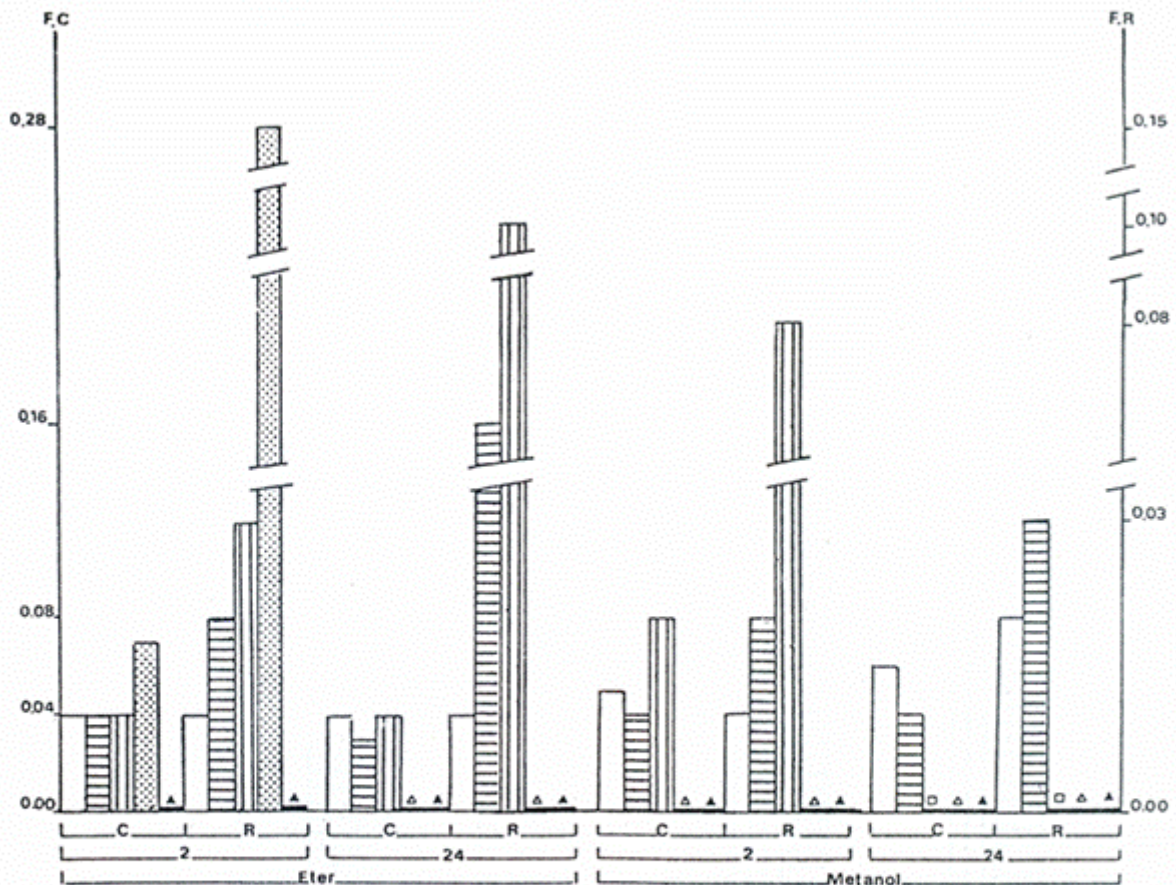
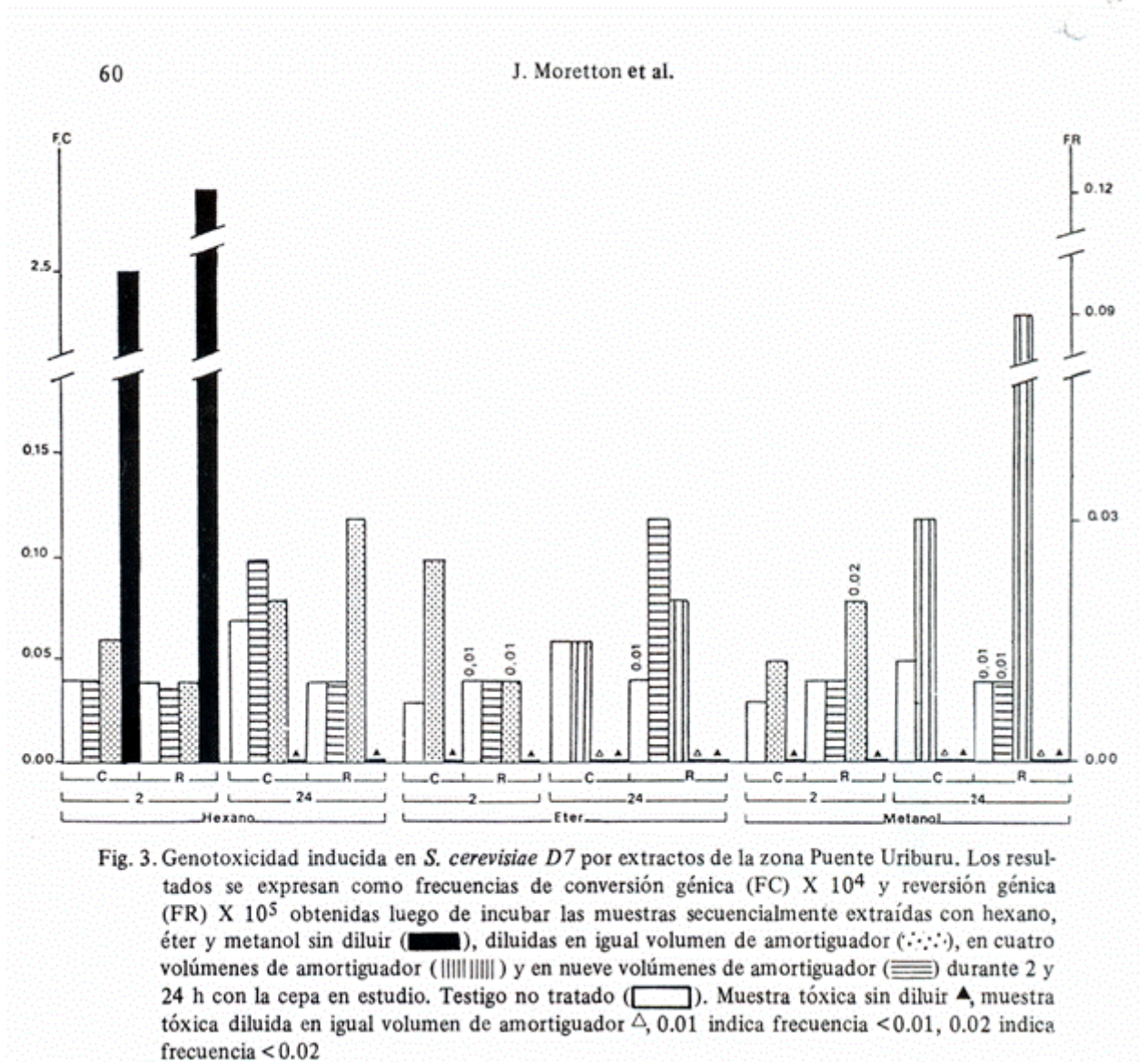


Fig. 5. Genotoxicidad inducida en *S. cerevisiae* D7 por extractos de la zona Puente Uriburu. Los resultados se expresan como frecuencias de conversión génica (FC) $\times 10^4$ y reversión génica (FR) $\times 10^5$ obtenidas luego de incubar muestras extraídas secuencialmente con éter y metanol sin diluir (■), diluidas en igual volumen de amortiguador (· · · · ·), en cuatro volúmenes de amortiguador (|||||) y en nueve volúmenes de amortiguador (≡≡≡) durante 2 y 24 h con la cepa en estudio. Testigo no tratado (□). Muestra tóxica sin diluir ▲, muestra tóxica diluida en igual volumen de amortiguador △, muestra tóxica diluida en cuatro volúmenes de amortiguador □

Este gráfico muestra los resultados obtenidos en uno de los trabajos que hicimos con estas cepas, publicado en 1990, el primero que realizamos con sedimentos. Las muestras de sedimentos se tomaron en varios puntos del Riachuelo, las que se muestran en el gráfico corresponden a la zona de Puente Uriburu (Puente Alsina), de particular importancia porque el Riachuelo que fluye como un canal rectificado artificialmente abandona en ese punto la rectificación y vuelve a ser un curso con meandros donde se acumulan los contaminantes. Lo que hicimos experimentalmente fue tomar muestras de sedimento y someterlas a extracciones secuenciales, con distintos solventes.

En el gráfico, cada barra blanca corresponde a los controles es decir agua no contaminada, en las barras restantes se muestran 2 tipos de efectos genotóxicos con conversión génica y reversión génica. Las muestras son incubadas durante 2 y 24 horas.

Cuando la altura de las columnas por lo menos duplica al control, esto demuestra el efecto genotóxico. Los resultados obtenidos muestran un efecto genotóxico marcado en todos que se han extraído de estas zonas, el efecto, en este caso es la reversión génica, un daño directo a la molécula de ADN. Este daño lo produce la mezcla en sí.



Este gráfico corresponde al mismo trabajo y muestra los datos de otra extracción secuencial de la muestra de lodo con distintos solventes orgánicos. Aparecen marcados efectos genotóxicos en las fracciones que son liposolubles. La zona de muestreo es la misma, la secuencia de solventes de extracción es distinta, pero el efecto genotóxico detectado es más o menos el mismo.

Table 3
Ames *Salmonella typhimurium* mutagenicity test

| Sample | TA98 | TA100 |
|---------|--------|----------|
| Control | 15 ± 6 | 132 ± 24 |
| S1 | 20 ± 6 | 166 ± 17 |
| S2 | 15 ± 2 | 165 ± 26 |
| S3 | 20 ± 4 | 187 ± 10 |

The results were expressed as the mean number of revertant colonies per plate ±SD for 0.1 ml of filtrate leachates. Control: NaCl 0.9% solution.

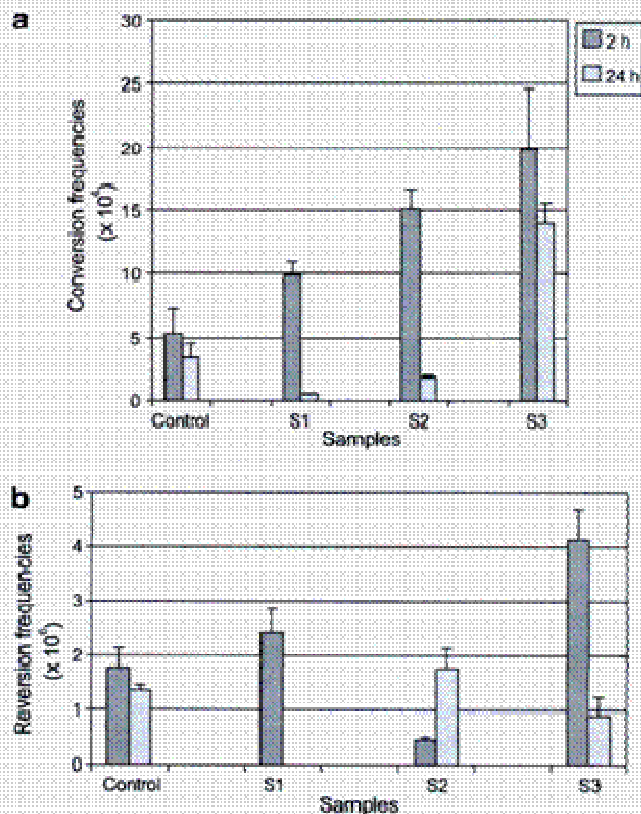


Fig. 2. Mitotic gene conversion and reverse mutation induced in *Saccharomyces cerevisiae* D7 by leachates of sediments; (a) conversion frequencies and (b) reversion frequencies.

Available online at www.elsevier.com/locate/wasman

ScienceDirect
Waste Management xxx (2008) xxx-xxx

wasteManagement
www.elsevier.com/locate/wasman

Genotoxicity of leachates from highly polluted lowland river sediments destined for disposal in landfill

Anahi Magdaleno ^a, Alicia Mendelson ^a, Alicia Fabrizio de Iorio ^b, Alicia Rendina ^c,
Juan Moretton ^{b,c,*}

^a *Optics, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Buenos Aires, Avda 508, 4° Piso C1113AAB, Ciudad de Buenos Aires, Argentina*
^b *Industrial Chemistry, Faculty of Agronomy, University of Buenos Aires, San Martín 445, C1417HDE, Ciudad de Buenos Aires, Argentina*
^c *Accepted 17 September 2007*

Este último gráfico corresponde a un trabajo publicado en 2007, 17 años después. Las muestras de sedimento fueron tomadas de la misma zona, pero el esquema experimental es un poco más simple. Ya no utilizamos las extracciones tan complejas con solventes orgánicos, ahora la extracción fue acuosa.

Evidentemente la actividad genotóxica fue marcada tanto con respecto a la incubación de 2hs como la de 24. Estos resultados muestran que la situación no ha mejorado durante el período de 17 años.

La ventaja que tienen los ensayos que utilizan microorganismos como las levaduras es que permiten incubar durante períodos prolongados mejorando el contacto entre las partículas de sedimento y los microorganismos. Puede determinarse así la posibilidad de que se transfiera la actividad genotóxica desde las partículas de sedimento al sistema biológico.

Como se ve la actividad que implica daño al ADN detectada fue tan importante en 2007 como lo fue en los años 90 cuando empezamos nuestros ensayos. La aparición de genotoxicidad en las fracciones acuosas es un importante indicador de la posibilidad de transferir este tipo de toxicidad a las aguas del curso Matanza Riachuelo si las partículas sedimentadas en el fondo se resuspenden como sucede durante los dragados.

PRIORIDAD PARA ENSAYOS DE MEZCLAS AMBIENTALES

- **Aquellas a las que está expuesta una población importante**
- **Magnitud y frecuencia de la exposición**
- **Riesgos de la exposición**

Se ha reconocido internacionalmente una escala de prioridad para muestras ambientales a investigar. Esta escala indica que los estudios deben dedicarse en primera instancia a aquellos ambientes contaminados que impliquen una exposición de población muy grande. Debe también tomarse en cuenta que la frecuencia de exposición de dicha población al ambiente contaminado sea importante y que implique un riesgo de exposición significativo.

Por eso nuestro tema de trabajo ha sido la Cuenca Matanza Riachuelo, donde tanto la magnitud de exposición como la población implicada son sumamente importantes.

Pregunta:

La Cuenca del Reconquista, ¿qué similitudes puede tener con la Cuenca Matanza Riachuelo?

Yo no estudié particularmente la Cuenca del Reconquista. Sé que la Ciudad de Buenos Aires está entre 2 paréntesis negros, el Reconquista y el Riachuelo, pero me imagino que es distinta por las características hidrológicas y por los vertidos que ha tenido a lo largo del tiempo.

El Reconquista a partir del arroyo Morón recibe una carga de metales pesados muy importante, a partir de ahí hemos observado que los sedimentos del Río Reconquista tienen mayor concentración de determinados metales que el Riachuelo. Hay una similitud en cuanto a combinación, en cuanto a contaminación, no en cuanto a comportamiento hidrológico. Tenemos una represa, la represa Roggero que cambia la situación.

En cambio la Cuenca Matanza Riachuelo es una cuenca de bajo caudal, con una rectificación, zonas de acumulación, con un comportamiento hidrológico distinto al de la Cuenca del Reconquista, pero en cuanto a contaminación yo creo que son las dos más contaminadas de Buenos Aires.