



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"

ESTUDIO DEL DAÑO GENOTÓXICO INDUCIDO POR
SUSTANCIAS TÓXICAS EN AGUAS RESIDUALES UTILIZADAS
PARA RIEGO AGRÍCOLA EN EL MUNICIPIO DE
TEOLOYUCAN, ESTADO DE MÉXICO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I Ó L O G O
P R E S E N T A:
OSCAR EDUARDO VILLASEÑOR BRETÓN

DIRECTOR DE TESIS: I. A. OSCAR HORACIO GUILLÉN AYALA

ASESOR INTERNO: DR. MARIO ALTAMIRANO LOZANO



MÉXICO, D. F.

2005

0350238



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Tesis realizada en el laboratorio de genética de la carrera de Ingeniería Agrícola de la Facultad de estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, bajo la dirección del I. A. Oscar Horacio Guillén Ayala.

AGRADECIMIENTOS

A los miembros del jurado por todas sus atenciones y sugerencias:

I. A. Oscar Horacio Guillén Ayala
Dr. Mario Altamirano Lozano
Biol. Raúl Arcos Ramos
Biol. Cristina Alvarado Domínguez
M. en C. Juan José Rodríguez Mercado

A Guillén por su amistad, su asesoría y su disposición.

A todos mis profesores de la carrera por sus enseñanzas y sus consejos.

A la maestra Idalia por su amabilidad y su motivación.

A mi *Alma Mater*, la UNAM.

A todos mis amigos, por su amistad sincera y desinteresada.

DEDICATORIAS

A mis padres, Alma y Mario, que han sido los pilares que siempre me han sostenido en lo alto.

A mis hermanas, Paty, Lili, y Moni, que han sido mis compañeras de la vida.

A Brisa, Bruno, Lluvia y Omar, esperando servirles de inspiración.

A Sergio, el hermano que siempre quise.

A Luz María por su gran apoyo y su solidaridad

A Mayte por su gran apoyo y su solidaridad

A Eyra por representar una motivación para la superación.

La educación, la conciencia y el conocimiento,
son consecuencia del esfuerzo y el estudio constantes.

O. E. V. B.

La ciencia es la única rama de la cultura que
proporciona conocimientos válidos.

Bertrand Russell

Í N D I C E

	Página
Índice de tablas.....	I
Índice de figuras.....	II
Resumen.....	III
1.- Introducción.....	1
Importancia de la calidad del agua utilizada para el riego agrícola.....	4
Antecedentes del uso de aguas residuales para el riego agrícola en México.....	5
Clasificación de las aguas residuales según su origen.....	6
Características de las aguas residuales.....	8
Características Biológicas.....	8
Características Físicas.....	9
Características Químicas.....	9
Criterios y normas de calidad de las aguas residuales	9
Efecto del riego con aguas residuales en el suelo y en las plantas cultivadas.....	13
Efecto en el suelo.....	13
Efecto en las plantas cultivadas.....	14
Contaminación del agua por metales pesados.....	15
Generalidades de los metales pesados y el Arsénico.....	16
Arsénico (As).....	16
Cadmio (Cd).....	17
Cromo (Cr).....	18
Mercurio (Hg).....	20
Plomo (Pb).....	21

	Página
Efectos Tóxicos de los metales pesados en las plantas.....	22
Ciclo celular en células meristemáticas.....	24
División celular en células meristemáticas.....	26
Importancia de la evaluación genotóxica.....	28
Definición e importancia de la prueba de micronúcleos.....	31
El haba (<i>Vicia faba</i> L.) como sistema biológico de prueba.....	34
2.- Objetivo general.....	36
2.1. Objetivos particulares.....	36
3.- Hipótesis.....	37
4.- Materiales y métodos.....	38
4.1. Ubicación del sitio de muestreo.....	38
4.2. Metodología para el muestreo del agua.....	39
4.3. Sitio de la experimentación.....	41
4.4. Material biológico.....	41
4.5. Metodología.....	41
4.6. Diseño experimental.....	43
4.7. Análisis estadístico.....	43
4.8. Análisis citogenético.....	44
4.9. Criterios para seleccionar células micronucleadas.....	44
5.- Resultados.....	45
6.- Discusión.....	53
7.- Conclusiones.....	59
8.- Recomendaciones.....	61

9.- Referencias..... 62

ÍNDICE DE TABLAS

	página
Tabla 1. Límites máximos permisibles de los parámetros de contaminantes para las aguas residuales que se dispongan para el riego agrícola (Norma Oficial Mexicana, 1996).....	12
Tabla 2. Frecuencia de micronúcleos en los tratamientos evaluados.....	48
Tabla 3. Valores obtenidos del índice mitótico en los tratamientos evaluados.....	49
Tabla 4. Valores obtenidos para los metales pesados analizados por Espectrofotometría de Absorción Atómica.....	50

ÍNDICE DE FIGURAS

	página
Figura 1. Ubicación geográfica del municipio de Teoloyucan en el Estado de México.....	3
Figura 2. Fases de la mitosis en células meristemáticas de <i>Vicia faba</i>	29
a) Profase	
b) Metafase	
c) Anafase	
d) Telofase	
Figura 3. Ciclo celular en células meristemáticas de <i>Vicia faba</i>	30
Figura 4. Ubicación del sitio de muestreo en el municipio de Teoloyucan.....	40
Figura 5. Células meristemáticas de <i>Vicia faba</i> observadas en interfase con presencia de micronúcleos.....	51
Figura 6. Células meristemáticas de <i>Vicia faba</i> que se observaron en las diferentes fases mitóticas.....	52
a) Profase	
b) Metafase	
c) Anafase	
d) Telofase	

RESUMEN

En la República Mexicana, la escasez de agua apropiada para riego en la agricultura ha generado la necesidad de usar fuentes alternas de este elemento. Esto ha provocado que varias regiones del país estén siendo afectadas por el uso de aguas residuales que tienen un origen industrial y urbano. Entre estas regiones se encuentra el municipio de Teoloyucan, ubicado en el Estado de México, que se ve afectado por utilizar aguas residuales provenientes de la zona urbana de la ciudad de México. Por lo que este trabajo tiene como objetivo evaluar mediante la prueba de micronúcleos y el índice mitótico, los efectos genotóxico y citotóxico, respectivamente, ocasionados en células meristemáticas de raíz de *Vicia faba*. Para lo anterior se sometieron las raíces de *Vicia faba* a diferentes tiempos de exposición en la muestra de agua colectada y con diferentes tiempos de recuperación en agua destilada. Los resultados muestran que las sustancias químicas presentes en el agua, son capaces de inducir micronúcleos en células en interfase a partir del tiempo de menor exposición (1 hora), y manifestándose un incremento de células micronucleadas conforme aumentaba el tiempo de exposición y de recuperación. La evaluación del índice mitótico mostró que desde la primera hora de exposición se tuvo un efecto inhibitor de la división celular, mientras que en los tiempos de mayor recuperación fue disminuyendo la frecuencia de células mitóticas, presentándose la menor frecuencia en el tiempo de 42 horas de recuperación. De acuerdo con los resultados obtenidos es necesario que este tipo de aguas reciban algún tipo de tratamiento para su uso agrícola, ya que de lo contrario representan un riesgo genético potencial para todos los seres vivos.

1. INTRODUCCIÓN.

La justificación del presente trabajo se basa en que existen muchas sustancias químicas, presentes en las aguas residuales, y que sin tratamiento alguno, son usadas para el riego agrícola. Sustancias con las que todos los seres vivos están en contacto, ya sea de una forma directa o indirecta, y las cuales producen alteraciones genéticas como, por ejemplo, lo llevan a cabo algunos metales pesados que se encuentran en las aguas residuales. Dichos efectos genéticos generalmente resultan muy graves para la constitución bioquímica, fisiológica y morfológica de todos los seres vivos. Uno de los propósitos de los estudios genotóxicos es prevenir este tipo de problemas, y por eso es importante realizar estudios como el presente para obtener una información temprana, preventiva y amplia, desde el punto de vista citogenético, de la actividad biológica que llevan a cabo los agentes genotóxicos y, que por consiguiente, ayuden a tomar decisiones para disminuir el riesgo de usar productos o medios que sean nocivos para el ambiente, para la salud humana, para la sanidad de animales y el vigor de las plantas, sobre todo las cultivadas.

En México, la escasez de agua apropiada para el riego en la agricultura, ha generado la necesidad de utilizar fuentes alternas de este elemento vital, pero que en la mayoría de los casos está contaminada por desechos industriales y domésticos, principalmente.

El Estado de México tiene varios municipios que presentan diversas regiones agrícolas que se ven afectadas por el uso de aguas residuales de origen urbano e industrial que no son tratadas (Guerrero, 1997; SARH, 1994). Uno de

estos municipios es el de Teoloyucan ubicado a 20 Km. al norte de la ciudad de México (figura 1), que tiene una extensión territorial de 48 km², de los cuales el 79% es de uso agrícola. Este municipio recibe los afluentes de aguas residuales urbanas e industriales, provenientes de la ciudad de México y de municipios como Tlalnepantla, Tultitlán, Cuautitlán Izcalli, Cuautitlán y Tepotzotlán, todos del Estado de México. La recepción de estas aguas en el municipio es a través de dos canales principales nombrados "río Cuautitlán" y "río Chico". El "río Cuautitlán" es continuación de un canal llamado colector poniente el cual a su vez es continuación de otro canal nombrado río San Javier que se origina en la ciudad de México y que forma parte del sistema general de desagüe de la ciudad. El "río Chico" se origina en la zona montañosa del municipio de Tepotzotlán, atraviesa la cabecera municipal y en su trayecto recoge las descargas de aguas residuales domésticas y de industrias como la automotriz, la hulera y la química entre otras, incrementando su nivel de contaminación. El "río Cuautitlán" y el "río Chico" se unen adelante de la cabecera municipal de Teoloyucan para seguir su trayecto en un solo canal hacia la región del valle del mezquital en el estado de Hidalgo, para utilizar estas aguas en el riego agrícola. Estas aguas son usadas en el municipio de Teoloyucan, sin tratamiento convencional alguno, para regar diversos cultivos como maíz, alfalfa, frijol, trigo y haba, además de hortalizas como col, coliflor, lechuga, calabaza, chayote, cebolla, chile y tomate, que son principalmente para autoconsumo o que en pequeña escala se comercializan en las centrales de abasto de Cuautitlán, Tultitlán y de la ciudad de México (Ayuntamiento de Teoloyucan, 2000; IGCEM, 2003; INEGI, 2003).

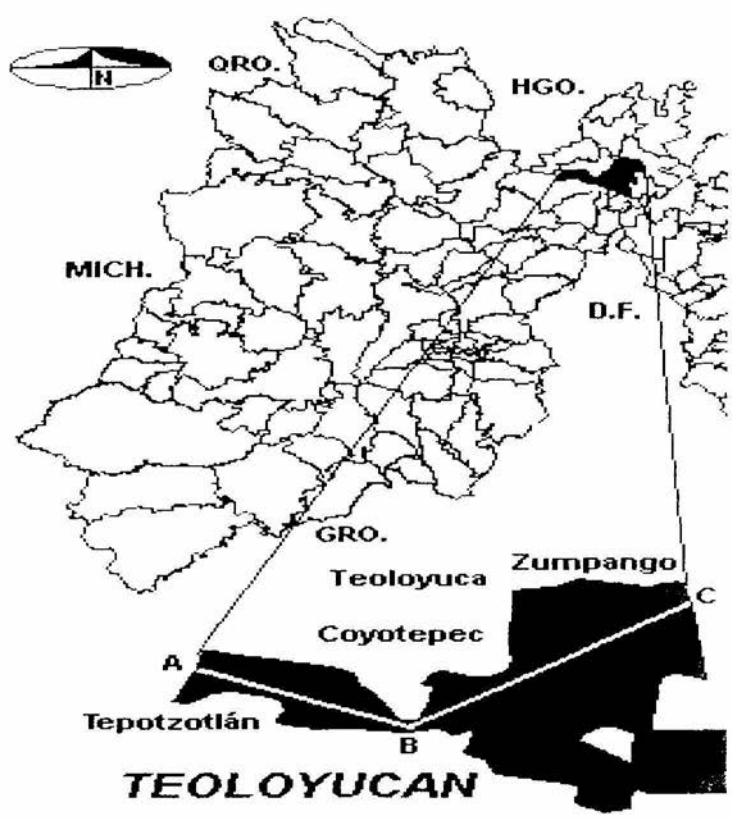


Figura 1. Ubicación geográfica del municipio de Teoloyucan en el Estado de México.

El interés principal de este trabajo es que el uso de estas aguas ha ocasionado que se presenten problemas de un menor vigor y fertilidad, así como de una disminución de la producción en cantidad y calidad en los diversos cultivos y hortalizas que se producen en el municipio (comunicación personal de varios agricultores). posiblemente esto sea consecuencia de un daño genético ocasionado por las diversas sustancias presentes en estas aguas, efecto que se detecta a un nivel fisiológico y morfológico en las plantas ya establecidas (Palafox, 2003). También están generando diversos problemas de salud entre los habitantes del municipio que consumen estos productos, así como en los animales domésticos que también se alimentan directamente de estas plantas como la alfalfa, maíz y trigo (Ayuntamiento de Teoloyucan, 2000). Por otra parte, el monitoreo de la calidad del agua siempre ha sido limitado por medios químicos. Esta es la primera vez que se usa un sistema biológico (micronúcleos-*Vicia faba*) para determinar la genotoxicidad de muestras de agua de estos canales.

Importancia de la calidad del agua utilizada para el riego agrícola.

El concepto de la calidad del agua de riego se refiere a las características de las aguas que pueden afectar su adaptabilidad a un uso específico, de acuerdo a las necesidades del usuario (Pescod, 1992; Seoáñez y Angulo, 1999). Diversos autores mencionan que en la calidad del agua para riego se debe tomar en cuenta principalmente las características químicas, físicas y biológicas que presenten (Metcalf y Eddy, 1996; Nakayama y Bucks, 1991; Ramalho, 1996; Seoáñez y Angulo, 1999).

Otros autores, mencionan que para determinar la calidad del agua que se puede utilizar en el riego, bajo condiciones específicas, se deben considerar las

variaciones e interacciones de suelos, plantas y clima, además del sistema de irrigación que se vaya a emplear (Pescod, 1992; Tebbutt, 2002).

Los parámetros más usuales en la determinación de la calidad del agua, usada para el riego, surgen de acuerdo con el origen, tipo y concentración de contaminantes que existen en ella. En México, las principales fuentes de contaminación del agua, son los desechos domésticos y los provenientes de las industrias.

Con la finalidad de proteger, principalmente, la salud pública, la mayor parte de las autoridades prohíbe que las hortalizas, huertos o frutas, se rieguen con aguas residuales parcialmente tratadas o no tratadas. El riego de viñedos en los que el fruto yace sobre el suelo, también está prohibido. Además, no se permite a las vacas y cabras lecheras que pasten sobre terrenos húmedos irrigados con aguas residuales y se les debe mantener apartadas de los canales de riego que conduzcan aguas residuales. Aún en los casos en que los productos de las áreas irrigadas con aguas residuales se van a cocinar antes de consumirlos, el riego debe suspenderse por lo menos un mes antes de la cosecha (Norma Oficial Mexicana NOM-001-ECOL-1996).

Antecedentes del uso de aguas residuales para el riego agrícola en México.

La práctica de utilizar aguas residuales domésticas e industriales en el riego agrícola es ampliamente conocida y apreciada por los agricultores, esto se hace principalmente en zonas de escasas fuentes de abastecimiento de agua de buena calidad para el desarrollo de cultivos, como son las zonas áridas y semiáridas del país (Tejeda, 1993).

En México, esta actividad se inició a principios del siglo XX, en el Valle del Mezquital, en el estado de Hidalgo, debido a la terminación de las obras del "gran canal del desagüe", el cual conduce las aguas residuales industriales y domésticas generadas en el área metropolitana de la ciudad de México, y que son aprovechadas para el riego de diversos cultivos en esa región. Esta reutilización del agua se realiza directamente y sin ningún tratamiento previo en toda el área regable de esa región, en la cual, antes de aprovechar este tipo de aguas, los suelos eran infértiles, por lo que la productividad era sumamente baja, y a partir de la introducción del riego con dichas aguas se han formado suelos de espesor considerable y de alta productividad. Posteriormente, esta práctica se extendió a otras regiones del país, sin embargo, esto se ha realizado en una forma no planeada y con tecnologías inadecuadas, por lo que en algunas regiones del país se han presentado efectos indeseables de diferentes tipos y magnitudes (Arango, 1996; SARH, 1994; Tejeda, 1993).

Arango (1996), indica que en el año de 1995 la superficie regada por aguas residuales con fines agrícolas era de 314 000 hectáreas en 13 estados de la República Mexicana y los principales cultivos eran maíz, frijol, trigo, alfalfa, sorgo, algodón, hortalizas, cítricos y frutales.

Clasificación de las aguas residuales según su origen.

El ser humano le da al agua una gran diversidad de usos, lo cual ha provocado que se tenga una alta cantidad de descargas de aguas que llevan diferentes tipos de contaminantes.

De acuerdo con Palacios (2002), según su origen, las aguas residuales pueden ser clasificadas de la siguiente forma:

- a) **Domésticas o urbanas.** Las aguas de este tipo se componen principalmente de materia orgánica en forma de sólidos, que son originados por las actividades humanas más elementales y evacuados utilizando el sistema de alcantarillado. Este tipo de aguas se caracterizan además, por su contenido de organismos patógenos provenientes del tracto intestinal del humano, entre los que se pueden mencionar lo siguientes: coliformes fecales, estreptococos fecales, huevecillos de nemátodos, quistes amibianos, entre otros. También contienen cantidades significativas de materia inorgánica proveniente de la limpieza de las casas habitación, calles, centros comerciales y demás; siendo característicos los compuestos que forman los detergentes y concentraciones considerables de grasas y aceites.
- b) **Industriales.** Las aguas residuales de origen industrial se distinguen por contener gran variedad de sustancias tóxicas (como los metales pesados), ya sea en forma disuelta o suspendida, dependiendo del tipo y tamaño de la industria. Tal contenido define las características que condicionan el uso de las aguas y determinan el impacto sobre el ambiente cuando son dispuestas. Las principales industrias que aportan la mayor cantidad de aguas residuales de este tipo son: la del aluminio, automotriz, azucarera, vitivinícola, conservas y enlatados, lácteos, fertilizantes, vidrio, cemento y concreto, asbestos, química, curtiduría, metales, petróleo, plásticos, papel, termoeléctrica, acero y textil.
- c) **Agrícolas.** Las aguas de retorno agrícola son todas aquellas que han pasado por campos agrícolas y no han sido absorbidas ni por los vegetales

ni por el suelo, y por esto, contienen altas concentraciones de nutrientes provenientes de fertilizantes y además de plaguicidas. Este tipo de aguas provocan la aceleración de los procesos de eutroficación al llegar a los cuerpos de agua, además de ser causantes de contaminación tanto de flora como de fauna.

- d) **Municipales.** Este tipo de agua se caracteriza por estar compuesta por agua residual doméstica y agua residual industrial, por lo que su tratamiento o depuración es más complicado que los otros tipos, debido a que generalmente el tratamiento de las aguas residuales domésticas es distinto al de las industriales, y en ocasiones pueden antagonizar.

Características de las aguas residuales.

Para conocer las posibilidades de uso de las aguas residuales, su potencial de peligrosidad, su utilidad para riego, y su capacidad de fertilidad, es preciso conocer las características de dichas aguas, y éstas varían de gran manera ante la presencia y el tipo de industrias, y ante las costumbres higiénicas que siga la población urbana (Arango, 1996).

Diversos autores mencionan que en la calidad del agua para riego se debe tomar en cuenta principalmente las características químicas, físicas y biológicas que presenten (Metcalf y Eddy, 1996; Nakayama y Bucks, 1991; Ramalho, 1996; Seoáñez y Angulo, 1999).

Características biológicas como la presencia de diferentes tipos de microorganismos como virus, organismos coliformes, hongos, bacterias, algas y diferentes tipos de parásitos (Crites y Tchobanoglous, 2000; Ramalho, 1996; Tebbutt, 2002).

Características físicas como sólidos totales, olor, temperatura, densidad, color, turbiedad, conductividad eléctrica, transmitancia y absorbancia (Crites y Tchobanoglous, 2000; Seoáñez y Angulo, 1999; Tebbutt, 2002).

Características químicas como el contenido de materia orgánica, proteínas, carbohidratos, grasas, aceites, agentes tensoactivos, pH y cloruros (Metcalf y Eddy, 1996; Tebbutt, 2002; Ramalho, 1996).

Criterios y normas de calidad de las aguas residuales.

Desde finales de los años 60's, del siglo pasado, se iniciaron estudios en el uso de las aguas residuales para el riego agrícola, los cuales continúan en la actualidad. Con base en esos estudios se han establecido criterios para normar su aplicación y, según la calidad de estas aguas, ver cuáles cultivos son más factibles de producir. Así se tiene que desde el año de 1970, la Secretaría de Recursos Hidráulicos, a través de la Comisión Hidrológica de la Cuenca del Valle de México, propuso un reglamento para el riego de cultivos con aguas residuales, que fue publicado en el Diario Oficial de la Federación, en el mes de marzo de 1973 y con una aplicación para todo el país. Dicho reglamento se basa en los criterios de que pueden regarse con aguas residuales sedimentadas, cultivos como el maíz, frijol, trigo, cebada, remolacha, coliflor, espárragos, papa, calabaza, chayote, soya, cártamo y ajonjolí. En el caso de los árboles frutales como cítricos, plátano, nogal, aguacate, mango y membrillo, siempre y cuando el riego se suspenda por lo menos un mes antes de la cosecha. Para las flores y plantas ornamentales de invernadero, también, se recomienda que pueden ser regadas con este tipo de

aguas. El reglamento, también, indica que las aguas residuales pueden usarse en cultivos forrajeros para alimentación del ganado lechero, como alfalfa, pastos, avena, sorgo, etc., siempre y cuando sea obligatoria la pasteurización de la leche. Por otra parte, los cultivos que no deben ser regados con aguas residuales son col, zanahoria, lechuga, apio, ajo, jitomate, berro, perejil, cilantro, espinacas y aquellos que se dediquen a la producción de semillas (SARH, 1994).

En la actualidad existen normas que se refieren a la calidad que deben tener los diferentes tipos de aguas que se utilizan para el riego. En el tabla 1, se presentan los límites máximos permisibles de diversos parámetros que deben tener las aguas residuales para que se puedan utilizar para el riego agrícola, según la Norma Oficial Mexicana NOM-001-ECOL-1996, que se publicó el 24 de diciembre de 1996, en Diario Oficial de la Federación. La Norma Oficial Mexicana, indica que los contaminantes básicos son aquellos compuestos o parámetros que pueden ser removidos o estabilizados mediante procesos convencionales. En lo que corresponde a esta Norma Oficial Mexicana, considera que los contaminantes patógenos y parasitarios son los microorganismos, quistes y huevos de parásitos que pueden estar presentes en las aguas residuales y que representan un riesgo a la salud humana, flora o fauna. En lo que, también, corresponde a esta Norma Oficial Mexicana sólo se consideran los coliformes fecales medidos como NMP o UFC/100 ml (número más probable o unidades formadoras de colonias por cada 100 mililitros) y los huevos de helminto medidos como h/l (huevos por litro). Con respecto a los metales pesados, la Norma Oficial menciona que aquellos elementos que se encuentren en concentraciones por encima de determinados límites, pueden producir efectos negativos en la salud humana, flora o fauna. La

Norma Oficial sólo considera a los siguientes: arsénico, cadmio, cobre, cromo, mercurio, níquel, plomo y zinc.

PARÁMETROS (mg/l, excepto cuando se especifique)	NIVELES MÁXIMOS PERMISIBLES (Promedio diario)
Potencial de Hidrógeno (pH) (unidades)	5 a 10
Conductividad eléctrica (mmhos/cm)	2000
Temperatura (°C)	40.0
Grasas y aceites	25.0
Materia flotante	Ausente
Sólidos sedimentables	2.0
Sólidos suspendidos totales	125.0
Demanda bioquímica de oxígeno	150.0
Nitrógeno total	60.0
Fósforo total	30.0
Arsénico	0.4
Cadmio	0.4
Cianuros	3.0
Cobre	6.0
Cromo	1.5
Mercurio	0.02
Níquel	4.0
Plomo	1.0
Zinc	20.0

Tabla 1. Límites máximos permisibles de los parámetros de contaminantes para las aguas residuales que se dispongan para el riego agrícola (Norma Oficial Mexicana, 1996).

Efecto del riego con aguas residuales en el suelo y en las plantas cultivadas.

Efecto en el suelo.

El vertido de aguas residuales sobre un suelo origina en éste una serie de alteraciones que pueden ser beneficiosas en ciertas condiciones. Muchos componentes del agua residual son productos que pueden mejorar la fertilidad, pues son elementos y compuestos nutrientes, también la calidad de la textura puede ser mejorada por la adición de materia orgánica (SARH, 1994). En otras situaciones el riego puede ser problemático desde el punto de vista de la toxicidad. La aplicación de aguas residuales puede producir un aumento en el contenido en sales y metales pesados en el suelo, dependiendo de la concentración de estos productos en el vertido, del tipo de suelo, de la intensidad de la aplicación, de la modalidad de riego, etc. Si los componentes sólidos del vertido se concentran en el suelo y si se realizan lavados frecuentes con aguas no residuales, el resultado es una baja en la concentración de sales y metales en el suelo y un aumento de su presencia en los niveles freáticos y acuíferos (Cruz, 1997; Durán y Hernández, 1998). Así pues, la presencia de esta clase de elementos y compuestos puede alterar la calidad de un suelo, por lo que antes de las aplicaciones de aguas residuales, es importante hacer el análisis de la composición de esta agua y el análisis del suelo, para así conocer los niveles máximos de vertido admisibles bajo el punto de vista de la acumulación de metales, la capacidad del suelo de asimilarlos e incorporarlos en forma de fracción insoluble y no asimilable por las plantas (Cruz, 1997; Durán y Hernández, 1998).

Por otra parte, el exceso de materia orgánica implica un crecimiento desmedido de organismos que la degradan, lo que redundará en un abatimiento del oxígeno del suelo y, en consecuencia, un efecto nocivo en el desarrollo de las plantas. La alta concentración de sólidos suspendidos contenidos en las aguas residuales, provoca que al ser aplicadas al suelo, se tapen los poros del mismo, lo que imposibilita la aeración de éste, la infiltración del agua y con ello, el desarrollo de las plantas. Este mismo efecto también es provocado por las grasas y aceites debido a la película que producen en la superficie del suelo (SARH, 1994).

Efecto en las plantas cultivadas.

Se reporta un efecto benéfico de las aguas residuales usadas para riego en los rendimientos de muchas plantas cultivadas, esto obedece al alto contenido de materia orgánica y elementos nutritivos que transportan dichas aguas y que depositan en suelos empobrecidos volviéndolos fértiles. Sin embargo se ha logrado en algunos casos una disminución en rendimientos de alfalfa, jitomate, frijol y otros cultivos, por ejemplo, se observó una disminución en el número de cortes de alfalfa en suelos regados frecuentemente con aguas residuales, atribuyendo esto a la aparición de espumas de detergentes y a problemas de salinidad y toxicidad de contaminantes que se descargan en los suelos agrícolas (Durán y Hernández, 1998).

Cuando el vertido de las aguas residuales es intenso y prolongado y se satura el suelo durante un largo período de tiempo, se propician condiciones anaerobias y aparecen fenómenos de oxidación incompleta y producción de sustancias a veces tóxicas, que se traducen en asfixia de las raíces, lo que a su vez provoca marchitez de la planta (Palacios, 2002). Además de lo anterior, al realizarse las

fermentaciones se liberan sustancias, como etileno, capaces de influir negativamente sobre la germinación y el crecimiento de las raíces (Avilés, 2000; Durán y Hernández, 1998).

No obstante las ventajas del uso de aguas residuales en la agricultura, en la actualidad debido a la industrialización, principalmente, la composición física, química y biológica de las aguas residuales en los últimos años ha presentado cambios o degradación en su calidad con fines de riego. Esto se debe a que dichas industrias descargan sus desechos al drenaje y contaminan las aguas con gran cantidad de compuestos tóxicos y nocivos (Durán y Hernández, 1998).

Contaminación del agua por metales pesados.

En México, un aspecto de gran importancia es el alto porcentaje de aguas residuales que presentan elevadas concentraciones de metales pesados, los cuales contaminan el ambiente por sus características de bioconcentración y bioacumulación en los ecosistemas. Los metales más tóxicos, persistentes y abundantes en el ambiente son, cadmio, cromo, mercurio, plomo y el metaloide arsénico. Se conoce que estos elementos se concentran en los organismos vivos, permaneciendo largo tiempo en ellos, y se comportan como venenos acumulativos (Avilés, 2000; Cajuste y Carrillo, 1992; Cruz, 1997).

Los metales pesados se pueden definir como elementos químicos que se presentan en bajas concentraciones y que tienen una densidad igual o superior a los 5 g por cm³ (cinco veces la densidad del agua) cuando están en forma elemental o cuyo número atómico es superior a 20 (excluyendo a los metales alcalinos y alcalinos-térreos) (Avilés, 2000; Cruz, 1997; Durán y Hernández, 1998).

La concentración de los metales pesados en el agua residual se debe principalmente a su origen, ya que si es doméstica la concentración de metales es baja, y si es de origen industrial la concentración será mayor y dependerá del tipo de industria (Avilés, 2000; Cajuste y Carrillo, 1992; Durán y Hernández, 1998).

El peligro que pueden presentar los metales pesados, contenidos en las aguas residuales para riego, es que pueden acumularse en los tejidos vegetales (alterando su funcionamiento genético, bioquímico y fisiológico) y entrar a la cadena alimenticia de tal forma que se rebasen los límites máximos permitidos para preservar la salud de los consumidores (Knasmüller et al, 1998; Majer et al, 2002; Steinkellner et al, 1998).

Generalidades de los metales pesados.

A continuación se mencionan algunas características de los metales pesados más comunes que se presentan en las aguas residuales que son empleadas en el riego agrícola.

Arsénico (As).

El arsénico se conoce desde la antigüedad, ocupa el lugar 52 en abundancia entre los elementos naturales de la corteza terrestre. El elemento puro no es muy común en la naturaleza, pero se puede aislar fácilmente calentando un mineral común llamado arsenopirita (FeAsS). Es un elemento semimetálico, ya que químicamente se encuentra entre los metales y los no metales. Tiene un número atómico 33, su masa atómica es 74.92 uma. Cuando se calienta se sublima pasando directamente de sólido a gas a 613 °C. Su punto de fusión es de 817 °C. Una de sus formas más comunes del arsénico es gris de apariencia metálica y

tiene una densidad de 5.7 g/cm^3 . Existe también una forma amarilla no metálica con una densidad de 2.0 g/cm^3 (García, 1993).

El arsénico es venenoso, para el humano, en dosis significativamente mayores a 65 mg, y el envenenamiento puede producirse por una única dosis alta, pero también por acumulación progresiva de pequeñas dosis repetidas, como, por ejemplo, la inhalación de gases o polvo de arsénico. En el humano puede provocar bronquitis, cáncer de esófago, laringe, pulmón y vejiga, además de hepatotoxicidad y enfermedades vasculares (Sainz *et al.*, 2004). El arsénico tiene un efecto clastogénico, induce intercambios de cromátidas hermanas, causa daños al huso mitótico, interfiere con la reparación del DNA y es un comutágeno debido a que no produce un efecto mutágeno por si solo (Gómez *et al.*, 1997).

Cadmio (Cd).

El cadmio fue descubierto en 1817, por el químico alemán Friedrich Stromeyer, en las incrustaciones de los hornos de zinc. El cadmio ocupa el lugar 65 en abundancia entre los elementos de la corteza terrestre. Este elemento sólo existe como componente principal de un mineral llamado greenockita (sulfuro de cadmio), que se encuentra muy raramente. Casi todo el cadmio industrial se obtiene como subproducto en el refinado de los minerales de zinc. Para separar el cadmio del zinc se utiliza la destilación fraccionada o la electrólisis. Se encuentra en casi todos los organismos en pequeñas cantidades. La amplia utilización del cadmio en la industria hace que sea uno de los más frecuentes contaminantes del ambiente (Avilés, 2000; Durán y Hernández, 1998). Es un elemento metálico blanco plateado que es muy dúctil y maleable. Su número atómico es 48, la masa atómica es 112.4 uma, tiene una densidad de 8.64 g/cm^3 . Presenta un punto de

fusión de 321 °C, un punto de ebullición de 765 °C. Al calentarlo arde en el aire con una luz brillante, formando óxido de cadmio (Avilés, 2000; García, 1993).

El cadmio es un metal pesado que produce efectos tóxicos en los organismos vivos, aun en concentraciones muy pequeñas que se encuentran en el aire, agua, suelo y alimentos (Avilés, 2000; Durán y Hernández, 1998).

La exposición al cadmio en los humanos se produce generalmente a través de dos fuentes principales: la primera es la vía oral (por agua o consumo de alimentos contaminados). La segunda vía es por inhalación (las personas fumadoras son las más expuestas al cadmio porque los cigarrillos lo contienen) (Marcano et al, 1999). El cadmio entra al torrente sanguíneo por absorción en el estómago o en los intestinos, luego de la ingestión de comida o agua, o por absorción en los pulmones después de la inhalación. Personas que han estado expuestas al cadmio, presentan problemas de salud como enfermedades renales, daños en el sistema óseo, sistema inmunológico, sistema nervioso y en la sangre, también ocasiona problemas en el hígado y en los pulmones, causando cáncer (Cruz, 1997; Marcano et al, 1999).

Cromo (Cr).

El cromo fue descubierto en 1797 por el químico francés Louis Nicolas Vauquelin, quién lo denominó cromo debido a los múltiples colores de sus compuestos. Es un metal que se encuentra en la naturaleza en forma de sales y de óxido. Su mineral más importante es la cromita (FeCr_2O_4) cuyos yacimientos más importantes están en la zona de los Urales, República Sudafricana, Zimbabwe, Turquía y Filipinas. Está distribuido por toda la corteza terrestre ocupando el lugar 21 en abundancia entre los elementos (Cruz, 1997). Es un

elemento metálico de color gris, que puede presentar un intenso brillo, es muy duro y resistente químicamente. Su número atómico es 24, su masa atómica es 51.996 uma, su densidad de 7.2 g/cm³. Tiene un punto de fusión de 1857 °C y un punto de ebullición de 2672 °C. Se disuelve en los ácidos clorhídrico y sulfúrico, pero resiste al ácido nítrico (Durán y Hernández, 1998; García, 1993).

El cromo puede presentarse, en el ambiente, en los estados de oxidación de Cr³⁺ y Cr⁶⁺. Este último es fuertemente oxidante, muy móvil y el más tóxico como anión, mientras que el Cr³⁺ es relativamente insoluble, se adsorbe fuertemente sobre las superficies y es menos tóxico (Armienta *et al*, 2001). En un medio alcalino y en condiciones aerobias, puede ocurrir la oxidación de Cr³⁺ a Cr⁶⁺. Esta oxidación es más intensa a temperaturas más altas (Gardea *et al*, 2004). En los seres vivos no se produce la oxidación de Cr³⁺ a Cr⁶⁺ (García, 1993).

La vía más fácil de ingreso del cromo al organismo humano es la vía respiratoria. Los compuestos hexavalentes son más rápidamente absorbidos en el pulmón que los trivalentes, aunque luego en la sangre se biotransforman en trivalentes. Se ha demostrado que la absorción por vía digestiva es ineficaz, ya que no alcanza más del 6% de lo ingerido (Cruz, 1997). El cromo absorbido pasa a la corriente sanguínea, en donde se reduce a la forma trivalente y se distribuye por varios órganos como el hígado y los huesos, también, llega a ocasionar nefrotoxicidad, hepatotoxicidad y cáncer de pulmón (Sainz *et al*, 2004). Se conoce que la toxicidad del cromo produce efectos específicos a nivel celular, ya que pueden existir interacciones entre el metal y los sistemas enzimáticos, membranas celulares, organelos y sobre el metabolismo celular en general (Melo, *et al*, 2003). Por otra parte, se ha determinado que el Cr⁶⁺ puede ser transportado a través de

la membrana celular y su genotoxicidad es ejercida directamente de su poder oxidante. También puede tener un efecto indirecto al sufrir una reducción a Cr^{3+} el cual es viable para interactuar con el material genético (De Marco et al., 1988).

Mercurio (Hg).

El mercurio se conoce desde la antigüedad. Era conocido por los griegos y las minas de cinabrio existentes en España han sido explotadas por todos los pueblos que, históricamente, han habitado la península ibérica. Los alquimistas lo conocían también con el nombre de plata líquida. Fue distinguido por primera vez como elemento por el químico francés Antoine Laurent Lavoisier en sus experimentos sobre la composición del aire. El mercurio se clasifica en el 67º lugar en orden de abundancia de los elementos en la corteza terrestre. Se encuentra en estado libre en pequeñas cantidades oculto en grandes masas rocosas y combinado con la plata, pero la mayor parte se encuentra como mineral en el cinabrio (HgS) (Cruz, 1997). A temperatura ambiente, el mercurio es un líquido brillante, muy denso, de color blanco plateado, ligeramente volátil. Su número atómico es 80, su masa atómica es 200.59 uma. Tiene un punto de fusión de $-39\text{ }^\circ\text{C}$, y un punto de ebullición de $357\text{ }^\circ\text{C}$. Su densidad es de 13.534 g/cm^3 (García, 1993).

El vapor de mercurio y sus sales solubles en agua corroen las membranas del organismo. El envenenamiento progresivo, que se da al ingerir durante largos periodos pequeñas cantidades del metal o de sus sales liposolubles, en especial el metilmercurio, llega a provocar daños irreversibles en el cerebro, hígado y riñón. A causa del aumento de la contaminación del agua, se han encontrado cantidades significativas de mercurio en ciertas especies de peces, creciendo la preocupación por vertidos incontrolados del metal a las aguas (Cruz, 1997).

Plomo (Pb).

El plomo es uno de los primeros metales conocidos, se encuentra ampliamente distribuido por todo el planeta en forma de galena, que es sulfuro de plomo. Ocupa el lugar 36 en abundancia entre los elementos de la corteza terrestre (Avilés, 2000). Es un elemento metálico, de color gris azulado. Su número atómico es 82 y su masa atómica de 207.2 uma. Es un metal blando, maleable y dúctil. Presenta una baja resistencia a la tracción y es un mal conductor de la electricidad. Tiene un punto de fusión de 328 °C, un punto de ebullición de 1740 °C y una densidad de 11.34 g/cm³ (Avilés, 2000; Durán y Hernández, 1998; García, 1993).

El plomo ingerido, por el humano, en cualquiera de sus formas es altamente tóxico. Sus efectos suelen sentirse después de haberse acumulado en el organismo durante un periodo de tiempo. Los síntomas de envenenamiento son anemia, debilidad, estreñimiento y parálisis en muñecas y tobillos. Las escamas de pinturas con base de plomo y los juguetes fabricados con compuestos de plomo están considerados como muy peligrosos para los niños, para los que el plomo resulta especialmente dañino, incluso a niveles que antes se consideraban inocuos. El plomo, también, puede producir disminución de la inteligencia, retraso en el desarrollo motor, deterioro de la memoria y problemas de audición y equilibrio. En adultos, el plomo puede aumentar la presión sanguínea y generar problemas cardiovasculares (Avilés, 2000; Cruz, 1997). También, se ha encontrado que el plomo causa un daño genético, ya que se ha observado que

este metal inhibe la función de enzimas que intervienen en la reparación del DNA (Steinkellner et al,1998).

Efectos tóxicos de los metales pesados en las plantas.

Cruz, (1997), indica que la irrigación con aguas residuales puede aumentar la cantidad de sustancias tóxicas en el ambiente y en los vegetales, y entre éstas sustancias están los metales pesados, cuya concentración en las plantas depende de:

- a) la concentración de los metales en el agua
- b) la especie vegetal
- c) la periodicidad de aplicación de riegos con aguas contaminadas
- d) tipo de riego

A continuación se mencionan algunos de los efectos tóxicos que provocan los metales pesados en las plantas:

Arsénico (As).

Los síntomas de toxicidad que ocasiona el arsénico en los vegetales son, la presencia de manchas necróticas de un rojo oscuro en hojas viejas, un oscurecimiento o amarillamiento en las raíces, y en general un decaimiento de las plantas (Cruz, 1997; Durán y Hernández, 1998).

Cadmio (Cd).

El cadmio es uno de los elementos más tóxicos para las plantas, es muy persistente y tóxico aún en concentraciones muy pequeñas. Las plantas retienen el cadmio en sus tejidos, presentándose la mayor concentración en las raíces que

en las partes aéreas de la planta. Los efectos fitotóxicos que ocasiona el cadmio, son, una clorosis que incluye una reducción en el contenido de clorofila, marchitez y en ocasiones necrosis, además de raíces oscuras y cortas (Marcano et al, 1999). Este tipo de efectos se debe a que a altas concentraciones de cadmio se inhiben la fotosíntesis y la fijación de bióxido de carbono (Cruz, 1997; Durán y Hernández, 1998). También se ha establecido que el efecto tóxico del cadmio se refleja en un bloqueo en el crecimiento de las raíces y tallos en varias especies (Chakravarty y Srivastava, 1992)

A nivel celular, el cadmio es un metal antagonista del calcio, este último indispensable para la formación del huso mitótico, por lo que competitivamente, al superar la concentración de cadmio a la del calcio intracelular, se produce el bloqueo en la migración de los cromosomas metafásicos (Marcano et al, 1999).

Cromo (Cr).

El Cr^{6+} es un elemento muy tóxico para las plantas, aún en pequeñas concentraciones provoca clorosis en hojas nuevas y crecimiento deficiente de raíces (Cruz, 1997; Gardea et al, 2004), además reduce el tamaño de las plántulas, esto es debido a que el cromo sufre un proceso llamado mutilación que consiste en que forma un compuesto organometálico (un enlace carbono-metal) el cual es liposoluble, es decir puede atravesar fácilmente las membranas biológicas (Armienta et al, 2001; Gardea et al, 2004). Por otra parte, se ha encontrado que el cromo afecta a los protoplastos e inhibe la germinación de las semillas, y además ocasiona deficiencia de hierro en algunos cultivos y se bioacumula en las hojas (Durán y Hernández, 1998). También disminuye el índice mitótico e induce aberraciones cromosómicas y la formación de micronúcleos (Zhang y Xiao, 1998).

Mercurio (Hg).

El mercurio penetra a la planta a través de su sistema radicular o del follaje, provocando síntomas como el impedimento del desarrollo de las raíces, la manifestación de clorosis en las hojas y aparición de áreas necrosadas en las mismas hojas (Cruz, 1997; Durán y Hernández, 1998).

Plomo (Pb).

El plomo está considerado como un agente contaminante, ya que no tiene ninguna función específica en los organismos vivos. En los vegetales, la absorción de plomo se hace a través de las raíces y de las hojas. Una vez asimilado por la planta, el plomo es retenido por los cloroplastos y mitocondrias de las células, llegando a interferir con el metabolismo del hierro, además se concentra en la membrana del núcleo durante la mitosis y reduce la división celular. Entre los efectos morfológicos, que ocasiona el plomo, se conoce que, reduce el crecimiento de las raíces, las hojas tienen un color verde oscuro, hay un marchitamiento en hojas viejas, poco follaje y causa una adelantada senectud en la planta recién nacida (Cruz, 1997; Durán y Hernández, 1998).

Ciclo celular en células meristemáticas.

El ciclo celular comprende una serie de eventos en los cuales ocurre el crecimiento y la división celular (figura 2). La duración varía de 16 a 24 horas en los vegetales, dependiendo de la especie, edad y temperatura del ambiente (Stern, 1994; Lodish, 1995).

El ciclo celular comprende dos etapas: la interfase y la mitosis. Antiguamente se decía que la interfase era un estado de reposo, pero no es así, ya que es aquí

donde la célula esta metabólicamente activa, aumenta su volumen y hay una síntesis y replicación del DNA (Paniagua, 1993; Lodish, 1995). La interfase se divide en tres fases que son: G1, S y G2. La fase G1 corresponde a un intervalo entre la mitosis y la iniciación de la replicación del DNA, durante ésta etapa la célula es metabólicamente activa y continuamente esta creciendo pero no hay replicación del DNA, presentándose una síntesis de RNA y proteínas. En la fase S, se lleva a cabo la replicación del DNA o duplicación de los cromosomas. En la fase G2, la célula continúa una nueva etapa de crecimiento y más síntesis de RNA y proteínas, preparándose para la mitosis (Lodish, 1995; Cooper, 1997; Karp, 1999).

La duración de la interfase comprende un 90% del ciclo celular, la etapa G1 es la de mayor duración con un 40-50% de la interfase, luego sigue la etapa S con un 30% y la fase G2 con un 20% (Sterm, 1994; Cooper, 1997).

En el caso particular de las células meristemáticas de raíz de haba (*Vicia faba* L.) tienen un ciclo celular con una duración total de 19.3 horas a una temperatura de 19 °C, aproximadamente, en donde la mitosis tiene una duración de dos horas, y la interfase se divide en los periodos G1 con 4.9 horas, S con 7.5 horas y G2 con 4.9 horas (figura 6) (Curtis, 1986).

Las células pueden abandonar el ciclo celular y entran en una etapa llamada G0, en donde permanecen viables y activas metabólicamente presentándose el crecimiento y la diferenciación celular, pero no se dividen. La mayoría de las células nunca reinician el ciclo celular y hay otras que pueden volver a G1, continuando el ciclo celular (Klug y Cummings, 1999).

División celular en células meristemáticas.

La división celular en células meristemáticas es llamada mitosis, la cual es un fenómeno en donde el material genético se divide en partes iguales entre las células hijas. Este proceso es sólo la parte final de un cambio subyacente que ha ocurrido en el plano bioquímico macromolecular en las restantes etapas del ciclo celular, particularmente en la etapa S (Griffiths *et al.*, 2000).

En los vegetales, la mitosis ocurre en tejidos específicos como son los meristemas que se encuentran en los ápices de raíz y tallo, y en el cambium vascular (Curtis, 1986).

La mitosis para su estudio se divide en cinco fases nombradas: profase, prometafase, metafase, anafase y telofase. La profase es usualmente la más larga, seguida de la telofase, mientras que la metafase y anafase son etapas cortas y rápidas, y la prometafase es de muy breve duración (Griffiths *et al.*, 2000; Klug y Cummings, 1999).

La profase (figura 2a) comienza cuando los cromosomas aparecen como delicados filamentos extendidos dentro de la esfera nuclear (Griffiths *et al.*, 2000). Cada cromosoma está compuesto por dos filamentos denominados cromátidas, que se encuentran asociados estrechamente a todo lo largo, a medida que la profase avanza, ambas cromátidas van acortándose y engrosándose, y están unidas por el centrómero (Gardner *et al.*, 1999). Con el aumento del espesor de los cromosomas, la región del centrómero se hace más acentuada hasta llegar a aparecer como una constricción. A medida que avanza la profase, los cromosomas tienden a acercarse al borde del núcleo, mientras simultáneamente a estos fenómenos la membrana nuclear y el nucléolo van disgregándose (Klug y

Cummings, 1999). Durante la profase tiene lugar la formación del huso mitótico, que se forma fuera de la envoltura nuclear. Esta etapa termina con la disgregación de la membrana nuclear (Gardner et al, 1999; Griffiths et al, 2000; Klug y Cummings, 1999).

La prometafase es una etapa de transición entre la profase y metafase. dura muy poco tiempo, y consiste en que los cromosomas se desplazan hacia el ecuador o placa ecuatorial de la célula (Griffiths et al, 2000; Klug y Cummings, 1999).

La metafase (figura 2b) comienza cuando los cromosomas alcanzan el plano ecuatorial y se disponen irregularmente ocupando toda la superficie del ecuador y se “enganchan” a las fibras del huso mitótico, a través de su centrómero (Gardner et al, 1999; Griffiths et al, 2000; Klug y Cummings, 1999).

En la anafase (figura 2c), se lleva a cabo la separación de las cromátidas, de cada cromosoma; hacia los polos opuestos de la célula, y se denominan cromosomas hijos (Gardner et al, 1999; Griffiths et al, 2000; Klug y Cummings, 1999).

La telofase es la etapa final de la mitosis (figura 2d), comienza con el final de la migración de los cromosomas hacia los polos, en donde empiezan a desenrollarse, se hacen cada vez menos condensados y se agrupan finalmente en masas de cromatina rodeados de segmentos discontinuos de envoltura nuclear que finalmente se fusionan para formar la envoltura nuclear completa. Al final de la telofase reaparecen los nucléolos a partir de los organizadores nucleolares localizados en las constricciones secundarias de los satélites de los cromosomas.

Los microtubulos se reorganizan y reaparece el citoesqueleto y la forma propia de la célula (Gardner et al., 1999; Griffiths et al., 2000; Klug y Cummings, 1999).

Donde antes había una célula, ahora existen dos células con exactamente la misma información genética y el mismo número cromosómico (Klug y Cummings, 1999).

Importancia de la evaluación genotóxica.

Un problema muy grave que se está presentando en todos los organismos vivos, es la constante exposición a un número creciente de agentes contaminantes, lo cual ha dado lugar a un interés para desarrollar bioensayos que sirvan para detectar las posibles alteraciones en el material genético que ocasionan dichos agentes en los seres vivos, manifestación que se denomina genotoxicidad. Así, las respuestas celulares a cualquier tipo de exposición pueden determinarse y ser evaluadas utilizando diferentes indicadores y sistemas de prueba (De Marco et al., 1986; Duan et al., 1999; Gopalan, 1999).

Los agentes genotóxicos actúan en las células, con propiedades físicas y químicas que les permiten interactuar directa o indirectamente con el DNA, y poseen, por lo tanto, una posible actividad mutagénica y carcinogénica (Sawger, 1994).

El surgimiento de los estudios genotóxicos ha ocasionado que en la actualidad existan más de 200 pruebas de bioensayo para evaluar y detectar el potencial genotóxico de agentes contaminantes ambientales (Grover y Satwinderjeet, 1999).

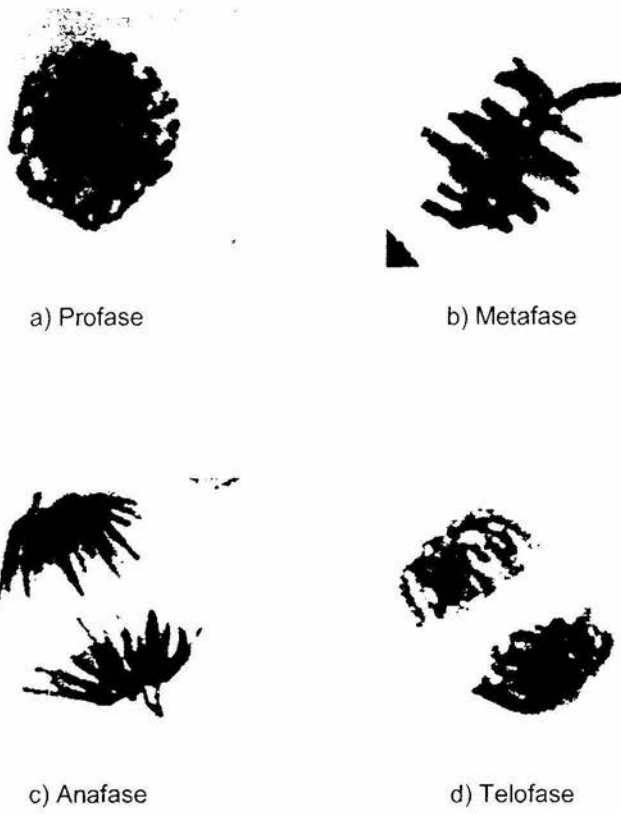


Figura 2. Fases de la mitosis en células meristemáticas de raíz de *Vicia faba*

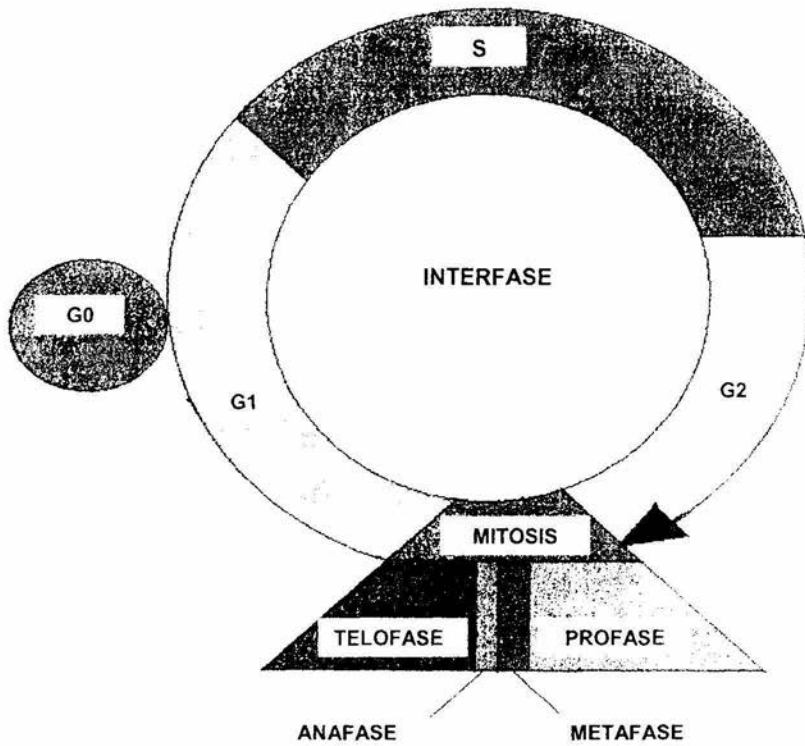


Figura 3. Ciclo celular en células meristemáticas de *Vicia faba*

Muchos trabajos han demostrado que la realización de bioensayos utilizando como sistemas de prueba a los vegetales, han resultado excelentes bioindicadores para evaluar el daño sobre el DNA ocasionado por diversos tipos de agentes ambientales. Entre las plantas que más se emplean como sistema de prueba, están la cebolla (*Allium cepa* L.), tradescantia (*Tradescantia* sp.) y el haba (*Vicia faba* L.), estas especies se han estado usando por más de 60 años en diferentes tipos de investigaciones (Fiskesjo, 1993; Kanaya et al, 1994; Rank y Nielsen, 1994). Su empleo fue inicialmente para estudiar los efectos mutagénicos de radiaciones iónicas y mutágenos químicos, pero, también, se ha demostrado que son excelentes indicadores para evaluar la mutagenicidad y clastogenicidad de contaminantes ambientales, ya que son muy sensibles a la presencia de éstos (Duan et al, 1999). Todo esto unido con la simplicidad para realizar dichos ensayos y su relativo bajo costo económico, los hacen una prueba de ensayo confiable y recomendable para un constante monitoreo ambiental, ya que constituyen una primera alerta de riesgo a la presencia de agentes potencialmente mutágenos en el agua, aire y suelo, elementos que son esenciales para la vida (Gopalan, 1999; Knasmüller et al, 1998; Miao et al, 1999; Steinkellner et al, 1998).

Definición e importancia de la prueba de micronúcleos.

Un estudio que se utiliza frecuentemente para determinar el daño al DNA de los agentes contaminantes ambientales es la llamada prueba de micronúcleos, la cual se encuentra entre los indicadores que detectan rupturas a nivel de cromosomas, y es considerada una prueba sencilla, rápida, confiable, económica y de alta sensibilidad para determinar el efecto genotóxico de compuestos químicos con efecto mutagénico (Evans, 1997; Miao et al, 1999).

La prueba de micronúcleos está desarrollada con base en las rupturas de fibras de DNA producidas, o alteraciones en la polimerización de las fibras del huso mitótico dejando a los cromosomas completos rezagados (Cotelle et al, 1999; Evans, 1997; Grover y Satwinderjeet, 1999; Ji et al, 1999).

Los micronúcleos se pueden definir como corpúsculos intracitoplasmáticos de cromatina separados del núcleo principal, que se producen por la ruptura de fragmentos acéntricos de cromosomas o bien de cromosomas completos que sufren un rezago anafásico durante la división celular, originados en forma espontánea o inducida (Chauhan et al, 1986; Evans, 1997; Ma et al, 1995; Rizzoni et al, 1987).

De Marco et al (1988), mencionan que el diámetro de los micronúcleos no debe exceder 1/3 del tamaño del núcleo principal, y se deben localizar dentro de la pared celular, en el citoplasma y alrededor del núcleo principal.

La presencia de micronúcleos se observa, principalmente, en la interfase de la siguiente generación de células (Evans, 1997; Ma et al, 1995).

Esta prueba permite estudiar y evaluar el efecto mutagénico en diversos sistemas biológicos, como en linfocitos humanos (Fenech y Crott, 2002; Müller y Rode, 2002), en células de hámster chino (Frieauff et al, 1998; Liu et al, 1998), en eritrocitos policromáticos de ratones (Ashby y Tinwell, 2001; Sudheer et al, 2003), en ratas (Robbiano et al, 1998; Trosic et al, 2002) y en peces (Ateeq et al, 2002; Campana et al, 1999). Los bioensayos vegetales son intensamente usados para el estudio de efectos mutagénicos ocasionados por agentes físicos y químicos desde los incios de los años 30's del siglo pasado (Duan et al, 1999). Con el aumento del conocimiento sobre genotoxicidad de diferentes agentes en agua, aire y suelo, se

han establecido varios sistemas vegetales para detectar el daño genotóxico de contaminantes ambientales, y así se han utilizado células meristemáticas de raíz, como en *Allium cepa* (Grover y Satwinderjeet, 1999; Rank y Nielsen, 1994), *Tradescantia sp.* (Cotelle et al., 1999; Rodríguez et al., 1998; Majer et al., 2002), *Hordeum vulgare* (Joutchev et al., 2002; Zhang y Xiao, 1998), y en *Vicia faba* (Duan et al., 1999; Kanaya et al., 1994; Ma et al., 1995; Miao et al., 1999).

La prueba de micronúcleos empleando células meristemáticas de raíz de haba (*Vicia faba* L.) como sistema biológico de detección, es de gran utilidad para estimar el potencial genotóxico de diversos agentes contaminantes presentes en el ambiente, y es ampliamente usada en diferentes condiciones, ya sea in vitro e in situ (Ji et al., 1999; Ma et al., 1995). Por ejemplo, este bioensayo ha servido para determinar los efectos clastogénicos de una gran variedad de compuestos químicos presentes en aguas residuales (Duan et al., 1999; Knasmüller et al., 1998; Miao et al., 1999; Minissi y Lombi, 1997; Steinkellner et al., 1998; Yang, 1999).

La Internacional Programme Chemical Safety (IPCS), tiene un programa para el monitoreo ambiental dentro del cual se ha establecido el Internacional Programme Plant Bioassays (IPPB) creado para el monitoreo y la observación de agentes genotóxicos en un ambiente contaminado en aire, agua y suelo, utilizando la prueba de micronúcleos en células de haba (Kong y Ma, 1999; Ma et al., 1994; Ma et al., 1997).

La República Popular de China, desde 1980 ha establecido la prueba de micronúcleos como un indicador oficial de genotoxicidad, en el monitoreo de aire, agua y suelos contaminados (Ji et al., 1999; Ma et al., 1997; Miao et al., 1999).

El haba (*Vicia faba* L.) como sistema biológico de prueba.

Estudios realizados han demostrado que los cromosomas presentes en las células meristemáticas de las plantas, son excelentes materiales para detectar y mostrar los cambios genéticos causados por diversos agentes contaminantes ambientales (Chauhan et al, 1986; Ma et al, 1995).

Un sistema de prueba vegetal muy útil para la detección de la actividad genotóxica, son las células meristemáticas de raíz de haba (*Vicia faba* L.), por ofrecer ventajas como, ser un sistema barato, de fácil manejo, de fácil adquisición y no requiere equipo sofisticado ni condiciones estériles. Los meristemas de su raíz contienen células en diversas etapas de la mitosis, poseen un ciclo celular corto que dura aproximadamente 19.3 horas (Curtis, 1986). Presenta pocos cromosomas ($2n = 12$) y muy grandes perfectamente visibles en el microscopio óptico, lo que los hace un material excelente para observar daños citogenéticos que producen los agentes tóxicos (Grant, 1994). Por otra parte, las células meristemáticas presentan una fracción metabólica llamada S10, que es capaz de transformar compuestos promutágenos en mutágenos, característica importante ya que muchos agentes químicos que no son mutágenos por sí mismos, requieren del metabolismo animal o vegetal para activarse y provocar daños al DNA (Gómez y Villalobos, 1997).

En años recientes, la prueba de micronúcleos en *Vicia faba* ha sido usada más frecuentemente como un indicador de clastogenicidad ocasionada por contaminantes presentes en el agua (Ma et al, 1995; Miao et al, 1999).

Vicia faba ha sido propuesta como un biomonitor para evaluar mutágenos ambientales en el programa de genotoxicidad de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA) (Kanaya et al., 1994; Ma et al., 1995).

Con base en lo anteriormente expuesto, y debido al empleo de aguas residuales para el riego agrícola en el municipio de Teoloyucan, Estado de México, es necesario conocer el posible efecto genotóxico y citotóxico que puedan ocasionar a las plantas cultivadas, principalmente, disminuyendo su calidad y/o producción, para lo cual se proponen cumplir los siguientes objetivos.

2. OBJETIVO GENERAL.

Evaluar mediante la prueba de micronúcleos el daño genotóxico y con la división celular el efecto citotóxico en células meristemáticas de raíz de haba (*Vicia faba* L.), debido a la acción de sustancias químicas presentes en aguas residuales usadas para riego en el municipio de Teoloyucan, Estado de México.

2.1. OBJETIVOS PARTICULARES.

- Cuantificar la concentración presente de arsénico, cadmio, cromo y plomo en las aguas residuales usadas para riego agrícola en el municipio de Teoloyucan, Estado de México.
- Evaluar mediante la prueba de micronúcleos, el daño genotóxico en células meristemáticas apicales de raíz de haba (*Vicia faba* L.) ocasionado por las sustancias presentes en las aguas residuales utilizadas para riego en el municipio de Teoloyucan, Estado de México
- Determinar a través del índice mitótico el daño citotóxico en la proliferación de células del meristemo apical de raíz de haba (*Vicia faba* L.) debido a la acción de las sustancias presentes en las aguas residuales empleadas para riego en el municipio de Teoloyucan, Estado de México.

3. HIPÓTESIS.

Si las sustancias químicas presentes en las aguas residuales utilizadas para riego en el municipio de Teoloyucan, Estado de México, actúan como agentes genotóxicos se inducirán cambios cromosómicos observándose un aumento en la frecuencia de micronúcleos, y además se alterará la proliferación celular manifestándose una disminución del índice mitótico, ambas variables evaluándose en las células meristemáticas de raíz de haba (*Vicia faba* L.).

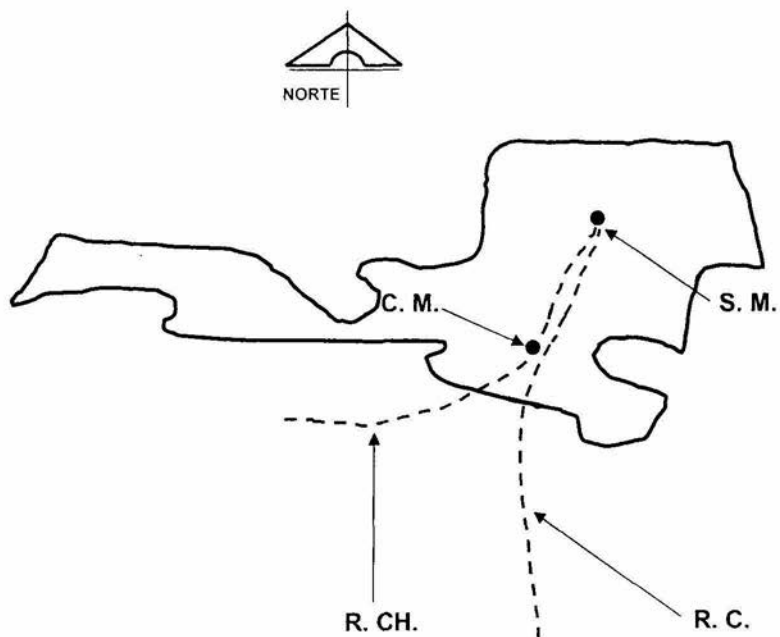
4. MATERIALES Y MÉTODOS.

4.1. Ubicación de los sitios de muestreo.

En el municipio de Teoloyucan, Estado de México, se realizó el muestreo en un solo sitio, que correspondió a un canal de riego, que pasa próximo a las tierras de cultivo, y que es un afluente en donde se unen los canales llamados "río Cuautitlán" y "río Chico", que conducen las aguas residuales provenientes del área metropolitana de la ciudad de México y de los municipios de Tlalnepantla, Tultitlán, Cuautitlán Izcalli, Cuautitlán, Tepetzotlán, con destino al estado de Hidalgo. El muestreo se efectuó en el mes de mayo de 2004, cuando todavía no hay lluvias en esa región y los diferentes cultivos son regados con las aguas residuales. En la figura 7, se muestra la ubicación del sitio de muestreo que se localiza al noreste de la cabecera municipal, aproximadamente a una distancia de 5 km. La zona donde se efectuó el muestreo tiene Clima templado subhúmedo con lluvias en verano, la temperatura media anual es de 15 grados centígrados, la máxima es de 30 grados centígrados, la mínima extrema es de 5 grados centígrados. La precipitación pluvial máxima en 24 horas es de 46.2 mm. La zona está compuesta por suelos altamente orgánicos como son el aluvial, y toba. La vegetación se caracteriza por árboles de pirul, sauce, sauce llorón, eucalipto, casuarina, y huizache, y cultivos de maíz, alfalfa, frijol, trigo y haba (Ayuntamiento de Teoloyucan, 2000; IGCEM, 2003).

4.2. Metodología para el muestreo del agua.

Siguiendo el método de análisis indicado por la American Public Health Association (APHA) (1996), y mencionado en la Norma Oficial Mexicana NOM-001-ECOL-1996, la muestra se tomo directamente de un canal de riego. El muestreo fue de tipo simple, colectándose 10 litros de agua. La cantidad de agua recomendada para muestrear, según la Norma Oficial Mexicana NOM-001-ECOL-1996, es de 5 litros para hacer los análisis físicos y químicos, pero se tomaron 5 litros más, de los cuales 2 litros fueron para la determinación de los metales pesados y los otros 8 litros se emplearon en los diferentes tratamientos de genotoxicidad que se evaluaron. La colecta del agua se realizó a la mitad de profundidad del canal, más o menos, para tener un mínimo de turbulencia, y así evitar una mayor acumulación de partículas en suspensión como materia coloidal, arcillas, limos y gránulos de sílices. El agua se almaceno en recipientes de plástico de polietileno que fueron colocados en una hielera, a una temperatura de 4 °C. La toma de la muestra se realizó aproximadamente a las 7 de la mañana, hora en que la temperatura del agua es baja y así evitar una mayor velocidad de las reacciones químicas que se llevan a cabo entre las sustancias presentes en el agua. Ahí mismo se realizaron las mediciones de pH y temperatura. Para medir el pH se utilizó un pH-metro portátil modelo HANNA HI 9025C de lectura digital, y para determinar la temperatura se empleo un termómetro portátil modelo HANNA HI 9143 graduado de -10 a 100 grados centígrados. A continuación la muestra de agua se traslado a las instalaciones de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.



CLAVE	DESCRIPCIÓN
C. M.	Cabecera Municipal
S. M.	Sitio de Muestreo
R.CH.	Río Chico
R. C.	Río Cuautitlán

Figura 4. Ubicación del sitio de muestreo en el municipio de Teoloyucan

4.3. Sitio de la experimentación.

La parte experimental de la evaluación genotóxica se llevo a cabo en el laboratorio de Genética Vegetal de la carrera de Ingeniería Agrícola en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.

La determinación de metales pesados se realizó en el laboratorio de Química de Suelos y Aguas de la Secretaría de Desarrollo Agropecuario (SEDAGRO) en Metepec, Estado de México. Las muestras fueron digeridas en un medio ácido con peróxido de hidrógeno, siguiendo la metodología propuesta por Chapman y Pratt (1983). Las soluciones obtenidas fueron diluidas en agua y la concentración de cada metal se obtuvo a partir de la absorbancia de cada elemento a su longitud de onda específica con un espectrofotómetro de absorción atómica Perkin-Elmer modelo 460, utilizando el método de emisión a la flama.

4.4. Material Biológico.

El material biológico que se utilizó como sistema de prueba fueron células meristemáticas del ápice de raíz de haba (*Vicia faba* L.), las cuales se cultivaron en condiciones de laboratorio. Las semillas de haba que se emplearon son de la variedad "minor" que se obtuvieron en un cultivo de agricultura orgánica en las parcelas experimentales de la FES-Cuautitlán, UNAM.

4.5. Metodología.

Las semillas de haba se desinfectaron, primeramente lavándolas con agua de la llave, y posteriormente en 400 ml de agua destilada se agregaron 50 ml de cloro y 10 gotas de Tween 20 y se agitaron durante 20 minutos. A continuación las semillas se dejaron remojando en un recipiente con agua destilada durante 24 horas, a temperatura ambiente y en la oscuridad, con la finalidad de que las

semillas absorbieran la mayor cantidad de agua y acelerar la germinación. En seguida, las semillas se sembraron en cajas de plástico, utilizando como sustrato vermiculita para tener una germinación uniforme y evitar la contaminación por hongos, ya que este sustrato es inerte, estéril, y tiene la propiedad de proporcionar humedad a la semilla (Kanaya *et al*, 1994; Minissi *et al*, 1998).

Las semillas de haba se mantuvieron en una germinadora a una temperatura de 25-27 °C. Se tuvieron esas condiciones hasta que sus raíces alcanzaron una longitud de 2 a 3 cm.

Las muestras de agua se colocaron en recipientes de vidrio, tapados con papel aluminio con perforaciones, en donde se acomodaron las plántulas de manera que sus raíces quedaran en contacto con el agua durante los tratamientos.

Se aplicaron los tratamientos de 1, 2 y 3 horas sin recuperación y de 4 horas con 2, 14, 18, 42 y 44 horas de recuperación.

Los tratamientos que fueron testigos se mantuvieron en las mismas condiciones experimentales, pero con las raíces sumergidas en agua destilada.

Las plántulas que necesitaron tiempo de recuperación, al finalizar el tratamiento fueron colocadas en un baño de agua corriente, con aereación y una temperatura (21 °C) constantes.

Las preparaciones se realizaron modificando la técnica de Villalobos-Pietrini (1965). Se cortaron los ápices de la raíz a una longitud aproximada de 2 mm. Se lavaron con agua corriente, y en seguida se fijaron en una solución de etanol-ácido acético (Sigma) en proporción 3:1, durante 24 horas. A continuación, los ápices se lavaron con agua corriente. En seguida, se colocaron en un vidrio de reloj y se

les agregaron unas gotas de HCl (Sigma) 5N, y se hidrolizaron durante 10 minutos. Posteriormente se les retiró el ácido y se les puso unas gotas del colorante de aceto-orceína* y se dejaron durante 10 minutos. En seguida, los ápices se trasladaron a los portaobjetos a los cuales previamente se les colocó una gota de ácido acético (Sigma) al 45%. Rápidamente se colocó el cubreobjetos y se efectuó una presión con la goma de un lápiz. Se observaron las preparaciones al microscopio óptico con el objetivo 40X.

*Para su preparación se usaron 3 g de orceína sintética (Sigma) y 100 ml de ácido acético (Sigma) al 70%, los cuales se mezclaron y calentaron a reflujo durante 2 horas, posteriormente la mezcla se dejó enfriar, y luego se filtró.

4.6. Diseño experimental.

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar, con un total de 16 tratamientos, y 5 repeticiones por tratamiento, para un total de 80 unidades experimentales. Cada unidad experimental consistió de una preparación que contenía las células meristemáticas de raíz de haba. Los parámetros a evaluar fueron la frecuencia de micronúcleos e índice mitótico, éste último se determinó con la fórmula:

$$I. M. = \frac{\text{Número de células en división}}{\text{Número total de células}}$$

4.7. Análisis Estadístico.

Se utilizó el programa estadístico INSTAT2 versión 2.03. Para evaluar la frecuencia de micronúcleos e índice mitótico se efectuó primeramente un análisis

de varianza con la finalidad de determinar la significancia estadística entre los tratamientos evaluados y a continuación se compararon los tratamientos por medio de la prueba de significancia de Tukey-Kramer. Se maneja un nivel de probabilidad de error de 0.05 y 0.01 para establecer niveles significativos de confiabilidad tanto en el análisis de varianza como en la prueba de Tukey-Kramer.

4.8. Análisis Citogenético.

Para la determinación de la frecuencia de micronúcleos e índice mitótico, por cada repetición se contaron 1000 células, resultando un total de 5000 células por tratamiento, contando el número de células que presentaban micronúcleos o alguna fase mitótica.

4.9. Criterios para seleccionar células micronucleadas.

- a) Que las células presentaran buena tinción
- b) Los micronúcleos debían distinguirse como corpúsculos circulares bien definidos, con una coloración roja característica.
- c) Los micronúcleos no debían exceder de 1/3 del núcleo principal y que estuvieran localizados en el citoplasma circundante al núcleo principal.
- d) Los micronúcleos no debían mostrar refractibilidad, es decir, al momento de mover el micrométrico del microscopio el objeto no debe desaparecer o pasar a otro plano, ya que si esto se presenta, entonces se excluye como micronúcleo.

5. RESULTADOS.

El valor de pH que se obtuvo en la muestra fue de 7.1, lo cual indica que dicho valor esta dentro de los valores máximos permisibles para riego agrícola según la Norma Oficial Mexicana NOM-001-ECOL-1996 (tabla 1). La temperatura que se registro en la muestra de agua fue de 15.3 °C, la cual también se encuentra dentro de los límites establecidos por la Norma Oficial Mexicana NOM-001-ECOL-1996 (tabla 1).

Los efectos producidos en los cromosomas de las células meristemáticas del ápice de raíz de *Vicia faba*, se evaluaron mediante el análisis de la frecuencia de micronúcleos que se presentaron en células en interfase (figura 4), y el índice mitótico (figura 5). Para esto se realizó el análisis estadístico de los resultados obtenidos, efectuando primeramente el análisis de varianza para la frecuencia de micronúcleos e índice mitótico para determinar el grado de significancia entre los tratamientos evaluados, presentándose una diferencia estadística entre los tratamientos de los dos parámetros determinados.

A continuación se realizó la prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer para conocer entre que tratamientos evaluados se presentaba una diferencia estadística, tanto para la frecuencia de micronúcleos como para el índice mitótico.

En la tabla 2 se muestran las frecuencias de micronúcleos producidas en los diferentes tiempos de exposición y de recuperación, así como los testigos. Se puede observar que los micronúcleos aparecen a partir de la primera hora de exposición. En general se presenta que al aumentar el tiempo de exposición se incrementa el número de células micronucleadas, a excepción del tratamiento de 2

horas sin tiempo de recuperación. También se manifiesta que en los tratamientos de 4 horas de exposición, y conforme aumenta el tiempo de recuperación, crece el promedio de micronúcleos presentes. Por otra parte, se observó que existe una diferencia entre los tratamientos de 4 horas de exposición con 42 y 44 horas de recuperación, con respecto a los demás tratamientos, lo cual indica que las células meristemáticas de *Vicia faba* necesitan de periodos largos para recuperarse y así manifestar en su máxima potencialidad el daño ocasionado por la mezcla de agentes contenidos en el agua de riego.

Comparando los tratamientos con sus respectivos testigos, se presentó una diferencia estadística altamente significativa (tabla 2) lo que indica presencia de sustancias mutágenas en las aguas residuales evaluadas, y que son muy estimulantes para inducir daños en la estructura de los cromosomas de *Vicia faba*.

En el caso del índice mitótico, los valores obtenidos se presentan en la tabla 3, observándose, en general, que a mayor tiempo de exposición es menor el índice mitótico, sin que éste se inhiba totalmente. Para los tratamientos de 4 horas de exposición y sus respectivos tiempos de recuperación, se obtuvo que conforme aumenta el tiempo de recuperación disminuye el número de células mitóticas, a excepción del tratamiento con 44 horas de recuperación en donde es mayor el número de células que presentan alguna fase mitótica.

En la misma tabla 3, se presentan los valores obtenidos de los testigos de cada tratamiento. Al utilizar la prueba de Tukey-Kramer en la comparación de los tratamientos con sus respectivos testigos, se obtuvo un comportamiento estadísticamente muy variable, debido a que los tratamientos de 1 y 3 horas de exposición no presentaron diferencia estadística con sus testigos, lo mismo

sucedió con los tratamientos de 4 horas de exposición con 18 y 44 horas de recuperación, pero el tratamiento de 2 horas de exposición si presento una diferencia estadística con respecto a su control negativo, y en el caso de 4 horas de exposición y los tiempos de recuperación de 2, 14 y 42 horas, mostraron una marcada diferencia estadística en la frecuencia de divisiones celulares con respecto a sus testigos, lo cual indica que estos tratamientos si inhiben la división celular.

Los resultados de los análisis de los metales pesados se observan en la tabla 4, en donde se puede apreciar que para el caso del mercurio no se detecto ninguna concentración, y para los demás elementos los valores obtenidos no exceden al valor máximo permisible de la Norma Oficial Mexicana NOM-001-ECOL-1996 (tabla 1), por lo cual los cultivos no están de forma permanente expuestos a un elevado índice de toxicidad por estos elementos. Esta situación se debe posiblemente a que los suelos de esta región son arcillosos, lo cual ocasiona que retengan una elevada acumulación de estos elementos.

TIEMPO DE EXPOSICIÓN (horas)	TIEMPO DE RECUPERACIÓN (horas)	X ± D. E.
1	0	9.8 ± 3.42*
Testigo 1	0	1.0 ± 1.22
2	0	7.6 ± 2.70*
Testigo 2	0	0.6 ± 0.54
3	0	13.6 ± 1.81*
Testigo 3	0	0.4 ± 0.54
4	2	11.6 ± 3.05*
Testigo 4	2	0.4 ± 0.54
4	14	14.4 ± 1.67*
Testigo 4	14	0.8 ± 0.83
4	18	15.6 ± 2.88*
Testigo 4	18	0.2 ± 0.44
4	42	18.2 ± 2.16*
Testigo 4	42	0.2 ± 0.44
4	44	19.8 ± 1.48*
Testigo 4	44	0.6 ± 0.54

Tabla 2. Frecuencia de micronúcleos en los tratamientos evaluados.

Se obtuvieron diferencias estadísticas significativas entre los testigos y los grupos de tratamiento por análisis de varianza $F = 82.536$ con $p < 0.01$, entonces se aplico la prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer * $p < 0.01$.

TIEMPO DE EXPOSICIÓN (horas)	TIEMPO DE RECUPERACIÓN (horas)	X ± D. E.
1	0	0.13 ± 0.0457
Testigo 1	0	0.16 ± 0.0285
2	0	0.14 ± 0.0561*
Testigo 2	0	0.20 ± 0.0145
3	0	0.11 ± 0.0285
Testigo 3	0	0.14 ± 0.0217
4	2	0.09 ± 0.0134*
Testigo 4	2	0.17 ± 0.0168
4	14	0.08 ± 0.0152*
Testigo 4	14	0.18 ± 0.0251
4	18	0.08 ± 0.0128
Testigo 4	18	0.12 ± 0.0189
4	42	0.07 ± 0.0081*
Testigo 4	42	0.15 ± 0.0432
4	44	0.09 ± 0.0100
Testigo 4	44	0.11 ± 0.0188

Tabla 3. Valores obtenidos del índice mitótico en los tratamientos evaluados.

Se obtuvieron diferencias estadísticas significativas entre algunos testigos y los grupos de tratamiento por análisis de varianza $F = 10.747$ con $p < 0.01$, entonces se aplicó la prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer $*p < 0.01$.

ELEMENTO	CONCENTRACIÓN (mg/l)
Arsénico	0.00025
Cadmio	0.011
Cromo hexavalente	0.10
Mercurio	no detectado
Plomo	0.086

Tabla 4. Valores obtenidos para los metales pesados analizados por Espectrofotometría de Absorción Atómica.

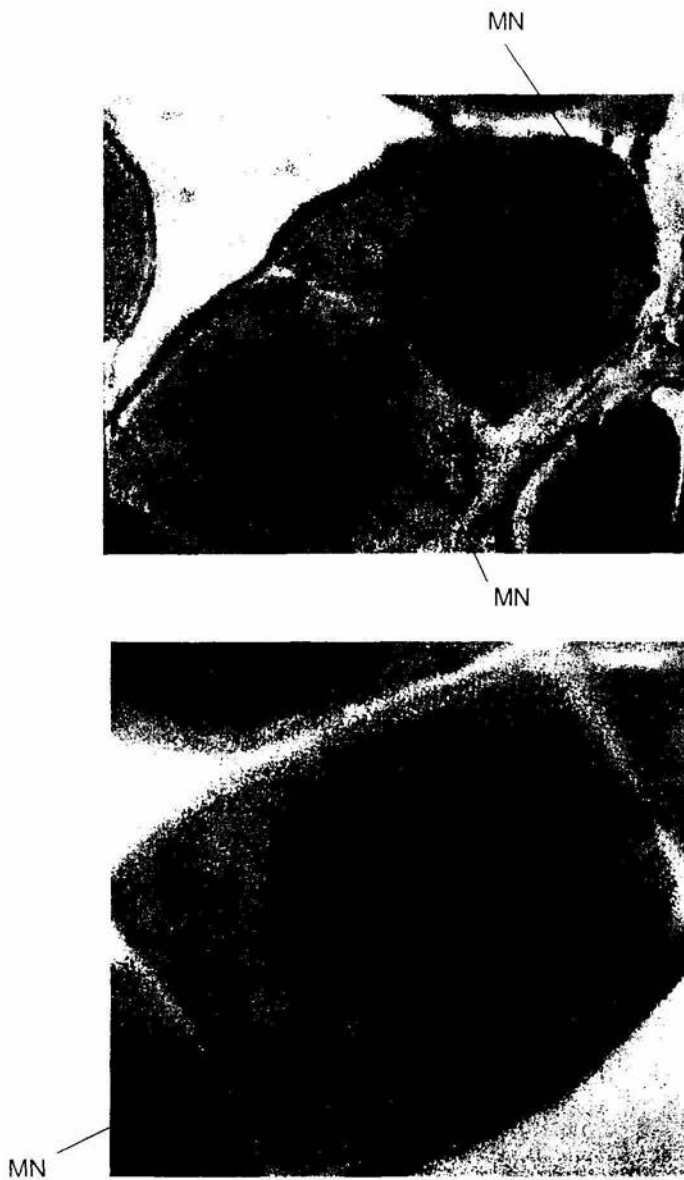


Figura 5. Células meristemáticas de *Vicia faba* observadas en interfase con presencia de micronúcleos (MN).



a) Profase



b) Metafase



c) Anafase



d) Telofase

Figura 6. Células meristemáticas de *Vicia faba* que se observaron en las diferentes fases mitóticas.

6. DISCUSIÓN.

Los resultados obtenidos en este trabajo confirman que empleando una metodología sencilla como es la prueba de micronúcleos y usando como biomonitor células meristemáticas de *Vicia faba*, resultan muy eficientes para determinar el daño genético ocasionado por los agentes químicos presentes en las aguas residuales provenientes del área metropolitana de la ciudad de México, y que son usadas para el riego agrícola en el municipio de Teoloyucan, Estado de México. Esto coincide con los reportes de diversos autores (Duan et al, 1999; Grover y Satwinderjeet, 1999; Ji et al, 1999; Jiang et al, 1999; Miao et al, 1999; Ruiz et al, 1992; Steinkellner et al, 1999; Yang, 1999), quienes utilizando diferentes sistemas vegetales, establecen un efecto genotóxico de aguas residuales provenientes de actividades domésticas, industriales, minería y de plantas químicas, debido a que inducen una elevada presencia de micronúcleos.

En el presente estudio se efectuaron los registros de micronúcleos en células en interfase porque es la etapa del ciclo celular en donde generalmente se manifiestan (Evans, 1997; Ma et al, 1995).

Se aplicaron tratamientos cortos de 1, 2 y 3 horas de exposición, así como de 4 horas con diferentes tiempos de recuperación para poder evaluar la rapidez con la actúan las sustancias tóxicas de las aguas residuales.

Los micronúcleos aparecieron desde la primera hora de tratamiento y son el producto de fragmentos acéntricos (Evans, 1997; Miao et al, 1999) y de cromosomas retardados (Cotelle et al, 1999; Ji et al, 1999) que no son

transportados a los polos en el momento de la anafase y al no incorporarse a los núcleos hijos quedan como pequeños núcleos.

Tanto los fragmentos acéntricos, como los cromosomas con centrómero inactivado e isocromosomas pueden examinarse en interfase como micronúcleos, de tal manera que el análisis de éstos provee un método sencillo para detectar la presencia de daño cromosómico en *Vicia faba* (Valencia, 1987).

Para todos los tratamientos se sugiere que el daño fue ocasionado por agentes químicos que tienen la capacidad para provocar micronúcleos.

En el caso de los tratamientos de 1 y 3 horas de exposición, así como de 4 horas con 14, 18, 42 y 44 horas de recuperación, se manifestó una relación directa entre la presencia de micronúcleos y el tiempo de exposición y de recuperación de las células de *Vicia faba*, a excepción de los tratamientos de 2 horas de exposición y de 4 horas con 2 horas de recuperación en donde se manifiesta una disminución en la presencia de micronúcleos, lo cual se puede deber a la integración de más de una alteración por micronúcleos o a la inclusión de éstos en uno de los núcleos hijos, tal como lo proponen Evans y Sparrow (1961).

Se sugiere que el centrómero puede ser afectado por las sustancias contaminantes, y que esta acción se traduce en una activación del mismo dando origen a los cromosomas con el centrómero inactivado (Gómez y Villalobos, 1983; Chauhan et al., 1986) o provoca su división anormal en sentido transversal, en vez de longitudinal y forma los isocromosomas (Gómez et al., 1986; Nicoloff y Gecheff, 1976), en ambos casos los cromosomas afectados quedan fuera de la cinética normal de la anafase, ya que no se integran a los núcleos hijos y pueden dar como resultado micronúcleos (Gómez et al., 1986; Valencia, 1987).

Por otra parte, Schmid (1973, 1975), así como Mattern y Grauwiler (1974) señalan que el daño parcial o los disturbios en el huso mitótico pueden dar como resultado cromosomas con el centrómero inactivado quedando fuera de la cinética normal de la anafase y pueden formar micronúcleos en células en interfase.

El daño o disturbios en el huso mitótico se pueden presentar debido a que existen compuestos químicos que ocasionan alteraciones en el proceso metabólico básico a nivel celular, sobre todo por desordenes en la síntesis de proteínas, como es el caso de la tubulina que es la proteína que forma los microtubulos de las fibras del huso mitótico (De Marco et al, 1988; Samborska, 1987).

Con respecto al índice mitótico, se considera como un parámetro citotóxico que refleja la frecuencia de la división celular y la velocidad de crecimiento de las células meristemáticas. El índice mitótico muestra el daño que provocan diversos agentes, ya que se ha demostrado que tanto las radiaciones (Gustavino et al, 1987; Rizzoni et al, 1987; Wang y Wang, 1999) como las sustancias químicas (Chauhan et al, 1986; Grant et al, 1992; Zhang y Xiao, 1998) producen inhibición de la división celular.

En el presente trabajo, se propone que en todos los tratamientos evaluados actuaron diversos agentes químicos que influyeron notablemente en ciertas fases de la división celular, así como otros que impidieron la entrada de las células en mitosis o que inhibieron la formación del huso mitótico o la citocinesis. Se considera que en estas aguas estudiadas existen los agentes que inhiben la división celular, afectando a las células en la etapa de interfase, pudiendo actuar

en G1, S o G2, y en ocasiones en la profase temprana. Los que actúan en G1 o S pueden inhibir la replicación cromosómica y la división de cromosomas, mientras que los que lo hacen principalmente en G2, solo afectan la separación de las cromátidas (Chauhan et al., 1986; De Marco et al., 1986; Kihlman, 1966). También, se toma en cuenta, que la supresión de los procesos necesarios para que se lleve a cabo el ciclo celular, como son la síntesis de DNA, RNA, proteínas y la formación del huso mitótico, puede interferir en la proliferación de células (Chauhan et al., 1986).

Se ha demostrado que si se impide la síntesis de DNA no hay división celular. Dentro de los agentes que afectan al DNA y su metabolismo se encuentran los inhibidores de la síntesis y de los precursores del DNA y aquellos que modifican su estructura (Kihlman, 1966; Mohamed y Ma, 1999; Steinkeller et al., 1998).

Por otra parte, se ha demostrado que al bloquearse la síntesis de RNA y proteínas, la siguientes síntesis de DNA y la mitosis se reprimen totalmente (Gollapudi et al., 1995; Knasmüller et al., 1998).

Está bien fundamentado que la inhibición de la función del huso mitótico impide las divisiones celulares de manera normal (Chauhan et al., 1986; Kihlman, 1966), por ejemplo, se ha observado que los insecticidas inhiben la mitosis, evitando la polimerización de la tubulina de los microtubulos del huso mitótico (Chauhan et al., 1986; Moreno, 2001).

Otra causa que puede provocar la disminución de la frecuencia de divisiones celulares, es la producción de alteraciones cromosómicas, ya que se ha descrito que éstas pueden causar directamente la muerte celular (De Marco et al., 1986; Heddle y Salomone, 1981; Valencia, 1992). Bloqueos en la síntesis de DNA

inducen regiones sin replicación que pueden persistir en la mitosis y provocar la formación de aberraciones cromosómicas, y debido a que éstas se correlacionan estrechamente con la muerte celular es probable que las lesiones que bloquean la síntesis de DNA sean citotóxicas (Schwartz, 1989).

Las situaciones anteriores posiblemente se encontraron con las sustancias tóxicas de la muestra de agua, en donde se observó un aumento en la inducción de micronúcleos con el incremento de los tiempos de exposición y de recuperación, y por otro lado una disminución en la división celular.

Los resultados de los análisis de los metales pesados indican que en todos los casos, los valores obtenidos no exceden al valor máximo permisible establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-001-ECOL-1996, esta situación se debe posiblemente a que el sitio de muestreo son los canales de riego próximos a las parcelas de cultivo, y dichos canales no están revestidos por ningún tipo de material, y que el tipo de suelo presente es arcilloso el cual tiene la característica de retener una elevada concentración de estos metales y que por consiguiente presenten una solubilidad baja en el agua (Ortiz y Ortiz, 1990). Pero existen reportes que indican que, aún presentes en bajas concentraciones, los metales pesados ocasionan daños clastogénicos en células vegetales (Knasmüller et al., 1998; Marcano et al., 1999; Steinkeller et al., 1998; Zhang y Xiao, 1998).

El efecto de los metales pesados en las células vegetales es diverso. En este trabajo se sugiere que posiblemente, a nivel molecular, los metales pueden inhibir la función de enzimas que intervienen en la reparación del DNA, ya sea desnaturalizándolas, precipitándolas o produciendo efectos alostéricos o alteraciones en su síntesis (De Marco et al., 1988; Jha et al., 1992; Steinkellner et

al, 1998). Otra posibilidad es que a menudo, los metales pueden ligarse a la molécula de DNA y ocasionar un daño directo debido a que alteran la conformación núcleo-proteica (De Marco et al, 1988; Knasmüller et al, 1998). Esta reportado que cualquiera de las acciones anteriores pueden afectar la división celular y la estructura y comportamiento del huso mitótico (Ramírez, 1999).

Los metales ocasionan alteraciones en la mitosis induciendo una disminución en la frecuencia de la división celular (Marcano et al, 1999; Zhang y Yang, 1994; Zhang y Xiao, 1998), llegando a conducir la inhibición total de la división, o a un desajuste en la separación de los cromosomas (Giri et al, 1981; Ramírez, 1999).

Por otra parte, se reporta que la alta afinidad de muchos metales por los enlaces disulfuro en el citoplasma llegan a provocar anomalías o destruyen las fibras del huso mitótico (Sharma y Talukder, 1987).

Los metales también constituyen complejos ligados con grupos cíclicos u otros metales. Esta formación de complejos pueden alterar la composición y la viscosidad citoplásmica lo que conduce a efectos clastogénicos (Ramírez, 1999).

7. CONCLUSIONES.

- El bioensayo de *Vicia faba*-micronúcleos es un indicador que puede predecir la peligrosidad que presentan las aguas residuales utilizadas para el riego agrícola.
- Las aguas residuales evaluadas presentan sustancias químicas que son potencialmente inductoras de células micronucleadas en *Vicia faba*, manifestando su efecto clastogénico. Presentándose que a mayor tiempo de exposición y de recuperación se incremento la frecuencia de micronúcleos.
- Se encontró una disminución del índice mitótico en las células meristemáticas de *Vicia faba*, lo que manifiesta un efecto citotóxico por parte del agua evaluada, debido a la presencia de sustancias contaminantes. Se manifestó que a mayor tiempo de recuperación de las células, los contaminantes ejercieron un mayor efecto inhibitor sobre la división celular.
- Los datos obtenidos en este estudio para los metales evaluados indican que cumplen con los límites permisibles propuestos por la Norma Oficial Mexicana NOM-001-ECOL-1996, y por lo tanto supuestamente no representan un mayor riesgo para las plantas cultivadas de la región, así como tampoco para los animales y humanos, ya sean productores o consumidores, pero se considera que si influyeron en los resultados obtenidos debido a que esta bien documentado que los metales pesados son una clase de

contaminantes ambientales que son potencialmente mutágenos e inducen la presencia de daño genético.

8. RECOMENDACIONES.

- Se recomienda realizar este tipo de estudio en más sitios de muestreo y en diferentes épocas del año, para verificar si este tipo de aguas presentan una acción genotóxica y citotóxica, así como probando otros sistemas vegetales como pueden con *Allium cepa* y *Tradescantia*.
- Es recomendable la aplicación en forma combinada de las siguientes medidas indicadas para prevenir y controlar el riesgo sanitario, no solo para las plantas, también debe ser para los animales y sobre todo para el humano:
 - 1) Se debe llevar a cabo, por algún método, el tratamiento de las aguas residuales para su uso agrícola.
 - 2) Debe existir la restricción de cultivos sobre todo de hortalizas que se consumen crudas.
 - 3) Se debe tener una atención sanitaria para las plantas cultivadas, así como para los agricultores y los consumidores expuestos.
 - 4) Se deben mejorar los métodos de riego.

9. REFERENCIAS.

American Public Health Association (APHA). 1996. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 19a. edition. Washington, DC, USA.

Arango, M. J. M. 1996. Panorama general sobre la reutilización del agua en el riego agrícola en México. Memorias del taller experimental de reuso del agua en la agricultura México-Israel. México. pp: 19-23.

Armienta, M. A.; Morton, O.; Rodríguez, R.; Cruz, O.; Aguayo, A.; Cenicerros, N. 2001. Chromium in a tannery wastewater irrigated area, León valley, México. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 66: 189-195.

Ashby, J. Y Tinwell, H. 2001. Continuing ability of the rodent bone marrow micronucleus assay to act as a predictor of the posible germ cell mutagenicity of chemicals. Mutat. Res. 478: 211-213.

Ateeq, B.; Abul-farah, M.; Niamat, M.; Waseem, A. 2002. Induction of micronuclei and erythrocyte alterations in the catfish (*Clarias batrachus*) by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and butachlor. Mutat. Res. 518: 135-144.

Avilés, H. G. 2000. Identificación de especies vegetales con capacidad para remover metales pesados en suelos contaminados. Tesis Profesional. Departamento de Suelos. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. pp: 5-31.

Ayuntamiento de Teoloyucan. 2000. Plan de Desarrollo Municipal 1997-2000. <http://www.edomex.gob.mx>

Cajuste, L. J. y Carrillo, G. R. 1992. Estudio de metales pesados en agua, suelo y plantas en el Valle del Mezquital y su incidencia en la cadena alimenticia en la región del estado de Hidalgo. Colegio de Postgraduados. Montecillos, México. pp: 16-45.

Campana, M. A.; Panzeri, A. M.; Moreno, V. J.; Dulot, F. N. 1999. Genotoxic evaluation of the pyrethroid lambda-cyhalothrin using the micronucleus test in erythrocytes of the fish (*Cheirodon interruptus*). Mutat. Res. 438: 155-161.

Chakravarty, B. y Srivastava, S. 1992. Toxicity of some heavy metals in vivo and in vitro in *Helianthus annus*. Mutat. Res. 283: 287-294.

Chapman, H. D. y Pratt, P.E. 1983. Métodos de análisis para suelos, plantas y aguas. Ed. Trillas. México.

Chauhan, L. K. S.; Dikshith, T. S. S.; Sundararaman, V. 1986. Effect of deltamethrin on plant cells. Cytological effects on the root meristems of *Allium cepa*. *Mutat. Res.* 171: 25-30.

Cooper, G. M. 1997. *The Cell*. Library of Congress Cataloging in Publication Data, USA. pp: 561 – 582.

Cotelle, S.; Masfaraud, J. F.; Férad, J. F. 1999. Assessment of the genotoxicity of contaminated soil with the *Allium/Vicia*-micronucleus and the *Tradescantia*-micronucleus assays. *Mutat. Res.* 426: 167- 171.

Crites, R. y Tchobanoglous, G. 2000. Tratamiento de aguas residuales en pequeñas poblaciones. McGraw-Hill. México pp: 33-96.

Cruz, C. J. L. 1997. Contaminación por metales pesados en cultivos regados con aguas del río Lerma, en la región de Salamanca, Guanajuato. Tesis Profesional. Departamento de Suelos. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. pp: 4-40.

Curtis, P. J. 1986. Introducción a la citología vegetal. Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. pp: 115-123.

De Marco, A.; Romanelli, M.; Stazi, M. A.; Vitagliano, E. 1986. Induction of micronucleated cells in *Vicia faba* and *Allium cepa* root tips treated with nitrilotriacetic acid (NTA). *Mutat. Res.* 171: 145-148.

De Marco, A.; Paglialunga, S.; Rizzoni, M.; Testa, A.; Trinca, S. 1988. Induction of micronuclei in *Vicia faba* root tips treated with heavy metals (cadmium and chromium) in the presence of NTA. *Mutat. Res.* 206: 311-315.

Duan, Ch. Q.; Hu, B.; Jiang, X. H.; Wen, Ch. H.; Wang, Z.; Wang, Y. X. 1999. Genotoxicity of water samples from Dianchi lake detected by the *Vicia faba* micronucleus test. *Mutat. Res.* 426: 121-125.

Durán, C. R. y Hernández, G. R. 1998. Efecto de las aguas residuales en la agricultura, con énfasis a la horticultura. Departamento de Irrigación. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. pp: 83-103.

Evans, H. J. y Sparrow, A. H. 1961. Nuclear factors affecting radiosensitivity. II. Dependence on nuclear and chromosome structure and organization. *Fundamental aspects of radiosensitivity. Brookhaven Symp. Biol.* 14: 101-107.

Evans, J. H. 1997. Historical perspectives on the development of the in vitro micronucleus test: a personal view. *Mutat. Res.* 392: 5-10.

Fenech, M. y Crott, J. W. 2002. Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes evidence for breakage-fusion-bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutat. Res.* 504: 131-136.

Fiskesjo, G. 1993. The *Allium* test in wastewater monitoring. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 8: 291-298.

Frieauff, W.; Pötter, L. F.; Cordier, A.; Suter, W. 1998. Automatic analysis of the in vitro micronucleus test on V79 cells. *Mutat. Res.* 423: 57-68.

García, M. M. R. 1993. Contaminantes tóxicos prioritarios en agua. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. pp: 71-102.

Gardea, T. J. L.; Peralta, V. J. R.; Montes, M. R.; Corral, D.B. 2004. Bioaccumulation of cadmium, chromium and copper by *Convolvulus arvensis* L.: impact on plant growth and uptake of nutritional elements. *Bio. Tech.* 92: 229-235.

Gardner, E. J.; Simmons, M. J.; Snustad, P. D. 1999. Principios de Genética. 4a. edición. Uteha-Noriega editores. México. pp: 54-57.

Gesta, Ch.; Jaswant, S. y Viswana, T. 1990. Effect of pH and temperatura on the uptake of cadmium by *Lemna minor*. *Environ. Contam. Toxicol.* 47: 84-90.

Giri, A. K.; Sanyal, R.; Talukder, G.; Sharma, A. 1981. Mutachromosomal effects of some trace elements on mammalian systems. *Bionature* 1: 55-58.

Gollapudi, B. B.; Mendrala, A. L.; Linscombe, V. A. 1995. Evaluation of the genetic toxicity of the organophosphate insecticide chlorpyrifos. *Mutat. Res.* 342: 25-36.

Gómez, A. S. y Villalobos, P. R. 1983. Chromosomal alterations induced by some chromium salts. *Cytologia* 48: 185-193.

Gómez, A. S.; Castillo, R. P.; Villalobos, P. R. 1986. Chromosomal alterations induced in *Vicia faba* by different industrial solvents: thinner, toluene, benzene, n-hexane, n-heptane and ethyl acetate. *Cytologia* 51: 133-142.

Gómez, A. S.; Abarca, H. J.; Villalobos, P.R. 1989. Sister chromatid exchanges induced by cadmium in *Vicia faba*. *Contam. Ambient.* 5: 71-82.

Gómez, A. S. y Villalobos, P. R. 1997. El intercambio de Cromátidas Hermanas en *Vicia faba* como monitor genético de contaminantes ambientales. En: Resúmenes del VII Congreso Nacional de Genética. Universidad Autónoma de Baja California. Ensenada, Baja California Norte.

Gómez, A. S.; Armienta, M. A.; Cortés, E. J.; Villalobos, P. R. 1997. Sister chromatid exchanges in *Vicia faba* induced arsenic-contaminated drinking water from Zimapan, Hidalgo, Mexico. *Mutat. Res.* 394: 1-7.

Gopalan, H. N. B. 1999. Ecosystem health and human well being: the mission of the international programme on plant bioassays. *Mutat. Res.* 426: 99-102.

Grant, W. F.; Lee, H. G.; Logan, D. M.; Salamone, M. F. 1992. The use of *Tradescantia* and *Vicia faba* bioassays for the in situ detection of mutagens in an aquatic environment. *Mutat. Res.* 270: 53-64.

Grant, W. F. 1994. The present status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens. *Mutat. Res.* 310 (2): 175-185.

Griffiths, A. J. F.; Gelbart, W. M.; Miller, J. H.; Lewontin, R. C. 2000. *Genética Moderna*. McGraw-Hill-Interamericana. Madrid, España. pp: 92-96.

Grover, I. S. y Satwinderjeet, K. 1999. Genotoxicity of wastewater samples from sewage and industrial effluent detected by the *Allium* root anaphase aberration and micronucleus assays. *Mutat. Res.* 426 (2): 183-188.

Guerrero, L. M. 1997. *El agua*. 2ª. Reimpresión. Fondo de Cultura Económica. México. pp: 61-87.

Gustavino, B.; Vitagliano, E.; Sottili, A.; Rizzoni, M. 1987. A comparison between short-term evolution of micronuclei induced by X-rays and colchicine in root tips of *Vicia faba*. *Mutat. Res.* 192: 109-119.

Heddle, J. A. y Salomone, H. F. 1981. Chromosomal aberration and bone marrow toxicity. *Environ. Health Perspect.* 34: 23-27.

Instituto de Información e Investigación Geográfica Estadística y Catastral del Gobierno del Estado de México (IGECEM). 2003. <http://www.edomexico.gob.mx>

Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática (INEGI). 2003. <http://www.inegi.gob.mx>

Jha, A. N.; Noditi, M.; Nilsson, R.; Natatajan, A. T. 1992. Genotoxic effects of sodium arsenite on human cells. *Mutat. Res.* 284: 215-221.

Ji, Q.; Yang, H.; Zhang, X. 1999. *Vicia* root-micronuclei assays on the clastogenicity of waters samples from the Kui river near Xuzhou city, People's Republic of China. *Mutat. Res.* 426: 133-135.

Jiang, Y. G.; Yu, Z. D.; Liu, G. Z.; Chen, R. Z.; Peng, G. Y. 1999. Genotoxicity of waters samples from the scenic Lijiang river in the Guilin area, China, evaluated by *Tradescantia* bioassays. *Mutat. Res.* 426: 137-141.

Joutchev, G.; Stergios, M.; Schubert, I. 2002. A comparison of N-methyl-N-nitrosourea-induced chromatid aberrations and micronuclei in barley meristems using FISH techniques. *Mutat. Res.* 517: 47-51.

Kanaya, N.; Gill, B. S.; Grover, I. S.; Murin, A.; Osiecka, R.; Sandhu, S. S.; Andersson, H. C. 1994. *Vicia faba* chromosomal aberration assay. *Mutat. Res.* 310: 231-247.

Karp, G. 1999. *Cell and Molecular Biology*. 2a. ed. John Wiley & Sons. USA. pp: 609 – 628.

Kihlman, B. A. 1966. *Actions of chemicals on dividing cells*. Printice Hall. New Jersey. pp: 143-157.

Klug, W. S. y Cummings, M. R. 1999. Conceptos de Genética. 5ª. Edición. Prentice Hall. Madrid, España. pp: 25-27.

Knasmüller, S.; Gottmann, E.; Steinkellner, H.; Fomin, A.; Pickl, Ch.; Paschke, A.; Göd, R.; Kundi, M. . 1998. Detection of genotoxic effects of heavy metal contaminated soils with plant bioassays. *Mutat. Res.* 420: 37-48.

Kong, M. S. y Ma, T. H. 1999. Genotoxicity of contaminated soil and shallow well water detected by plant bioassays. *Mutat. Res.* 426: 224-228.

Kotas, J. y Stasicka, Z. 2000. Chromium occurrence in the environment and methods of its speciation. *Environ. Pollut.* 107: 263-283.

Liu, Y.; Wu, Z.; Chen, J. 1998. Differential effects of aneugens and clastogens on incidences of multinucleated cell and micronucleated cells in Chinese hamster lung (V79) cell line in vitro. *Mutat. Res.* 413: 39-45.

Lodish, H. 1995. *Molecular Cell Biology*. 3a. ed. Scientific American Book. USA. pp: 609 – 628.

Ma, T. H.; Cabrera, G. L.; Chen, R.; Gill, B. S. ; Sandhu, S. S. ; Vandenberg, A. L. ; Salamone, M. F. 1994. *Tradescantia* micronucleus bioassay. *Mutat. Res.* 310: 221-230.

Ma, T. H.; Grant, W. F. ; de Serres, F. J.. 1997. The genotoxicity monitoring of air, water and soil. A preliminary report of the International Programme on Plant Bioassays (IPPB). *Mutat. Res.* 379 (1), Supplement 1, page 599.

Ma, T. H.; Xu, Z.; Xu, Ch.; McConnell, H. ; Valtierra, R. E. ; Arreola, G. A. ; Zhang, H. 1995. The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. *Mutat. Res.* 334: 185-195.

Majer, B. J. ; Tscherko, D. ; Daschke, A.; Wennrich, R.; Kundi, M.; Kandeler, E.; Knasmüller, S. 2002. Effects of heavy metal contamination of soils on micronucleus induction in *Tradescantia* and on microbial enzyme activities: a comparative investigation. *Mutat. Res.* 515: 111-124.

Marcano, L.; Carruyo, I.; Montirl, X.; Bracho, M.; Soto, L. M. 1999. Valoración del efecto tóxico del cadmio en células meristemáticas de cebolla *Allium cepa* L. *Rev. Fac. Agron.* 16: 476-487.

Mattern, B. E. y Grauwiler, J. 1974. Micronuclei in mouse bone-marrow cells. A simple in vivo model for the evaluation of drug-induced chromosomal aberrations. *Mutat. Res.* 23: 239-249.

Melo, S. F. M.; Márquez, E. C.; Juárez, J. M.; Martínez, M. F.; Miranda, R. P.; Esquivel, R. L. 2003. Análisis de metales pesados en las aguas residuales del río San Javier y repercusión en la salud e impacto ambiental. Departamento de Química, Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, Instituto Politécnico Nacional. México.

Metcalf y Eddy. 1996. Ingeniería de aguas residuales. Tratamiento, vertido y reutilización. 3ª. Edición. McGraw-Hill. México. pp: 53-135.

Miao, M.; Fu, R.; Yang, D.; Zheng, L. 1999. *Vicia* root micronucleus assay on the clastogenicity of water samples from the Xiaoqing river in Shandong Province of the People's Republic of China. *Mutat. Res.* 426: 143-145.

Minissi, S. y Lombi, E. 1997. Heavy metal content and mutagenic activity, evaluated by *Vicia faba* micronucleus test, of Tíber river sediments. *Mutat. Res.* 393: 17-21.

Minissi, S.; Caccese, D.; Passafiume, F.; Grella, A. ; Ciccotti, E. ; Rizzoni, M. 1998. Mutagenicity (micronucleus test in *Vicia faba* root tips) polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metal content of sediments collected in Tiber river and its tributaries within the urban area of Rome. *Mutat. Res.* 420: 77-84

Mohamed, K. B. y Ma, T. H. 1999. Tradescantia-micronucleus and stamen hair mutation assays on genotoxicity of the gaseous and liquid forms of pesticides. *Mutat. Res.* 426: 193-199.

Moreno, L. J. F. 2001. Genotoxicidad del insecticida clorpirifos en células apicales de raíz de haba (*Vicia faba* L.). Tesis de Licenciatura. Ingeniería Agrícola. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM. Cuautitlán Izcalli, México.

Müller, W. U. y Rode, A. 2002. The micronucleus assay in human lymphocytes after high radiation doses (5-15 Gy). *Mutat. Res.* 502: 47-51.

Nakayama, F. S. y Bucks, D. A. 1991. Water quality in drip/trickle irrigation: A review. *Irrigation Science* 12: 187-192.

Nicoloff, H. Y Gecheff, K. 1976. Methods of scoring induced chromosome structural changes in barley. *Mutat. Res.* 34: 233-244.

Norma Oficial Mexicana NOM-001-ECOL-1996. Establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales. Publicada en el Diario Oficial de la Federación, 6 de enero de 1997.

Ortiz, V. B. y Ortiz, S. A. 1990. Edafología. 3ª edición. Departamento de Suelos. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. pp: 254-256.

Palacios, O. J. 2002. Estudio del efecto de aguas residuales en diversos cultivos en el Valle del Mezquital, Hidalgo. Tesis de Licenciatura. Departamento de Suelos, Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México.

Palafox, M. D. 2003. Evaluación genotóxica de aguas residuales de la actividad de tenería utilizadas para riego en el municipio de León, Guanajuato. Tesis de Licenciatura. Ingeniería Agrícola. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM. Cuautitlán Izcalli, México.

Paniagua, R. 1993. Citología e Histología Vegetal y Animal. Interamericana McGraw Hill. Madrid. pp: 166 – 257.

Pescod, M. M. 1992. Wastewater treatment and use in agriculture. FAO. Irrig & Drain. Paper No. 47. Roma. pp: 1-7.

Ramalho, R. S. 1996. Tratamiento de aguas residuales. Reverté. México. pp: 1-64.

Ramírez, D. Y. 1999. Efecto citogenético inducido por níquel en *Vicia faba*. Tesis de Licenciatura. Biólogo. Facultad de Ciencias, UNAM.

Rank, J. y Nielsen, M. H. 1994. Evaluation of the *Allium* anaphase-telophase test in relation to genotoxicity screening of industrial wastewater. *Mutat. Res.* 312 (1): 17-24.

Rizzoni, M.; Vitagliano, E.; Marconi, M. C.; Sottili, A.; Gustavino, B. 1987. Micronucleus induction by low doses of X-rays in *Vicia faba* root tips. *Mutat. Res.* 176: 205-209.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

Robbiano, L.; Mereto, E.; Mgliuzzi, M. A.; Pastore, P.; Brambilla, G. 1998. Increased frequency of micronucleated kidney cell in rats exposed to halogenated anaesthetics. *Mutat. Res.* 413: 1-6.

Rodríguez, G. S.; Pimentel, D.; Weinstein, L. H. 1998. In situ assessment of pesticide genotoxicity in an integrated pest management program I-*Tradescantia* micronucleus assay. *Mutat. Res.* 412: 235-244.

Ruiz, E. F.; Rabago, V. M. E.; Lecona, S. U.; Pérez, A. B.; Ma, T. H. 1992. *Tradescantia*-micronucleus (Trad-MCN) bioassay on clastogenicity of wastewater and in situ monitoring. *Mutat. Res.* 270: 45-51.

Sainz, A.; Grande, J. A.; de la Torre, M. L. 2004. Characterisation of heavy metal discharge into the Ria of Huelva. *Environ. Int.* 30: 557-566.

Samborska, C. A. 1987. Cytogenetic disturbances in germinating seeds of broad bean (*Vicia faba* L. var. minor) caused by herbicide Avadex B. W. *Genetica Polonica* 28 (3): 277-287.

Sawger, T. W. 1994. Cellular methods of genotoxicity and carcinogenicity. In: Introduction to in vitro cytotoxicology. Mechanisms and methods. CRC Press Inc. Boca Raton, Florida. pp: 75-105.

Schmid, W. 1973. Chemical mutagen testing on in vivo somatic mammalian cells. *Agents and Actions* 3: 77-85.

Schmid, 1975. The micronucleus Test. *Mutat. Res.* 31: 9-15.

Schwartz, J. L. 1989. Monofunctional alkylating agent induced S-phase-dependent DNA damage. *Mutat. Res.* 216: 111-118.

Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos (SARH). 1994. Manual de aprovechamiento de aguas residuales en el riego agrícola. Dirección General de Usos del Agua y Prevención de la contaminación. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. México. pp: 245-263.

Seoánez, C. M. y Angulo, A. I. 1999. Aguas residuales urbanas. Tratamientos naturales de bajo costo y aprovechamiento. Mundi-Prensa. México. pp: 47-87.

Sharma, A. K. y Talukder, G. 1987. Effects of metal on chromosome of higher organisms. *Environ. Mutagen.* 9: 191-226.

Steinkellner, H.; Mun-Sik, K.; Helma, Ch.; Ecker, S.; Ma, T. H.; Horak, O.; Kundi, M.; Knasmüller, S. 1998. Genotoxic effects of heavy metal: comparative investigation with plant bioassays. *Environ. Mol. Mutat.* 31: 189-191.

Stern, K. R. 1994. *Introductory Plant Biology*. Brown Publishers. USA. pp: 34 – 37.

Sudheer, K. M.; Unnikrishnan, M. K.; Uma, D. P. 2003. Effect of 5-aminosalicylic acid on radiation induced micronuclei in mouse bone marrow. *Mutat. Res.* 527: 7-14.

Tebbutt, T. H. Y. 2002. *Fundamentos de control de la calidad del agua*. Limusa-Noriega Editores. México. pp: 19-53.

Tejeda, G. C. 1993. Programa Nacional para el aprovechamiento de aguas residuales. Secretaria de Agricultura y Recursos Hidráulicos (SARH). México. pp: 87-93.

Trosic, I.; Busljeta, I.; Kasuba, V.; Rozgas, R. 2002. Micronucleus induction after whole-body microwave irradiation of rats. *Mutat. Res.* 521: 73-79.

Valencia, Q. P. R. 1987. Efecto del Dimetil Sulfoxido (DMSO) sobre las células meristemáticas de la raíz de *Vicia faba*. Tesis de Licenciatura. Biólogo. Facultad de Ciencias, UNAM.

Valencia, Q. P. R. 1992. Efecto de los insecticidas carbámicos metomil y oximil sobre los cromosomas de las células meristemáticas de la raíz de *Vicia faba*. Tesis de Maestría en Biología Celular. Facultad de Ciencias, UNAM.

Villalobos, P. R. 1965. Alteraciones inducidas por los rayos X en los cromosomas de las células meristemáticas de la raíz de *Vicia faba*. I. Aspectos técnicos. *Bol. Soc. Bot. Mex.* 29: 178-183.

Wang, S. y Wang, X. 1999. The Tradescantia-micronucleus test on the genotoxicity of UV-B radiation. *Mutat. Res.* 426: 151-153.

Yang, G. 1999. *Tradescantia*-micronucleus assay on the water quality of lake Hongzhe in Jiangsu Province, China. *Mutat. Res.* 426: 155-157.

Zhang, Y. y Xiao, H. 1998. Antagonistic effect of calcium, zinc and selenium against cadmium induced chromosomal aberrations and micronuclei in root cell of *Hordeum vulgare*. *Mutat. Res.* 420: 1-6.

Zhang, Y. X. y Yang, X. L. 1994. The toxic effects of cadmium on cell division and chromosomal morphology of *Hordeum vulgare*. *Mutat. Res.* 312: 121-126.