



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**EVALUACIÓN DEL DAÑO GENOTÓXICO EN HORTALIZAS  
DEL VALLE DEL MEZQUITAL IRRIGADAS CON AGUAS  
NEGRAS DE LA CIUDAD DE MÉXICO**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGA**

**P R E S E N T A:**

**YULIA HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ**



**DIRECTORA DE TESIS:  
DRA. JOSEFINA CORTÉS ESLAVA  
2018  
CIUDAD UNIVERSITARIA. CDMX.**



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.

1. Datos del alumno.  
Hernández  
Hernández  
Yulia  
5581197881  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
310085081

2. Datos del Tutor.  
Dra.  
Josefina  
Cortés  
Eslava

3. Datos del sinodal 1  
Dra.  
Sandra Luz  
Gómez  
Arroyo

4. Datos del sinodal 2.  
Dr.  
Marcelo  
Rojas  
Oropeza

5. Datos del sinodal 3.  
Dr.  
Pedro Rafael  
Valencia  
Quintana

6. Datos del sinodal 4.  
Dra.  
Karen Elizabeth  
Nava  
Castro

7. Datos del trabajo escrito.  
Evaluación del daño genotóxico en hortalizas del Valle del Mezquital irrigadas con aguas  
negras de la Ciudad de México.  
p.77  
2018

*Dedico este trabajo a las dos personas que me han  
brindado incondicionalmente todo su cariño y  
apoyo; que me han enseñado que la educación,  
es la mejor arma para cambiar al mundo.  
A mis padres: Alberta y Crescencio.*

## **Agradecimientos**

A la UNAM.

En primer lugar, quiero agradecer a la Universidad Nacional Autónoma de México: por la oportunidad de formarme y crecer como persona en sus aulas desde el Colegio de Ciencias y Humanidades en el nivel medio superior, a nivel licenciatura en la Facultad de Ciencias y en el Centro de Ciencias de la Atmosfera en el laboratorio de Genotoxicología Ambiental, donde tuve el privilegio de realizar el presente trabajo. Gracias por hacerme coincidir con personas que aprecio y valoro mucho.

Agradezco profundamente a todos y cada uno de los profesores que me han formado, por su orientación, dedicación y pasión por la ciencia.

En especial, quiero agradecerle a la *Dra. Josefina Cortés Eslava*, mi asesora, por apoyar este proyecto; confiar en mí, brindándome el apoyo y la orientación necesaria para sacarlo a delante. Y, por supuesto facilitarme los recursos y materiales necesarios.

Gracias a la *Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo*, por todos los comentarios, recomendaciones y apoyo hacia este proyecto de investigación desde el primer día que se lo presenté.

A mis sinodales, *Dr. Marcelo Rojas Oropeza*, *Dr. Pedro Rafael Valencia Quintana* y a *Dra. Karen Elizabeth Nava Casto*, por tomarse el tiempo para corregir este trabajo, cuyos comentarios enriquecen el contenido del mismo.

A *Victoria Carrillo*, por estar siempre al pendiente de mis experimentos, facilitándome el material necesario para realizarlos, gracias también por las palabras de aliento.

Quiero extender mis agradecimientos al programa de becas para estudiantes de pueblos indígenas del Programa Universitario de Diversidad Cultural e Interculturalidad (PUIC-UNAM). Por el apoyo económico y moral brindado durante mi carrera universitaria. Y a Wilfrido Martínez Matías, quien fuera mi tutor durante cuatro años, siempre pendiente de mi avance académico semestre a semestre.

Mamá y papá: No me alcanzan las palabras para agradecerles todo lo que han hecho por mí. Hemos alcanzado la meta que nos propusimos hace algunos años, no ha sido fácil pero puedo decir que ha valido la pena. Gracias por la vida que me han regalado y la oportunidad de estar aquí, me siento muy orgullosa de tenerlos como padres. Son mi motor y mi modelo a seguir, espero llegar a ser algún día, un gran ser humano como ustedes lo son, este logro es más suyo que mío.

Gracias a mis abuelos, a los que se ya fueron y tengo muy presentes en mi corazón. Y a mi abuelita Ana: “Tlaskamati tonana, pampa ta ti nex iskalti, ti nex ikneli uan nochipaya ti nech iklamiktok. Ni mits neki ika nochi no yolo. Axkema xi nech kaua”.

Gracias infinitas a mis hermanos: Yenni, Flor, Alberto y Jaime. Por estar en las buenas y en las malas, por las lecciones que a su manera cada uno me da y por hacer mi vida más divertida con sus ocurrencias. A mi tío José, que desde que tengo memoria, ha estado siempre pendiente de mi bienestar. A mi tía Flora que me ha procurado todos estos años. A Eli Matías, gracias por todos los momentos que hemos pasado juntas.

A mis Amigos, colegas y compañeros de aventuras: Daniela Muñoz, Vanessa Montiel, Karen Almaguer, Brenda Hernández, Viridiana Aguilera, Araceli Mercado, Michelle Rodríguez, Víctor Piña, Alejandro Moyers, Ulises Castillo, Ángel Martínez, Pedro Gama, Isabel Martínez y Omar Osorio por permitirme compartir con ustedes esta bella experiencia, por todo el apoyo que me ha brindado cada uno de ustedes tanto en lo académico como en lo personal, gracias.

*“Después de todo, ¿qué es un científico entonces?  
Es un Hombre curioso que mira a través del ojo  
de una cerradura, la cerradura de la naturaleza,  
tratando de saber qué es lo que sucede.”*

Jacques Yves Cousteau

# ÍNDICE

RESUMEN.....	- 8 -
1 INTRODUCCIÓN .....	- 9 -
2 ANTECEDENTES.....	- 11 -
2.1 Sitio de estudio.....	- 11 -
2.2 Caracterización del agua .....	- 14 -
2.2.1 Agua de manantial .....	- 15 -
2.2.2 Agua residual .....	- 16 -
2.3 Uso de las aguas residuales en la agricultura .....	- 18 -
2.4 Hortalizas .....	- 22 -
2.4.1 Betabel.....	- 22 -
2.4.2 Coliflor .....	- 25 -
2.4.3 Rábano .....	- 27 -
2.5 Sistemas biológicos de prueba .....	- 29 -
2.6 Las plantas como monitores de contaminación ambiental .....	- 31 -
2.7 Electroforesis de células individuales .....	- 33 -
3 JUSTIFICACIÓN.....	- 36 -
4 OBJETIVO.....	- 37 -
5 HIPÓTESIS.....	- 38 -
6 MATERIALES Y MÉTODOS .....	- 39 -
6.1 Muestreo.....	- 39 -
6.2 Ensayo cometa.....	- 40 -
6.2.1 Preparativos previos .....	- 40 -
6.2.2 Aislamiento de núcleos .....	- 41 -
6.2.3 Lisis .....	- 42 -
6.2.4 Pre-electroforesis y electroforesis.....	- 43 -
6.2.5 Tinción y observación .....	- 44 -
6.3 Análisis estadístico.....	- 44 -
7 RESULTADOS.....	- 45 -
8 DISCUSIÓN .....	- 48 -
9 CONCLUSIONES .....	- 57 -

10	PERSPECTIVAS .....	- 58 -
11	REFERENCIAS .....	- 59 -
12	ANEXOS.....	- 77 -

## RESUMEN

El Valle del Mezquital en el estado de Hidalgo, es una de las zonas áridas del país en donde la agricultura era escasa. Desde hace poco más de 100 años se envían a este Valle, aguas residuales provenientes de la Ciudad de México y zona metropolitana. Son estas mismas las que han hecho del Valle del Mezquital un paraíso en medio de la aridez. No obstante, el beneficio de las aguas residuales trae consigo riesgo para la salud ya que contiene coliformes fecales, cianuros, detergentes, grasas, aceites y metales pesados, en cantidades que rebasan las normas oficiales. Estos contaminantes pueden tener impacto significativo en los cultivos irrigados, dada su alta reactividad y como la mayoría son electrofílicos, tienden a reaccionar con centros nucleofílicos como el DNA induciendo genotoxicidad.

La electroforesis unicelular evalúa el daño al material genético, particularmente las rupturas de cadena causado por diferentes agentes físicos y químicos. El objetivo de este trabajo fue determinar mediante electroforesis unicelular si las aguas negras provenientes de la Ciudad de México causan daño al DNA de las hortalizas betabel, coliflor y rábano (*Beta vulgaris ssp. vulgaris* L, *Brassica oleracea* L. var. *Botrytis* y *Raphanus sativus* L., respectivamente), irrigadas con éstas. Por lo cual se realizó una colecta *in situ* de hortalizas regadas con aguas negras (HRAN) en Tlahuelilpan y hortalizas regadas con aguas blancas (HRAB) en Tezontepec de Aldama específicamente de la estructura foliar de las tres especies.

Para el registro de núcleos se tiñeron con bromuro de etidio 0.02 (1mg/ml), con un número de muestra de 150 núcleos por individuo, se observaron al microscopio de fluorescencia acoplado al programa de análisis de imágenes “Comet Assay” IV a 40x. En el análisis estadístico se tomó en cuenta el momento de la cauda. Se realizó un ANOVA de dos vías y una prueba de comparación múltiple de Dunnet con un  $p < 0.05$ . Los resultados de las pruebas estadísticas mostraron diferencias entre ambos tipos de riego, el daño al DNA inducido en las HRAN fue significativamente mayor comparado con el de las HRAB. Concluyendo, las aguas negras resultaron genotóxicas en las hortalizas evaluadas.

# 1 INTRODUCCIÓN

La escasez cada vez mayor de las aguas dulces debido al crecimiento demográfico, a la urbanización y probablemente, a los cambios climáticos, ha dado lugar al uso creciente de aguas residuales para la agricultura, la acuicultura, la recarga de aguas subterráneas y otras áreas. En algunos casos, las aguas residuales son el único recurso hídrico de las comunidades pobres que subsisten por medio de esta actividad. Si bien la aplicación de aguas residuales en los cultivos puede aportar beneficios (como provisión de alimentos y una mejor nutrición), la explotación no controlada generalmente está relacionada con impactos significativos sobre la salud humana. Estos riesgos se pueden minimizar cuando se implementan buenas prácticas de manejo (OMS, 2015). Regar cultivos agrícolas con aguas residuales urbanas se generalizó en el siglo XX, en modo particular en los últimos tres decenios del siglo, especialmente en las zonas áridas y semiáridas, tanto de los países en desarrollo como de los desarrollados. El aprovechamiento controlado de aguas residuales depuradas y no depuradas para el riego se practica ahora muy comúnmente en Europa, los Estados Unidos, México, Australia, China, la India, el Cercano Oriente. En menor medida en Chile, Perú, Argentina, Sudán y Sudáfrica (Bartone y Arlosoroff, 1987)

El Valle del Mezquital, Hidalgo, es una tierra de contrastes, pues, a pesar de su aridez el 61% de su población, aproximadamente 420 mil habitantes, viven de la agricultura. Actualmente las aguas residuales generadas por la zona metropolitana del Valle de México se envían a Hidalgo y se han utilizado para riego agrícola en más de 80 mil hectáreas de cultivos (CONAGUA, 2015) en un lapso de más de un siglo, desde 1890 (Winpenny *et al.*, 2013). La presa Endhó, vertedero de estas aguas residuales fue construida entre 1947 y 1957, se encuentra entre los municipios de Tula de Allende y Tepetitlán en el estado de Hidalgo; concentró en sus inicios el agua dulce del río Tula, donde representaba un atractivo turístico. Sin embargo, desde 1975 se mandan a esta presa las aguas negras de la Ciudad de México. Los principales cultivos en esta área son hortalizas, legumbres y especias (alfalfa, maíz, avena, trigo, frijol, jitomate, chile y betabel); existiendo una restricción para cultivos de lechuga, col, cilantro, rábano, zanahoria, espinacas y perejil (aunque se cultivan en la actualidad) y que se debe a la regulación en la reutilización de aguas residuales para la protección de la salud (Maples, 1990).

Los agentes capaces de ocasionar toxicidad genética son llamados genotóxicos y se clasifican en tres categorías de acuerdo a su origen: químicos, físicos y biológicos (Abrevaya, 2015). Entre los daños causados por los agentes químicos a los organismos expuestos, los efectos genotóxicos han sido de los más preocupantes, debido a que pueden causar diferentes problemas de salud y afectar generaciones futuras. Muchos contaminantes ambientales tienden a ser muy reactivos, la mayoría de ellos son electrofílicos, es decir, son compuestos que pueden reaccionar con varios centros nucleofílicos de las moléculas celulares, incluyendo al ácido desoxirribonucleico (DNA, por sus siglas en inglés) (Veleminsky y Gicher, 1992).

Por otra parte, entre los más de 200 bioensayos conocidos en la literatura, las plantas superiores son consideradas como excelentes indicadores de efectos citogenéticos y mutagénicos de contaminantes ambientales. Estos bioensayos son confiables y muy sensibles para el monitoreo y evaluación de agentes genotóxicos (Waters *et al.*, 1990). Los cambios genéticos inducidos son expresados por varios biomarcadores, los cuales incluyen: modificaciones estructurales en los cromosomas y en las cromátidas, llamados aberraciones cromosómicas; alteraciones de la mitosis y de la meiosis como la inactivación del huso acromático; lo que produce C-mitosis, no disyunción y otras irregularidades en la distribución cromosómica durante la anafase. Esto resulta en células aneuploides y poliploides; eventos de recombinación como el entrecruzamiento en células somáticas y los intercambios de cromátidas hermanas; esterilidad y letalidad embrionaria, mutaciones en tejidos somáticos expresadas en hojas y flores; además de mutaciones en células germinales expresadas en granos de polen o en la progenie (Valencia-Quintana *et al.*, 2013).

El ensayo cometa, también conocido como electroforesis unicelular, es una prueba que evalúa el daño del material genético causado por diferentes agentes químicos y físicos en células individuales (Fekadu *et al.*, 2000). El protocolo de este ensayo ha quedado bien establecido para detectar el daño al DNA, sobre todo en las rupturas de cadena sencilla o doble, tanto en sitios lábiles a álcali, así como los entrecruzamientos DNA-DNA y DNA-proteínas (Lagroye *et al.*, 2004) teniendo una gran reproducibilidad.

## 2 ANTECEDENTES

### 2.1 Sitio de estudio

El Valle del Mezquital (Fig. 1), se ubica dentro del límite sudoeste del estado de Hidalgo (longitud norte 20° 02' y longitud oeste 99° 15'). Se sitúa en lo alto de la meseta mexicana, con una altitud entre 1700 y 2100 metros sobre el nivel del mar (Romero-Alvarez, 1997). Se delimita al norte por las elevaciones de la sierra de Juárez, la Sierra Gorda y las barrancas del río San Juan en el umbral del Bajío queretano; al poniente por las estribaciones de la Sierra de Pachuca y Tolcayuca, que lo separan de las barrancas de Meztlán y de la Cuenca de México; al poniente por la Serranía de las Cruces y Cuautlalpan y al sur por las elevaciones de Apaxco que separan al valle de la cuenca de la laguna de Zumpango. Está conformado entonces, por la cuenca alta del río Tula-Moctezuma, donde se incluyen las subcuencas de los ríos Actopan, Alfajayucan, Arroyo Zarco, Rosas, Salado, Tecozautla, Tlautla y Tula, que cubren una superficie de 7,206 kilómetros cuadrados (López, 1991).

El valle del Mezquital es en realidad una cuenca de origen lacustre que ocupa las depresiones que se han formado entre el relieve montañoso de la ya mencionada Meseta Central y que pertenece a la provincia fisiográfica denominada Neovolcánica, en su porción cercana a la vertiente occidental de la Sierra Madre Oriental. El Valle constituye una de las partes elevadas de la cuenca del río Moctezuma que se encuentra drenada por el caudal permanente del río Tula, tributario de las aguas que provienen de la cuenca de México (Segerstrom, 1962; González, 1968; Granados-Sánchez *et al.*, 2004).

La litología está dada principalmente por caliza del Cretácico Inferior, basalto y brecha volcánica de naturaleza básica, toba ácida, aluvión y material volcánico-clásico del Terciario superior. Las formaciones sedimentarias son de gran importancia en la región ya que constituyen aproximadamente el 60% del área. Las porciones planas y parte de las laderas están constituidas por toba arcillosa y pumicita, así como por arena y arcilla. Además, las rocas sedimentarias de origen no ígneo, que sobresalen en la zona, están formadas por caliza y áreas pequeñas de pizarra (Blázquez, 1938; Hernández-Silva *et al.*,

1994). El paisaje es de tipo semidesértico, extensión austral del desierto Chihuahuense, con clima cálido seco y una baja precipitación pluvial, que ha creado recursos zonificados de vegetación y fauna que se caracterizan por el matorral rosetófilo y bosques de mezquite nopaleras y cardonales (Melville, 1990; López y Bali, 2002).

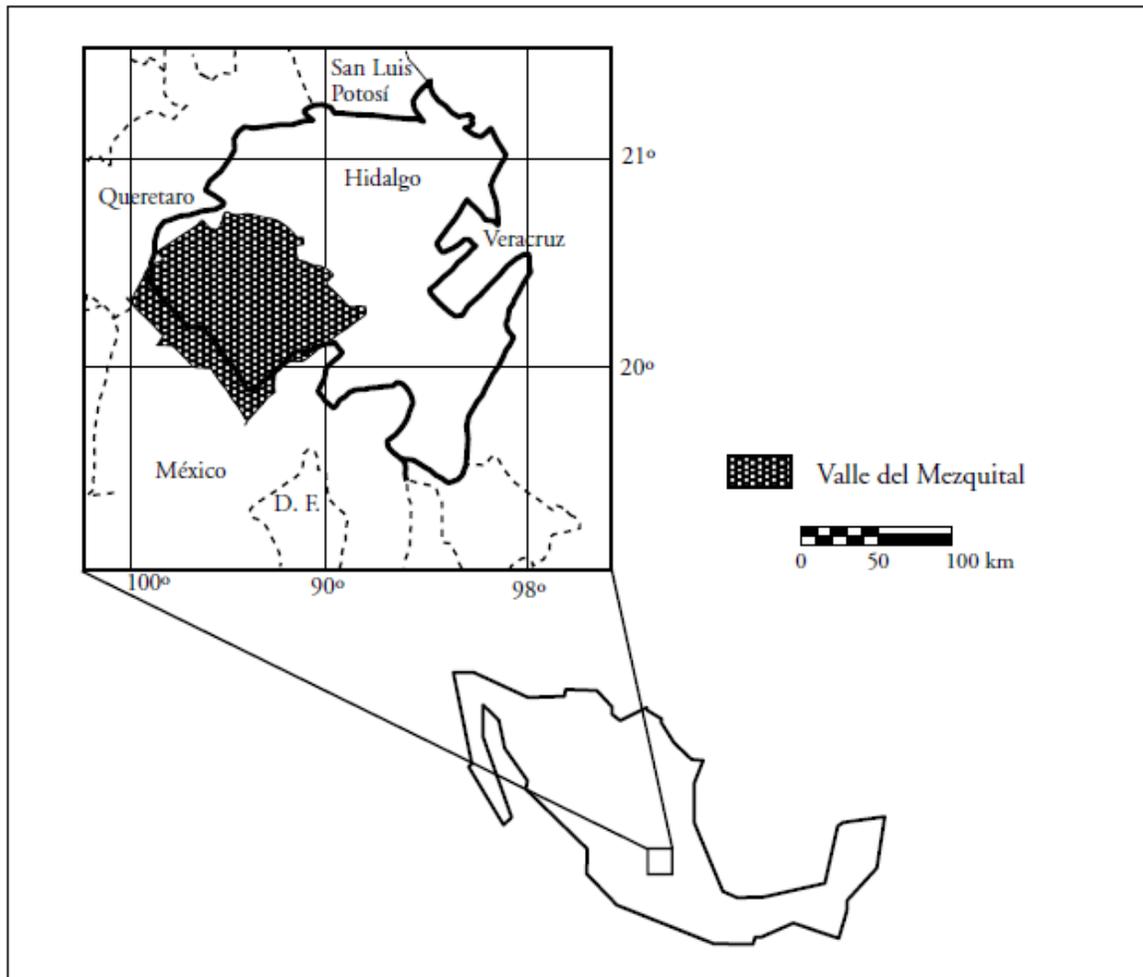


Fig. 1. Ubicación del Valle del Mezquital (López y Bali, 2002)

El municipio de Tlahuelilpan (Fig. 2.) se encuentra ubicado en las coordenadas geográficas; latitud norte de  $20^{\circ} 07' 47''$  y en longitud oeste  $99^{\circ} 13' 43''$ , a una altura sobre el nivel del mar de 2,040 metros. Colinda al norte con el municipio de Mixquiahuala; al oriente con el municipio de Tetepango, al sur con Tlaxcoapan y al poniente con Tezontepec de Aldama, El suelo que existe es de origen mesozoico, semidesértico, rico en materia orgánica y nutrientes, de uso primordialmente agrícola (SIIEH<sup>a</sup>, 2016). La parte más alta del poblado de Tlahuelilpan, al suroeste del estado de Hidalgo, es atravesada por el canal principal de

distribución del agua residual utilizada para el riego de las parcelas del piedemonte, Tlamaco-Juandhó, mientras que la parte más baja corresponde al manantial Cerro Colorado (Prado *et al.*, 2015). Por otra parte, el municipio de Tezontepec de Aldama se encuentra en las coordenadas geográficas; latitud norte de 20°11'35'' y en longitud oeste 99°16'24'', a 2100 metros sobre el nivel del mar. Colinda al noreste con el municipio de Chapatongo; al norte con el municipio de Chicuautla, al oriente con los municipios de Mixquiahuala y Tlahuelilpan, al sur con Tlaxcoapan y Tula de Allende, al poniente con Tepetitlán. El suelo es de origen mesozoico, semidesértico, rico en materia orgánica y nutrientes. Su uso es principalmente agrícola en más de un 70% siguiéndole el de agostadero cercano al 30%. La flora principalmente de matorral espinoso, con formaciones de tipo sabana, cuenta con pino, pirul, casuarina, sabino y aguacate. A la orilla de los ríos y manantiales se encuentran mezquites y árboles como durazno, higo, capulín, mora y granada. Asimismo, el municipio cuenta con tierras de riego del río Tula, de manantial y algunos cultivos de temporal (SIIEH<sup>b</sup>, 2016).

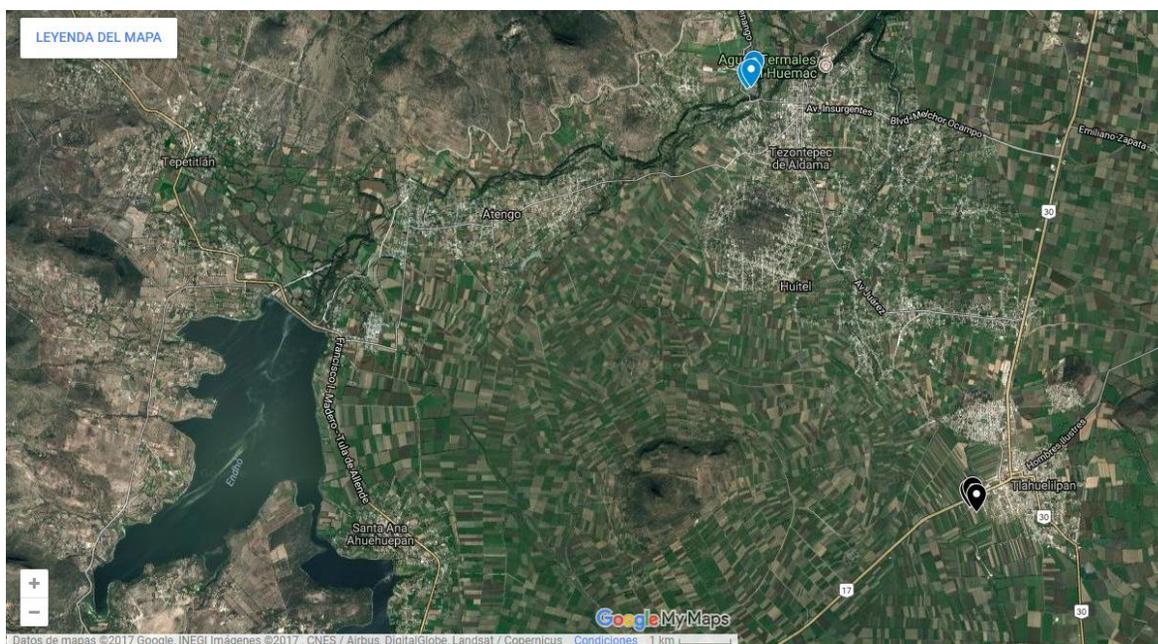


Fig. 2. Mapa satelital, Valle del Mezquital (presa Endhó) vertedero de aguas negras provenientes de la Ciudad de México y área metropolitana, distribuye a parcelas con diferentes sembradíos. Se señalan: en color azul, Tezontepec de Aldama, zona de cultivo de hortalizas regadas con agua de manantial y en color negro, Tlahuelilpan, zona de cultivo de hortalizas regadas con aguas negras (google maps, 2017).

## 2.2 Caracterización del agua

Se estima que la tierra contiene 1,352 millones de km<sup>3</sup> de agua. Sólo el 0.003% es agua dulce, es decir, agua apta para beber, higiene, agricultura e industria. La mayor parte del agua dulce se encuentra lejos de la civilización o en lugares de difícil acceso para ser captada para su uso. La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura estima que sólo de 9,000 a 14,000 km<sup>3</sup> se encuentran económicamente disponibles para el uso humano cada año (FAO, 2006). El agua no sólo es esencial para el consumo humano directo y para los hogares, sino además para producir alimentos y productos manufacturados necesarios para vivir y mejorar los estándares de vida. (Winpenny *et al.*, 2013). Los principales usos del agua pueden clasificarse de diversas formas, por ejemplo: el municipal que incluye el doméstico, el comercial, el industrial y servicios al público, además del que se pierde en el sistema de distribución llamada agua “no cuantificada” (Tchobanoglous y Schroeder, 1985) De manera particular en México este recurso es empleado en el sector agropecuario, abastecimiento público, urbano y doméstico, que incluye servicios que toman agua de las redes municipales, en la industria y generación de energía eléctrica. Una vez ocupada para cualquiera de estos destinos su calidad se altera en diferente grado. (CONAGUA, 2010; Jiménez *et al.*, 2010).

El agua, a diferencia de otros recursos naturales, la hay en cantidad fija. Aunado a esto, la alteración de su calidad reduce el volumen disponible para el uso y consumo humano, así como para el funcionamiento de diversos ecosistemas (Jiménez, *et al.*, 2010). En la actualidad se integran como componentes de la suciedad de las aguas blancas: 1) Elementos de la contaminación atmosférica: depuración húmeda de las lluvias ácidas; 2) Restos de la actividad humana y asociada: papeles, colillas, excrementos de animales (aves, gatos, perros) restos de la recogida y evacuación de basura; 3) Residuos de tráfico: aceites, grasas, hidrocarburos, componentes fenólicos y de plomo; arenas residuos vegetales y biocidas (insecticidas, herbicidas, abonos) de zonas ajardinadas y 4) Contaminación aportada por las aguas de drenaje: aguas salobres, fugas de alcantarillado (Núñez, 2015).

Para determinar la calidad del agua se emplean tres indicadores: la demanda bioquímica de oxígeno a cinco días (DBO<sub>5</sub>) y la demanda química de oxígeno (DBQ) y los sólidos

suspendidos totales (SST). La DBO<sub>5</sub> y la DQO se utilizan para valorar la cantidad de materia orgánica presente en los cuerpos de agua provenientes principalmente de las descargas de aguas residuales de origen municipal y no municipal. Estos parámetros permiten reconocer gradientes de agua que van desde una condición relativamente natural o sin influencia de la actividad humana, hasta indicios o aportaciones importantes de aguas residuales de tipo doméstico, industrial o mezcla de ambas (CONAGUA, 2010).

### *2.2.1 Agua de manantial*

Los manantiales son aguas subterráneas que debido a la orografía del terreno emergen a la superficie, generalmente en laderas o llanuras, al encontrar las corrientes capas impermeables en los suelos por los que discurren (BOE, 1990). Los manantiales están en aquellas depresiones o valles en los que el límite superior de la zona saturada alcanza la superficie topográfica. Generalmente, en estos casos, cuando la depresión topográfica es un valle, los manantiales de aguas abajo dan origen a un curso permanente de agua, de modo que éstos suelen ser subfluviales (Samper, 2014). Se recargan o llenan de agua de forma natural, por infiltración del agua de lluvia que cae sobre ellos, de los ríos o lagos que los atraviesan o limitan o del excedente de agua empleada en regar cultivos asentados sobre ellos (excedente respecto al agua consumida por el propio cultivo y por la evaporación). Este volumen de agua que se llama también aportación, recarga o entrada al acuífero es variable a lo largo del tiempo, mayor en unas épocas, menor o inexistente en otras (Custodio y Llamas, 1983).

El agua que se encuentra en la naturaleza no es pura, a través de su paso por el suelo se carga de minerales que le darán sus características peculiares, pero también puede recoger materia orgánica, gases o microorganismos (BOE, 1990). Algunos factores que influyen en la calidad del agua pueden ser: presencia de excretas humanas y/o animales de sangre caliente, animales vivos en la corriente, rebosamiento de aguas residuales, escurrimientos, presencia de fisuras, empleo de material inadecuado en la construcción, filtraciones a través del suelo, maleza, vertederos, impregnación del suelo por sustancias tóxicas naturales o procedentes de vertidos de la agricultura o industria. La calidad del terreno tiene enorme

importancia, ya que los arenosos suelen dar aguas menos contaminadas por procesos de filtración, mientras los arcillosos, al ser impermeables, no producen este efecto y el agua pasa a través de las grietas (Fernández y Pérez, 1989). En numerosos casos (incluso en algunas grandes ciudades), las aguas residuales de origen urbano se canalizan por redes de saneamiento en mal estado o inadecuadas; a veces se vierten a los cauces o a lagunas de infiltración, directamente o a través de acequias de riego o de drenaje. Todas estas vías de evacuación pueden provocar la contaminación de los acuíferos, que será más o menos intensa en función del volumen vertido y su grado de depuración y dilución (Sánchez, 1995).

### 2.2.2 *Agua residual*

Se define como agua residual al líquido de composición variable proveniente de usos municipales, industriales, comerciales, agrícolas, pecuarios o de cualquier otra índole ya sea pública o privada y que por tal motivo haya sufrido degradación en su calidad original (INB, 2012). Se considera contaminante al exceso de materia o energía (calor) que provoque daño a seres humanos, animales, plantas y bienes; o que perturbe las actividades que se desarrollan con agua, es decir, que limiten su uso en condiciones seguras de salud para el hombre y el ambiente (Jiménez, 2001). Los contaminantes en las aguas residuales son habitualmente una mezcla compleja de compuestos orgánicos e inorgánicos. Normalmente no es ni práctico ni posible obtener un análisis completo (Cabildo-Miranda *et al.*, 2008), éstas se clasifican en municipales e industriales. Las municipales corresponden a las que son manejadas en los sistemas de alcantarillado, urbanos y rurales, en tanto que las industriales son aquellas descargadas directamente a los cuerpos receptores de propiedad nacional, proceden de los procesamientos realizados en fábricas y establecimientos industriales (CONAGUA, 2010). La descarga de aguas residuales domésticas, industriales, agrícolas y pecuarias sin tratamiento provoca la contaminación de los cuerpos de agua receptores, disminuyendo la calidad de las aguas superficiales y subterráneas, poniendo en riesgo la salud de la población y la integridad de los ecosistemas (SEMARNAT, 2013).

Uno de los principales problemas sanitarios relativos a la contaminación ambiental es el vertido de residuos tóxicos al agua. Por ello es importante efectuar investigaciones de los

riesgos que pueden producir los contaminantes presentes en las aguas residuales sobre los ecosistemas (Stumpf *et al.*, 1999). Entre éstos se encuentran sustancias que poseen la capacidad de inducir efectos genotóxicos (Würgler y Krames, 1992; Ferreira la Rosa *et al.*, 1999; Pitot y Dragan, 2001; Emmanuel *et al.*, 2005).

Cerca del 75% de los sólidos en suspensión y del 40% de los sólidos filtrables de agua residual de concentración media son de naturaleza orgánica (Grijalvo, 2016). Los principales contaminantes de descargas municipales son nitrógeno, fósforo, compuestos orgánicos, bacterias, coliformes fecales, materia orgánica, residuos farmacéuticos y detergentes (Masters, 2008; Jiménez *et al.*, 2010). Además de que contribuyen con una amplia gama de mutágenos y carcinógenos entre ellos hidrocarburos aromáticos policíclicos, nitrosaminas y aminas heterocíclicas, todos ellos formados durante la combustión de materia orgánica y en alimentos proteicos cocidos a altas temperaturas, dichos compuestos mutágenos y carcinógenos llegan a las aguas residuales especialmente a través de la orina y las heces (Orozco *et al.*, 2001). Las descargas agrícolas contienen pesticidas, fertilizantes y sales, mientras que las industriales muestran gran variedad de contaminantes químicos (Masters y Ela, 2008). Éstos pueden ser de varios tipos: plaguicidas, compuestos orgánicos de síntesis, disolventes, plastificantes, cosméticos, productos farmacéuticos, antibióticos, metales pesados y compuestos organometálicos, incluyendo drogas de abuso (Marín, 2016). La contaminación química inorgánica consiste en aporte de iones, nutrientes, detergentes o metales y productos de desecho de actividades urbanas y rurales que llegan a los cuerpos de agua. Se les conoce químicamente como metales pesados cuando presentan una densidad mayor a  $5 \text{ g/cm}^3$ , ese término se ha asociado con los metales tóxicos como cadmio (Cd), cromo (Cr), mercurio (Hg), níquel (Ni), plomo (Pb) y zinc (Zn) (Jiménez *et al.*, 2010).

### ***2.3 Uso de las aguas residuales en la agricultura***

Con frecuencia se desconoce la forma de cómo se producen los alimentos; sin embargo, las aguas residuales, a menudo no tratadas, son utilizadas para el riego de un 10% de los cultivos del mundo (Scott *et al.*, 2004). El crecimiento de las plantas se suele relacionar frecuentemente con la disponibilidad de nutrientes más que con las condiciones físicas del suelo (Cornejo *et al.*, 2012). La reutilización en la agricultura de las aguas residuales (ya sea tratada o sin tratar) es una opción que se está estudiando y adoptando cada vez más en regiones con escasez de agua. Muchas regiones del mundo están experimentando crecientes problemas de déficits hídricos. Debido al crecimiento implacable de la demanda de agua frente a unos recursos hídricos estáticos o en disminución y a las periódicas sequías debidas a factores climáticos (Winpenny *et al.*, 2013). La discusión sobre el uso del agua residual tiene aspectos sociales, económicos, políticos y ambientales de gran relevancia. Entre sus beneficios están: que se obtengan grandes cosechas en extensiones considerables de tierras semiáridas e improductivas desde el punto de vista agrícola; sus cualidades de fertilizante agrícola hacen posible altos rendimientos por unidad de superficie cultivable; genera empleo en áreas de alta migración como son las zonas rurales áridas y su aplicación planeada en tierras agrícolas evita que se realicen descargas de drenajes en los cuerpos de agua superficial como ríos, con lo que se reduce la contaminación de este recurso vital, aunque también existen riesgos para la salud pública y deterioro para la calidad del ambiente (Cifuentes *et al.*, 1994).

El agua residual se utiliza para este propósito en alrededor de 50 países, en 10% de todas las tierras de riego. La conversión de la agricultura de secano a regadío puede aumentar el rendimiento de la mayoría de los cultivos entre un 100% a un 400% y permite obtener distintos cultivos con un mayor valor económico. Las especies de climas húmedos pueden cultivarse en áreas áridas (Winpenny *et al.*, 2013). Aunque esta práctica en gran parte es oculta y sancionada en un gran número de países, muchos agricultores, utilizan las aguas residuales porque, además de los beneficios de su uso, no tienen ningún costo y son abundantes, aún durante la época de sequías (Scott *et al.*, 2004). La actividad agrícola demanda agua residual por la necesidad de un abastecimiento regular que compense la escasez del recurso, por causa de la estacionalidad o la distribución irregular de la oferta de

otras fuentes de agua a lo largo del año (Lara y Hernández, 2003). Adicionalmente, el uso de aguas residuales presenta beneficios asociados al mejoramiento de la fertilidad de los suelos agrícolas por el aporte de materia orgánica, macronutrientes (N y P) y oligoelementos, como Na y K, permitiendo reducir y en algunos casos eliminar, la necesidad del uso de fertilizantes químicos y trayendo beneficios económicos al sector (Medeiros *et al.*, 2005)

La sinergia entre los valles de la Ciudad de México y del Mezquital fue dándose a partir de la necesidad de drenar los escurrimientos de la cuenca en que se encuentra la ciudad. Inicialmente, siglos atrás, se limitaba a la descarga de agua dulce desde los caudales de cursos de agua de la ciudad, pero con el tiempo las aguas residuales también pasaron a formar parte de este caudal. Mediante esto último, la ciudad ahorra dinero en cuanto al costo de tratamiento de las aguas residuales urbanas, al mismo tiempo que los agricultores se beneficiaban al aplicarla a la tierra (Ríos, 2015). Este proceso, denominado atenuación natural, se basa en el potencial biodegradativo de suelo/agua, definido por la Agencia de Protección Medioambiental de los Estados Unidos (U.S. EPA) por la directiva 9200.4-17, 1999, como el conjunto de procesos naturales (físicos, químicos y biológicos) que se desarrollan en suelos y aguas subterráneas y que bajo condiciones favorables contribuyen a la reducción de la masa, toxicidad, movilidad, volumen o concentración de los contaminantes en el medio sin la intervención humana. Los distritos de riego 03 de Tula con 51,825 hectáreas irrigadas (HI) y 100 de Alfajayucan, con 40,473 HI (CONAGUA, 2010) (Fig. 3), usan aguas residuales crudas del área metropolitana de la Ciudad de México desde 1912 (Cruz-Campa, 1965). De estas sólo algunas reciben tratamiento convencional, debido al inmenso tamaño del área cultivada y su antigüedad (más de 100 años en operación continua). Es por esto que la región representa un ejemplo único de riego con aguas residuales. Las aguas residuales, ya sean crudas, parcialmente tratadas o mezcladas con agua de lluvia, son sumamente valoradas por los agricultores ya que permiten una mayor productividad (SARH, 1994; Romero-Alvarez, 1997). El agua empleada en los distritos de riego se aprovecha por gravedad, en que la distribución es motivada por dicha fuerza, o por bombeo, cuando la conformación topográfica de la fuente respecto del aprovechamiento requiere de auxilio electromecánico (CONAGUA, 2010).

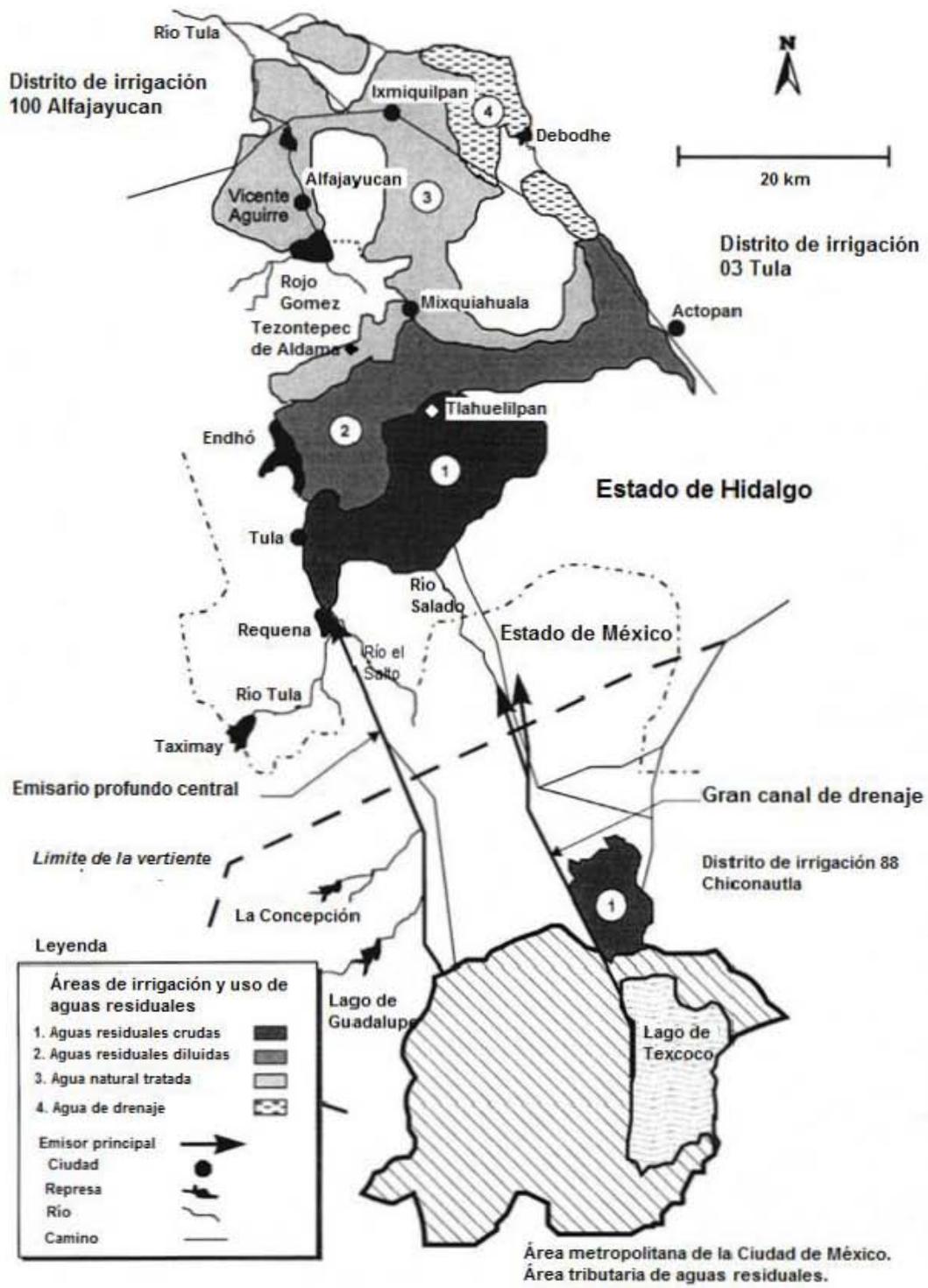


Fig. 3. Mapa del sistema de irrigación con aguas residuales en el Valle del Mezquital, México. Modificado de (Romero-Alvarez, 1997).

En el Valle del Mezquital los principales cultivos son alfalfa, maíz, trigo, avena, frijol, jitomate y chile también hay una producción pequeña pero importante de cultivos restringidos en la parte inferior del Valle (Distrito 100) que incluye lechuga, repollo, cilantro, rábano, zanahoria, betabel, espinaca y perejil. Esta restricción de cultivos forma parte de la política de manejo de reúso de aguas residuales con medidas preventivas para salvaguardar la salud (Romero-Alvarez, 1997).

## 2.4 Hortalizas

Las hortalizas son un conjunto de plantas cultivadas generalmente en huertas o regadíos que se consumen como alimento, ya sea de forma cruda o cocida. El término hortaliza incluye a las verduras y a las legumbres verdes. Las principales son: Acelga, ajo, alcachofa, apio, berenjena, brócoli, calabacín, calabaza, cebolla, champiñón, chícharo, col, coliflor, endibia, escarola, espárrago, espinaca, haba, frijol, lechuga, nabo, papa, pepino, perejil, pimiento, rábano, tomate y zanahoria (Rozano *et al.*, 2004).

Son elementos básicos en toda canasta básica familiar, la OMS recomienda un consumo de 400 gr/cápita/día, diversos estudios muestran el impacto potencial del aumento de la ingesta de frutas y verduras como medida de reducción de la incidencia de numerosas enfermedades no transmisibles que provocan aproximadamente 28 millones de muertes cada año (Pantoja *et al.*, 2011).

Éstas son una fuente fundamental de fibra, vitaminas y minerales en la alimentación humana (Saavedra, 2013). Se cultivan y recolectan en una gran variedad de condiciones climáticas y geográficas diversas, utilizando distintos insumos y tecnologías agrícolas y en explotaciones agrícolas de diferentes dimensiones. Por lo tanto, los peligros biológicos, químicos y físicos pueden variar considerablemente de un tipo de producción a otro (FAO, 2003).

### 2.4.1 Betabel

Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Caryophyllales
Familia:	Amaranthaceae
Subfamilia:	Chenopodioideae
Género:	<i>Beta</i>
Especie	<i>B. vulgaris</i>
Subespecie	<i>Beta vulgaris ssp. vulgaris</i>

Betabel o remolacha (Fig. 4), es originaria de las costas europeas y en México se encuentra como planta ruderal en suelos salinos (CONABIO, 2009), normalmente es una especie bienal, sin embargo, bajo ciertas condiciones puede actuar como una planta anual (Smith, 1987).



Fig. 4. Betabel también conocido como remolacha (Ecomallaray, 2012).

En la primera etapa de crecimiento se desarrolla una raíz blanca y carnosa, prominentemente hinchada en la unión del tallo (Duke, 1983). Tiene una raíz engrosada, de diferentes tamaños, formas y colores (Sotelo y Velázquez 1995), su madurez es durante el primer año (Smith, 1987).

En la segunda temporada de crecimiento, la etapa reproductiva, el tallo de floración se alarga (pernos) de la raíz. Este tallo de semillas forma una inflorescencia y aumenta aproximadamente 1.2 a 1.8 metros de altura (Duke, 1983).

Durante la etapa vegetativa las hojas son glabras con formas cordadas a ovadas y de color verde oscuro, constituyen una roseta de un tallo subterráneo (Duke, 1983). En la etapa reproductiva se desarrolla una hoja petiácea en la base del tallo con hojas pequeñas, más arriba del tallo surgen un menor número de hojas pecioladas, finalmente se constituyen

hojas sésiles. En las axilas de las hojas, los brotes secundarios se desarrollan formando una serie de racimos indeterminados (Forster *et al.*, 1997).

Las flores son verduzcas, se encuentran en grandes panículas de espigas más o menos abiertas, son pequeñas, sésiles y se presentan de forma individual o en grupos, producen una flor perfecta que consiste en un pistilo con tres carpelos rodeado de cinco estambres y un perianto de cinco sépalos estrechos. Los pétalos están ausentes y cada flor está subtendida por una esbelta bráctea verde debajo del cáliz incurvado, el ovario está hundido en un disco o hipantio (Smith, 1987; Sotelo y Velázquez, 1995). Las flores llegan a la antesis 5 a 6 semanas después del inicio del desarrollo reproductivo, la antesis continúa por un periodo de varias semanas después de la dehiscencia de las anteras maduras.

El ovario integra un grupo que está incrustado en la base del perianto de la flor. Cada fruta contiene una sola semilla cuya apariencia varía de redonda a arriñonada. Los ovarios están rodeados de un receptáculo común de un grupo de flores (Duke, 1983). La semilla de betabel multigérmica está compuesta por la agregación de dos o más flores (Cooke y Scott, 1993). Los frutos son agregados, constituidos por la unión de 2 o más flores, creciendo conjuntamente en sus bases y moldeando un cuerpo seco muy irregular (Sotelo y Velázquez 1995).

Cada semilla está cubierta por una testa dura formada por el alargamiento del disco y del cáliz (Sotelo y Velázquez 1995) que se desarrolla durante el segundo año, para su producción se requiere un periodo de hibernación de temperaturas frías de 4 a 7 °C (vernalización) para que la raíz se frene en la próxima temporada de crecimiento y se inicie la etapa reproductiva (Smith, 1987).

### 2.4.2 Coliflor

Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Brassicales
Familia:	Brassicaceae
Género:	Brassica
Especie	<i>B. Oleracea</i>
Subespecie	<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>Botrytis</i>

La Coliflor (Fig. 5) se caracteriza fundamentalmente por su corazón o su cogollo formado por una inflorescencia constituida por numerosas flores no desarrolladas que se unen alrededor de un eje central (Vigliola, 1996; Pinto, 2013). Presenta un bajo contenido en calorías, el cual depende de la variedad empleada y de las condiciones de cultivo. Sin embargo, son ricas en minerales y presentan elevados contenidos en glucosinolatos, especialmente isotiocianato de alilo y butilo y/o vinil-tio-oxalina (Rozano *et al.*, 2004).



Fig. 5. Coliflor, tomado de (Laserma, 2015).

La raíz se encuentra a una profundidad de 30 a 50 cm, es pivotante y con ramificaciones, puede llegar a crecer hasta 80 cm de profundidad, lo que explica su relativa resistencia a la sequía (Valadez, 1996) con zona de radículas amplia que le permite un buen anclaje y alta capacidad de absorción de agua y nutrientes. Se adapta a casi cualquier tipo de suelo, pero como todos los vegetales, prefiere suelos no muy ligeros, uniformes, profundos con buen drenaje y con un pH de 6 a 7.5 (Vigliola, 1996).

Posee tallos cortos, carnosos y gruesos que emergen de axilas foliares formando inflorescencias, generalmente una central de mayor tamaño y otras laterales (Pinto, 2013). Posee un tejido medular que experimenta un fuerte crecimiento primario en grosor al crecimiento en longitud (Seymour, 1997).

Los colores de las hojas de coliflor van desde verde azulado, al verde oscuro, su forma puede ser lanceolada o redondeada según las variedades, a veces aparecen algunas con los bordes de limbo brisado (Zapata, 2008) y festoneadas con un largo pecíolo, con los nervios marcados especialmente en el envés y cubierta de cera (Pinto, 2013).

Las flores son amarillas blanquecinas, se agrupan en racimos formados a partir del tallo principal y de sus ramificaciones durante la diferenciación floral se desarrolla sucesivamente 4 sépalos erectos sin estambres, 2 carpelos y 4 pétalos disponiéndose sobre los pedicelos a lo largo del pedúnculo de la inflorescencia (Seymour, 1997).

El fruto corresponde a una silicua dehiscente y glabra de color amarillento de 7 a 10 cm de largo x 4 a 5 cm de ancho, contiene 20 semillas por lóculo (Pinto, 2013).

Las semillas son redondeadas 2 mm de diámetro, de color negro o rojizo (Aucancela y Apugllón, 2013).

### 2.4.3 Rábano

Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Brassicales
Familia:	Brassicaceae
Género:	<i>Raphanus</i>
Especie	<i>Raphanus sativus</i> L.

El rábano (Fig. 6.) es una hortaliza de raíz, el origen de los rábanos es incierto pero parece ser que las variedades de rábanos de pequeño tamaño se originaron en la región mediterránea, mientras que los grandes rábanos pudieron originarse en Japón o China. Son plantas anuales o bienales. Cumple con todas las características de un buen bioindicador, aunque es una planta mayormente conocida por su importancia económica (Kostka-Rick y Manning, 1993).



Fig.6. *Raphanus sativus* L. (ASOCAE, 2017).

Raíz carnosa, pivotante profunda (CONABIO, 2009), ligeramente alargada, pequeña o gruesa, rosada, roja o negruzca según las variedades (García, 1992), presenta escaso crecimiento radicular, pueden encontrarse a una profundidad de 5 a 25 cm durante la etapa del desarrollo vegetativo, las raíces tuberosas se crecen a partir de la parte superior de la raíz y del hipocótilo (Laserma *et al.*, 2015).

Durante la etapa vegetativa, el tallo puede ser corto, con hojas que forman roseta o corona; llega a medir entre 80 y 120 cm de altura. Puede ser cilíndrico o anguloso, de color verde y pubescente (Laserma *et al.*, 2015). Liso y glabro o algo hispido, ampliamente ramificado.

Las hojas son imparapinadas, de peciolo largo y ovalado, de borde dentado y ápice más grande (CONABIO, 2009), finamente pubescentes con bordes irregulares dentados. Hojas de la roseta hasta 24 cm de largo por 12 cm de ancho, largamente espatuladas u oblondas, pinnatífidas hasta pinnatisectas, presentan un lóbulo terminal grande y ancho, lóbulos laterales más pequeños ovados u oblongos; hojas caulinares enteras, lanceoladas (Laserma *et al.*, 2015).

Inflorescencia en racimo terminal, flores de 2 a 2.2 cm de diámetro, con pétalos de 11 a 20 mm de largo, violáceos a rosados a blancos, con nervaduras conspicuas de color más oscuro, luego de la fecundación los pétalos pierden su color tornándose casi blancos (CONABIO, 2009)

Silículas indehiscentes, glabras, gruesas, con varias nervaduras longitudinales, carnosas, cilíndrico-lanceoladas u oblongo.cónicas, no presentan contracciones transversales o muy ligeras entre semillas, atenuadas ligeramente hacia el ápice, de 3 a 8 cm de largo por 5 a 10 mm de diámetro, con 2 a tres semillas por fruto (CONABIO, 2009).

Semillas globosas, opacas, rojizo u ocráceas a café rojizas, finamente reticuladas, de aproximadamente 3 a 3.3 mm de diámetro (CONABIO, 2009). Si se respetan las condiciones de almacenamiento pueden tener una viabilidad por 3 ó 4 años (Laserma *et al.*, 2015).

## ***2.5 Sistemas biológicos de prueba***

Las herramientas comúnmente utilizadas para evaluar la contaminación en aguas residuales se basan en análisis fisicoquímicos como pH, oxígeno disuelto, demanda biológica de oxígeno, demanda química de oxígeno, carbono orgánico total y sólidos en suspensión (Tothill y Turner, 1996; Párvez *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2007), sin embargo, no reflejan los efectos biológicos que la contaminación puede causar en animales, plantas y seres humanos. Por lo que los ensayos biológicos son una buena alternativa para evaluar tales efectos (Movahedian *et al.*, 2005; Bayo *et al.*, 2009).

Los ensayos biológicos o bioensayos son herramientas de diagnóstico adecuadas para determinar el efecto de agentes físicos y químicos sobre organismos de prueba bajo condiciones experimentales específicas y controladas (Dias-Baes, 2004). A estos organismos se les denomina sistemas biológicos de prueba, los cuales presentan alguna respuesta a niveles peligrosos de cualquier sustancia o mezcla compleja de agentes tóxicos presentes.

A la fecha no existen herramientas analíticas ni instrumentales para medir toxicidad. Es sólo mediante el uso de organismos vivos que se puede estimar los efectos de los contaminantes en los sistemas biológicos (Zakrzewski, 1991; Newman y Jagoe, 1996). En los últimos 20-25 años se han desarrollado más de 200 bioensayos a corto plazo que utilizan como sistemas biológicos de prueba a microorganismos, insectos y plantas, con el fin de ayudar a la identificación de agentes que presentan riesgos genéticos para el ser humano (Waters *et al.*, 1988). Además, estos bioensayos pueden auxiliar en la evaluación de los efectos a la salud y ecológicos de millares de sustancias tóxicas que son introducidas por varias vías en el ambiente y permiten su aplicación en programas de monitoreo en la evaluación de la toxicidad (CETESB, 1991).

La elección de un sistema biológico de prueba adecuado para un bioensayo depende del efecto que se desea evaluar y de las características del organismo. En las últimas décadas, se han desarrollado bioensayos rápidos con el empleo de plantas en la evaluación de sustancias tóxicas y muestras ambientales (Reynaldo *et al.*, 2000). Los cuales están siendo considerados, de manera creciente, para el diagnóstico eco toxicológico, ya que constituyen una excelente herramienta en la evaluación de riesgo ambiental. Estos ensayos representan una metodología ventajosa al brindar información acerca de alguna sustancia que resulte tóxica en el medio, es decir algún agente que pueda producir un efecto adverso en el sistema biológico, dañar su estructura o función, o producir la muerte (Paggi y de Paggi, 2000).

Los ensayos biológicos permiten determinar la toxicidad de agentes físicos y químicos sobre los organismos de prueba, bajo condiciones experimentales específicas y controladas. La toxicidad o capacidad de una sustancia de generar un efecto nocivo en un organismo vivo, estará condicionada a sus características fisicoquímicas, así como a la concentración, frecuencia y tiempo de exposición (aguda, subcrónica, crónica). Los efectos adversos en un individuo pueden ser tanto de inhibición como de incremento, generando desde la muerte de un individuo o produciendo gran diversidad de respuestas a distintos niveles de la organización biológica. Que van desde alteraciones bioquímicas y celulares, incluyendo genotoxicidad y disrupciones endócrinas, alteraciones a nivel morfológico y fisiológico, efectos en el crecimiento, además de alteraciones en parámetros poblacionales (Dutka, 1989; Boutin *et al.*, 1993).

Los bioensayos en plantas son pruebas importantes que ayudan a detectar la contaminación genotóxica en el ambiente. Las plantas usadas como sistemas de prueba pueden proporcionar información sobre una amplia gama de daños genéticos, incluidas mutaciones genéticas y aberraciones cromosómicas. La evaluación de genotoxicidad en raíces de plantas como *Vicia faba*, *Nicotiana tabacum* y *Allium cepa*, se han llevado a cabo ampliamente. Durante la última década, el ensayo cometa en plantas se ha aplicado extensivamente para detectar daños en el ADN que surgen debido a la radiación química y metales pesados en suelos contaminados (Bajpayee *et al.*, 2016).

## ***2.6 Las plantas como monitores de contaminación ambiental***

Aunque las mediciones de contaminantes por métodos fisicoquímicos son importantes, no permiten obtener conclusiones sobre los efectos que las concentraciones de contaminantes tienen sobre los seres vivos. Para ello, se utilizan los llamados bioindicadores, que complementan a los citados métodos fisicoquímicos y aportan información sobre los efectos de la contaminación sobre los organismos (Klumpp *et al.*, 2004).

Los ensayos con plantas son únicos en el sentido de que pueden emplearse para evaluar la genotoxicidad de los agentes en un amplio rango de condiciones ambientales que incluyen monitoreo *in situ* (Sandhu y Lower, 1989). Las plantas tienen una relación muy estrecha con su entorno: mientras que los animales y el hombre pueden movilizarse para buscar condiciones favorables para su supervivencia, las plantas se hallan sujetas a un sustrato y espacio determinado cuyos cambios las afectan directamente (Barceló y Poschenrieder, 1989), son base de la cadena alimenticia y muy sensibles a las variaciones del medio. También reaccionan más rápido ante la presencia de contaminantes que otros organismos, lo que las convierte en elementos idóneos para el monitoreo de la contaminación (Dutka, 1989; Ferrat *et al.*, 2003; Gianazza *et al.*, 2007). Tienen la ventaja de poner en evidencia signos tempranos del daño causado por el contaminante y, por tanto, pueden ser utilizados como señales de alarma anticipada de la presencia de contaminantes químicos (Livingstone, 1993; Melacon, 1995; Reyes, 1999; Ferrat *et al.*, 2003; Bozo *et al.*, 2007).

Las plantas vasculares han sido recomendadas por la Agencia de Protección Ambiental (EPA) y por la Administración de Drogas y Alimentos (FDA) ambas de EUA, debido a su alta sensibilidad, en comparación con otras especies de plantas terrestres (Wang, 1991). Como parte integral del ecosistema, son ampliamente empleadas por ser organismos eucarióticos y por lo tanto comparables a la mayoría de las especies de flora y fauna (Fiskesjö, 1993), han sido utilizadas para la diagnosis y/o predicción de las consecuencias negativas de las actividades antropogénicas (Pernia, 2008). Son buenos bioindicadores porque juegan un papel importante en la transferencia de la cadena alimenticia, son fáciles de cultivar y adaptables al estrés ambiental además reflejan daño tóxico en otros organismos, como los animales (Minissi y Lombi, 1997).

El uso de plantas en los bioensayos tiene ventajas sobre el empleo de otros modelos biológicos, en la evaluación y monitoreo de contaminación ambiental, estas ventajas se enlistan a continuación de acuerdo a Grant (1993)

1. Las plantas superiores son eucariotas, tienen cromosomas con una estructura similar a los del ser humano. Sufren mitosis y meiosis además de mutaciones. Es posible estudiar efectos en células germinales comparables a los animales.
2. Son fáciles de cultivar y poco costosas para trabajar.
3. Algunas tienen tiempos de generación cortos (*Arabidopsis*).
4. Los ensayos pueden ser llevados a cabo bajo un amplio rango de condiciones ambientales, de pH y temperatura. Las plantas superiores pueden ser regeneradas a partir de células individuales haploides y diploides.
5. Los ensayos genéticos en plantas superiores pueden ser usados para evaluar la genotoxicidad de compuestos químicos solos o de mezclas complejas.
6. Existe un amplio rango de biomarcadores genéticos. Alteraciones citológicas y mutaciones, en plantas completas, hojas, embriones, polen, etc.
7. Pueden ser utilizados para el monitoreo *in situ* de contaminantes mutagénicos.
8. Son muy confiables, han demostrado su utilidad en mutagénesis.
9. Están disponibles evaluaciones de genotoxicidad para diferentes compuestos químicos así que pueden hacerse comparaciones entre distintos ensayos.
10. Estudios han mostrado correlación positiva con ensayos citogenéticos en mamíferos.
11. Pueden ser combinadas con ensayos microbianos para detectar intermediarios metabolitos mutagénicos (promutágenos).
12. Son muy sensibles (pocos falsos negativos) en la predicción de carcinogenicidad de agentes evaluados.
13. Se pueden monitorear cientos de *loci* genéticos.

## ***2.7 Electroforesis de células individuales***

La electroforesis alcalina de células individuales embebidas en microgel, mejor conocido como ensayo cometa, es un método óptimo para detectar daño genotóxico en diversos organismos. Puede ser capaz de detectar muchas clases de daño en una gran variedad de células en un amplio rango de organismos, ya que proporciona datos a nivel de células individuales al ser sensible rápido y rentable (Tice *et al.*, 1995). Además, el ensayo es utilizado para detectar el daño acumulado que producen en el DNA una serie de agentes contaminantes denominados genotóxicos (Rajaguru *et al.*, 2003; Andrade *et al.*, 2004; Egito *et al.*, 2010; Liman *et al.*, 2011; Mohaty *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011). Este ensayo se aplica a cualquier tipo celular, eucariota, para medir rupturas de cadena sencilla y de cadena doble de DNA además de sitios lábiles a álcali, también es considerado como un ensayo indicador para detectar lesiones premutagénicas (Hartmann *et al.*, 2003).

Östling y Johanson (1984) fueron los primeros en desarrollar la técnica de electroforesis en microgel para visualizar directamente el daño al DNA en los núcleos de células individuales. En esta técnica las células embebidas en agarosa se colocaron en un portaobjetos, se lisaron con detergentes y altas concentraciones de sal, posteriormente el DNA libre se sometió a una electroforesis en condiciones neutras. Años después en 1988, Singh y colaboradores desarrollaron una mejora significativa de estos ensayos, realizando la electroforesis bajo condiciones alcalinas.

El ensayo cometa se basa en el hecho de que el DNA en condiciones normales se encuentra enrollado en el núcleo, mientras que al estar dañado o roto y ser sometido a un campo electromagnético, éste migrará más que un DNA sin daño. En condiciones alcalinas (pH mayor a 13) la técnica es capaz de evidenciar rompimientos de una sola hebra, sitios retardados de reparación y sitios álcali lábiles; mientras que a un pH neutro, la técnica es capaz de evidenciar rompimientos de doble hebra en el ADN (Rojas, *et al.*, 1999; Corona *et al.*, 2008). Debido a su capacidad de relajar el súper enrollamiento del DNA, las rupturas del DNA permiten que éste migre fuera del núcleo bajo la influencia de un campo eléctrico. De esta forma se crea una imagen similar a un cometa con cola (Albertini *et al.*, 2000; Tice *et al.*, 2000; Hartmann *et al.*, 2004; Collins, 2011).

La lisis con detergentes y altas concentraciones de sales a pH 10 elimina el contenido de la célula excepto el material nuclear. El DNA permanece súper enrollado en presencia de proteínas no histonas, pero cuando ésta se coloca en solución alcalina, comienza a desenrollarse en los sitios de la ruptura de la hebra. Las células con más daño en el DNA muestran mayor migración de este desde el núcleo hacia el ánodo bajo una corriente eléctrica, dando la apariencia de la cola de un cometa (Rojas *et al.*, 1999).

Las ventajas relativas del uso del ensayo cometa sobre la prueba convencional de aberraciones cromosómicas, micronúcleos e intercambio de cromátidas hermanas son que el primero es muy sensible para detectar niveles bajos de daño en el DNA, el requerimiento de un pequeño número de células o muestra de núcleos, su flexibilidad, bajo costo, fácil aplicación y corto tiempo para completar su estudio (Tice *et al.*, 2000).

Una aplicación útil de la versión alcalina del ensayo cometa es en el área de la genotoxicología, un gran número de investigadores han usado esta versión para evaluar *in vivo* o *in vitro* genotoxicidad de varios productos químicos. La variedad de células normales y transformadas incluidas las humanas, animales y de plantas han sido empleadas para estudios *in vitro* (Rojas *et al.*, 1999).

Los protocolos del ensayo cometa para plantas y animales difieren debido a la presencia de la pared celular de la planta formada por celulosa, mientras que las células animales pueden aislarse mediante lisis con altas concentraciones de sal y detergentes, que generan estructuras similares a los núcleos (nucleoides) con supuesta pérdida de proteínas histonas protectoras y componentes nucleares no asociados con el DNA. Los núcleos de las plantas no pueden tratarse de esta manera, deben aislarse mediante la formación de protoplastos o de manera mecánica (Moller, 2005; Gichner *et al.*, 2016).

En la metodología para la formación de protoplastos (es decir, células de plantas con pared celular eliminada) se utilizan enzimas tales como celulasa y pectinasa, la pared celular de la planta se digiere y los protoplastos se suspenden en agarosa sobre portaobjetos, posteriormente estas laminillas se sumergen en una solución de lisis (Sun *et al.*, 1999; Zhou

*et al.*, 1999; Lesniewska *et al.*, 2000; Hao *et al.*, 2004; Abas *et al.*, 2007; Jiang *et al.*, 2007). El aislamiento de los núcleos a través de protoplastos es costoso, consume tiempo y, actualmente se usa rara vez. Además de que no se recomienda para estudios de toxicidad (Gichner *et al.*, 2016).

De manera mecánica los núcleos de una suspensión de células vegetales se pueden aislar agitando suavemente 400 mg de células en 100 mg de arena de mar lavada y 500  $\mu$ L de amortiguador salino de fosfatos 0.4 M, pH=10, frío, en un tubo de microcentrifuga Después de que la arena se deposita en el fondo del tubo la mezcla se pasa por un filtro de 53  $\mu$ m. Los núcleos pasan a través del filtro y se recogen en un microtubo sobre hielo (Stavreva *et al.*, 1998; Stavreva y Gichner, 2002).

Los núcleos de hoja o raíz también se pueden aislar cortando suavemente un pequeño trozo de hoja o raíz con una navaja de bisturí nueva. Este procedimiento se realiza en hielo en una caja Petri con 320  $\mu$ L de amortiguador 0.4 M Tris-HCl, pH=7. La pared celular se rompe mecánicamente con los cortes por lo que los núcleos quedan libres. La caja Petri se mantiene inclinada en hielo para que los núcleos aislados se acumulen por gravedad en el fondo (Gichner *et al.*, 2016).

### 3 JUSTIFICACIÓN

Una de las prácticas más comunes de disposición final de las aguas residuales domésticas ha sido el empleo directo sin tratamiento en los cuerpos de agua superficiales y en el suelo (Mara, 1996). El Valle del Mezquital es una zona árida donde gracias a las aguas negras de la Ciudad de México se ha dado paso al cultivo de alfalfa, maíz, cebada, trigo, sorgo, avena y hortalizas (Miranda y Mejía, 2004). Sin embargo, estas aguas además de materia orgánica llevan también gran cantidad de contaminantes emergentes, metales pesados entre otros compuestos tóxicos que constituyen un riesgo para la salud, tanto de los agricultores como de los consumidores de productos agrícolas (Romero-Alvarez, 1997; Arbeláez, 2015). Muchos de estos contaminantes no pueden ser degradados o destruidos fácilmente de forma natural o biológica ya que no tienen funciones metabólicas específicas en los seres vivos (Abollino *et al.*, 2002). Estos agentes son causantes de daño genotóxico en células eucariotas. Por tales razones se justifica realizar una evaluación genotóxica de las hortalizas irrigadas con estas aguas, utilizando el ensayo cometa, para probar si los contaminantes de la presa afectan a las hortalizas no solo haciéndolas portadoras de enfermedades, sino también dañando su material genético.

## 4 OBJETIVO

Determinar mediante electroforesis unicelular alcalina, si las aguas negras provenientes de la Ciudad de México tienen efecto genotóxico sobre el DNA foliar de las hortalizas: *Beta vulgaris ssp. vulgaris* L., *Brassica oleracea* L. y *Raphanus sativus* L. (betabel, coliflor y rábano, respectivamente) irrigadas con aquellas en la localidad de Tlahuelipan Hidalgo, usando como testigo las mismas hortalizas, con riego de agua de manantial en la localidad de Tezontepec de Aldama, Hidalgo. Ambas localidades pertenecientes al Valle del Mezquital.

## **5 HIPÓTESIS**

Dado que las aguas residuales de la Ciudad de México contienen altos niveles de contaminantes genotóxicos, se espera encontrar daño al DNA en las hortalizas: betabel, coliflor y rábano irrigadas con éstas, usando el ensayo cometa o electroforesis unicelular.

## 6 MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Muestreo

La colecta de las hortalizas se realizó en parcelas de dos comunidades diferentes pertenecientes al Valle del Mezquital, Hidalgo: Tlahuelilpan, riego por inundación de aguas negras (Fig.7) y Tezontepec de Aldama, riego por inundación de aguas blancas (Fig.8). Se colectaron 5 ejemplares sanos de *Beta vulgaris ssp. vulgaris* L. (betabel, ubicado en las coordenadas 20.12°54'8" -99.24°07'3" riego con aguas negras y 20.19°63'5" -99.28°08'2" riego con aguas blancas), *Brassica oleracea* var. *Botrys* L. (Coliflor localizada en 20.12°61'8" -99.24°19'8" riego con aguas blancas y 20.19°60'3" -99.28°15'6" riego con aguas negras) y *Raphanus raphanistrum ssp. sativus* (rábano en las coordenadas 20.12°65'1" -99.24°13'6" riego con aguas blancas y 20.19°76'6" -99.28°02'9" riego con aguas negras) por cada localidad (Fig. 9). Cada planta se colocó en una maceta con la tierra en la que se encontraba plantada, se trasladaron al Centro de Ciencias de la Atmosfera. Debido al estrés que sufren las plantas al ser trasplantadas a las macetas, se les dejó reposar dos días en las macetas para su aclimatación.



Fig. 7. Riego por inundación de aguas negras en Tlahuelilpan.



Fig. 8. Riego por inundación de aguas blancas en Tezontepec de Aldama.



Fig. 9. Colecta del material biológico.

## ***6.2 Ensayo cometa***

### ***6.2.1 Preparativos previos***

Antes de realizar cada ensayo se cubrieron portaobjetos esmerilados con 50  $\mu$ L de agarosa de punto de fusión normal al 1% disuelta y fundida en agua desionizada. Tres portaobjetos por cada planta. Se prepararon las soluciones; de lisis a pH 10 (NaCl 2.5 mM, EDTA 100 mM, Tris 10 mM, NaOH 10 mM, DMSO 10% y Tritón X-100 al 1%), de electroforesis a pH  $\leq$ 13 (NaOH 10 mM, EDTA 200 mM), Tris a pH 7.5 (Tris 0.4 mM), amortiguador salino

de fosfatos (PBS por sus siglas en inglés Phosphate Buffered Saline) a pH= 7.4. Se disolvieron en agua desionizada y se guardaron a 4°C para mantenerlas sin alteraciones. Se prepararon agarosas con punto de fusión bajo al 1% y al 0.5% disueltas en PBS. También se cortó la punta de la micropipeta con el fin de proporcionar orificios en los que las células pasaran sin ninguna dificultad. Se colocaron en tubos eppendorf 50 µL de agarosa de punto de fusión bajo al 1%.

Una vez que las plantas pasaron el tiempo de adecuación, se seleccionaron tres hojas sanas de cada individuo con riego de aguas negras y con riego de aguas blancas por cada hortaliza; betabel, coliflor y rábano, se lavaron cuidadosamente con agua destilada, se dejaron secar y se sumergieron en PBS. A partir de ese momento todo el ensayo se realizó en oscuridad.

### 6.2.2 *Aislamiento de núcleos*

Con ayuda de un bisturí se realizaron de 15 a 20 cortes finos perpendiculares a la vena media de cada hoja, en cajas Petri con 500 µL de PBS frío, colocadas sobre placas de hielo. Estos cortes permiten la liberación de las células que se precipitan al fondo de la caja Petri al dejarlas reposar durante 10 minutos. Se tomaron 50 µL de la suspensión y se mezclaron cuidadosamente en un tubo eppendorf con 50 µL de agarosa de punto de fusión bajo al 1%; se tomaron 80 µL de la mezcla, se gotearon en un cubreobjetos y se colocó el portaobjetos previamente cubierto con agarosa sin permitir la formación de burbujas. Una vez adherido se colocó sobre una placa fría hasta que la agarosa tomo una consistencia sólida. Posteriormente se retiró cuidadosamente el cubreobjetos y se repitió el procedimiento para agregar una tercera capa con 80µL de agarosa de punto de fusión bajo al 0.5%, (Fig. 10). Se Repitió el proceso, a partir de la toma de suspensión de células, dos veces más para obtener tres muestras embebidas en agarosa, por cada planta.



#### 6.2.4 *Pre-electroforesis y electroforesis*

Las laminillas se colocaron horizontalmente en una cámara de electroforesis con la parte esmerilada orientada hacia el cátodo, se incubó durante 20 minutos en el amortiguador de electroforesis  $\text{pH} \leq 13$ . Este paso permite que la agarosa quede libre de la solución de lisis y que debido a la alta alcalinidad los puentes de hidrogeno se rompan entre los pares de bases de la doble hélice del DNA, ocasionando un desenrollamiento de la hebra. Finalizado el tiempo de incubación, la electroforesis corrió a 25 V y 300 mA, durante 20 minutos a 4 °C. Los fragmentos de DNA, al tener carga positiva dada por los grupos fosfato son atraídos hacia el polo positivo y migran hacia el ánodo.

Al terminar la electroforesis las preparaciones se neutralizaron sumergiéndolas en una caja con fondo plano horizontales con Tris  $\text{pH}=7.5$  durante 5 minutos (tres veces). Posteriormente, se fijaron con etanol al 100% frío, en cajas copling verticales, durante 15 minutos y se dejaron secar al aire (Fig. 12).



Fig. 12. Electroforesis, lavado de laminillas con Tris y fijación de estas en etanol.

### 6.2.5 Tinción y observación

La tinción se realizó con 50  $\mu$ L de bromuro de etidio (1mg/ml). Las laminillas teñidas se colocaron en un recipiente oscuro, con toallas de papel previamente humedecidas con agua filtrada. Fueron observadas en el microscopio de fluorescencia Axiostar Plus (Zeiss) cuyo filtro de excitación es de 515-560 nm y filtro barrera de 590 nm, acoplado al programa de análisis de imágenes “Comet Assay IV”. Con un objetivo de 40x se contaron al azar 50 núcleos por cada laminilla haciendo un total de 150 núcleos por muestra (Fig. 13). Las laminillas fueron reetiquetadas para evitar prejuicio del observador.



Fig. 13. Tinción con bromuro de etidio, observación en microscopio de fluorescencia y cometas a 40x.

### 6.3 Análisis estadístico

Se tomó en cuenta el momento de la cauda ya que combina la longitud y la intensidad de la cauda, cabe mencionar que los valores que da el programa “Comet Assay IV” son unidades arbitrarias (UA), de este modo se obtiene un valor más acertado de las rupturas que presenta cada núcleo. Se calcularon la media, error estándar y se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de 2 vías con una  $p < 0.05$ , ya que se tomaron en cuenta dos variables: las tres especies de hortaliza (betabel coliflor y rábano) y la exposición de las plantas, aguas negras y aguas blancas. A su vez se realizó una prueba de comparación múltiple de Dunnett con una  $p < 0.05$ .

## 7 RESULTADOS

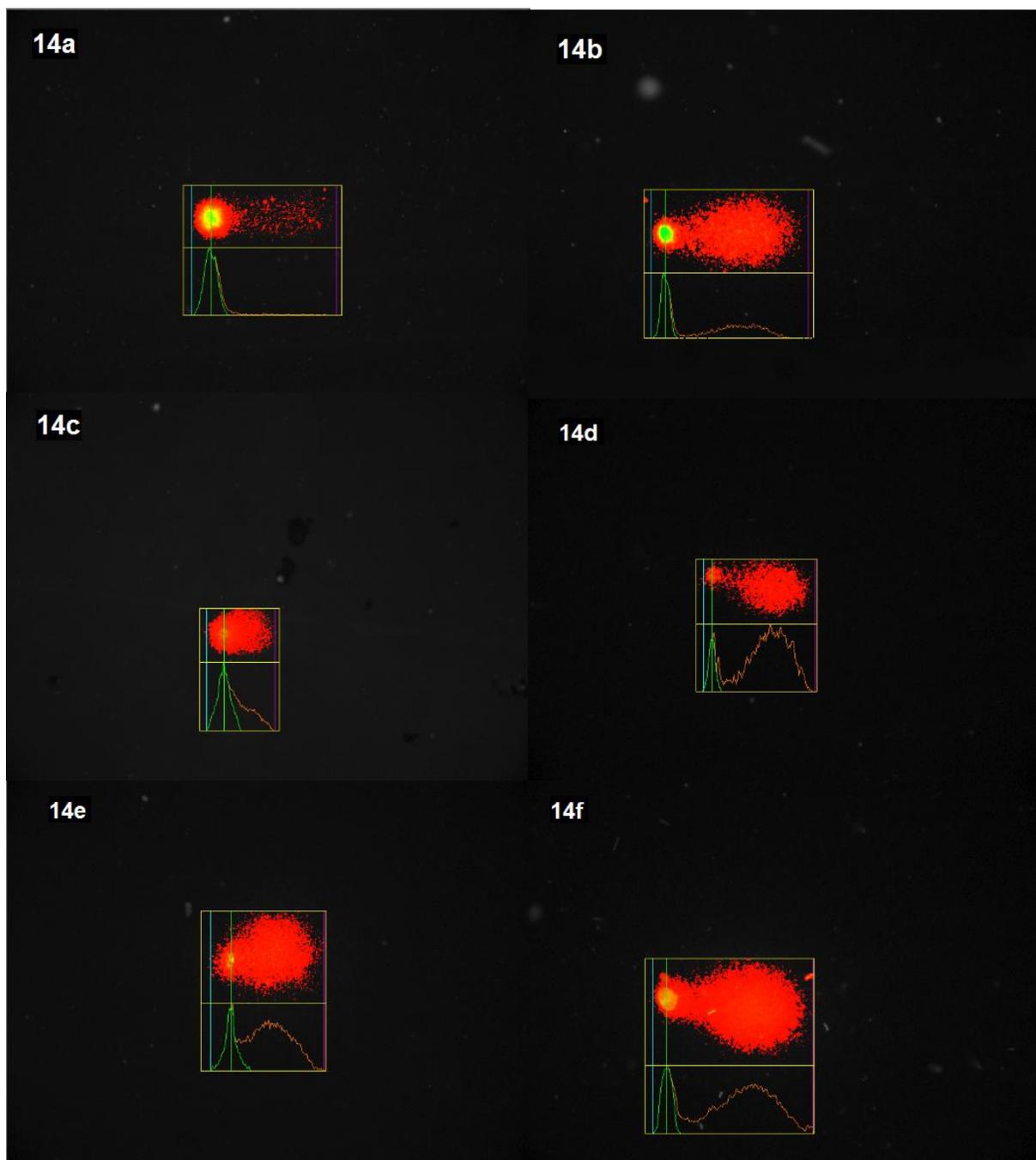


Fig. 14. Núcleos de betabel 14a y 14b; coliflor 14c y 14d; y rábano 14e y 14f, en el programa de análisis de imagen Comet assay IV a 40X. 14a, 14c y 14e corresponden a riego con aguas de manantial ;14b, 14d y 14f a riego con aguas negras, N=150 núcleos analizados.

En la Fig. 14, se muestran imágenes de los núcleos de las hortalizas estudiadas, generadas por el programa Comet Assay IV. En las Figs.14a, 14c, 14e se encuentran los núcleos de las plantas cultivadas con riego de aguas blancas, en las Figs. 14b, 14d, 14f se muestran las cultivadas con riego de aguas negras, las imágenes 14a y 14b; 14c y 14d; 14e y 14f corresponden a betabel, coliflor y rábano, respectivamente. En estas imágenes se aprecia la migración del DNA fragmentado.

En la tabla 1 se muestra el promedio del momento de la cauda de 150 núcleos representativos del total de la población muestreada.

Tabla 1. Daño al DNA inducido por aguas negras en hortalizas del Valle del Mezquital.

	Momento de la cauda Aguas Blancas	Momento de la cauda Aguas Negras
	<b>Media ± EE</b>	<b>Media ± EE</b>
<b>Betabel</b>	<b>3.88 ± 0.45</b>	<b>21.69 ± 0.76 ****</b>
<b>Coliflor</b>	<b>5.54 ± 0.33</b>	<b>28.90 ± 0.33****</b>
<b>Rábano</b>	<b>19.16 ± 0.70</b>	<b>33.67 ± 1.13****</b>

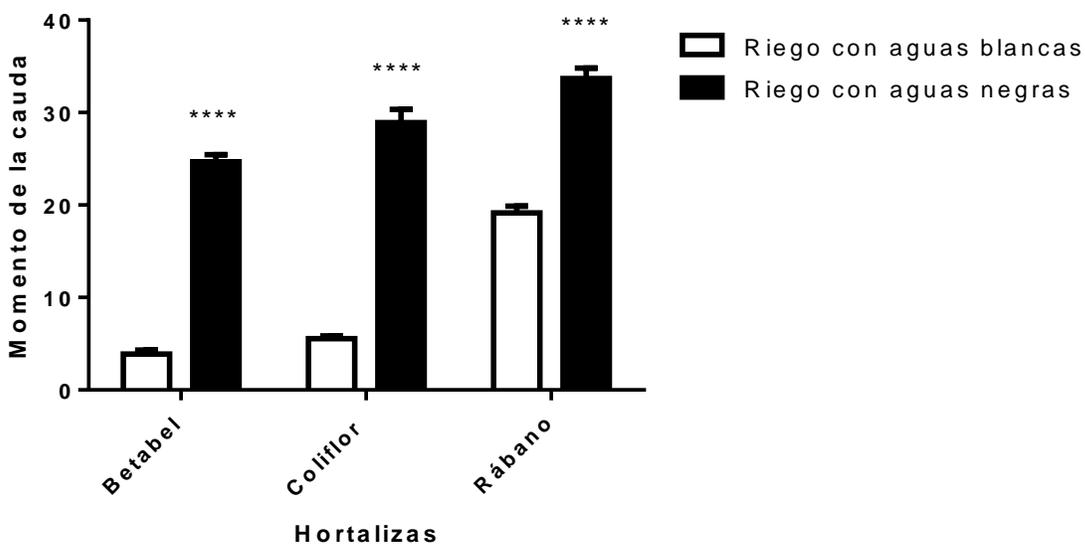


Fig. 15. Daño al DNA inducido por aguas negras en hortalizas del Valle del Mezquital. (Prueba Dunnet de comparación múltiple entre las dos variables de riego \*p<0.05 significativo).

La Fig. 15 muestra el promedio del momento de la cauda  $\pm$  error estándar, de las variables HRAB y HRAN, estudiadas. Cada planta reaccionó de manera diferente al tipo de riego en la que creció. En el caso del betabel el agua residual resultó ser 5.5 veces más genotóxico que el riego con agua de manantial, en la coliflor fue 5.2 veces más genotóxico y en rábano el agua residual causó 1.7 veces más daño en comparación con el agua blanca.

La sensibilidad de las especies es variada. La prueba de comparación múltiple de Dunnett indicó que el betabel y la coliflor no presentan una diferencia significativa entre los testigos, sin embargo, si se presentó con el testigo de betabel, esto muestra que es más susceptible al daño del DNA por los contaminantes presentes en el agua, al manifestar un momento de la cauda elevado aún en agua de manantial.

## 8 DISCUSIÓN

Con base en estudios publicados se tiene un registro de los contaminantes que se han encontrado en aguas residuales en la región del Mezquital, en las mismas, destacan los metales pesados. En este trabajo no se determinaron los compuestos químicos presentes en las aguas negras, sin embargo Vázquez-Alarcón *et al.* (2005) mencionan a los metales pesados entre las principales sustancias que se incorporan al suelo vía agua residual, los cuales pueden participar en diversos procesos como la incorporación al ciclo del agua, principalmente en la fase relacionada con el suelo y el agua subterránea; también pueden acumularse en el suelo con diversos grados de biodisponibilidad o en el tejido vegetal debido a su absorción por las plantas.

Además de los contaminantes microbianos en las aguas residuales, los contaminantes químicos también pueden provenir de: sales inorgánicas, nutrientes, metales pesados en materia orgánica, detergentes, oligo contaminantes, plaguicidas, subproductos de la coloración como N-nitroso-dimetilamina, cloroformo y sustancias que perturban el sistema endocrino, además de productos farmacéuticos. Las aguas de riego con alto contenido salino pueden degradar de manera severa los suelos, así como también las altas concentraciones de boro ( $>0.4$  mg/l), con efectos tóxicos sobre las plantas (Winpenney *et al.*, 2013). El Código Internacional Recomendado de Prácticas-Principios Generales de Higiene de los Alimentos define que los insumos agrícolas no deberán contener contaminantes microbianos o químicos, en cantidades que puedan menoscabar a la inocuidad de las frutas y hortalizas frescas, teniendo en cuenta las directrices de la OMS sobre el uso seguro de aguas residuales y excretas en la agricultura y la acuicultura cuando proceda (FAO, 1997).

En lugares dónde se ha venido utilizando aguas residuales para el riego agrícola, se reporta una tendencia creciente en las concentraciones de metales en los suelos, por efecto del tiempo prolongado (décadas). Las cantidades del metal que se extraen y se miden en los suelos, se han asociado positivamente con el tiempo de uso de agua residual; mostrando una mayor tasa anual de acumulación el níquel (Ni) y el plomo (Pb) (Prieto *et al.*, 2009). Además de que han llegado a acumularse en maíz, trigo y alfalfa; metales pesados como

cadmio (Cd), Ni y Pb, principalmente en tejido foliar, en hojas de alfalfa e incluso en granos de trigo (Lucho *et al.*, 2005ab).

Los suelos del Valle del Mezquital, así como el agua de riego han sido estudiados previamente por diversos autores, para determinar las concentraciones de metales pesados. Estos reportan presencia de Cd, Ni y Pb, en agua, suelo y en plantas (Prieto *et al.*, 2007). Cajuste *et al.* (1991) observaron concentraciones de metales en agua para riego más elevados que los permitidos por: la NOM-CCA-33-ECOL./1993 que regula el empleo de aguas residuales con fines agrícolas. Vázquez-Alarcón *et al.* (2005) descubrieron que hay un incremento en la concentración de Cd, Ni y Pb, con respecto al tiempo en las aguas residuales que llegan al Valle (Fig. 16) estas superan los valores permitidos por la NOM-001-ECOL-1996, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales, a su vez los autores determinaron la concentración de éstos en cultivos de maíz, alfalfa y trigo.

Siebe (1994) concluyó que los metales pesados Cd, Pb, cromo (Cr) y zinc (Zn) introducidos a los suelos a través del riego con agua residual tienden a acumularse en la capa arable de los suelos y que después del tiempo que llevan éstos en el suelo solo se encuentran disponibles para las plantas en cantidades moderadas, siendo el Cd el más disponible. Cornejo *et al.* (2013) realizaron una cuantificación de metales en suelo y en alfalfa (Tabla 2) en el municipio de Tlahuelilpan, que al compararse con los valores establecidos por la NOM-021-RECNAT-2000 que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudio, muestreo y análisis (Tabla 3), rebasan las tasas permitidas para Cd, ni y Pb sin llegar a los valores peligrosos.

El riesgo de altos niveles de metales pesados como Pb, Ni, Cd y manganeso (Mn), presentes en suelos y aguas negras, utilizadas para riego agrícola, radica principalmente en, que pueden ser acumulados. Por su carácter no biodegradable, biodisponibilidad y toxicidad pueden ser peligrosos (Prieto *et al.*, 2009).

La absorción de metales pesados por las plantas es generalmente el primer paso para la entrada de éstos a la cadena alimenticia. La absorción y posterior acumulación dependen en primera instancia del movimiento (movilidad de las especies) de los metales desde el suelo a la raíz de la planta (Prieto et al., 2009). Los iones inorgánicos y el agua se transportan desde la raíz hasta las hojas mediante una serie de células tubulares que pertenecen a un tejido leñoso denominado xilema. La fuerza que mueve esta solución no radica en las células del tejido xilemático, sino de la fuerza propia del proceso de osmosis y en otra fuerza menos habitual, conocida como fuerza de succión. La osmosis se ocurre porque existe una gran diferencia de concentración iónica entre la parte superior de la planta (hojas, inflorescencias) donde es mayor y la inferior (raíz), es decir, existe un potencial hídrico favorable al impulso ascendente. La fuerza de succión actúa cuando en las hojas se pierde agua por transpiración, de tal manera que se provoca una fuerza que atrae agua desde las raíces hacia las hojas (Navarro, 2007).

En el suelo, los metales pesados como iones libres pueden tener acción directa sobre los seres vivos lo que ocurre a través del bloqueo de las actividades biológicas, es decir, la inactivación enzimática por la formación de enlaces entre el metal y los grupos -SH (sulfhidrilos) de las proteínas, causando daños irreversibles en los diferentes organismos (Wang *et al.*, 1992). Se sabe que, por difusión, flujo en masa e intercambio catiónico, los metales alcanzan fácilmente la raíz para seguir la ruta apoplástica o simplástica. Este órgano constituye la entrada principal del metal pesado en plantas superiores (Mejía, 2011). La toxicidad de los metales depende no sólo de su concentración, sino también de su movilidad y reactividad con otros componentes del sistema (Abollino et al., 2002).

La toxicidad de un elemento o compuesto químico es la capacidad que tiene este material de afectar adversamente alguna función biológica (Jiménez et al., 2010). Cd, Pb, Mercurio (Hg), Plata (Ag), son elementos tóxicos, produciendo un efecto adverso, alterando el crecimiento normal y desarrollo del organismo (Taiz y Zeiger, 2002). Metales como; Arsénico (As) (III), Cd (II), Cr (III, IV), Hg (II), Ni (II), Pb (II), Vanadio (V), han sido positivos en pruebas con ensayo cometa en mamíferos usando células humanas o de rata *in vitro* (Betti *et al.*, 1993; Hartman y Speit, 1994; Pool-Zobel *et al.*, 1994; Rojas *et al.*, 1996;

Anderson *et al.*, 1997; Blasiak y Kowalik, 2000). Algunos metales, Cd (II), Cr (III) y Cr (VI) han sido probados usando el ensayo cometa en plantas encontrando una respuesta positiva a genotoxicidad (Koppen y Verschaeve, 1996; Poli *et al.*, 1999). La genotoxicidad se refiere a los efectos potencialmente dañinos sobre el material genético de las células, que no necesariamente se asocian con mutagenicidad. Estos cambios pueden involucrar un único gen o segmento de gen, un bloque de genes o cromosomas completos (Sousa *et al.*, 2012). Con base en diversos datos registrados de toxicidad se pueden considerar como metales más tóxicos para las plantas vasculares y microorganismos a Hg, cobre (Cu), Ni, Pb, cobalto (Co) y Cd y en menor medida al cromo (Cr), estaño (Sn), Ag y berilio (Be) (Kabata-Pendias y Pendias, 1985; Barceló y Poschenrieder, 1989).

Los metales pesados como el Cd, el As y el Ni se clasifican como carcinógenos. Aunque el mecanismo preciso de la carcinogénesis no está definido, la exposición a metales pesados puede contribuir al daño genético al inducir rupturas de cadena doble (Morales *et al.*, 2016). Los metales pueden unirse a bases, grupos fosfatos o azúcares en los nucleótidos. Los grupos fosfato parecen ser el grupo coordinador más fuerte de los metales. En general, la estabilidad de los compuestos de metales a los nucleótidos refleja una firmeza de unión a los grupos fosfatos (Nava, 2009). Los posibles mecanismos para que se lleve a cabo la fragmentación de una cadena sencilla de DNA en tratamientos con plomo puede ser el incremento de la formación de radicales libres llevando a un daño en el DNA. Numerosos estudios han concluido que la formación de radicales libres de O<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> son capaces de causar daño al material genético (Anderson, 1994).

El ensayo cometa empleado en el presente estudio es considerada de alta sensibilidad para detectar daño al DNA a nivel de células individuales, éste se determina midiendo la migración del DNA que forma la cola del cometa y la intensidad de fluorescencia del mismo en unidades arbitrarias. Los resultados obtenidos con el ensayo cometa indican que si hay daño genotóxico por el riego con aguas residuales, el programa “Comet Assay IV” mostró la migración del DNA fragmentado. Cuanta más alta es la migración e intensidad mayor es el daño en el material genético.

En la Fig. 14 se muestran los cometas de las tres plantas en las cuales la diferencia de daño es notable a simple vista, las hortalizas que fueron irrigadas con aguas negras tienden a tener una cola más larga e intensa, mientras que en las cultivadas con agua de manantial se aprecia menor migración e intensidad. Las tres especies respondieron de manera diferente a las condiciones en las que fueron cultivadas, la sensibilidad a los contaminantes presentes en el agua es variable.

El betabel presentó un promedio del momento de la cauda de 3.88, la coliflor 5.54 y el rábano 19.16 UA en riego con agua de manantial. Los resultados de genotoxicidad de las tres plantas mostraron ser estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ) en las hortalizas expuestas a aguas residuales, en comparación con el grupo testigo. El grado de daño registró una mayor diferencia en betabel y coliflor siendo de 5.5 y 5.2 veces, respectivamente, más genotóxico que el testigo. Por otra parte, el grado de daño en rábano cultivado con aguas residuales fue solo de 1.7 veces mayor que el testigo. Las diferentes respuestas de las plantas vasculares a metales pesados pueden ser atribuidas a factores genéticos y fisiológicos (Calow, 1993).

Todas las plantas absorben metales del suelo donde se encuentran, pero en distinto grado, dependiendo de la especie vegetal y de las características y contenido en metales del suelo. Las plantas pueden adoptar distintas estrategias frente a la presencia de metales en su entorno (Baker, 1981; Barceló y Poschenrieder, 2003). Unas basan su resistencia a los metales con la estrategia de una eficiente exclusión del metal, restringiendo su transporte en la parte aérea. Otras acumulan el metal en la parte aérea en una forma no tóxica para la planta. La exclusión es más característica de especies sensibles y tolerantes a los metales y la acumulación es más común en especies que aparecen siempre en suelos contaminados (Prieto *et al.*, 2009).

De las tres hortalizas estudiadas la que presenta mayor sensibilidad es el rábano teniendo un promedio de momento de la cauda de 19.16 UA en HRAB. Un valor demasiado elevado en comparación a los otros dos testigos con agua de manantial, que no superan el promedio de 5.6 UA. Los miembros de la familia Brassicaceae a la que pertenecen el rábano y la coliflor

son conocidos por sus efectos protectores del material genético y anticancerígenos. Sin embargo, muchas de las especies de esta familia acumulan grandes cantidades de metales, lo cual es una característica indeseable. El rábano ha demostrado acumular metales en raíces en mayor medida que otros miembros de la familia Brassicaceae (Villatoro-Pulido *et al.*, 2009).

Por otra parte, en estudios realizados en plantas de rábano se observó la tendencia del Mn a acumularse en las hojas y en menor concentración en la raíz. (Intawongse y Dean, 2006). Además, Villatoro-Pulido y colaboradores (2009) cultivaron rábano en suelo contaminado con As, Pb y Cd, una pequeña porción de estos elementos permanecía en las raíces con una mayor cantidad del elemento translocado a los brotes. Las plantas de rábano acumularon una concentración significativamente más alta de metaloides en los brotes en comparación con las raíces. También se ha estudiado con anterioridad la modulación de la genotoxicidad y citotoxicidad por el rábano. De acuerdo a Villatoro (2011), los resultados obtenidos a partir de la prueba SMART de *Drosophila melanogaster* y los ensayos de citotoxicidad con células tumorales demostraron que las plantas de rábano desarrolladas en suelos contaminados con metaloides resultaron genotóxicas y citotóxicas en comparación a los rábanos desarrollados en suelos no contaminados.

La tendencia del rábano a acumular metales pesados puede estar fuertemente relacionada con los valores elevados de genotoxicidad que se observaron en los resultados, por lo que es muy probable que esos sean los principales responsables de los efectos registrados. El material genético al estar expuesto a una mayor cantidad de agentes genotóxicos tiende a presentar reacciones de éstos con grupos fosfato o en la formación de radicales libres que ocasionen rupturas en el DNA. Que el rábano no presentara la misma proporción de daño que las otras dos plantas estudiadas puede deberse a que el límite de resistencia al daño de la planta sea bajo y que al pasar este umbral los núcleos de la célula se encuentran tan deterioradas que es imposible para el programa reconocerlos como un cometa. Durante el conteo de núcleos se encontraron numerosos cometas que fue imposible registrar a través del programa de análisis de imágenes al ser muy tenues o tener el DNA muy disperso debido al daño severo.

Gonçalves *et al.* (2012) evaluaron la genotoxicidad y anti genotoxicidad de *Brassica oleracea* en ratones, en la que observaron la ausencia de genotoxicidad en el extracto. Por otro lado, este extracto presentó efectos protectores en tratamiento agudo frente al daño en el DNA inducido por doxorubicina como agente de daño. En la variedad *costaca* se analizó la capacidad del extracto para prevenir/inducir daño en el DNA, se probó con el ensayo cometa en una línea celular de fibroblastos de V79 de mamífero (criceto) y 500 µL del extracto que no provocaron mutaciones ni protegieron contra la mutagenicidad inducida por metil metano sulfonato. Pero al combinarla con extracto de larvas de *Pieris brassicacea* (mariposa de la col) proporcionan un efecto protector contra la genotoxicidad inducida. Kalavrouziotis *et al.* (2008) realizaron un estudio de los efectos de las aguas residuales municipales en *Brassica oleracea* variedad *Itálica* (brócoli) y *Brassica oleracea* variedad *gemmifera* (coles de Bruselas) en comparación con agua de riego ordinaria, en el cual concluyeron que los contenidos de metales pesados como Cd, cobalto (Co), Ni y Pb en las partes comestibles son muy altos, variando de la siguiente manera: en la variedad *Italica* Ni 3.91-4.15 mg/g, Pb 9.82-10.4 mg/g, en la variedad *gemmifera* Cd 0.8-1.17 mg/g, Co 2.35-2.70 mg/g y Ni 5.70-6.17 mg/g. Debido a que el incremento de metales pesados en las partes comestibles de la planta constituyen un alto factor de riesgo para la salud los autores declaran que el riego con aguas residuales municipales tratadas en primer nivel no puede utilizarse en la actualidad para el riego de estos vegetales a menos que se sometan a un tratamiento secundario o primario avanzado. Los resultados del presente estudio indican que el daño por rupturas en el DNA en la coliflor (una variedad más de la especie *Brassica oleracea*) en riego con aguas residuales es estadísticamente significativa.

Nadal *et al.* (2004) observaron concentraciones de Pb y Cd en hojas de *Beta vulgaris* L. variedad *cicla* (acelga) así como de Mg, la bibliografía no reporta más análisis de esta especie y su relación con aguas residuales. En el presente estudio la coliflor presenta diferentes niveles de daño en el DNA dependiente del tipo de riego con el que se cultivó, ésta mostró ser ligeramente más sensible que el betabel pero no tanto como lo fue el rábano. La cantidad de contaminantes presentes en el agua está directamente relacionada con la genotoxicidad inducida en la planta, ésta al ser capaz de absorber los contaminantes

y traslocarlos a las diferentes estructuras, tal como se tiene reportado en betabel y rábano, se ve afectada a nivel DNA. El daño generado por riego con aguas negras es estadísticamente significativo con un  $p < 0.05$ , comparada con riego con de agua de manantial.

Los principales efectos genotóxicos que causan los contaminantes son: 1. Mutagénesis, que se refiere a la mutación genética o puntual, un cambio en la secuencia de DNA dentro de un gen; 2. Clastogénesis, hace referencia al cambio en la estructura del cromosoma, que generalmente resulta en una ganancia, pérdida o reordenamiento de las piezas cromosómicas dentro del genoma; 3. Aneugénesis, ganancia o pérdida de uno o más cromosomas (aneuploidia) o conjunto haploide de cromosomas (euploidia); y 4. Recombinogénesis se refiere al intercambio homólogo o no de segmentos entre cromátidas o cromosomas (Panda y Panda, 2002). Los resultados de las pruebas de genotoxicidad basadas en ensayos de plantas para varios mutágenos químicos y carcinógenos estándar han mostrado una correlación positiva con los ensayos de mamíferos y no mamíferos (Grant, 1994).

Se han desarrollado una serie de protocolos para el uso y manejo de aguas residuales en la agricultura para procurar que los alimentos cultivados con ellas cumplan con los estándares de calidad establecidos por cada país. La FAO ha sugerido que cuando sea posible, los productores evalúen los usos anteriores de los lugares (abiertos y cerrados) así como de las zonas adyacentes a fin de identificar posibles peligros microbianos, químicos y físicos. También deberá tenerse en cuenta la posibilidad de que haya otras fuentes de contaminación (por ejemplo: productos agroquímicos y residuos peligrosos). Utilización pasada y presente de la zona de producción primaria y de los lugares adyacentes (por ejemplo, cultivos, parcela de engorde, producción pecuaria, zona de residuos peligrosos, zona de tratamiento de aguas negras, zona de extracción minera) a fin de identificar los posibles peligros microbianos, con inclusión de la contaminación fecal y la contaminación por desechos orgánicos y posibles peligros ambientales que podrían ser transportados a la zona de cultivo. Si existen agentes contaminantes en cantidades excesivas y no se han adoptado medidas preventivas o correctivas para reducir al mínimo los posibles peligros, no

deberán utilizarse esos lugares hasta que se hayan aplicado medidas correctivas o de control (FAO, 2003).

Los productores deberán identificar las fuentes del agua utilizada en la explotación agrícola (abastecimiento municipal, agua de riego reutilizada, pozo, canal abierto, embalse, ríos, lagos, estanques piscícolas). Deberán evaluar su calidad microbiológica y química y su idoneidad para el uso agrícola. Si es necesario, identificar medidas correctivas para prevenir o reducir al mínimo permisible la contaminación (por ejemplo, procedente de ganado, tratamiento de aguas negras y asentamientos humanos). La frecuencia de los análisis dependerá de la fuente de la que procede el agua y de los riesgos de contaminación ambiental, incluida la contaminación temporal o intermitente (por ejemplo, lluvias intensas e inundaciones). Si se observa que la fuente de agua está contaminada, deberán tomarse medidas correctivas a fin de garantizar que el agua resulte idónea para la aplicación prevista (FAO, 2003).

Sin embargo, los pobladores del Valle del Mezquital no cuentan con los recursos necesarios para realizar dichas evaluaciones, por lo que optan por no hacerlas, si bien la NOM-001-ECOL-1996 también establece el uso restringido de aguas residuales en legumbres y verduras que se consumen crudas (clasificación en la que caen las hortalizas aquí estudiadas) estas se siguen cultivado. No es posible ignorar la parte social de este problema, y pedir a los agricultores que dejen de producir, cuando ellos dependen económicamente de los productos que cosechan, más aun cuando ellos no son los emisores de estas aguas residuales. El tratamiento de aguas residuales podría solucionar parte del problema ya que reduce y elimina contaminantes, generando un biosólido que mejora la calidad de suelos más agua tratada para determinados usos incluido el agrícola sin restricción para hortalizas, a nivel secundario el efluente tratado a un nivel secundario aún contiene nutrientes de valor para los agricultores, mientras que algunos tratamientos terciarios eliminan el nitrógeno y el fósforo que son ingredientes fundamentales para la fertilización (Winpenny *et al.*, 2013).

## 9 CONCLUSIONES

Se demostró que las aguas residuales de la Ciudad de México y área Metropolitana contienen agentes genotóxicos, mismos que a través de canales de riego llegaron a las parcelas de las hortalizas, betabel, coliflor y rábano, evaluadas en el presente estudio mediante electroforesis unicelular.

La genotoxicidad inducida por los contaminantes presentes en el agua residual en las estructuras foliares fue: en betabel, 5.5 veces más dañino que el agua de manantial; en coliflor, 5.2 veces más dañino que el agua de manantial; y en rábano 1.7 más dañino. La relación de daño entre betabel y coliflor es similar, lo que los hace buenos monitores, esto difiere con el rábano que no guarda la misma proporción de daño.

El rábano presentó valores basales muy altos que no permitieron ver una clara diferencia con los expuestos a los contaminantes, los valores de HRAN no llegaron a rebasar el doble, sin embargo, para el programa “Comet Assay IV” muchos de estos cometas estaban tan dañados que le fue imposible registrarlos. Esto indica que el betabel es muy susceptible a los contaminantes presentes en el agua.

## **10 PERSPECTIVAS**

El desecho de aguas residuales trae consigo numerables problemas difíciles de solucionar. Quienes más las enfrentan son los habitantes del Valle del Mezquital que de una u otra manera han sacado provecho de esta desventajosa situación. Son muchas las cosas que se pueden hacer para tratar de reducir la cantidad de contaminantes que llegan al valle y que sin duda retornan a la ciudad en forma de alimentos, por ejemplo: biorremediación de los suelos contaminados, tratamiento de aguas residuales y regular la cantidad de contaminantes por parte de la industria. Además de concientizar a la población en general sobre estos temas. En cuanto al Valle del Mezquital deben buscarse alternativas para el cultivo de las hortalizas, un problema difícil de resolver por la escases de agua limpia que presenta esta zona.

## 11 REFERENCIAS

- Abas, A.; Touil, N.; Kirsch-Volders, M.; Angenon, G.; Jacobs, M. y Famelaer, I. D. H. (2007). Evaluation of UV damage at DNA level in *Nicotina plumbaginifolia* protoplast using single-cell electrophoresis, *Plant Cell, Tissue Organ Culture* 91,145.
- Abollino, O.; Aceto, M.; Malandrino, M.; Mentaste, E.; Sarzanini, C. y Barberis, R. (2002). Distribution and mobility of metals in contaminated sites. *Chemometric Investigation of Pollutant Profiles. Environmental Pollution*, 119, 177-193.
- Abrevaya, X. (2015). ¿Qué es la genotoxicidad?, *Intramed* (en línea) <<http://www.intramed.net/contenidover.asp?contenidoID=47111>>, consulta 10 de diciembre de 2015.
- Albertini, R.J.; Anderson, D.; Douglas, G.R.; Hagmar, L.; Hemminki, K.; Merlo, F.; Nataranja, A.T.; Norppa, H.; Sguker, D.E.; Tice, R.; Waters, M.D. y Aitio, A. (2000). IPCS guidelines for the monitoring of genotóxic effects of carcinogenesis in humans., *Mutation Research* 463, 111-172.
- Anderson, D.; Dobrzynska, M.M. y Basaran, N. (1997). Effect of various genotoxins and reproductive toxins in human lymphocytes and sperm in the comet assay, *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis* 17, 29-43.
- Anderson, D.; Yu, T.W.; Phillips, B.J. y Schmezer, P. (1994). The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the comet assay, *Mutation Research* 307, 261-271.
- Andrade, V.M.; Silva, J.; Silva, F.R.; Heuser, V.S; Días, J.F.; Yoneama, M.L. y Freitas, T.R. (2004). Fish as a bioindicators to assess the effects of pollution in two southern Brazilian rivers using the comet assay and micronucleus test. *Environmental Molecular Mutagenesis* 44, 459-468.
- Arbeláez S., P.A. (2015). Contaminantes emergentes aguas residuales y de río y fangos de depuradora. *Universitat Rovira I Virgili, Tarragona*, 450p.
- ASOCAE (2017). Agricultura, horticultura, rábano. Asociación Española para la cultura, el arte y la educación. (en línea) <<https://natureduca.com/agricultura-horticultura-rabano.php>> Consulta; 12 de noviembre de 2017.

- Aucancela, N. y Apugllón, A. (2013). Evaluación de la productividad del cultivo de coliflor (*Brassica oleracea*) a la aplicación de tres tipos de abonos orgánicos con tres dosis, en las localidades de; Sacahuan Tiocajas y Laim Capulispungo de la Parroquia matriz, Cantón Guamote, Provincia Chimborazo, Universidad estatal de Bolívar, Facultad de Ciencias Agropecuarias 115p.
- Bajpayee, M.; Ashutosh, K. y Dhawan, A. (2016). The comet Assay: A versatile tool for assessing DNA damage. en: Dhawan, A. y Anderson, D., The comet assay in toxicology, Royal Society of Chemistry 2ªed., 5p.
- Baker, A.J.M. (1981). Accumulators and excluders strategies in the response of plants to heavy metals, *Journal Plant Nutrition* 3, 643-654.
- Barceló, J. y Poschenrieder, C. (1989). Estrés vegetal inducido por metales pesados. *Investigación y Ciencia* 154, 54-66.
- Barceló, J. y Poschenrieder, C. (2003). Phytoremediation: Principles and perspectives, Institut d'Estudis Catalans, Barcelona, Contributions to Science 333-344.
- Bartone, C.R. y Arlosoroff, S. (1987). Reuse of pound effluent in developing countries. *Watersci Technology* 289-297.
- Bayo, J.; Angosto, J.M.; Gómez López, M.D. (2009). Ecotoxicological screening of reclaimed disinfected wastewater by *Vibrio fischeri* bioassay after a chlorination-dechlorination process. *Journal of Hazardous Materials* 172, 166-171.
- Betti, C.; Barale, R. y Pool-Zobel, B.B. (1993). Comparative studies an cytotoxic and genotoxic effects of two organic mercury compounds in lymphocytes and gastric mucosa cells of Sprague-Dawley rats. *Enviromental and Molecular Mutagenesis* 22, 172-180.
- Blasiak, J. Kowalik, J. (2000). A comparsion of the *in vitro* genotoxicity of tri- and hexavalent chromoium, *Mutation Research* 469, 135-145.
- BOE, (1990). Reglamentación técnico-sanitaria para el abastecimiento y control de calidad de las aguas potables de consumo público. Boletín oficial del Estado. (en línea) <<https://www.boe.es/boe/dias/1990/09/20/pdfs/A27488-27497.pdf>> Consulta el 23 de octubre 2017.

- Boutin, C.; Freemark, K.E. y Keddy, C.J. (1993). Proposed guidelines for registration of chemical pesticides: Non-target plant testing and evaluation. Technical report series, Canadian Wildlife service, Enviromental Canada, Ottawa num 145.
- Bozo, L.; Fernández, M.; López, M.; Reyes, R. y Suarez, P. (2007). Biomarcadores de la contaminación química en contaminantes microbianas. *Interciencia* 32, 8-3.
- Blázquez, L. (1938). Contenido de la memoria de la comisión geológica del Valle del Mezquital, Hidalgo. Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Geología, Memoria de la Comisión del Valle del Mezquital, Hidalgo, México, D.F., Memoria 2, 13-63.
- Cabildo-Miranda, M.P.; Claramunt-Vallespí, R.M.; Cornago-Ramírez, M.P.; Escolastico-León, C.; Esteban-Santos, S.; Farrán-Morales, M.A.; García-Fernández, M.A.; López-García, C.; Perez-Esteban, J.; Perez-Torralba, M.; Gutierrez, D.S.M. y Sanz-del Castillo, D. (2008). Reciclado y tratamiento de residuos, Universidad Nacional de Educación a Distancia, Madrid.
- Cajuste, L. J.; Carrillo, R.; Cota, E. y Laird, R.J. (1991). The distribution of metals from wastewater in the Mexican Valley of Mezquital. *Water, Air and Soil Pollution* 57, 763-771.
- CETESB (1991). Bioensaios Microbianos Aplicados no controle de Contaminantes Toxicos Ambientais; Serie Didáctica, PROCOP 1-75.
- Collins, A.R. (2011). The use of bacterial repair endonucleases in the comet assay. *Drug Safety Evaluation* 691, 137-147.
- CONABIO (2009). Malezas de México, Heike Vibrans, (en línea) <<http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/brassicaceae/raphanus-sativus/fichas/ficha.htm>> consulta el 17 de octubre de 2017.
- CONAGUA (2010). Estadísticas del agua en México, México comisión nacional del agua, (en línea) <<http://www.conagua.gob.mx/CONAGUA07/Publicaciones/Publicaciones/EA M2010-16Junio2010.pdf>> consulta el 22 de octubre 2017.
- CONAGUA (2015). Planta de tratamiento de aguas residuales Atotonilco, (en línea), <<http://www.conagua.gob.mx/CONAGUA07/Publicaciones/Publicaciones/SG APDS-19-11.pdf>>, consulta: 8 de diciembre del 2015.

- Cooke, D.A. y Scott, R.K. (1993). The sugar Beet Crop. Chapman and Hall 675p.
- Cornejo, F.M; López, M.; Beltrán, R.I. Acevedo, O.A.; Lucho, C.A. y Reyes, M.I. (2012). Degradación del suelo en el distrito de riego 003 Tula, Valle del Mezquital, Hidalgo, México. UDO Agrícola 12, 873-880.
- Corona V., D.; Cram H., S. y Rojas C. E. (2008). Ensayo de genotoxicidad con la lombriz de tierra *Eisenia andrei*. En: Ramirez R., P. y Mendoza C., A. Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo La experiencia en México, Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales, México 233-273.
- Cifuentes, E.; Blumenthal, U.; Ruiz, G.; Benett, S. y Peasey, A. (1994). Escenario epidemiológico del uso agrícola del agua residual: El Valle del Mezquital, México, Salud Pública de México 36, 3-9.
- Custodio, E. y Llamas, O. (1983). Hidrología Subterránea, tomo I, segunda edición.
- Cruz-Campa, S. (1965). Rehabilitación integral del Distrito de Riego 03, Tula, Hidalgo., Escuela Nacional de Agricultura, Chapingo, México 163p.
- Días-Báez, M.C.; Bustos, M.C. y Espinosa, A. J. (2004). Pruebas de Toxicidad Biológica, Fundamentos y Métodos. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá Colombia 18p.
- Duke, J. A. (1983). Handbook of Energy Crops: *Beta vulgaris* L. (en línea) <[http://www.hort.purdue.edu/newcrop/duke\\_energy/Beta\\_vulgaris.html](http://www.hort.purdue.edu/newcrop/duke_energy/Beta_vulgaris.html)> consulta el 16 de octubre de 2017.
- Dutka, B.J. (1989). Methods for microbiological and toxicological analysis of waters, wastewaters and sediments. National Water Research Institute, Canada: Burlington.
- Ecomallaray (2012). Remolachas o betabel. (en línea) <<http://ecomallaray.blogspot.mx/2012/09/remolachas-o-betabel.html>> consulta el 10 de noviembre de 2017.
- Egito, L.C.; Dos Santos, P.E.; De Madeiros, V.S. y Agnes-Lima, L.F. (2010). Use of native species *Crenicichla menezesi* (Ariidae) as a model for *in situ* evaluation of genotoxicity in surface water. Science of the Total Environment 408, 6042-6046.

- Emmanuel, E.; Perrodin, Y.; Keck, G.; Blanchard, J.M y Vermande, P. (2005). Ecotoxicological risk assessment of hospital wastewater: A proposed framework for raw effluents discharging into urban sewer network *Journal of Hazardous Materials* 117, 1-11.
- FAO (1997). Código internacional recomendado de prácticas-Principios generales de higiene de los alimentos., CAC/RCP, Rev. 3.
- FAO (2003). Código de prácticas de higiene para frutas y hortalizas frescas, CAC/RCP núm, 53. pp.1-26. (En línea) <[http://www.fao.org/ag/agn/CDfruits\\_es/others/docs/alinorm03a.pdf](http://www.fao.org/ag/agn/CDfruits_es/others/docs/alinorm03a.pdf)>, consulta el 14 de octubre de 2017.
- FAO (2006). Water desalination for agricultural applications. Proceedings of the FAO Expert consultation on Water Desalination for agricultural.
- Fekadu, K; Wolfram, P. y Siegfried, K. (2000). Single Cell gel electrophoresis assay: a new technique for human biomonitoring studies, *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 463, 13-31.
- Fernández, J. y Pérez, J.A. (1989). Servicio de abastecimiento de aguas. En: Piédrola Gil, Medicina preventiva y salud pública 8ª Ed. Barcelona; Salvat Editores, pp. 168-177.
- Ferrat, L.; Pergent-Martini, C. y Romero, M. (2003). Assessment of the use of biomarkers in aquatic plants for the evaluation of environmental quality: application to seagrasses. *Aquatic Toxicology* 66, 187-204.
- Ferreira La Rosa, A.M.; Moschem, A.; Olinto, L.; Nascimento, M.M.; da Silva, M.G.; Genro, M.J.; de Almedia, M.M. y Raya, M.T. (2000). Gestão de efluentes de serviços de saúde em Porto Alegre. *Anais XXVII Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental*. ABES 1-13.
- Fiskesjö, G. (1993). The Allium test in wastewater monitoring. *Environmental Toxicology* 8, 291-298.
- Forster, V., Marrese, D., Staska, K., Trinks, K., y Stander, J.R. (1997). Petition for determination of non-regulated status: Glufosinate tolerant sugar beet, transformation event. *AgrEvo USA Company, Wilmington, Delaware* 67p.

- García, A. (1992). El cultivo del rábano (*Raphanus sativus L*) En el ejido de Santa Anita, Municipio de Tlaquepaque. Las Agujas, Zapopan, Jalisco. Universidad de Guadalajara.
- Gianazza, E.; Wait, R., Sozzi, A.; Regondi, S.; Saco, D.; Labra, M. y Agradi, E. (2007). Growth and protein profile changes in *Lepidium sativus L.* plantlets exposed to cadmium. *Environmental and Experimental Botany* 59, 179-187.
- Gichner, T.; Znidar, I.; Wagner, E.D. y Plewa, M.J. (2016). The use of higher plants in the comet assay. en: Dhawan, A. y Anderson, D., *The comet assay in toxicology*, Royal Society of Chemistry, 2<sup>a</sup> ed. 99-115.
- Google maps (2017) Mapa satelital del sitio de estudio, Tlahuelilpan y Tezontepec de Aldama, Hidalgo, (en línea) <<https://www.google.com.mx/maps/@20.1615736,99.2946079,13z/data=!3m1!4b1!4m2!6m1!1s17U4zjCqhN9ocPuLjSL2xaNG4mjc>> consulta el 28 de agosto, 2017.
- Gonçalvez., Á.L.M.; Lemos, M.; Niero, R.; Faloni D. A., S. y Maistro, E. L. (2012). Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic potential of *Brassica oleracea L.* var. *acephala* D.C. in different cells of mice, *Journal of ethnopharmacology* 143, 740-745.
- Gonzales Q., L. (1968). Tipos de vegetación del Valle de Mezquital, Hgo., México. Instituto Nacional de Antropología e Historia. México, D.F.
- Granados-Sánchez, D.; López-Ríos G. F. y Hernández-Hernández, J. (2004). Agricultura nhanñhu-otomí del Valle del Mezquital, Hidalgo, *Terra Latinoamericana* 22, 117-126.
- Grant, W.F (1994). The present Status of higher plan bioassays for the detection of enviromental mutagens, *Mutation Research* 310, 175-185.
- Grijalvo, L. (2016). Elaboración de inventarios de focos contaminantes, ed. tutor formación, San Milán, pp. 191-192.
- Hao, Y.-J; You, C.-X. y Deng, X.-X; (2004). Evidences for the control of chromosome number variation by a programmed-cell-death liked pathway in citrus callus, *Euphytica* 143, 140-205.

- Hartmann, A. y Speit, G. (1994). Comparative investigation of the genotoxic effect of metals in single cell (SSG) assay and the sister chromatid exchange (SCE) test, *Environmental and Molecular Mutagenesis* 23, 299-305.
- Hartmann, A.; Agurell, E.; Beevers, C.; Brendler-Schwaab, S.; Burlinson, B.; Clay, P.; Collins, A.; Smith, A.; Speit, G.; Thybaud, V. y Tice, R.R. (2003). Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline comet assay. *Mutagenesis* 18, 45-51.
- Hartmann, A.; Schumacher, M.; Plappert-Helbig, U.; Lowe, P.; Suter, W. y Mueller, L. (2004). Use of the alkaline *in vivo* comet assay for mechanistic genotoxicity investigations, *Mutagenesis* 19, 51-59.
- Hernández-Silva, G.; Flores-Delgadillo, L.; Maples-Vermeersch, M.; Solorio-Munguía, J. G. y Alcalá-Martínez, J. R. (1994). Riesgo de acumulación de Cd, Pb, Cr y Co en tres series de suelos del DR03, Estado de Hidalgo, México, *Revista Mexicana de Ciencias Geológicas* 11, 53-61.
- INB, (2012). Gobierno del Distrito Federal, Secretaría de Protección Civil, Glorario de Términos, (en línea) <<http://www.inb.unam.mx/stecnica/glosario.pdf>> Consulta el 14 de octubre 2017.
- Intawongse, M. y Dean, J. (2006). Uptake of heavy metals by vegetable plants grown on contaminated soil and their bioavailability in the human gastrointestinal tract; *Food Additives and contaminants* 23, 36-48.
- Jiang, J.; Wang, Y. y Li, S. (2007). Application of the comet assay to measure DNA damage induced by UV radiation in the hydropyte, *Spirodella polyrhiza*, *Physiologia Plantarum* 129, 652-657.
- Jiménez, B. E.; Valiente, E.L.; Ponce, G.; Villanueva, S.; Botello, A.V.; López, B.; Herrera, G.; Carrillo-Rivera, J.J.; Cardona, A.; Mazai, M.; Aguilar, M.; Espinosa, A.C.; Durán, N.; Zambrano, L.; Ávila, S.; Espejo, R. y Aguilar, A. (2010). *Calidad del agua: un enfoque multidisciplinario*. Ciudad de México, ed. Universidad Nacional de México, pp. 25-54.
- Jiménez, B.E. (2001). *La contaminación ambiental en México: causas, efectos y tecnología apropiada*, Mexico: Limusa, Colegio de Ingenieros Ambientales de México, pp. 926.

- Jiménez, C.; Durán, J. C.; Méndez, J. M.; Torregosa, M.L. y Aboites, L. (2010). El agua en México; causas y encauses, AMC-CONAGUA, México.
- Kabata-Pendias, A. y Pendias, H. (1985). Trace elements in soil and plants. CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, 315 p.
- Kalavrouziotis, I. K.; Robolas, P.; Koukoulakis, P.H. y Papadopoulos, A. H. (2008). Effects of municipal reclaimed wastewater on the macro- and micro-elements status of soil and of *Brassica oleracea* var. *Italica*, and *Brassica oleracea* var. *Gemmifera*, *Agricultural Water Management* 95, 419-426.
- Klumpp, A.; Ansel W. y Klumpp G. (2004). EuroBionet, European Network for the Assessment of Air Quality by the Use of Bioindicator Plants. Universidad Hohenheim. Stuttgart, Alemania.
- Koppen, G. y Verschaece, L. (1996). The alkaline comet test on plant cells: A new genotoxicity test for DNA strand breaks in *Vicia faba* root cells, *Mutation Research* 360, 193-200.
- Kostka-Rick, R. y Manning, W. (1993). Radish (*Raphanus sativus* L.): A model for studying plant responses to air pollutants and other environmental stresses. *Environmental Pollution* 82, 107-138.
- Lagroye, I.; Hook, G; Wettring, B; Baty, J; Moros, E y Srauble, W. (2004). Measurements of alkali-labile DNA damage and protein-DNA crosslinks after 2450 MHz microwave and low-dose gamma irradiation *in vitro*. *Radiation Research Society* 161, 201-214.
- Lara, J. A. y Hernández, A. (2003). Reutilización de las aguas residuales: aprovechamiento de los nutrientes en el riego agrícola. Seminario internacional sobre métodos naturales para el tratamiento de aguas residuales. Instituto Cinara, Universidad del Valle 237-242.
- Laserna, S.; Laserna-Arcas, S. y Laserna-Arcas J. (2015). Rábano, taxonomía y descripciones botánicas, morfológicas, fisiológicas y ciclo biológico, (en línea) <<http://www.agroes.es/cultivos-agricultura/cultivos-huerta-horticultura/rabano/428-rabano-descripcion-morfologia-y-ciclo>>.
- Lesniewska, J.; Simeonova, E.; Sikora, A.; Mostowska, A. y Charzynska, M. (2000). Application of the comet assay in studies of programmed cell death in plants, *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 69, 101-107.

- Liman, R.; Hakki, I.G.; Akyil, D.; Eren, Y. y Konuk, M. (2011). Determination of genotoxicity of fenaninosulf by *Allium* and comet tests. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 99, 61-64.
- Livingstone, D. (1993). Biotecnology and pollution monitoring: use of molecular biomarkers in the aquatic environment, *Chemical Technology and Biotechnology* 57, 195-211.
- López, F. y Bali, G. (2002). Estudios de cultura otomape, Distribución de los asentamientos del Valle del Mezquital como un modelo de desarrollo social, Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Investigaciones Antropológicas, pp.17-22.
- López, F. (1991). Estructura de las repúblicas de indios de los siglos XVI y XVII. En: *Nos queda la Esperanza. El Valle del Mezquital, México. Consejo Nacional para la Cultura y las Artes, Colección Regiones*, pp. 49-96.
- Lucho, C.A.; Álvarez, M.; Beltrán, R.I.; Prieto, F. y Poggy, H. (2005a). A multivariate analysis of the accumulation and fractionation of major and trace elements in agricultural soils in Hidalgo State, Mexico Irrigated with raw wastewater. *Environmental International* 31, 313-323.
- Lucho, C.A.; Prieto, F.; Del Razo, L.M.; Rodriguez, R. y Poggy, H. (2005b). Chemical fractionation of boron and heavy metals in soils irrigated with wastewater in central Mexico. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 108, 57-71.
- Malla, R.; Tanaka, Y. y Mori, K.L. (2007). Short term effect of sewage irrigation on chemical build up in soils and vegetables. *The Agricultural Engineering International: the CIGR ejournal*, vol. IX.
- Maples, M. (1990). Antecedentes fisicoquímicos del distrito de desarrollo rural 063 Estado de Hidalgo. Primer simposio Nacional. Degradación del suelo. *Memorias. Universidad Nacional Autónoma de México*.
- Mara, D. y Cairneross, S. (1989). Guidelines for the safeuse of wastewater and excreta in agriculture and aquaculture, *World Health Organization UNEP*, pp. 19-30.
- Mara, D. (1996). Waste stabilization ponds: Effluen quality requirements and implications for pricess desing. *Water Science Technology* 33, 23-31.

- Marín, R. (2016). Contaminantes emergentes y metales pesados en aguas residuales: un caso de estudio, Retema, pp. 68-74.
- Masters, G. y Ela, W. (2008). Introducción a la ingeniería medioambiental, Madrid, España, Pearson Prentice Hall, tercera edición.
- Medeiros, S.; Soares, A.; Ferreira, P.; Neves, J.; Matos, A. y Souza, J. (2005). Utilización de agua residual de origen doméstica en la agricultura: estudio de las alteraciones químicas. Revista brasileña Ingeniería Agrícola y ambiental 9, 603-612.
- Mejía D., C.M. (2011). Metales pesados en suelos y plantas: contaminación y fitotoxicidad, Universidad Nacional José Sánchez Carrión, Huacho Perú, pp. 6-23.
- Melacon, M. (1995). Handbook of Ecotoxicology. CRD. Boca Ratón, FL. pp. 755.
- Melville, E., (1990). Environmental and social change in the Valle del Mezquital, México, 1521-1600, Comparative studies in society and history 33, 24-53.
- Miranda, F. y Mejía, F. (2004). Campesinos de Hidalgo riegan con aguas negras los cultivos de hortalizas, Milenio, 7 de agosto, (en línea), <<http://sipse.com/mexico/valle-del-mezquital-donde-las-aguas-negras-son-un-tesoro-105874.html>> consulta: 10 de diciembre 2015.
- Minissi, S. y Lombi, E. (1997). Heavy metal content and mutagenic activity: Evaluated by *Vicia faba* micronucleus test, of Tiber river sediments. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 393, 17-21.
- Morales, M. E.; Derbes, R. S.; Ade, C.M.; Ortego, J.C.; Stark, J. y Deininger, P.L. (2016). Heavy metal exposure influences double strand break DNA repair outcomes, Plos One, pp. 1-21.
- Mohanty, G.; Mohanty, J.; Nayak, A.; Mohanty, S. y Dutta, S. (2011). Application of comet assay in the study of DNA damage and recovery in rohu (*Labeo rohita*) fingerling after an exposure to phorate, an organophosphate pesticide. Ecotoxicology 20, 283-292.
- Moller, P. (2005). Genotoxicity of environmental agents assessed by the alkaline Comet Assay. Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology 96, 1-42.

- Movahedian, H.; Bina, B. y Asghari G.H. (2005). Toxicity evaluation of wastewater treatment plant effluents using *Daphnia magna*. Environmental Health Science Engineering 2, 1-4.
- Nadal, M.; Schuhmacher, M. y Domingo, J. L. (2004). Metal pollution of soils and vegetation in an area with petrochemical industry, The science of the total environment 321, 33-40.
- Nava H., M. P. (2009). Toxicidad del Plomo, Cadmio y Arsenico después de una exposición crónica en el DNA del espermatozoido primario de rata macho, Universidad autónoma de Nuevo León, León 114 p.
- Navarro, J.P.; Aguilar, I. y López-Moya, J.R. (2007). Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas, Ecosistemas, pp. 2-18.
- Newman M.C. y Jagoe, C.H. (1996). Ecotoxicology: A hierarchical treatment., Lewis publishers, Boca Raton, 411 p.
- NOM-CCA-33-ECOL (1993). Norma Oficial Mexicana NOM-CCA-032-ECOL./1993, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las aguas residuales de origen urbano o municipal para su disposición mediante riego agrícola. Diario Oficial de la Federación, 18 de octubre 1993. México, D.F. pp. 120-128.
- NOM-001-ECOL (1996). Norma Oficial Mexicana NOM-001-ECOL-1996 Que establece los límites Máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales.
- NOM-021-RECNAT (2000). Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000 Que establece las especificaciones de fertilidad y clasificación de suelos, estudio, muestreo y análisis,
- Núñez, A. L. (2015). Caracterización de la problemática de las aguas residuales en Ixmiquilpan Hidalgo, Universidad Autónoma Metropolitana, 90 p.
- Organización mundial de la salud (OMS), (2015). Agua saneamiento y salud; El uso de aguas residuales, (en línea), <[http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/wastewater/es/](http://www.who.int/water_sanitation_health/wastewater/es/)>, consulta: 9 de diciembre del 2015.

- Orozco, L. Y.; López, C.; Naranjo, L. C. y Zuleta, M. (2001). Detección de mutacarcinógenos y genotoxicidas en aguas residuales que surten dos plantas de tratamiento de agua de consumo, *Acta biológica Colombia* 6, 114 p.
- Östling, O. y Johanson, K.J. (1984). Microelectrophoretic study of radiation induced DNA damages in individual mammalian cells, *Biochemical and biophysical research communications* 123, 291-298.
- Paggi, J. y de Paggi, S. (2000). *Daphnia magna*: el “canario” de las aguas. (en línea) <<http://www.santafe-conicet.gov.ar/servicios/comunica/canario.htm>> Consulta el 21 de noviembre de 2017
- Panda, B.B. y Panda, K.K. (2002). Genotoxicity and mutagenicity of metals in plants. En: Prasad, M. N. V. y Strzalka, K. *Physiology and biochemistry of metal toxicity and tolerance in plants*, Springer, the Netherlands, pp. 395-414.
- Pantoja, A.; Granados, S. e Izquierdo, J. (2011). De la huerta a la mesa, promoción de frutas y vegetales a partir de huertas familiares., FAO, Santiago Chile, pp. 46. (en línea) < <http://www.fao.org/docrep/019/i2122s/i2122s.pdf>> consulta el 14 de octubre de 2017.
- Párvez, S.; Venkataraman, C. y Mukeherj, S. (2006). A review on advantages of implementing luminescence inhibition (*Vibrio Fischeri*) for acute toxicity prediction of chemicals. *Environment International* 32, 265-268.
- Pernia, B.; De Sousa, A.; Reyes, R. y Castrillo, M. (2008). Biomarcadores de contaminación por Cadmio en las plantas. *Interciencia* 33, 112-119.
- Pinto, V. E. (2013). Obtención de plántulas de Coliflor (*Brassica olerace var. Botrys*) a través de activadores ecológicos, Universidad técnica de Ambato, Facultad de ingeniería agrónoma, Ambato Ecuador, 77 p.
- Pitot, H.C. y Dragan, Y.P. (2001). Chemical carcinogénesis. En: *Casarett and Dowlla'S Toxicology. The basic science of poisons*, 6<sup>th</sup>Edition. McGraw Hill, New York, pp. 241-319.
- Pool-Zobel, B.L.; Lotzmann, N.; Knoll, M.; Kuchenmeister, F.; Lambertz, R.; Leucht, U.; Schroder, H.G. y Schmezer, P. (1994). Detection of genotóxico effects of human gastric and nasal mucosa cells isolated form biopsy samples, *Environment and molecular mutagenesis* 24, 23-45.

- Prado, B.; Siebe, C.; Bischoff, W. A.; Hernández, L. y Mora, L. (2015). El suelo: guardián de la calidad del agua subterránea. *CONABIO. Biodiversitas* 122, 6-9.
- Prieto, F.; Lucho, C.A.; Poggi, H.; Acevedo, O. y Barrado, E. (2007). Caracterización fisicoquímica y extracción secuencial de metales y elementos traza en suelos de la región Actopan-Ixmiquilpan del Distrito de Tiego 03, Valle del Mezquital, Hidalgo, México, *Ciencia ErgoSun* 14, 69-80.
- Prieto, J.; Gonzáles, C.A.; Román, A.D. y Prieto, F. (2009). Contaminación y fitotoxicidad en plantas por metales pesados provenientes de suelos y agua, *Tropical and subtropical Agroecosystems* 10, 29-44.
- Rajaguru, P.; Suba, S.; Palanivel, M. y Kalaiselvi, K. (2003). Genotoxicity of a polluted river system measured using the alkaline comet assay on fish and earthworm tissues. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 41, 85-91.
- Reyes, R. (1999). Las metalotioninas como biomarcadores de la contaminación ambiental por metales pesados en organismos acuáticos. *Inteciencia* 24, 366-371.
- Reynaldo, I.M.; Jerez, E. y Torres, J. (2000). Fitotoxicidad del aluminio en plántulas de Arroz de la variedad LP-7. *Contribución a la educación y a la Protección Ambiental, Cátedra Medio Ambiente* 1, 89-93.
- Ríos, P. (2015). Planta modular de tratamiento biológico para aguas residuales. *Texcoco México*, pp. 40-45.
- Rojas, E.; Lopez, M.C. y Valverde, M. (1999). Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications, *Journal of Chromatography B*, pp. 225-254.
- Rojas, E.; Valverde, M.; Herrera, L. A.; Altamirano-Lozano, M. y Ostrosky-Wegman, P. (1996). Genotoxicity of vanadium pentoxide evaluated by the single cell gel electrophoresis assay in human lymphocytes, *Mutation Research* 359,77-84.
- Rosa, C.E.V., M. Sierra, y CM. Radetski (1999). Use of plant tests in the evaluation of textile effluent toxicity. *Ecotoxicology, environmental research* 2, 56-61.
- Rozano, V.; Quiróz, C.; Acosta, J. C., Pimentel, L.A. y Quiñones, E. I. (2004). Hortalizas, las llaves de la energía., *Revista Digital Universitaria*, 5, 2-30. (en línea) < [http://www.revista.unam.mx/vol.6/num9/art88/sep\\_art88.pdf](http://www.revista.unam.mx/vol.6/num9/art88/sep_art88.pdf)>, consulta el 14 de octubre de 2017.

- Saavedra, G. (2013). Producción de hortalizas para la República de Guinea Ecuatorial, Introducción a la producción de hortalizas, Food and agricultura Organization of the united nations, 44p. (en línea) < <http://www.fao.org/3/a-az120s.pdf>>, consulta el 14 de octubre de 2017.
- Samper, J. (2014). Manantiales y Relaciones Río-Acuífero de hidrología del subsuelo. (en línea) <[ftp://ceres.udc.es/ITS\\_Caminos/Optativas/Hidrologia\\_Subterranea/29%20Octubre\\_2013\\_Hidrologia%20Subterranea\\_ICCP\\_Manantiales%20y%20Rio\\_apuntes\\_2013-2014.pdf](ftp://ceres.udc.es/ITS_Caminos/Optativas/Hidrologia_Subterranea/29%20Octubre_2013_Hidrologia%20Subterranea_ICCP_Manantiales%20y%20Rio_apuntes_2013-2014.pdf)> consulta el 24 de octubre 2017.
- Sánchez, A. (1995). Jornadas sobre el libro blanco de las aguas subterráneas, Problemas actuales y potenciales. I) Recursos y explotación, declaración de Madrid sobre las aguas subterráneas, pp. 49-66.
- Sandhu, S. S. y Lowe, W. R. (1989). In situ assessment of genotóxico hazard of environmental pollution, Toxicology and Industrial Health 5, 61-69.
- SARH (1994). Anuario de la producción Agrícola, Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos, México D.F.
- Scott, C.; Faruqui, N.I. y Raschid, I. (2004). Wastewater use in irrigated agriculture: confronting the livelihood and environmental realities. IWMI, IDRC, CABI, Sri Lanka, 240 p.
- Seegerstrom, K. (1962). Geology of South-central Hidalgo and Northeastern México, Mexico, Geological Survey Bulletin 1104-C, 82 p.
- SEMARNAT, (2013). Agua, Aguas residuales. En línea: <[http://apps1.semarnat.gob.mx/dgeia/informe\\_resumen14/06\\_agua/6\\_2\\_3.html](http://apps1.semarnat.gob.mx/dgeia/informe_resumen14/06_agua/6_2_3.html)> consulta el 19 de septiembre de 2017.
- Seymour, J. (1997). Biblioteca de la agricultura, Impreso en España.
- Siebe, C. (1994), Acumulación y disponibilidad de metales pesados en suelos regados con aguas residuales en el distrito de riego 03, Tula, Hidalgo, México. Revista Internacional de Contaminación Ambiental 10, 15-21.

- SIIEH, (2016a). Enciclopedia de los municipios del estado de Hidalgo, Tezontepec de Aldama, en línea: <[http://siieh.hidalgo.gob.mx/files/tezontepec\\_de\\_aldama.pdf](http://siieh.hidalgo.gob.mx/files/tezontepec_de_aldama.pdf)>, consulta el 18 de septiembre de 2017.
- SIIEH, (2016b). Enciclopedia de los municipios del estado de Hidalgo, Tlahuelilpan, en línea: <<http://siieh.hidalgo.gob.mx/files/tlahuelilpan.pdf>>, consulta el 18 de septiembre de 2017.
- Smith, G.A., (1987). Sugar beet: principles of cultivar development, Fehr, W.R., MacMillan Publishing Company, pp. 577-625.
- Sotelo, M. y Velázquez, J. A. G. (1995). Descripción botánica de las especies vegetales principales del estado de Jalisco con importancia económica, Universidad de Guadalajara, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y agropecuarias división de Ciencias Agronómicas, 13 p.
- Sousa, C.; Fernandes, F.; Valentão, P. Sebasião Rodriguez, A.; Coelho, M.; Teiceria J.P; Silva, S.; Ferreres, F.; Guedes de Pinho, P. y Andrare, P.B. (2012). *Brassica oleracea* L. *costata* DC and *Pieris brassicae* L. Aqueous extraxts reduce methyl methanesulfonate-induced DNA damage in V79 Hamster lung fibroblasts, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60, 5380-5387.
- Stavreva, D. A.; Ptacek, O.; Plewa, M.J. y Gichner, T. (1998). Single-cell gel electrophoresis analysis of genomic damage induced by ethyl methane-sulfonate in cultured tobacco cells, *Mutation Research/Fundamental and molecular mechanisms of mutagenesis* 422, 323-330.
- Stavreva, D. A. y Gichner, T. (2002). DNA damage induced by hydrogen peroxide in cultured tobacco plants, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 514, 147.
- Stumpf, M.; Ternes, T.A.; Wilken, S.V. y Bauman, W. (1999). Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil, *Science of the Total Environment* 225, 135-141.
- Sun, Y.-L.; Zhu, H.-Z.; Zhou, J.; Dai, Y.-R y Zhai, Z.-H. (1999). Menadione induced apoptosis and the degradation of lamin-like proteins in tobacco protoplasts, *Cellular and Molecular Life Sciences* 55, 310-316.

- Taiz, L. y Zeiger, E. (2002). Plant physiology, Sinauer associates, Sunderland, 690 p.
- Tchobanoglous, G. y Schroeder, E. D. (1985). Water quality, reading, Addison-Welsey Pub, 768 p.
- Tothill, I.E. y Turner, A.P.F. (1996). Developments in bioassay methods for toxicity testing in water treatment. Trends in Analytical Chemistry 15, 178-187.
- Tice, R.R.; Agurell, E.; Anderson, D.; Burlinson, B.; Hartmann, A.; Kobayashi, H.; Miyamae, Y.; Rojas, E.; Ryu, J.C. y Sasaki, Y.F. (2000). Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. Environmental Molecular Mutagenesis 25, 125-132.
- Tice, R.R.; Butherworth, F.M.; Corkum, L.D. y Guzmán-Rincón, J. (1995). Biomonitoring and Biomarkers as indicators of environmental change, plenum press, 69 p.
- U.S. EPA (1999). Directiva 9200.4.17, Use of monitored natural attenuation at superfund, RCRA corrective action, and underground storage tank sites. En: OSWER (office of solid waste and emergency response).
- Valadez, A., (1996). Producción de Hortalizas. Colombia: Limusa, 109 p.
- Valencia-Quintana, R.; Sánchez, J; Gómez-Arroyo, S; Cortés, J; Waliszewski, S. M.; Fernández, S. y Villalobos-Pietrini, R. (2013). Genotoxicidad de plaguicidas en sistemas vegetales, Revista Internacional de Contaminación ambiental 29, 133-157.
- Vázquez-Alarcón, A.; Cajuste, L.J.; Carrillo-Gonzales, R.; Zamudio-Gonzales, B.; Alvarez-Sánchez, E. y Castellanos-Ramos, J.Z. (2005) Límites permisibles de acumulación de cadmio, níquel y plomo en suelos del Valle del Mezquital, Hidalgo. Terra Latinoamericana 23, 447-455.
- Veleminsky, J y Gicher, T. (1992). Methods to assess adverse effects on plants. En: Tardiff R. G. Scientific Commite On Problems of the Enviroment.
- Vigliola, G. (1996). Botánica general. 2 ed. México, Diana, 78p.
- Villatoro, M.M. (2011). Caracterización nutricional y agronómica, análisis de la actividad biológica y selección de crucíferas para uso alimentario. Instituto de

investigación y formación agraria y pesquera Consejería de agricultura y pesca, Universidad de Córdoba, 17p.

- Villatoro-Pulido, M.; Font, R.; De Haro-Bravo, M.I.; Romero-Jiménez, M.; Anter, J.; De Haro-Bailón; Alonso-Moraga, A. y Del Río-Celestino, M. (2009). Modulation of genotoxicity and cytotoxicity by radich grown in metal-contaminated soils, *Mutagenesis* 24, 51-57.
- Wang, L.S.; Wei, D.B; Wei, J. y Hua, H.Y. (2007). Screenin and estimating of toxicity formation with *Photobacterium* bioassay during chlorine didinfection of wastewater., *Journal of Hazadous Materials* 142, 289-294.
- Wang, W. (1991). Literature review on higher plants for toxicity testing. *Water air soil polluted* 59, 381-400.
- Wang, Y. P. y Chao, C.C. (1992). Effects of Vesicular- Arbuscular mycorrhizae and heavy metals on the growth of soybean and phosphate and heavy metal uptake by soybean in major soil groups of taiwan. *Journal Agricultural Association China New Series* 157, 6-20.
- Waters, M.D.; Stack, H.F.; Brady, A. L.; Lohman, P.H. M.; Haroun, L. y Vainio, H. (1988) Use of computerized data listing and activity profiles of genetic and related effects in the review of 195 compound, *Mutation Research* 205, 295-312.
- Waters, M; Brady, A. y Brackman, H (1990). Antimutagenicity profile for some model compounds. *Mutation Research* 238, 57-85.
- Romero-Alvarez, H. (1997). El Valle del Mezquital México, estudio de caso. En: Helmer, R. y Hespanhol, Water pollution control- A guide to the use of water quality management principles. Behalf of the Unites Nations Enviroment Programme, pp. 377-391.
- Winpenny, J.; Heinz, I.; Koo-Oshima, S.; Salgot, M.; Collado, J.; Hernández, F.; Torricelli, R.; Mateo-Sagasta, J. y Román, P. (2013). Reutilización del agua en la agricultura: ¿Beneficios para todos?, Organización de las Naciones unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), pp. 20-33.
- Würgler, F. y Kramers, P. (1992). Enviromental Effects of genotoxins. *Mutagenesis*, 7, 321-327.

- Zakrzewski, S.F. (1991). Principles of environmental toxicology. American Chemical Society, Washington DC. pp. 270.
- Zapata, O. (2008). Módulo de Horticultura, Universidad estatal de Bolívar, Facultad de Ciencias Agropecuarias Recursos Naturales y el Ambiente, pp. 30-31.
- Zhang, L.J.; Jia, J.F.; Hao, J.G.; Cen, J.R. y Lit, T. K. (2011). A modified protocol for the comet assay allowing the processing of multiple samples. Mutation Research 721, 153-156.
- Zhou, J.; Zhu, H. y Dai, Y.-R. (1999). Effect of ethrel on apoptosis in carrot protoplast, Plant growth Regulation 27, 119.

## 12 ANEXOS

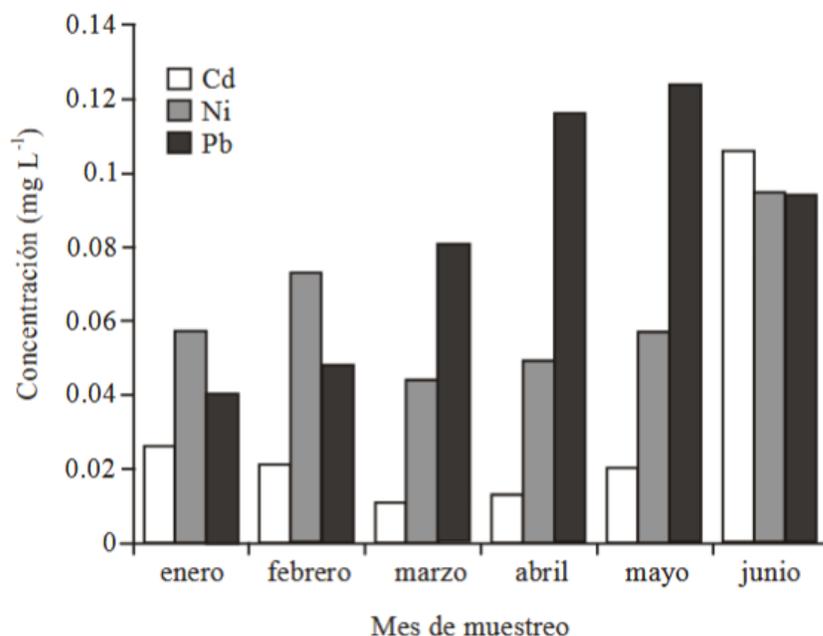


Fig. 16. Variación mensual en la concentración total de metales en el agua ocho sitios seleccionados del Valle del Mezquital de enero a junio de 1996 (Vázquez-Alarcón).

Tabla 3. Cuantificación de metales en suelo y alfalfa en marzo del 2009 en el municipio de Tlahuelilpan, Hidalgo LD=Límite de Detección (Cornejo *et al.* 2013).

Metales (mg kg <sup>-1</sup> )	Suelo 0-10 cm	Raíz	Hoja/Tallo
<b>Cadmio</b>	0.62-0.26	2.25	0.1/0.9
<b>Cromo</b>	<LD	<LD	<LD/1.02
<b>Hierro</b>	7.54		86/90
<b>Níquel</b>	10.66-31.5	0.27-0.83	<LD/3.01
<b>Plomo</b>	53.89		<LD
<b>Selenio</b>	<LD		<LD

Tabla 2. Valores (mg kg<sup>-1</sup>) de elementos tóxicos en el suelo según la tolerancia de los cultivos NOM-021-SEMARNAT-2000.

	Cd	Ni	Pb
<b>Normal</b>	0.35	50	35
<b>Peligroso</b>	3-5	100	100-300