



**UNIVERSIDAD POPULAR
AUTÓNOMA DEL ESTADO DE PUEBLA**

**DECANATO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y FACULTAD
DE BIOTECNOLOGÍA**

GENOTOXICIDAD Y CITOTOXICIDAD POR AGUAS RESIDUALES TRATADAS

TESIS

Para obtener el título de:
MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

Karen del Carmen Morales Ramírez

Director:
Dr. Luis Daniel Ortega Martínez

Co-directora:
Dra. María del Carmen Martínez Valenzuela

Asesora:
Dra. Beatriz Pérez Armendáriz

Puebla, Puebla, a 18 de Septiembre de 2020





UPAEP – Secretaría General

Dirección General de Apoyos Académicos

Dirección del Centro de Recursos para el Aprendizaje y la Investigación.

Biblioteca Central - **Karol Wojtyla**

Tesis Digitales Restricciones de uso:

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

El uso de textos, imágenes, gráficas, 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 de donde la obtuvo mencionando el autor o autores involucrados en el documento.

Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla
Centro Interdisciplinario de Posgrado e Investigación

Departamento de Ciencias Biológicas

Maestría en Biotecnología

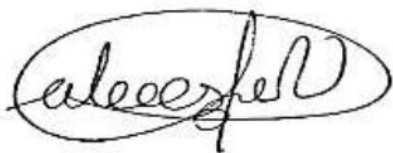
SE APRUEBA LA TESIS:

**Genotoxicidad y citotoxicidad por aguas residuales
tratadas**

Del alumno: KAREN DEL CARMEN MORALES RAMIREZ



Dr. Luis Daniel Ortega Martínez
Director de Tesis



Dra. Carmen Martínez Valenzuela
Co- director



Dra. Beatriz Pérez Armendáriz
Asesor

Puebla, México.

Agosto 2020



PLAGIARISM SCAN REPORT

Words 997 Date August 12,2020

Characters 6660 Exclude Url

0% Plagiarism	100% Unique	0 Plagiarized Sentences	5 Unique Sentences
------------------	----------------	-------------------------------	-----------------------

Content Checked For Plagiarism



PLAGIARISM SCAN REPORT

Words 976 Date August 12,2020

Characters 6396 Exclude Url

12% Plagiarism	88% Unique	5 Plagiarized Sentences	37 Unique Sentences
-------------------	---------------	-------------------------------	------------------------

Content Checked For Plagiarism



PLAGIARISM SCAN REPORT

Words 641 Date August 12,2020

Characters 4406 Exclude Url

0% Plagiarism	100% Unique	0 Plagiarized Sentences	27 Unique Sentences
------------------	----------------	-------------------------------	------------------------

Content Checked For Plagiarism



PLAGIARISM SCAN REPORT

Words 448 Date August 12,2020

Characters 2791 Exclude Url

0% Plagiarism	100% Unique	0 Plagiarized Sentences	8 Unique Sentences
------------------	----------------	-------------------------------	-----------------------

Content Checked For Plagiarism



PLAGIARISM SCAN REPORT

Words 967 Date August 12,2020

Characters 6010 Exclude Url

0% Plagiarism	100% Unique	0 Plagiarized Sentences	15 Unique Sentences
------------------	----------------	-------------------------------	------------------------

Content Checked For Plagiarism



PLAGIARISM SCAN REPORT

Words 700 Date August 12,2020

Characters 4314 Exclude Url

4% Plagiarism	96% Unique	1 Plagiarized Sentences	26 Unique Sentences
------------------	---------------	-------------------------------	------------------------

Content Checked For Plagiarism

AGRADECIMIENTOS

A Dios, a mis padres José Moises y Ludi, a mi esposo Enrique, a mis hermanos Carla y Jorge por acompañarme y guiarme durante toda la vida. Por esforzarse a mi lado.

Al Dr. Luis Daniel Ortega Martínez por haberme dirigido y guiado durante el proyecto de maestría. Por haber puesto su confianza en mí y en el trabajo, por apoyarme y enseñarme durante este tiempo. Gracias por aceptarme como su tesista.

A la Dra. María del Carmen Martínez Valenzuela que sin duda su colaboración en este trabajo fue de vital importancia para su culminación.

A la Dra. Beatriz Pérez Armendáriz por haberme aceptado en su programa de maestría, que sin duda es uno de los mejores, por apoyarme y siempre estar al pendiente de mí, por haber sido mi maestra y guiarme, por sus acertados consejos y colaboración en este proyecto.

A la Dra. Genoveva Rosano por todas sus enseñanzas, por haber sido mi maestra y apoyarme, por sus acertados consejos que fueron de gran ayuda para el desarrollo de este trabajo. Sin duda ha complementado mi formación y entendimiento.

A la maestra Laura Isabel, que sin su apoyo no hubiese sido posible este trabajo, gracias por tu guía y enseñanza.

A la maestra Concepción Carrión por apoyarme en el laboratorio.

A la maestra Victoria Conde Ávila por sus acertadas observaciones y apoyo.

A mis compañeros de biotecnología e ingeniería ambiental que me apoyaron durante el proceso de la tesis, Héctor, Eduardo, Maribel, Diana.

Gracias al CONACYT por el apoyo para poder realizar mis estudios de posgrado y por fomentar el desarrollo de la ciencia y tecnología.

CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS	8
ÍNDICE DE TABLAS.....	9
RESUMEN	10
ABSTRACT	11
Capítulo I	12
MARCO TEÓRICO	12
1.1 Agua	13
1.2 Contaminación.....	14
1.2.1 Fuentes de contaminación.....	15
1.3 Calidad del agua	16
1.4 Alternativas para la descontaminación	17
1.4.1 Tratamiento de aguas residuales.....	17
1.4.2. Procesos biológicos	18
1.4.2.1 Sistema de contacto biológico rotativo (CBR)	19
1.5 Utilización de aguas residuales tratadas	20
1.6 Genotoxicidad y Citotoxicidad.....	22
1.7 Bioindicadores.....	24
1.8 Impacto genotóxico en vegetales.....	25
1.8.1 <i>Allium sativum</i>	28
1.9 Biomarcadores.....	30
Capítulo II	35
ORGANIZACIÓN DEL TRABAJO.....	35
2.1 Planteamiento del problema	36
2.2 Pregunta de investigación.....	39
2.3 Justificación del estudio	39
2.4 Hipótesis.....	39
2.5 Objetivo general	40
2.6 Objetivos específicos.....	40
Capítulo III	41
ARTÍCULO.....	41
Resumen	44
Palabras clave.	44

Abstract	45
Keywords.....	45
Introducción.....	45
Materiales y métodos.....	47
Recolección de muestras	47
Procesado de las muestras	48
Análisis estadístico	50
Resultados	50
Caracterización físico-química	51
Genotoxicidad y Citotoxicidad.....	51
Discusión.....	56
Conclusiones	57
Agradecimientos.....	57
Referencias	58
BIBLIOGRAFÍA.....	61
Capítulo IV.....	68
Anexos.....	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de un sistema contactor biológico rotativo (CBR) para tratamiento secundario de aguas residuales (Fuente: Pérez A., 2010).....	20
Figura 2. <i>Allium sativum</i> . Montaje de bulbos de ajo en tubos de ensayo para pruebas de genotoxicidad y citotoxicidad.....	29
Figura 3. 1- Inducción de MN en <i>A. cepa</i> por exposición a efluentes de industrias textiles (Pathiratne, Hemachandra, & De silva, 2015), 2-MN inducidos por nanopartículas de Pb en células de la raíz de <i>V. faba</i> (Patlolla, Berry, May, & Tchounwou, 2012), 3- Micronúcleo en metafase inducido por efluentes de la industria textil, 4- Brotes nucleares inducidos por efluentes textiles (Giorgetti et al. 2011), 5- Anafase con puente cromosómico (AC) en células meristemáticas de <i>A. cepa</i> expuestas a extractos de metanol de <i>E. hirta</i> . Ampliación 400X (Yuet Ping, Darah, Kalsom Yusuf, Yeng, & Sasidharan, 2012).	33
Figura 4. Montaje de las yemas de <i>Allium s.</i> para germinación y crecimiento de las raíces en tres tratamientos; (C) control, (T.S) tratamiento secundario y (T.P) tratamiento primario de ambos periodos (Fig. 4 A diciembre-2018 y Fig. 4 B julio-2019).	49
Figura 5. Se muestra la media de la longitud (cm) de las raíces de <i>Allium s.</i> en cada tratamiento contemplando ambos periodos. Medias con letras iguales no difieren estadísticamente, según Tukey ($p \leq 0,01$).	130
Figura 6. Porcentajes de células en división de la raíz de <i>Allium s.</i> en cada tratamiento por periodo (A-diciembre del 2018 y B-julio del 2019).	54
Figura 7. Aumento de puentes cromosómicos en anafase en el T. SECUNARIO y T. PRIMARIO respecto al grupo CONTROL, contemplando diciembre y julio.	56
Figura 8. Aumento de Micronúcleos en el T. SECUNARIO y T. PRIMARIO respecto al grupo CONTROL, contemplando diciembre y julio.	55

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Concentraciones máximas permisibles de contaminantes. Tomado de NOM-003-SEMARNAT-1997.....	21
Tabla 2. Concentración permisible de metales pesados en aguas residuales tratadas. (Modificado de NOM-001-SEMARNAT-1996.).....	21
Tabla 3. Ventajas de Bioensayos de Genotoxicidad con Plantas Superiores para Evaluación y Monitoreo de Contaminantes Ambientales (Fuente: Grant, 1994).....	26
Tabla 4. Caracterización físico-química del agua residual del tratamiento primario y secundario (CBR) solo para el mes de diciembre.	51
Tabla 5. Conteo del análisis genotóxico (AC) y citotóxico (IM) de los meristemos apicales de la raíz de <i>Allium s.</i> expuestas a tres tratamientos.....	53

RESUMEN

Palabras clave: *Allium sativum*, genotoxicidad, citotoxicidad, agua residual, tratamiento secundario.

En el presente estudio se determinó el daño genotóxico y citotóxico en células de raíces expuestas a aguas residuales procesadas en una planta de tratamiento de discos rotatorios (CBR) utilizando el bioindicador *Allium sativum* con el fin de prevenir el riesgo de exposición. Se tomaron muestras de aguas residuales tratadas tanto del efluente del tratamiento primario como del secundario, en dos periodos distintos (diciembre y julio). Se determinaron concentraciones más altas de metales pesados tales como Pb (3.07 mg/L) y As (5 mg/L) en el agua procesada por el tratamiento secundario (CBR). La genotoxicidad y citotoxicidad se midió analizando 1000 células por tratamiento. Para la genotoxicidad se comparó el número de células aberrantes (puentes cromosómicos en anafase y micronúcleos) con el grupo control utilizando la prueba de Ji^2 , se contabilizó un aumento de células aberrantes tanto en las raíces expuestas al tratamiento secundario y primario en ambos periodos respecto a los grupos control con una $P < 0.01$, lo que indica daño genotóxico inducido por aguas tratadas. Los tratamientos mostraron un porcentaje de índice mitótico (IM) por debajo del grupo control, pero mayor de la mitad, lo que indicó daño citotóxico no significativo. Las raíces expuestas al agua procesada por el sistema CBR (tratamiento secundario) no mostraron inhibición significativa en el crecimiento de raíces con respecto al grupo control, sin embargo, hay una inhibición del crecimiento de las raíces expuestas al agua procesada por el tratamiento primario.

ABSTRACT

Key words: *Allium sativum*, genotoxicity, cytotoxicity, wastewater, secondary treatment.

In the present study, the genotoxic and cytotoxic damage was determined in root cells exposed to wastewater processed in a rotating disc treatment plant (RBC) using the *Allium sativum* bioindicator in order to prevent the risk of exposure. Samples of treated wastewater were taken from both the primary and secondary treatment effluents, in two different periods (December and July). Higher concentrations of heavy metals such as Pb (3.07 mg / L) and As (5 mg / L) were determined in the water processed by the secondary treatment (RBC). Genotoxicity and cytotoxicity were measured by analyzing 1000 cells per treatment. For genotoxicity, the number of aberrant cells (chromosomal bridges in anaphase and micronuclei) was compared with the control group using the Ji^2 test, an increase in aberrant cells was recorded both in the roots exposed to secondary and primary treatment in both periods with respect to the control groups with a $P < 0.01$, which indicates genotoxic damage induced by treated water. The treatments showed a mitotic index (MI) below the control group, but higher than half, which indicated non-significant cytotoxic damage. The roots exposed to the water processed by the CBR system (secondary treatment) did not show significant inhibition in the growth of roots with respect to the control group, however, there is an inhibition of the growth of the roots exposed to the water processed by the primary treatment.

Capítulo I

Marco teórico

1.1 Agua

La composición química y física del agua le confieren propiedades esenciales para el desarrollo de la vida. El agua es importante para procesos biológicos y el desarrollo de la vida y esencial tanto para el consumo humano, municipal, recreativo, etc., como para el funcionamiento de las actividades agropecuarias e industriales (Carbajal Azcona & González Fernández, 2012). De acuerdo con Semarnat en 2015, la demanda por el agua en las últimas décadas ha crecido significativamente, y ha presionado fuertemente su calidad en los reservorios naturales, ya que la producción de más alimentos y energía, así como de dotar del servicio de agua potable ha ido en alza junto con una población cada vez más numerosa.

Otro inconveniente se relaciona con el grado de contaminación, los bienes acuáticos nacionales tanto subterráneas como superficiales son mayormente contaminados debido a descargas de aguas residuales industriales y sanitarias además de arrastres provenientes de actividades agropecuarias. El agua es un elemento esencial para la conservación de los ecosistemas naturales ya que su escasez amenaza su conservación, deteriorando los ecosistemas y la pérdida de biodiversidad, con ello se reduce la calidad de los bienes y servicios ambientales que sostienen a las comunidades. Existe una presión significativa sobre el ciclo hidrológico debido a las actividades antropogénicas, cuyas consecuencias en diversas regiones afectan directamente de manera negativa a la calidad de vida de la población, los ecosistemas acuáticos naturales y su biodiversidad (Semarnat, 2012).

La producción y el uso desmesurado de bienes y servicios, genera una mayor demanda de agua, lo que implica generar mayor carga de aguas residuales continuamente en el mundo, donde la gran mayoría se vierten directamente en el medio ambiente sin un tratamiento adecuado (UNESCO, 2017., Semarnat, 2012).

La contaminación de numerosos acuíferos y cuerpos de agua superficiales aunado a la presión de su demanda ha reducido la disponibilidad, y en algunos casos, altas

inversiones económicas para su tratamiento y potabilización (Semarnat, 2015).

Existen procesos físicos, químicos y biológicos en condiciones ambientales naturales que permiten, de alguna manera, mantener en equilibrio diferentes sustancias, desde compuestos orgánicos hasta compuestos químicos tóxicos, sin embargo, la mayoría de las actividades antropogénicas modifican la composición química del agua que no han recibido tratamiento para remover contaminantes los cuales alteran su equilibrio dinámico. Un ejemplo de ello es cuando incrementan nutrientes como nitratos, fosfatos y amonio los cuales promueven el desarrollo de algas y fitoplancton. A este fenómeno conocido como eutrofización, reduce el oxígeno disuelto afectando a diversos organismos (Semarnat, 2015., Gómez Sandoval et al, 2013., Barba ,2002).

1.2 Contaminación

De manera inevitable dentro de las actividades humanas está la producción de aguas residuales, generalmente líquidos, materiales orgánicos e inorgánicos provenientes de diversas actividades como las domésticas, industriales y agropecuarias, las cuales son vertidas a las fuentes hídricas como arroyos, ríos y lagos. La contaminación del agua también puede tener lugar a través de los lixiviados de rellenos sanitarios (Pérez Aristizábal, 2010). Estas características de las aguas residuales hacen permisible el desarrollo de una diversidad de microorganismos patógenos.

Debido a la descarga continua de aguas residuales domésticas e industriales sin un tratamiento que elimine los contaminantes, como de los escurrimientos con fertilizantes y plaguicidas provenientes de las actividades agrícolas y pecuarias asentadas en las diferentes cuencas, la calidad de las aguas superficiales y subterráneas se afecta negativamente, poniendo en riesgo la salud de la población y la integridad de los ecosistemas (Conagua, 2015), lo que resulta en un desequilibrio del sistema ecológico, así como la genética de los seres vivos, pues

se ha informado que se encuentran compuestos carcinógenos, genotóxicos, mutagénicos y xenobióticos en las aguas residuales que causan efectos perjudiciales en animales, humanos y plantas (Alam, Ahmad, & Malik, 2009) . Se estima que a nivel mundial entre 85 y 95% del agua residual se descarga directamente a los ríos, lagos y océanos sin recibir tratamiento previo (Semarnat, 2012., Conagua, 2015).

Barba H. en 2002, nos muestra de una forma estructurada, por un lado; las principales fuentes de contaminación y por otro las sustancias contaminantes del agua a continuación.

1.2.1. Fuentes de contaminación

Los contaminantes los podemos encontrar de manera natural en forma de partículas dispersas de polvo generadas por la fragmentación de rocas y otros minerales, hojarasca y otro tipo de materiales en concentraciones bajas sin generar polución. Por el contrario, los desechos de origen humano son producidas en grandes cantidades y por lo general son compuestos que generan daño en los ecosistemas. A continuación, se mencionan ambas fuentes:

- 1) De origen natural: Por ejemplo, el Hg que se encuentra naturalmente en la corteza de la Tierra y en los océanos. Los sólidos suspendidos.
- 2) De origen antropogénico: Se mencionan algunos ejemplos.
 - ✓ Industria: Construcción, minería, energía, textil y piel, automoción, navales, siderurgia, química inorgánica (metales pesados como Hg, Pb, Cd, Zn, Cr, etc.), química orgánica, fertilizantes, pasta y papel, plaguicidas, fibras químicas, contaminación térmica liberada por procesos industriales y sustancias radiactivas.
 - ✓ Vertidos urbanos: Proviene de las viviendas las cuales tiene una composición muy variada debido a factores y la naturaleza de la población residente, edificios públicos y de la escorrentía urbana que se colecta en el drenaje. Sus principales

contaminantes son nutrientes (nitrógeno, fósforo, carbono), microorganismos (bacterias, virus, protozoos, nematodos, etc.), materia orgánica (heces, desechos de alimentos), detergentes, sustancias químicas orgánicas sintéticas, hormonas y productos farmacéuticos (Semarnat, 2012).

Agricultura y ganadería: Donde se generan desechos biológicos y vertidos de pesticidas y fertilizantes.

1.3. Calidad del agua

Es necesario conocer las propiedades físicas, químicas y biológicas del agua, ya que estas proporcionan información acerca de su calidad para poder utilizarla apropiadamente y con seguridad. Para medir la calidad se definen estándares específicos en función de los usos que pretende dársele, por ejemplo, de agua potable, para el uso agrícola o industrial, riego de áreas verdes, etcétera (Semarnat, 2015).

Dentro de las propiedades físicas podemos considerar: turbidez, sólidos, olor, temperatura y color. Además de las propiedades antes mencionadas, la calidad del agua puede medirse con otros parámetros tales conductividad, pH y oxígeno disuelto que son muy fáciles de medir. Existen otros parámetros enfocados en la medición de nutrientes, sólidos disueltos totales, metales pesados, patógenos y compuestos orgánicos (Mazari Hiriart et al., 2010).

La materia orgánica es el principal contaminante en las aguas residuales (Henze, Brdjanovic, van Loosdrecht, & Ekama, 2017). Tradicionalmente, la materia orgánica se mide a través de la demanda bioquímica de oxígeno (DBO) la cual determina la cantidad de materia orgánica biodegradable, la demanda química de oxígeno (DQO) que mide la cantidad total de materia orgánica y la concentración de sólidos suspendidos totales (SST). De acuerdo con la CONAGUA (2015) en la actualidad, a través de la Red Nacional de Monitoreo (RNM), la evaluación de calidad del agua se lleva a cabo utilizando los tres indicadores mencionados anteriormente. Otros indicadores importantes son los sólidos suspendidos volátiles (SSV) y fijos (SSF) que considera la materia en suspensión sedimentable y no sedimentable (coloidal),

el nitrógeno total Kjeldhal (NTK), nitratos y nitritos (NO_3^- , NO_2^-), fósforo total (Pt), ortofosfatos (PO_4^{3-}) que son nutrientes que provocan eutrofización en cuerpos de agua y contaminación de acuíferos, grasas y aceites, Sólidos Disueltos Totales (SDT), además de coliformes fecales y huevos de helmintos que son patógenos y parásitos transmisores de enfermedades gastrointestinales (Noyola, Morgan-Sagastume, & Güereca, 2013).

1.4 Alternativas para la descontaminación

1.4.1 Tratamiento de aguas residuales

De acuerdo con la NOM-003 (SEMARNAT,1997) un agua residual se define como toda agua de composición variada provenientes de las descargas de usos municipales, industriales, comerciales, de servicios, agrícolas, pecuarios, domésticos, incluyendo fraccionamientos y en general de cualquier otro uso, así como la mezcla de ellas. La finalidad del tratamiento del agua residual es la remoción de contaminantes orgánicos e inorgánicos, en suspensión y/o disueltas, para alcanzar una calidad de agua requerida por la normativa de descarga o por el tipo de reutilización a la que se destinará. En un sistema de tratamiento de aguas residuales, siempre se producen residuos, tales como los lodos acompañados por la generación de emisiones gaseosas. Podemos diferenciar tres tipos comúnmente utilizados en sistemas de tratamiento de aguas residuales, los tratamientos físicos, los cuales hacen uso de procesos como la gravedad, filtración por retención física, atracción electrostática etc. Procesos químicos como la coagulación, adsorción, oxidación. Y los tratamientos biológicos que involucran la degradación del material orgánico por medio de microorganismos. Estos tipos de tratamiento pueden utilizarse de forma aislada o en combinación (Noyola et al. 2013).

Una vez que el agua residual es captada por un sistema o tren depurador, el primer paso es someterla a un pretratamiento donde se retira basura, sólidos y gruesos de gran tamaño, así como arenas y grasas. Posteriormente el agua pasa al siguiente

modulo del tren denominado tratamiento primario, donde se eliminan sólidos en suspensión fácilmente sedimentables y algo de materia orgánica (Metcalf & Eddy, Inc., Tchobanoglous, Burton, & Stensel, 2003).

En el tratamiento secundario se elimina la materia orgánica biodegradable (principalmente soluble) por medios preferentemente biológicos (aerobios y anaerobios) debido a su bajo costo y alta eficacia de remoción. Básicamente, los contaminantes presentes en el agua residual son transformados por los microorganismos en materia celular, energía para su metabolismo y en otros compuestos orgánicos e inorgánicos. Los microorganismos desarrollados forman una biomasa conocida como flóculos, que posteriormente son apartados y desechados del efluente tratado a través de un sedimentador o clarificador. En el caso del agua residual doméstica o municipal, el objetivo principal es reducir el contenido orgánico y, en ciertos casos, los nutrientes tales como el nitrógeno y el fósforo. Finalmente, el tratamiento terciario cuya finalidad es eliminar compuestos suspendidos y materia orgánica remanente no biodegradable (Noyola et al. 2013).

1.4.2. Procesos biológicos

Los procesos biológicos (secundarios) aplicados al tratamiento de aguas residuales pueden ser de tipo aerobios, anóxicos, anaerobios, todos los anteriores combinados, o procesos en estanques o lagunas (Merli & Ricciuti, 2009).

En los procesos biológicos anaerobios el 90% de la energía contenida se encuentra en forma de gas metano y solo el 10% de la energía de sustrato se transforma en lodo, a diferencia del sistema aerobio en el que el 65% de la energía se transforma en lodos (células nuevas) y el 35% restante se disipa como resultado de la liberación de energía. La característica principal de los sistemas anaerobios es que su operación no depende del suministro de oxígeno y por lo tanto no se requieren equipos de aireación y todo lo relacionado con su mantenimiento, operación y costo energético. Entre los principales procesos biológicos de tratamientos anaerobios se encuentran las fosas sépticas, tanque Imhoff, contacto anaerobio, filtro anaerobio,

reactor de lecho de lodos, reactor de lecho expandido (Noyola et al., 2013).

Algunos de los procesos de tratamiento biológico aerobios más utilizados son los fangos activados, lagunas aireadas, digestión aerobia y sistemas biológicos rotativos de contacto (CBR) también llamados biodiscos, entre otros (Nodal Becerra, 2001).

De acuerdo con Noyola y colaboradores (2013) la ventaja que posee el sistema aerobio sobre el anaerobio, y por lo cual es utilizado ampliamente, es porque la calidad del agua tratada es mayor al efluente anaerobio y permite cumplir con regulaciones ambientales estrictas. Los tratamientos anaerobios conservan materia orgánica disuelta (DQO) y compuestos inorgánicos reducidos (amonio, sulfuro de hidrógeno), que son destinados al medio receptor.

1.4.2.1 Sistema de contacto biológico rotativo (CBR)

El sistema de contacto biológico rotativo (CBR) o también conocido como biodiscos, es un tratamiento biológico aerobio de crecimiento adherido, utilizado para la depuración de aguas residuales mediante la oxidación de compuestos orgánicos carbonáceos y de amoníaco.

Este sistema de biodiscos, presenta un medio de soporte (discos) en serie parcialmente sumergidos en el agua residual, los cuales giran lentamente sobre su eje (Fig. 1). Este proceso estimula la adherencia de población microbiológica al material de soporte (discos), también llamada biopelícula o biofilm. El giro de los discos permite que el biofilm esté en contacto con el agua residual y luego con el aire atmosférico alternadamente. Cuando la superficie de los discos está sumergida, la microbiota degrada los compuestos orgánicos depurando el agua, posteriormente cuando gira el disco se expone la biopelícula a la atmósfera para el intercambio de oxígeno y garantizar las condiciones aerobias en el proceso (Pérez A., 2010).

El sistema CBR está compuesto en etapas o secciones. El agua entra en la primera sección y avanza a las etapas subsecuentes. Mientras el agua recorre el tren, cada una de las secciones procesa una carga orgánica menor del vagón anterior. Por lo que en cada sección se establecen distintas condiciones para el desarrollo de

diferentes organismos (Pérez Aristizábal, 2010).

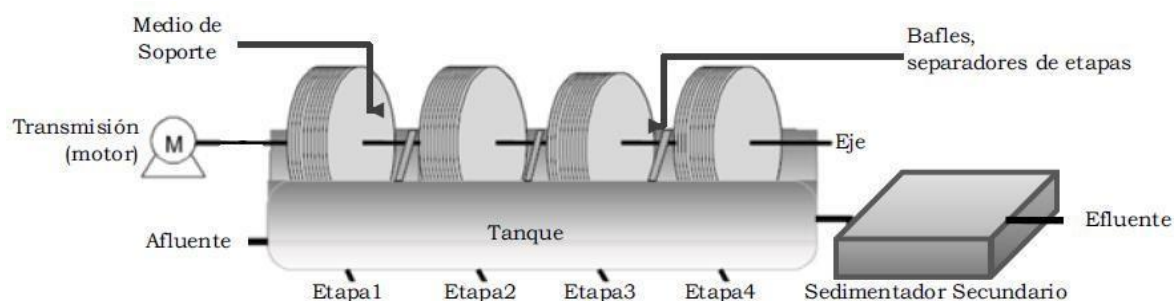


Figura 1. Esquema de un sistema contactor biológico rotativo (CBR) para tratamiento secundario de aguas residuales (Fuente: Pérez A., 2010).

1.5 Utilización de aguas residuales tratadas

De acuerdo con la NOM-003-SEMARNAT-1997 que establece los límites máximos permisibles de contaminantes para las aguas residuales tratadas que se reúsen en servicios al público, los contaminantes varían según el destino en función del contacto que tenga con las personas, ya sea directo u ocasional.

El reúso en servicios que se destinan a actividades con contacto directo, por mencionar algunos son: el llenado de lagos y canales artificiales recreativos, fuentes ornamentales, lavados de vehículos, riego de parques y jardines.

Por otro lado, el reúso en servicios públicos con contacto indirecto u ocasional se destina a actividades con acceso restringido, por mencionar algunos como: riego de jardines y camellones en autopistas, camellones en avenidas, fuentes de ornato, campos de golf, lagos artificiales no recreativos, entre otros.

Dentro de las especificaciones de los límites máximos permisibles de contaminantes en aguas residuales tratadas se muestran en la tabla 1. La cantidad de metales pesados y cianuros deberán respetar las concentraciones máximas permisibles establecidos a los correspondientes a embalses naturales y artificiales con uso en riego agrícola (tabla 2) de la norma oficial mexicana NOM-001-SEMARNAT-1996.

Tabla 1. Concentraciones máximas permisibles de contaminantes. Tomado de NOM-003-SEMARNAT-1997.

LÍMITES MÁXIMOS PERMISIBLES DE CONTAMINANTES					
TIPO DE REUSO	PROMEDIO MENSUAL				
	Coliformes fecales NMP/100 ml	Huevos de helminto (h/l)	Grasas y aceites mg/l	DBO5 mg/l	SST mg/l
SERVICIOS AL PÚBLICO CON CONTACTO DIRECTO	240	≥ 1	15	20	20
SERVICIOS AL PÚBLICO CON CONTACTO INDIRECTO U OCASIONAL	1,000	≤ 5	15	30	30

NMP= número más probable, DBO5= demanda bioquímica de oxígeno, SST= sólidos suspendidos totales.

Tabla 2. Concentración permisible de metales pesados en aguas residuales tratadas. (Modificado de NOM-001-SEMARNAT-1996.)

LÍMITES MÁXIMOS PERMISIBLES PARA METALES PESADOS Y CIANUROS														
PARÁMETROS (*)	RÍOS						EMBALSES NATURALES Y ARTIFICIALES				SUELO			
(miligramos por litro)	Uso en riego agrícola (A)		Uso público urbano (B)		Protección de vida acuática (C)		Uso en riego agrícola (B)		Uso público urbano (C)		Uso en riego agrícola (A)		Humedales Naturales (B)	
	P.M.	P.d.	P.M.	P.d.	P.M.	P.d.	P.M.	P.d.	P.M.	P.d.	P.M.	P.d.	P.M.	P.d.
Arsénico	0.2	0.4	0.1	0.2	0.1	0.2	0.2	0.4	0.1	0.2	0.2	0.4	0.1	0.2
Cadmio	0.2	0.4	0.1	0.2	0.1	0.2	0.2	0.4	0.1	0.2	0.05	0.1	0.1	0.2
Cianuro	1.0	3.0	1.0	2.0	1.0	2.0	2.0	3.0	1.0	2.0	2.0	3.0	1.0	2.0
Cobre	4.0	6.0	4.0	6.0	4.0	6.0	4.0	6.0	4	6.0	4	6.0	4.0	6.0
Cromo	1	1.5	0.5	1.0	0.5	1.0	1	1.5	0.5	1.0	0.5	1.0	0.5	1.0
Mercurio	0.01	0.02	0.005	0.01	0.005	0.01	0.01	0.02	0.005	0.01	0.005	0.01	0.005	0.01
Níquel	2	4	2	4	2	4	2	4	2	4	2	4	2	4
Plomo	0.5	1	0.2	0.4	0.2	0.4	0.5	1	0.2	0.4	5	10	0.2	0.4
Zinc	10	20	10	20	10	20	10	20	10	20	10	20	10	20

(*) Medidos de manera total. P.D.= Promedio Diario, P.M.= Promedio Mensual; N.A.= No es aplicable (A), (B) y (C): Tipo de Cuerpo Receptor según la Ley Federal de Derechos.

El reúso posee varias ventajas en cuanto a costo, reduce las presiones sobre los cuerpos de agua de primer uso y satisface demandas de agua que no exigen calidad potable (Conagua, 2015).

1.6 Genotoxicidad y Citotoxicidad

En el desarrollo y crecimiento de tejidos, las células de los organismos tendrán que asegurar que todo su material se reparta en forma aproximadamente equitativa entre las células hijas resultantes, sin embargo el DNA tendrá que ser duplicado exactamente, las células que los conforman deben de pasar por distintos eventos moleculares en el ciclo celular, dicho evento es regulado por diversos genes, como los que codifican a las proteínas del sistema de ciclinas y kinasas dependientes de ciclinas que ayudan a la creación del factor promotor de la maduración que es importante para transición de metafase a la anafase además de promover el fin de la mitosis. La regulación genética en el ciclo celular implica la transcripción y síntesis de proteínas específicas que determinan el inicio y fin de la fase de síntesis (S) y el paso hacia la fase G2, la mitosis y de nuevo al G1. Este ciclo puede verse afectado por compuestos genotóxicos y citotóxicos que alteran o dañan a los cromosomas (Cumpa Yumpton & Zavala de la Cruz, 2013).

Peña, Carter y Ayala (2001), refieren que la toxicidad o capacidad de causar daño, es una propiedad intrínseca de algunas sustancias que se puede ver afectada por diferentes factores, tanto bióticos como abióticos, de manera tal que es necesario tomarlos en cuenta cuando se evalúa la toxicidad de una muestra. Existe en los organismos, una respuesta tóxica que es cualquier cambio que produce una lesión celular, razón por la cual, la caracterización de los efectos tóxicos o dañinos es esencial en la evaluación del peligro potencial impuesto por dichas sustancias.

En presencia de ciertos estímulos externos, el progreso celular se puede bloquear en una de las fases del ciclo celular o la división celular, y su acción se denomina mitoinhibición. Los mitógenos actúan para superar los mecanismos de frenado

intracelular que bloquean la progresión del ciclo celular, y su acción se denomina mitoestimulador. Cualquier desviación de la progresión ordenada y dirigida del ciclo celular, y respectivamente, de la mitosis y la citocinesis, se refleja en un estado de citotoxicidad y genotoxicidad (Bonciu, et al. 2018).

Los ensayos de genotoxicidad están diseñados para detectar compuestos denominados genotóxicos o xenobióticos (ya sea de origen químico, físico o biológico) que provocan alteraciones o afectan negativamente la integridad del material genético de una célula (Alborghetti Nai et al. 2013., Tobón M. & López G., 2011) de forma directa o indirecta, las cuales, están expuestas a los sustratos tóxicos (EUPATI, 2015), por lo que originan efectos biológicos adversos en el organismo dando lugar a procesos mutagénicos (alteraciones genéticas, el caso de las macromutaciones, se definen como agentes clastógenos a aquellos capaces de inducir rupturas cromosómicas y agentes aneunógenos, a aquellos que producen la pérdida de cromosomas enteros o grupos de cromosomas), carcinogénicos (se refiere a cambios o transformación celular de tipo irreversible, a través de una serie de estadios; iniciación, promoción y progresión) o teratogénicos (daño inducido sobre el organismo en desarrollo, es decir, en alguno de los distintos períodos de gestación o a lo largo de la misma como proceso) (Abrevaya, 2008., Herrero Felipe & De La Peña De Torres, 2004). Si los efectos de las mutaciones se producen en los tejidos germinales, podrán tener consecuencias hereditarias (Klaassen & Watkins, 2005). La inducción de daños por los xenobióticos está influenciada por la cantidad, la vía y tiempo de exposición, aunado a la estructura genética de cada organismo impulsar una susceptibilidad particular (Abrevaya, 2008).

Los distintos ensayos de genotoxicidad para la detección de agentes que actúan como clastógenos o aneunógenos, se desarrollan mediante el uso de biomarcadores clásicos de la genética toxicológica. Para determinar estos marcadores, se han desarrollado varios sistemas de prueba, frecuentemente son usados para monitorear sustancias genotóxicas en el aire, el agua, suelo y analizar plaguicidas como parte de la evaluación de riesgos para los seres humanos (Valencia Quintana, y otros, 2013).

La citotoxicidad se define como el efecto acumulativo sobre el número de células debido a apoptosis, necrosis o reducción de la tasa de replicación celular y existen ensayos in vitro para evaluar cada alteración celular y se recomienda realizarlos en varios tipos de células (Velandia, Flechas, Stashenko, & Ocazonez, 2016). El índice mitótico (IM), caracterizado por el número total de células en división, ha sido utilizado como un criterio para evaluar la citotoxicidad de diversos agentes. Los niveles de citotoxicidad de un compuesto pueden ser determinados por el incremento o decremento en el IM. Una disminución de más del 50 % usualmente tiene efectos subletales; si el IM disminuye a menos del 22 % del valor presentado en el testigo negativo, significa que se están provocando efectos letales en los organismos expuestos. Por el contrario, los IM por arriba de los valores del testigo negativo son el resultado de la estimulación de la división celular, lo cual puede caracterizar un evento dañino para las células, llevando a una proliferación descontrolada que pueden causar efectos tumorales (Valencia Quintana, y otros, 2013).

Diversos investigadores han desarrollado pruebas con distintos bioindicadores para predecir efectos genotóxicos y citotóxicos de sustancias químicas, drogas, colorantes, extractos de plantas, entre otros. Por ejemplo, Ulloa Carbajal, Zavala de la Cruz, y Sisniegas (2015), determinaron el efecto citotóxico del colorante artificial tartrazina en el índice mitótico de células meristemáticas de las raíces de *Allium cepa* expuesta a diferentes tiempos y concentraciones, los resultados mostraron una disminución del índice mitótico (IM) en todos los tratamientos ensayados con respecto al control y testigos, por lo que se concluyó que la Tartrazina disminuye el índice mitótico de células meristemáticas de *A. cepa*. A partir de estos resultados se infiere que este colorante presenta efecto citotóxico.

1.7 Bioindicadores

El análisis de citotoxicidad y genotoxicidad puede ser determinada mediante el uso de bioindicadores, método basado en la propiedad que tienen ciertos organismos o poblaciones celulares para detectar contaminantes en un medio o de identificar la

pérdida de calidad de un ambiente (Sáenz & Di Marzio, 2013). En este sentido, estos organismos son utilizados como bioindicadores de compuestos que provocan alteración del ciclo celular (citotóxicos), anormalidades cromosómicas (genotóxicos) y cuadros malignos (carcinógenos) (Beltrán Orbegoso & Gonza Carnero, 2017). Atendiendo al organismo indicador se pueden clasificar en (Beringola Beringola, 1996):

- Ensayos bacterianos (*S.typhimurium*, *E. coli* y otras bacterias luminiscentes)
- Ensayos con mohos y levaduras (*S. cerevisiae*, *N. crassa*, etc.)
- Ensayos con insectos (*D. melanogaster*, *B. mori*)
- Ensayos con cultivos celulares de mamíferos (*H. chino*, linfoma de ratón y linfocitos de sangre periférica o total (Test Comet))
- Ensayos con mamíferos (ratón, rata, hombre etc.)
- Ensayos con plantas (Plantas como *Allium cepa*, *Arabidopsis thaliana*, *Glycine max*, *Allium sativum*, *Tradescantia paludosa*, *Vicia faba* y *Zea mays*, han sido consideradas como sistemas de prueba para evaluar genotoxicidad y citotoxicidad (Petriccione, Forte, Valente, & Ciniglia, 2013).

1.8 Impacto genotóxico en sistemas vegetales

Las plantas superiores son consideradas excelentes indicadores de efectos citotóxicos y genotóxicos por contaminantes (Waters, Brady, Stack, & Brockman, 1990) en diferentes ambientes, son confiables y tienen alta sensibilidad, también posibilitan la evaluación de distintos biomarcadores genéticos como; mutaciones puntuales, aberraciones cromosómicas (AC), aberraciones nucleares (AN), índice mitótico (IM), en células de diversos órganos y tejidos, tales como hojas, raíces y polen. Los biomarcadores pueden servir como: 1) Centinelas; demuestran la presencia de tóxicos biodisponibles y la magnitud de la exposición. 2) Indicadores potenciales de la contaminación; señalan efectos potenciales de los tóxicos para la salud de los humanos, animales o plantas. 3) Herramientas de predicción; en la salud de las poblaciones o de los ecosistemas (Jaramillo Juárez, Rincón Sánchez, & Rico Martínez, 2009).

Los ensayos con plantas se han utilizado ampliamente para probar los efectos genotóxicos de diferentes clases de sustancias o contaminantes en aire, suelo y sedimentos, presentan características (tabla 3) que las hacen excelentes modelos genéticos para probar y evaluar contaminantes ambientales (Grant, 1994), gracias a su sensibilidad de alterarse ante tóxicos (Valencia Quintana, y otros, 2013).

Tabla 3. Ventajas de Bioensayos de Genotoxicidad con Plantas Superiores para Evaluación y Monitoreo de Contaminantes Ambientales (Fuente: Grant, 1994).

(1)	Las plantas superiores son eucariotas y sus células tienen una estructura similar a las del hombre. Sufren mitosis y meiosis. Es posible estudiar efectos en células germinales comparables a los de animales
(2)	Técnicos pueden ser capacitados para realizar los ensayos vegetales de manera relativamente rápida. Son fáciles de cultivar y poco costosas para trabajar. De particular relevancia para países en desarrollo
(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 de temperatura. Las plantas superiores pueden ser regeneradas a partir de células haploides o diploides
(5)	Pueden ser usados para evaluar la genotoxicidad de compuestos 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 usados para el monitoreo in situ de contaminantes mutagénicos
(8)	Existe un amplio rango de biomarcadores genéticos. Alteraciones citológicas y mutaciones, en plantas completas, hojas, embriones, polen, etc.
(9)	Evaluaciones de genotoxicidad están disponibles para diferentes compuestos así que comparaciones pueden ser hechas entre diferentes ensayos
(10)	Diferentes estudios presentan correlación positiva con ensayos citogenéticos con mamíferos
(11)	Pueden ser combinadas con ensayos microbianos para detectar metabolitos mutagénicos (promutágenos)
(12)	Son muy sensibles (pocos falsos negativos) en la predicción de carcinogenicidad de agentes evaluados
(13)	Varios cientos de loci genéticos pueden ser monitoreados

Dependiendo de la etapa ontogenética del desarrollo de la planta, un agente tóxico puede causar mutaciones que conducen a la transformación de células somáticas, inducir mutaciones que afectan a las células germinales o ejercer efectos teratogénicos. Los ensayos de genotoxicidad en plantas superiores proporcionan valiosos sistemas de análisis genéticos para detectar y controlar los contaminantes ambientales (Grant 1994).

En la detección de eventos mutagénicos, los estudios para la determinación de AC utilizando plantas como bioindicadores son de los métodos más sencillos, fiables y

económicos.

Las alteraciones citogenéticas pueden ser detectadas en las divisiones mitóticas o meióticas. Los análisis de las AC somáticas son llevados a cabo en células en proliferación de las puntas de las raíces, los ápices de tallos o de los tubos polínicos, mientras que los estudios en meiosis son realizados en células madre del polen. Las más apropiadas para el análisis citogenético son las especies que tienen un número pequeño de cromosomas fácilmente distinguibles. Estas condiciones son reunidas en los meristemos radiculares de *Vicia faba*, *Allium cepa*, *Crepis capillaris*, *Pisum sativum* (Valencia Quintana et al. 2013) entre otros.

A lo largo de los últimos años, el uso de plantas para el biomonitoreo de agentes genotóxicos en el ambiente se ha reconocido como excelentes bioindicadores y, un sistema alternativo de ensayo de primer nivel para la detección de posibles daños genéticos resultantes de la contaminación o el uso de químicos. Los resultados de ensayos genéticos de plantas superiores podrían contribuir significativamente a proteger a los organismos, principalmente al humano, de los agentes que pueden causar mutación y cáncer (Grant, 1994).

Un ejemplo de lo anterior se resume en el estudio realizado por Beltrán Orbegoso & Gonza Carnero (2017) para determinar la citotoxicidad y genotoxicidad en el bioindicador ambiental *Vicia faba* por aguas de los ríos Jequetepeque y Moche mediante. Sometieron los ápices de las raíces de los ajos a diferentes niveles de ambas cuencas, posteriormete realizaron los ensayos toxicológicos encontrando que el agua de la cuenca media del río Moche, presentó una alta citotoxicidad (al inducir un índice mitótico de 5,4 %, un aumento del índice profásico de 87,2 % y reducciones de los índice metafásico de 5,1%, anafásico 3,3 % y telofásico 4,4 %) y un alto efecto genotóxico (por presencia de aberraciones cromosómicas clastogénicas, de las mas frecuentes como: puentes cromosomicos y cromosoma aislado, en cuanto a las AC aneugénicas, las más frecuentes fueron: cromosoma en espiral, c-metafase y cromosoma pegajoso); las aguas del río Jequetepeque no evidenciaron efecto citotóxico ni genotóxico de importancia.

Dong & Zhang (2010), estudiaron la genotoxicidad de las aguas residuales de una planta de coquización en China, utilizando como bioindicadores a *V. faba* y *Hordeum vulgare*. Los resultados mostraron que el agua residual de la planta en concentraciones moderadas, disminuyó el IM y aumentó la frecuencia de micronúcleos, intercambio de cromátidas hermanas y células picnóticas. La exposición a la misma concentración del agua residual indujo mayores lesiones genéticas en *V. faba* en contraste con *H. vulgare*. En conclusión, la exposición de aguas residuales de la planta de coquización en el medio ambiente, supone un riesgo genotóxico potencial para los organismos

1.8.1 *Allium sativum* L.

En cuanto a células eucariotas vegetales, se ha utilizado ampliamente en pruebas de toxicidad a *Allium sativum* conocido comúnmente como ajo (figura 2), un bulbo perteneciente a la familia Liliaceae y subfamilia Allioideae (Ramírez et al. 2016) que por su reducido genoma diploide $2n = 16$, tiene la propiedad de alterarse ante sustancias contaminantes (Tartar, Kaymak, & Gokalp Muranli, 2006). Se ha convertido en un bioindicador importante para el estudio y evaluación de citotoxicidad y genotoxicidad de contaminación ambiental por productos químicos usados en la alimentación, salud, industria, y agricultura además de otras sustancias. *Allium sativum* L. es una planta potencialmente útil para estudiar la absorción y acumulación de metales pesados (Liu, et al. 2009).

Las células vegetales generalmente poseen las importantes enzimas necesarias para la activación de ciertos promutágenos; Se ha demostrado que este es el caso de las células de la punta de la raíz de *Allium* (Fiskesjö, 1985).

Allium es un excelente modelo *in vivo*, ya que sus raíces crecen en contacto directo con la sustancia de interés y es altamente sensible a estos, lo que permite predecir el posible daño al DNA de organismos eucariotas. Por lo tanto, los datos se pueden

extrapolar para toda la biodiversidad animal y vegetal. El análisis de las alteraciones cromosómicas puede ser igual a la prueba de mutagenicidad principalmente para la detección de alteraciones estructurales, también es posible observar alteraciones cromosómicas numéricas. Debido a la preocupación por la contaminación ambiental, la prueba de *Allium* ha ocupado un lugar importante para la prevención y la predicción del impacto ambiental que es causado por el uso y la eliminación de sustancias como residuos químicos, de limpieza, medicamentos y herbicidas.

(Tedesco & Laughinghouse IV , 2012).

Las principales ventajas de utilizar a *Allium* es su disponibilidad durante todo el año, es económico, fácil de cultivar y manejar; su uso no requiere de condiciones estériles o materiales costosos y su tasa de división celular es rápida; sus cromosomas grandes permiten la visualización de las diferentes fases mitóticas e identificar daños genéticos (Iqbal, 2016., Fiskesjö, 1985)

De acuerdo con Leme y Marín Morales (2009), los estudios de sensibilidad y correlación de *Allium* y otros bioindicadores son importantes para la evaluación precisa de riesgos ambientales, así como la extrapolación de los datos a otros organismos como los humanos.

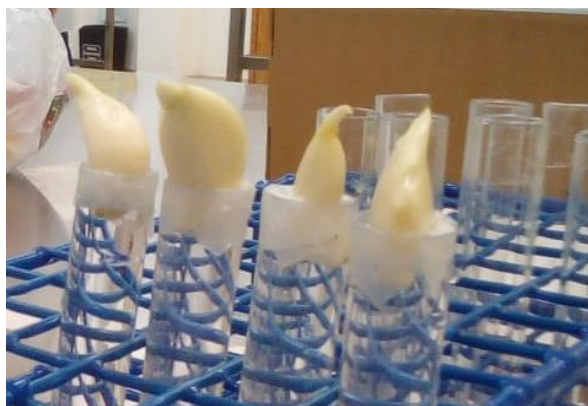


Figura 2. *Allium sativum*. Montaje de bulbos de ajo en tubos de ensayo para pruebas de genotoxicidad y citotoxicidad.

Para validar el uso de *Allium sativum* como modelo de prueba sensible para la genotoxicidad Saxena, Chauhan, y Gupta en 2005, evaluaron los efectos citogenéticos del insecticida cipermetrina en células meristemáticas de la raíz de *A. sativum* expuestas a diferentes concentraciones (1, 2, 4, 8, 16 ppm) durante 24 h. Las células analizadas después de la exposición tuvieron una inhibición significativa

dependiente de la dosis en el índice mitótico (IM) y la inducción de aberraciones mitóticas y cromosómicas (MA y CA). Los datos indican que las dosis más altas de cipermetrina producen toxicidad.

Liu Donghua et al. (2009), aplicaron diferentes concentraciones de Cu, así como diferentes tiempos de exposición, para investigar las alteraciones citogenéticas y ultraestructurales en las células del meristemo de *Allium sativum* L. Sus resultados mostraron que el índice mitótico disminuyó progresivamente cuando aumentaron la concentración de cobre y el tiempo de exposición. Se observaron C-mitosis, puentes de anafase, pegajosidad cromosómica y núcleos rotos en las células de la punta de la raíz tratadas con cobre.

Arya & Mukherjee en 2014, compararon pruebas con *V. faba* y *Allium cepa* para evaluación de toxicidad del cadmio (Cd). Las semillas de ambos organismos se expusieron a Cd y se analizaron. Los resultados mostraron que la exposición al metal indujo anomalías de AC, fragmentación de DNA e inducción de MN dependientes de la dosis para ambas cepas.

1.9 Biomarcadores

De acuerdo con Valencia Q. et al. (2013), el impacto genotóxico generado por ciertas sustancias en plantas, pueden ser determinados por anomalías en biomarcadores específicos, en este sentido, se desarrolló una clasificación con base en sus orígenes y consecuencias que se muestran a continuación:

- I. Efectos citotóxicos. Alteraciones en la división celular.
 - a. Incremento o decremento del Índice mitótico (IM), caracterizado por el número total de células en división (ver ecuación 1).

Los valores en el IM por debajo del testigo negativo pueden indicar que el crecimiento y desarrollo de los organismos expuestos ha sido afectado por el agente

evaluado. Una disminución de más del 50 % usualmente tiene efectos subletales; sí el IM disminuye a menos del 22 % del valor presentado en el testigo negativo, significa que se están provocando efectos letales en los organismos expuestos. Por el contrario, los IM por arriba de los valores del testigo negativo son el resultado de la estimulación de la división celular, lo que puede dar origen a un evento perjudicial para las células, ocasionando la multiplicación desmesurada y aún a la formación de tumores.

II. Efectos fisiológicos

- a. Alteraciones nucleares (núcleos lobulados, yemas nucleares, picnosis, aglutinación, excesiva condensación cromosómica, cromosomas pegajosos, enrollamiento anómalo de cromosomas, inactivación del huso acromático).

III. Efectos clastogénicos (Aberraciones cromosómicas). Cambios en la estructura de los cromosomas en células en anafase o metafase en la mitosis o en la meiosis de manera espontánea o por exposición a agentes físicos o químicos, indica que el contaminante a producido:

- a. Rupturas en el DNA a diferentes niveles (subcromatídico, cromatídico y cromosómico).
- b. Inhibición de la síntesis del DNA y replicación del DNA dañado. Se puede manifestar como fragmentos y puentes en células en anafase o metafase en la mitosis o en la meiosis (figura 3-5).

IV. Efectos aneugénicos. Alteraciones numéricas, aquellos (agentes o de manera espontánea) que producen la pérdida de cromosomas enteros o grupos de cromosomas por sus efectos sobre el huso acromático y la citocinesis.

- a. C-mitosis
- b. Anafases multipolares
- c. Cromosomas con centrómero inactivado “retardados” o “vagabundos”

V. Efectos mutagénicos.

- a. Mutaciones puntuales
- b. Rearreglos mayores

- VI. Intercambio de cromátidas hermanas. Los ICHs se originan de manera normal en células de mamíferos en estado replicativo y se han utilizado ampliamente como un indicador sensible de genotoxicidad. Es la transposición recíproca de segmentos entre cromátidas hermanas de un cromosoma somático duplicado, este proceso es conservativo y libre de error (Prieto González, s.f.).
- VII. Ensayo cometa. La técnica permite la detección de rupturas de una y dos hebras del DNA, errores en la reparación por escisión y enlaces cruzados en células individuales. Con la finalidad de medir o evaluar la fragmentación y migración del DNA, ocasionado por el rompimiento del material genético debido a la exposición a xenobióticos (Hernández Benavides, 2017).
- VIII. Esterilidad. Puede ser una consecuencia acumulada de la clastogenicidad, aneugenicidad y mutagenicidad descritas anteriormente y pueden ser biomarcadores indirectos de la genotoxicidad de estos compuestos.
- IX. Micronúcleos. Considerado como uno de los biomarcadores más sencillos y efectivos para analizar efectos genotóxicos inducidos por agentes químicos. Consiste en la observación de las células meristemáticas en interfase, en las que se monitorean posibles daños genéticos en las células hijas como una estructura similar a la del núcleo principal, pero de menor tamaño, son pequeñas masas de cromatina que aparecen junto a los núcleos principales (figura 3-1). El bioensayo se basa en el hecho de que el daño al DNA en las células, conduce a la formación de micronúcleos. Esta prueba mide el potencial mutagénico del agente genotóxico y fue aprobada por la Organización Internacional de Normalización. Debido a la acción mutagénica de los agentes, el núcleo se ve afectado y, en consecuencia, se degenera en células hijas. Esta degeneración de las células hijas revela una acción aneugénica y clastogénica del agente probado; el tamaño más grande de MN en las células hijas indica un efecto aneugénico, mientras que un tamaño menor de MN resulta de la acción clastogénica del agente probado (Leme & Marín Morales, 2009). A continuación, se enlistan las causas que pueden inducir MN:
 - a. Errores de reparación

- b. Daños directos a los cromosomas o alteraciones al huso y al aparato mitótico
- c. Exclusión de fragmentos acéntricos o de CCI, fuera de la envoltura nuclear durante el término de la mitosis.
- d. Anafases y telofases multipolares
- e. Cromosomas “retardados” o con centrómero inactivado.
- f. Eliminación de DNA excedente del núcleo principal en un intento por restaurar las condiciones normales de ploidía.

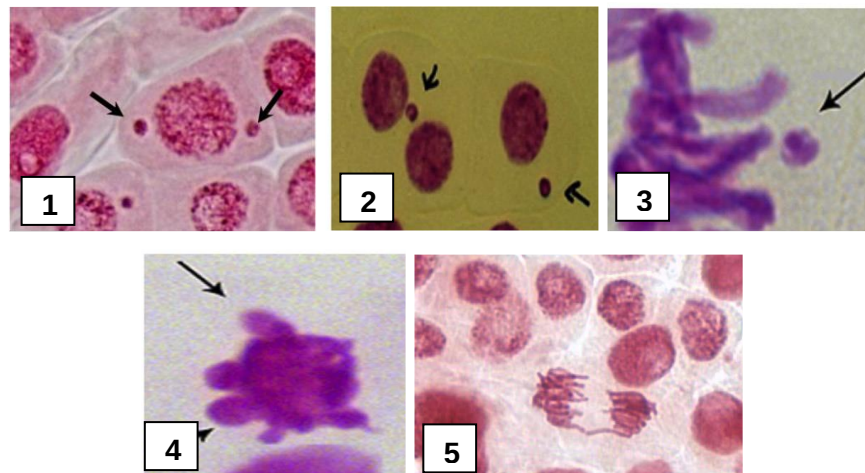


Figura 3. 1- Inducción de MN en *A. cepa* por exposición a efluentes de industrias textiles (Pathiratne, Hemachandra, & De silva, 2015), 2-MN inducidos por nanopartículas de Pb en células de la raíz de *V. faba* (Patlolla, Berry, May, & Tchounwou, 2012), 3- Micronúcleo en metafase inducido por efluentes de la industria textil, 4- Brotes nucleares inducidos por efluentes textiles (Giorgetti et al. 2011), 5- Anafase con puente cromosómico (AC) en células meristemáticas de *A. cepa* expuestas a extractos de metanol de *E. hirta*. Ampliación 400X (Yuet Ping, Darah, Kalsom Yusuf, Yeng, & Sasidharan, 2012).

De las diversas formas de evaluar el efecto de los agentes químicos sobre la biota, destaca para muchos investigadores el ensayo o prueba de IM y MN, ya que han sido validados en colaboración con estudios internacionales realizados bajo el apoyo de Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA), la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Agencia de Protección Ambiental de la Unión Americana (USEPA). Además, ha demostrado ser un sistema versátil para evaluar daño citogenético en plantas, es de fácil manejo y de mantenimiento relativamente económico (Olivares, Gaete, & Neaman, 2015).

Pourrut, Jean, Silvestre, & Pinelli en 2011, investigaron el efecto genotóxico del plomo sobre raíces de *V. faba* cultivadas hidropónicamente bajo condiciones controladas a ciertas concentraciones (0-20 μ M). Los resultados indican que el plomo causó la fragmentación del DNA de una manera dependiente de la dosis con un efecto máximo a 10 μ M. Además, a esta concentración, el daño en el DNA aumentó en función del tiempo hasta la exposición de 12 h. Una inducción significativa de MN reveló la naturaleza genotóxica del metal Pb.

Por su parte, Srivastava y Mishra (2009), evaluaron los efectos de la atrazina usando la prueba de MN, AC e IM. Las raíces de *V. faba* se expusieron a concentraciones de atrazina de 17.5, 35 y 70 mg / L durante 24 horas y, en consecuencia, la atrazina afectó el valor de IM, indujo anormalidades de MN y AC de una manera dependiente de la dosis. Entre las AC, los fragmentos cromosómicos y rupturas aparecieron con frecuencia, mientras que la C-metafase fue la aberración mitótica predominante.

Capítulo II

Organización del trabajo

2.1 Planteamiento del problema

El agua tratada por métodos biológicos reduce considerablemente los contaminantes orgánicos de un agua residual sanitaria, sin embargo, la eliminación podría ser incompleta ya que no tiene específicamente un tratamiento para la eliminación de metales pesados y otros compuestos inorgánicos que inducen daño en las células y al material genético en los organismos expuestos de manera directa e indirecta. En este sentido diversas investigaciones en distintos países se han desarrollado con el fin de prevenir el riesgo de exposición a aguas residuales tratadas, tal es el caso de Dutta, Ahmad, y Singh en la India (2018), determinaron el efecto genotóxico de efluentes industriales (tratados y no tratados) empleando el sistema de prueba *Allium cepa*. El resultado demostró que el agua no tratada era más tóxica en comparación con el efluente tratado, ya que reducía el número de células en división (IM) en la punta de la raíz. Todas las muestras de efluentes no tratados mostraron un alto efecto genotóxico. Al aumentar la dosis del 25% al 100%, se observó un efecto de aumento gradual de genotoxicidad y citotoxicidad en *A. cepa*. El estudio afirma que el efluente incluso después del tratamiento sigue siendo genotóxico, ya que tiene la capacidad de iniciar las aberraciones cromosómicas de varios tipos.

Smaka Kincl, Stegnar, Lovka, y Toman en Eslovenia (1996), utilizaron a *Allium cepa* como prueba de monitoreo ambiental para la detección de sustancias citotóxicas y genotóxicas potenciales en aguas residuales industriales y municipales sin diluir; agua de salida de una planta de tratamiento biológica; agua arriba del río Drava y aguas abajo de la ciudad de Maribor en Eslovenia, y agua potable no clorada como prueba de control negativo. Los líquidos de prueba más contaminados (aguas residuales industriales y municipales no tratadas) causaron efectos subletales e incluso letales. El agua más contaminada causó la inhibición del crecimiento de la raíz por encima del 50% (incluso hasta el 74%), una disminución del índice mitótico sobre el 36% (incluso hasta el 66%), un aumento de la presencia de células

interfásicas con micronúcleos sobre el 3% y un aumento de la presencia de células aberrantes más de 10 veces en comparación con la prueba de control. Se expresaron efectos subletales menos tóxicos y solo débiles en las aguas residuales tratadas en la planta de tratamiento biológico. Las muestras de agua de Drava expresaron solo efectos tóxicos débiles.

Pathiratne, Hemachandra y De silva (2015), evaluaron la citotoxicidad y la genotoxicidad en *Allium cepa* de nueve efluentes industriales tratados originados a partir de diferentes perfiles industriales que se descargan en el río Kelani en Sri Lanka. Después de 7 días de exposición crónica a los efluentes sin diluir y diluidos (1:8), el crecimiento de la raíz de los bulbos de *Allium* mostraron un patrón de inhibición específica del efluente en comparación con los expuestos al agua diluida y al agua control. Todos los efluentes sin diluir causaron $\geq 44\%$ de retraso en el crecimiento de la raíz en comparación con el agua control. El mayor efecto de inhibición del crecimiento de la raíz se asoció con el efluente de la industria del caucho 1 (inhibición del 95%). Los efluentes de dos industrias textiles, el complejo industrial 1 y las plantas de tratamiento de agua causaron la inducción simultánea de micronúcleos en las células meristemáticas de la raíz, pero los resultados no son estadísticamente significativos. La inducción de micronúcleos en las células de la punta de la raíz puede indicar contaminaciones mutagénicas, especialmente en los efluentes originados en las industrias textiles. Los parámetros fisicoquímicos, incluidos los niveles de metales pesados de los efluentes variaron según el perfil de la industria.

Hemachandra y Pathiratne (2016) realizaron pruebas de citotoxicidad y genotoxicidad de agua potable y agua tratada de dos plantas potabilizadoras proveniente de un efluente superficial en Sri Lanka utilizando dos sistemas de prueba in vivo: pruebas basadas en la raíz de *Allium cepa* y eritrocitos de la tilapia del Nilo. Las raíces expuestas a las aguas crudas de ambas plantas mostraron una disminución del IM y la disminución en el crecimiento de las raíces fue estadísticamente significativa en comparación con el control negativo que confirma

las propiedades citotóxicas de las aguas. La aparición de anomalías cromosómicas fue significativamente mayor en las células expuestas en aguas crudas, aguas filtradas, aguas cloradas y aguas de distribución de ambas plantas en comparación con el control negativo. Se observaron micronúcleos y brotes nucleares en las células de la punta de la raíz expuestas a las aguas crudas de ambas plantas, lo que confirma la potencial genotoxicidad / mutagenicidad.

Feng et al. (2011), determinaron la toxicidad aguda y la genotoxicidad de efluentes de entrada y salida de una planta de tratamiento de aguas residuales en Zhengzhou para proporcionar una base científica para la seguridad de la reutilización de aguas residuales. Se recogió agua de entrada, agua de salida procesada secundaria y terciaria de la planta de tratamiento de aguas residuales. La toxicidad aguda y la genotoxicidad del agua de entrada y salida se detectaron mediante la prueba de toxicidad de bacterias luminiscentes y la prueba de micronúcleos (MN) de células de la raíz de *Vicia faba*, respectivamente. Las tasas de inhibición de luminosidad de las bacterias luminiscentes por agua de entrada, agua de salida procesada secundaria y terciaria fueron (33.96 +/- 7.51)%, (14.32 +/- 7.36)% y (7.24 +/- 5.58)%, y las tasas de micronúcleos fueron (12.67 +/- 2.08) por mililitro, (6.33 +/- 1.53) por mililitro y (2.67 +/- 0.58) por mililitro, respectivamente. Los niveles de contaminación de estas tres muestras fueron pesados, leves y escasos, respectivamente. Las tasas de inhibición de las bacterias luminiscentes por el agua procesada secundaria y terciaria fueron significativamente menores que las del agua de entrada ($F = 12.159$, $P = 0.008$). Se observó un resultado similar para la tasa de MN ($F = 56.850$, $P < 0.001$). La toxicidad aguda y la genotoxicidad del agua procesada se redujo en gran medida. Sin embargo, todavía existían algunos riesgos ecológicos potenciales del agua procesada para el medio ambiente.

2.2 Pregunta de investigación

¿El agua residual tratada mediante un sistema CBR causa genotoxicidad y citotoxicidad en *Allium sativum*?

2.3 Justificación del estudio

En la ciudad de Puebla parte del agua residual sanitaria tratada por el sistema CBR se destina a ríos y a la reutilización en servicios al público con contacto directo como; riego en áreas verdes, relleno de cuerpos de agua, fuentes ornamentales y venta a usuarios que la demanden (Agua de Puebla para Todos, 2017). Debido al contacto directo e indirecto del agua tratada con la población, es necesario realizar pruebas de genotoxicidad para determinar si existe inducción de micronúcleos o aberraciones nucleares y citotoxicidad por aguas residuales tratadas mediante el sistema de discos rotatorios utilizando el bioindicador *A. sativum*, para prevenir el riesgo de exposición.

2.4 Hipótesis

Las células meristemáticas de la raíz de *A. sativum* expuestas a agua residual tratada por el sistema CBR presentan genotoxicidad y citotoxicidad.

2.5 Objetivo general

Determinar la genotoxicidad y citotoxicidad en células de *A. sativum* expuestas a aguas residuales tratadas por un sistema de CBR mediante el IM, micronúcleos y anormalidades nucleares para la prevención del riesgo de exposición.

2.6 Objetivos específicos

- Determinar pH, T°, OD, DBO, DQO, Pb, Cr, Cd, As, CN del agua residual sanitaria del tratamiento primario y secundario.
- Estimar el crecimiento de las raíces de *A. sativum* expuestas a aguas residuales sanitarias del tratamiento primario y secundario.
- Cuantificar la genotoxicidad y citotoxicidad en células meristemáticas de la raíz de *A. sativum* expuestas a aguas residuales sanitarias del tratamiento primario y secundario.

Capítulo III

Artículo

Genotoxicidad y Citotoxicidad por Aguas Residuales Tratadas

Genotoxicity and Cytotoxicity by Treated Wastewater

Resumen

En el presente estudio se determinó el daño genotóxico y citotóxico en células de raíces expuestas a aguas residuales procesadas en una planta de tratamiento de contacto biológico rotativo (CBR) utilizando el bioindicador *Allium sativum* con el fin de prevenir el riesgo de exposición. Se tomaron muestras de aguas residuales tratadas tanto del efluente del tratamiento primario como del secundario, en dos periodos distintos (diciembre y julio). Se determinaron concentraciones más altas de metales pesados tales como Pb (3.07 mg/L) y As (5 mg/L) en el agua procesada por el tratamiento secundario (CBR). La genotoxicidad y citotoxicidad se midió analizando 1000 células por tratamiento. Para la genotoxicidad se comparó el número de células aberrantes (puentes cromosómicos en anafase y micronúcleos) con el grupo control utilizando la prueba de Ji², se contabilizó un aumento de células aberrantes tanto en las raíces expuestas al tratamiento secundario y primario en ambos periodos respecto a los grupos control con una $P < 0.01$, lo que indica daño genotóxico inducido por aguas tratadas. Los tratamientos mostraron un porcentaje de índice mitótico (IM) por debajo del grupo control, pero mayor de la mitad, lo que indicó daño citotóxico no significativo. Las raíces expuestas al agua procesada por el sistema CBR (tratamiento secundario) no mostraron inhibición significativa en el crecimiento de raíces con respecto al grupo control, sin embargo, hay una inhibición del crecimiento de las raíces expuestas al agua procesada por el tratamiento primario.

Palabras clave: *Allium sativum*, genotoxicidad, citotoxicidad, agua residual, tratamiento de agua.

Abstract

In the present study, the genotoxic and cytotoxic damage was determined in root cells exposed to wastewater processed in a rotating disc treatment plant (RBC) using the *Allium sativum* bioindicator in order to prevent the risk of exposure. Samples of treated wastewater were taken from both the primary and secondary treatment effluents, in two different periods (December and July). Higher concentrations of heavy metals such as Pb (3.07 mg / L) and As (5 mg / L) were determined in the water processed by the secondary treatment. Genotoxicity and cytotoxicity were measured by analyzing 1000 cells per treatment. For genotoxicity, the number of aberrant cells (chromosomal bridges in anaphase and micronuclei) was compared with the control group using the Ji^2 test, an increase in aberrant cells was recorded both in the roots exposed to secondary and primary treatment in both periods with respect to the control groups with a $P < 0.01$, which indicates genotoxic damage induced by treated water. The treatments showed a mitotic index (MI) below the control group, but higher than half, which indicated non-significant cytotoxic damage. The roots exposed to the water processed by the CBR system (secondary treatment) did not show significant inhibition in the growth of roots with respect to the control group, however, there is an inhibition of the growth of the roots exposed to the water processed by the primary treatment.

Keywords: *Allium sativum*, genotoxicity, cytotoxicity, wastewater, water treatment.

Introducción

El agua es una sustancia de capital importancia para el desarrollo de la vida. De acuerdo con Semarnat (2015), la demanda del agua en las últimas décadas ha crecido significativamente, y ha presionado fuertemente su calidad en los reservorios naturales, ya que la producción de más alimentos y energía, así como de dotar del servicio de agua potable ha ido en alza junto con una población cada vez más numerosa.

Otro inconveniente se relaciona con el grado de contaminación, los bienes acuáticos nacionales tanto subterráneos como superficiales son mayormente contaminados debido a descargas de aguas residuales de proceso y sanitarias.

De manera inevitable dentro de las actividades humanas está la producción de aguas residuales, generalmente líquidos, materiales orgánicos e inorgánicos provenientes de diversas actividades como las domésticas, industriales y agropecuarias, las cuales son vertidas a las fuentes hídricas como arroyos, ríos y lagos (Pérez Aristizábal, 2010), lo que resulta en un desequilibrio del sistema ecológico, así como la genética de los seres vivos, pues se ha informado que se encuentran compuestos xenobióticos en las aguas residuales que causan efectos perjudiciales en animales, humanos y plantas (Alam, Ahmad, & Malik, 2009). Por lo anterior, el agua ha sido contaminada por distintos compuestos químicos tales como Cd, Cu, Zn, Ni, Co, Cr, Pb, As, CN (Iqbal, 2016), entre otros metales pesados y distintas sustancias tóxicas para los organismos vivos.

Existen algunas alternativas para la descontaminación del agua residual a través de tratamientos físico-químicos y/o biológicos. El objetivo primordial del tratamiento del agua residual es remover el material contaminante orgánico e inorgánico, con la intención de lograr una calidad de agua requerida por la normativa de descarga o por el tipo de reutilización a la que se destinará (Noyola et al. 2013). Cuando las aguas residuales entran a una estación depuradora o planta de tratamiento de aguas residuales (PTAR), sufren un pretratamiento, tratamiento primario, y tratamiento secundario, en esta última se elimina la materia orgánica biodegradable por medios preferentemente biológicos (aerobios y anaerobios) (Metcalf et al. 2003). Dentro de los procesos biológicos se encuentran los sistemas de contacto biológico rotatorio (CBR) o biodiscos, que es un sistema parcialmente sumergido en agua que estimula el desarrollo de una película biológica sobre la superficie de los discos los cuales degradan materia orgánica (Nodal Becerra, 2001., Pérez A., 2010). Finalmente, el tratamiento terciario cuya finalidad es eliminar compuestos suspendidos, materia orgánica remanente no biodegradable (Noyola et al. 2013) y la desinfección.

De acuerdo con Noyola et al. (2013) existen actividades que no requieren del uso estricto del agua potable, donde el empleo del agua tratada no representa ningún riesgo a la salud o impacto negativo al objetivo del proceso que la utilice. La NOM-003 de SEMARNAT que establece los límites máximos permisibles de contaminantes para las aguas residuales tratadas que se reúsen en servicios al público, las concentraciones no deberán ser mayor a estos límites, y estos contaminantes variarán según el destino en función del contacto que tenga con las personas, ya sea

directo u ocasional. La reutilización del agua tratada posee algunas ventajas en cuanto a costos, reducción de las presiones sobre los cuerpos de agua de primer uso, además de satisfacer las demandas de agua que no exigen calidad potable (Conagua, 2015).

Los ensayos de citotoxicidad y genotoxicidad están diseñados para determinar el efecto de agentes o compuestos contaminantes, ya sea de origen químico, físico o biológico, que provocan alteraciones o afectan negativamente la integridad del ciclo celular en el caso de citotóxicos, y del material genético en el caso de genotóxicos (Alborghetti Nai et al. 2013., Tobón M. & López G. 2011., Beltrán Orbegoso & Gonza Carnero, 2017) de forma directa o indirecta, las cuales, están expuestas a los sustratos tóxicos (EUPATI, 2015), por lo que originan efectos biológicos adversos en el organismo dando lugar a procesos mutagénicos (aquellos capaces de inducir rupturas en los cromosomas son conocido como agentes clastógenos, y agentes aneunógenos a las sustancias que provocan pérdida de cromosomas enteros), carcinogénicos o teratogénicos (Abrevaya, 2008., Herrero Felipe & De La Peña De Torres, 2004).

El análisis de citotoxicidad y genotoxicidad puede ser determinada mediante el uso de bioindicadores, método basado en la propiedad que tienen ciertos organismos o poblaciones celulares para detectar contaminantes en un medio o identificar la pérdida de calidad de un ambiente (Sáenz & Di Marzio, 2013). De acuerdo con la literatura, se han realizado bioensayos para determinar los efectos genotóxicos en distintos tipos de organismos. Entre ellos, las plantas superiores son consideradas como excelentes indicadores de efectos citotóxicos, citogenéticos y mutagénicos de contaminantes (Waters, Brady, Stack, & Brockman, 1990) en diferentes ambientes, son confiables y tienen alta sensibilidad (pocos falsos negativos), también posibilitan la evaluación de distintos biomarcadores genéticos, los cuales van desde mutaciones puntuales hasta aberraciones cromosómicas (AC) en células de diversos órganos y tejidos, tales como hojas, raíces y polen. Las plantas más apropiadas para el análisis citogenético son las especies que tienen un número pequeño de cromosomas grandes fácilmente distinguibles, lo que permite la identificación de las diferentes fases mitóticas e identificar daños (Grant 1994., Valencia Quintana et al. 2013). Estas condiciones son reunidas en los meristemos apicales de *Allium sativum* L. conocido comúnmente como ajo, un bulbo perteneciente a la familia Liliaceae y subfamilia Allioideae (Ramírez et al. 2016), por su reducido genoma diploide $2n = 16$, tiene la propiedad de alterarse ante sustancias contaminantes (Tartar, Kaymak, & Gokalp Muranli, 2006), se ha convertido en un bioindicador importante para el estudio y evaluación de citotoxicidad y genotoxicidad de

contaminación ambiental por productos químicos usados en la alimentación, salud, industria, y agricultura además de otras sustancias. *Allium s.* es una planta potencialmente útil para estudiar la absorción y acumulación de metales pesados (Liu, et al. 2009). De acuerdo con Leme y Marín-Morales (2009) los estudios de sensibilidad y correlación positiva con células animales de *Allium* y otros bioindicadores vegetales son importantes para la evaluación precisa de riesgos ambientales, así como la extrapolación de los datos a otros organismos como en humanos.

En este sentido la evaluación de los análisis genotóxicos y citotóxicos proporcionan un panorama integral de la calidad del agua tratada por métodos biológicos que si bien, reduce considerablemente los contaminantes orgánicos de un agua residual sanitaria, la eliminación podría ser incompleta ya que no tiene específicamente un tratamiento para la eliminación de metales pesados y otros compuestos inorgánicos que inducen daño en las células y al material genético en los organismos expuestos. Investigaciones en distintos países se han desarrollado con el fin de prevenir el riesgo de exposición a aguas residuales tratadas, tal es el caso de Dutta, Ahmad, y Singh en la India (2018), determinaron el efecto genotóxico de efluentes industriales (tratados y no tratados) empleando el sistema de prueba *Allium cepa*. El resultado demostró que el efluente no tratado era más tóxico en comparación con el efluente tratado, ya que reducía el número de células en división (IM) en la punta de la raíz. Smaka Kincl, Stegnar, Lovka, y Toman (1996), utilizaron el bioindicador *Allium cepa* como prueba de monitoreo ambiental para la detección de sustancias citotóxicas y genotóxicas potenciales en aguas residuales industriales y municipales sin diluir; agua de salida de una planta de tratamiento biológica; aguas arriba del río Drava y aguas abajo de la ciudad de Maribor en Eslovenia, y agua potable no clorada como prueba de control negativo. Las aguas residuales, antes y después del procedimiento de tratamiento, causaron un aumento estadísticamente significativo en la cantidad de micronúcleos interfásicos. Los líquidos de prueba más contaminados (aguas residuales industriales y municipales no tratadas) causaron efectos subletales e incluso letales. Pathiratne, Hemachandra y De silva (2015), evaluaron la citotoxicidad y la genotoxicidad en *Allium c.* de nueve efluentes industriales tratados originados a partir de diferentes perfiles industriales que se descargan en el río Kelani en Sri Lanka. El mayor efecto de inhibición del crecimiento de la raíz se asoció con el efluente de la industria del caucho 1 (inhibición del 95%). La inducción de MN se observó especialmente en efluentes originados de industrias textiles lo que indica contaminación mutagénica. En 2011, Feng y colaboradores determinaron la toxicidad aguda y la genotoxicidad de efluentes de entrada y salida de una planta de tratamiento de aguas residuales en Zhengzhou utilizando bacterias

luminiscentes y raíces de *Vicia faba* con el objetivo de proporcionar una base científica para la seguridad de la reutilización de aguas residuales. Los resultados mostraron que la toxicidad aguda y la genotoxicidad del agua procesada se redujo en gran medida. Sin embargo, todavía existían algunos riesgos ecológicos potenciales del agua procesada para el medio ambiente.

En la ciudad de Puebla parte del agua residual sanitaria tratada por el sistema CBR se destina a ríos y a la reutilización en servicios al público con contacto directo como; riego en áreas verdes, relleno de cuerpos de agua, fuentes ornamentales y venta a usuarios que la demanden (Agua de Puebla para Todos, 2017). Debido al contacto directo e indirecto del agua tratada con la población, es necesario realizar pruebas de genotoxicidad para determinar si existe inducción de micronúcleos o aberraciones nucleares y citotoxicidad por aguas residuales tratadas mediante el sistema de discos rotatorios utilizando el bioindicador *A. sativum*, para prevenir el riesgo de exposición.

Materiales y métodos

Recolección de muestras

Se colectaron muestras simples de agua residual de una planta de tratamiento de aguas residuales mediante sistema CBR ubicada en la ciudad de Puebla-Puebla a principios de diciembre del 2018 (lunes) y julio (martes, jueves, domingo) del 2019 en distintos días de la semana, tanto del contenedor aireador luego de pasar por el tratamiento primario como en el caudal de salida del tratamiento secundario para determinar genotoxicidad y citotoxicidad en los meristemos apicales de las raíces de *Allium sativum*. Solo para el periodo de diciembre se determinaron parámetros físico-químicos tal como; temperatura (T°), pH, oxígeno disuelto (OD) presencia de metales pesados, demanda química de

oxígeno (DQO) y demanda bioquímica de oxígeno (DBO₅) conforme a la norma oficial NMX-AA-003-1980. El llenado y preservación de las muestras para cada parámetro se realizó por separado en frascos de polietileno siguiendo la norma NMX-AA-051-1982 para metales pesados, la NMX-AA-058-2001 para cianuros, NMX-AA-030/1 para DQO y la NMX-AA-028-SCFI para DBO₅. En las muestras para toxicidad no se requirieron preservadores. Posteriormente se transportaron en hielera rápidamente al laboratorio para su análisis. En campo se realizaron las mediciones de T°, pH y OD con equipo multiparamétrico en un recipiente muestreador (se anexa: plan de muestreo, registro de campo, cadena de custodia y lista de verificación).

Procesado de las muestras

Las muestras de diciembre para la determinación de DQO y DBO₅ colectadas en el agua de salida del tratamiento primario y del caudal de salida del tratamiento secundario, una vez envasadas y preservadas se remitieron rápidamente a un laboratorio externo de calidad ambiental certificado, Ingeniería de Control Ambiental y Saneamiento, S.A. de C.V. (ICAYS), ubicado en la ciudad de Puebla.

Se realizó digestión ácida con H₂SO₄ (10ml), HNO₃ (5ml) y 50 ml de cada una de las muestras para determinar la concentración total de los metales pesados; As, Pb, Cr y Cd mediante espectrofotometría de absorción atómica utilizando el equipo AA200Analyst (UPAEP). El método espectrofotométrico UV-Visible se utilizó para determinar la concentración de cianuros inorgánicos, mediante la reacción entre el reactivo ninhidrina y el CN⁻ en una disolución de carbonato sódico (NMX-AA-058-SCFI-2001) en el Instituto Mexicanos Tecnológico del Agua (IMTA).

El análisis de genotoxicidad y citotoxicidad de las muestras se realizaron mediante el procedimiento utilizado por Fiskesjö (1985). Se germinaron las raíces de *Allium sativum* bajo condiciones de laboratorio a 25 ± 1 °C durante 6 días. Las yemas terminales de los ajos se montaron en tubos de ensayo con las distintas muestras de agua de los distintos días en diciembre y julio (figura 4). Por cada tratamiento se realizaron 3 repeticiones. El control negativo se germinó con agua potable de grifo. El

crecimiento de las raíces se registró durante tres días manteniendo los bulbos en oscuridad a temperatura ambiente para cada tratamiento. Cada día se midió la longitud de raíces con una regla simple de plástico y tomando como referencia las raíces más largas. Las raíces se cortaron del bulbo tras la tercera última medición y se fijaron con metanol-ácido acético en relación 3:1 y se preservaron a 4 °C (Fiskesjö, 1985). Siguiendo el protocolo de Sharma & Sharma (1980), se procedió a la hidrólisis de las puntas de las raíces con HCl 1N a 60-70 °C durante 10-15± minutos. Luego se realizó la preparación de las raíces en los portaobjetos, las puntas de las raíces se cortaron y se les añadió una gota de azul de metileno, se dejó reposar durante 20 minutos aproximadamente. El cubreobjetos se colocó con cuidado encima de las raíces para evitar burbujas de aire. Posteriormente se procedió a la observación de las raíces en los portaobjetos bajo el microscopio óptico de campo claro. Se analizaron un mínimo de 3000 células por tratamiento.

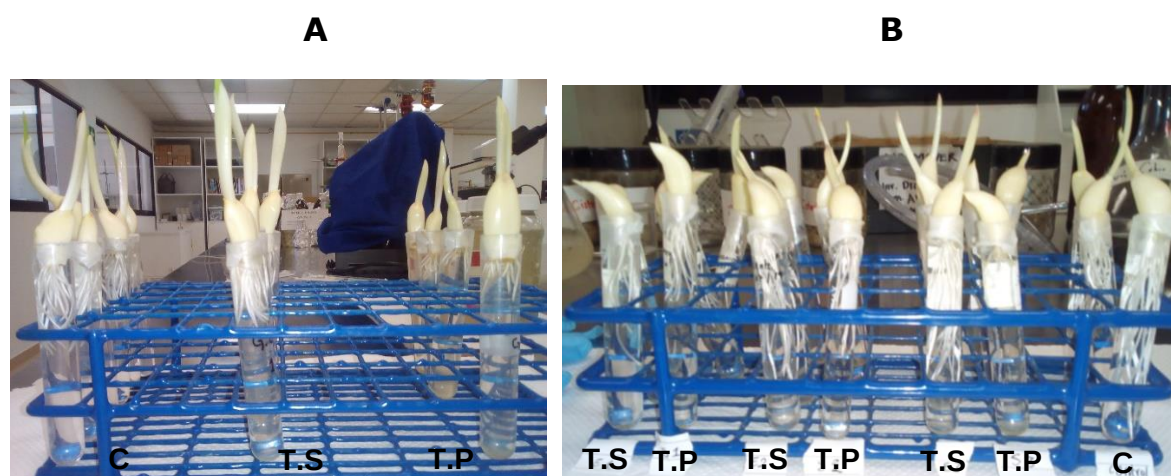


Figura 4. Montaje de las yemas de *Allium s.* para germinación y crecimiento de las raíces en tres tratamientos; **(C)** control, **(T.S)** tratamiento secundario y **(T.P)** tratamiento primario de ambos periodos (Fig. 4 **A** diciembre-2018 y Fig. 4 **B** julio-2019).

Análisis estadístico

Una vez que se corroboraron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas, las medias de los porcentajes de longitud de las raíces de *Allium s.* fueron sometidas a la prueba de Anova para determinar diferencias significativas en algún tratamiento y la prueba de Tukey para determinar en qué tratamiento o tratamientos estaría la diferencia significativa. Se realizó la prueba de Ji^2 para determinar si las aberraciones cromosómicas dependían del tipo de tratamiento. Se usó el programa estadístico Minitab 18 con un nivel de confianza de 99%.

Resultados

Caracterización físico-química

Se obtuvieron las lecturas del equipo (AA200Analyst) a través de las curvas de calibración para la detección de metales, las concentraciones que se muestran en la tabla 4. Respecto a los valores obtenidos a partir de las muestras de agua de la PTAR, la concentración de Cr fue menor a 0.1 mg/l, tanto para el tratamiento primario como para el efluente del tratamiento secundario. Así mismo para la concentración de Cd y CN⁻ en ambos puntos de la PTAR fue menor a 0.5 mg/l y <2 mg/l respectivamente. Por otro lado, los resultados de Pb (3.074 mg/l) y As (5 mg/l) del agua tratada arrojan una concentración mayor, por encima de la norma mexicana 001 de Semarnat (concentración máxima permisible de Pb es de 1 mg/l para uso en riego agrícola y de As 0.4 mg/l para uso público urbano). En cuanto al tratamiento primario la concentración fue Pb=2.624 mg/l y As=1.6 mg/l, aun por encima de la norma. Las concentraciones de Cr, Cd y CN⁻ se encuentran por debajo de los límites

máximos permisibles (NOM-001-SEMARNAT, 1997) en ambos tratamientos.

Tabla 4. Caracterización físico-química del agua residual del tratamiento primario y secundario (CBR) solo para el mes de diciembre.

Tratamientos		Parámetros físico-químicos del agua								
Muestras	pH	T°	OD	DBO ₅	DQO	Pb	Cr	As	Cd	CN
Tratamiento Primario	8.2	23.7	29.1	207	449	2.624	<0.1	1.6	<0.5	0.005
Tratamiento Secundario	7.8	25	6.4	5.08	82	3.074	<0.1	5	<0.5	0.006

OD = Oxígeno disuelto, DBO₅ = Demanda Bioquímica de Oxígeno, DQO = Demanda Química de Oxígeno, pH = Potencial de Hidrógeno, T° = Temperatura. Las concentraciones de metales, OD, DQO y DBO₅ se muestran en mg/l.

Genotoxicidad y Citotoxicidad

De acuerdo con la prueba de Anova, existe una diferencia significativa entre las longitudes de las raíces de *Allium sativum* en los distintos tratamientos con un valor $p < 0.01$. El resultado respecto a la longitud promedio de las raíces fueron estadísticamente diferentes entre el tratamiento control y el tratamiento primario, pero no hay diferencias entre el control y el tratamiento secundario (CBR) según Tukey (figura 5), siendo las raíces más largas las germinadas con el agua potable del grifo (Tratamiento control).

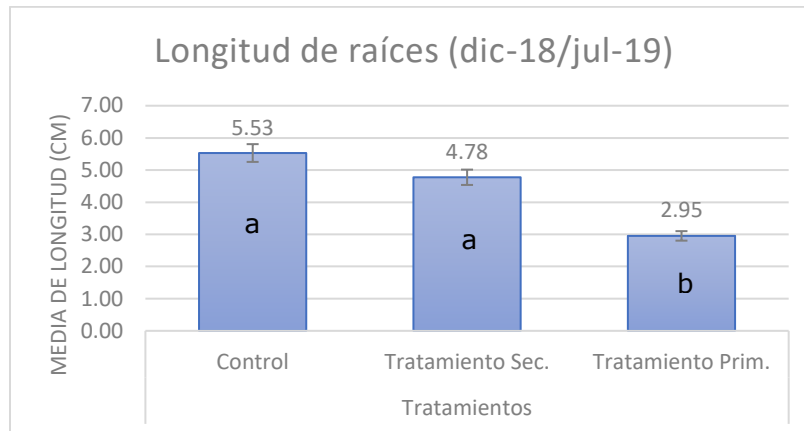


Figura 5. Se muestra la media de la longitud (cm) de las raíces de *Allium s.* en cada tratamiento contemplando ambos periodos. Medias con letras iguales no difieren estadísticamente, según Tukey ($p \leq 0,01$).

Se contabilizaron 1000 células (con sus respectivas repeticiones) de los meristemos apicales de las raíces sometidas a cada tratamiento para calcular el porcentaje de células en mitosis (profase, metafase, anafase, telofase), criterio fundamental para evaluar la citotoxicidad a partir de la siguiente fórmula (Dutta et al. 2018):

$$IM = \frac{\text{células en mitosis}}{\text{total de células contadas}} \times 100$$

El IM en las puntas de la raíz de *Allium s.* para el tratamiento control en diciembre y julio fue de 56.03 y 55.8 (tabla 5), lo que indica que, por cada 100 células, 56 entran en división. Posteriormente este índice se tomó como referencia para determinar el porcentaje de índice mitótico del 100%. Tomando como referencia a Asita Asita y Matebesi (2010), la citotoxicidad significativa se infirió cuando el índice mitótico (células en división / 1000) de las células tratadas fuera $\leq \frac{1}{2}$ del control negativo.

Tabla 5. Conteo del análisis genotóxico (Puentes cromosómicos en anafase, MN) y citotóxico (IM) de los meristemos apicales de la raíz de *Allium s.* expuestas a tres tratamientos.

Tratamientos			Análisis citotóxico		Análisis genotóxico		
Tipo de muestra	Periodo	N° de células	IM	%IM	(AC) Puentes cromosómicos en Anafase	MN	
Control	Diciembre 2018	1000	571	56.03	100	4	0
		1000	560			6	1
		1000	550			4	1
	Julio 2019	1000	577	55.8	100	5	1
		1000	530			3	1
		1000	568			3	0
Tratamiento secundario	Diciembre 2018	1000	320	33.3	59.4	22	4
		1000	350			18	5
		1000	329			21	4
	Julio 2019	1000	327	35.3	63.2	11	3
		1000	379			16	2
		1000	353			13	2
Tratamiento primario	Diciembre 2018	1000	366	34.26	61.2	23	3
		1000	322			22	3
		1000	340			30	3
	Julio 2019	1000	403	38.7	69.3	11	3
		1000	389			19	2
		1000	369			21	1

El número de células para el conteo de aberraciones cromosómicas fue de 1000 células por tratamiento con dos repeticiones cada una.

El IM para las raíces sometidas al agua del tratamiento primario fue igual a 34.2 (diciembre) y 38.7 (julio), por lo que su porcentaje de IM con respecto al tratamiento control representa el 61% y el 69% de manera correspondiente. Así mismo, el IM de las raíces sometidas al tratamiento secundario fue de 33.3 (diciembre) y 35.3 (julio) que representan el 59% y 63% del porcentaje de IM con respecto al control. Estos datos revelan que el % IM en ambos tratamientos (primario y secundario) y periodos (figura 6) fueron mayores de la mitad del porcentaje de IM de las células expuestas al agua potable del grifo, por lo tanto, no existe daño citotóxico significativo.

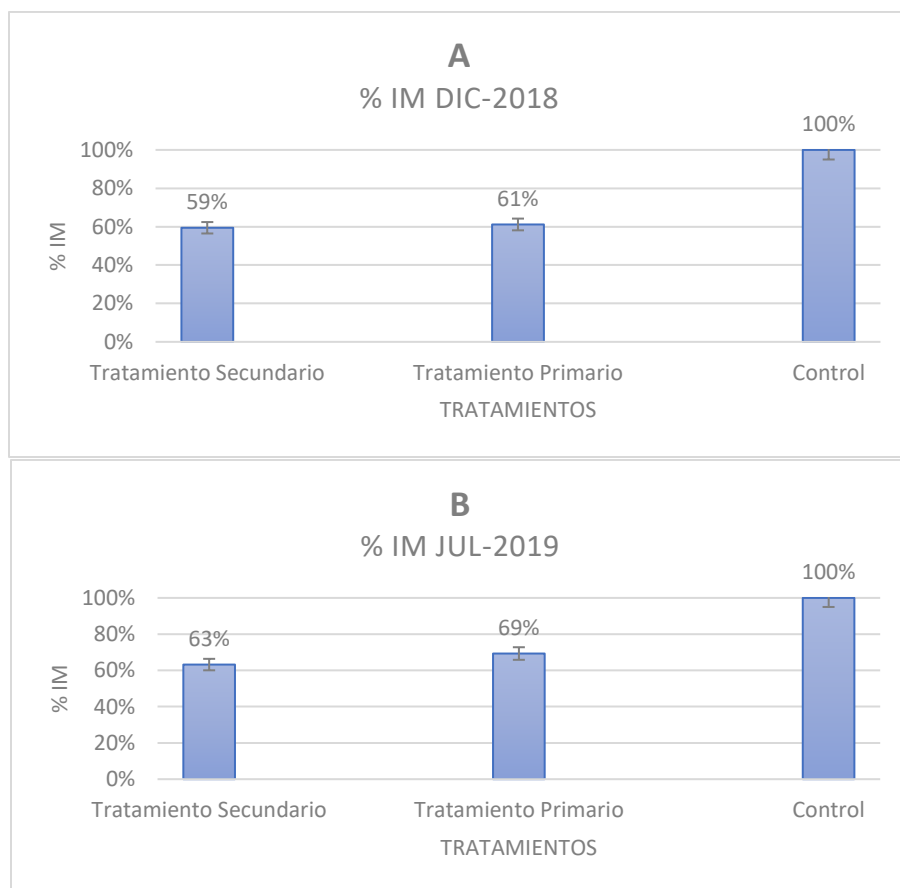


Figura 6. Porcentajes de células en división de la raíz de *Allium s.* en cada tratamiento por periodo (**A**-diciembre del 2018 y **B**-julio del 2019). El IM de las raíces sometidas al tratamiento secundario y primario tanto en diciembre como julio fueron mayores de la mitad al porcentaje de IM de las células expuestas al agua potable del grifo (grupo control).

La genotoxicidad al igual que la citotoxicidad se midió analizando 1000 células por tratamiento con sus respectivas repeticiones (tabla 4), esta vez comparando el número de células aberrantes (puentes cromosómicos en anafase y micronúcleos) con el grupo control utilizando la prueba de Ji^2 . Se contabilizó un aumento de puentes cromosómicos en anafase y micronúcleos tanto en el tratamiento secundario y tratamiento primario en ambos periodos con respecto a los grupos control, lo que indica daño genotóxico inducido por el agua con tratamiento primario y secundario (Ji^2 , $P < 0.01$). Las gráficas de intervalos (figura 7y 8) corroboran el aumento de puentes cromosómicos en anafase y aumento de MN en el T. SECUNARIO y T. PRIMARIO respecto al grupo CONTROL.

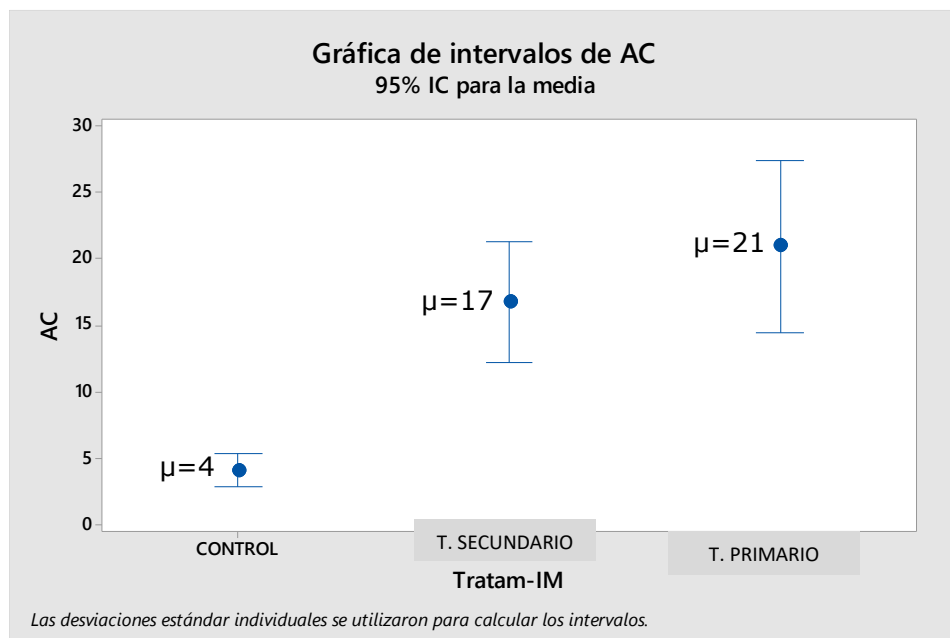


Figura 7. Aumento de puentes cromosómicos en anafase en el T. SECUNARIO y T. PRIMARIO respecto al grupo CONTROL, contemplando diciembre y julio.

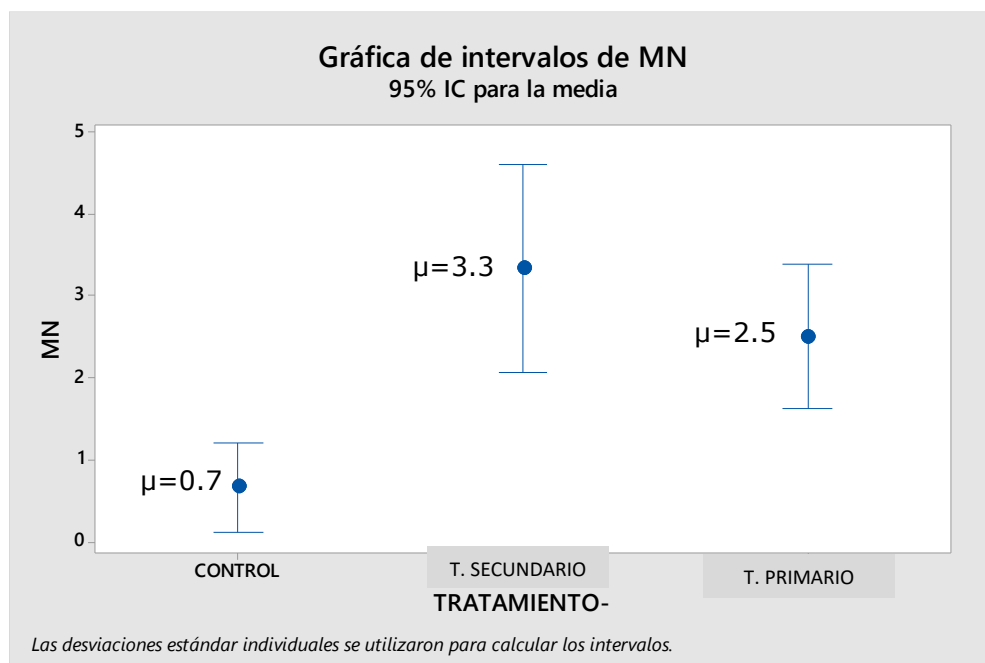


Figura 8. Aumento de Micronúcleos en el T. SECUNARIO y T. PRIMARIO respecto al grupo CONTROL, contemplando diciembre y julio.

Discusión

Se pudo observar concentraciones mayores de metales pesados en el efluente secundario, es decir, en el agua tratada después de pasar por el CBR, que se puede deber a las variaciones de las descargas en las diferentes horas, días y periodos del año, en este caso la determinación de metales pesados y parámetros físicos fue en época de estiaje (diciembre), por lo que el agua esta menos diluida que en época lluviosa, por lo tanto, hay mayores concentraciones de contaminantes. Cabe mencionar la cercanía de industrias textiles y de otros giros las cuales descargan al sistema de captación de aguas residuales de la planta en estudio.

A pesar de la cantidad alta de Pb y As en el agua procesada por el tratamiento secundario biológico, se observó un crecimiento de las raíces de *Allium s.* sin diferencias estadísticamente significativas con respecto a la media del grupo control y un %IM por debajo del grupo control pero mayor de la mitad, indicando daño citotóxico no significativo, lo que difiere con los resultados obtenidos por Smaka Kincl et al. (1996), cuya contaminación e inhibición del IM como efecto citotóxico en los meristemos apicales de *A. cepa* sometidos a aguas residuales tratadas de una planta biológica, fueron significativos en relación al control negativo. Sus resultados mostraron inhibición del crecimiento de las raíces y disminución del IM con efectos subletales.

Se expresaron AC significativas en las raíces expuestas al efluente secundario y primario, tales como puentes cromosómicos en anafase, indicadores de una acción clastogénica. Lo que concuerda con Smaka Kincl et al. (1996) en *A. cepa* y Feng et al. (2011) en *Vicia f.* cuyos resultados mostraron la inducción significativa de aberraciones cromosómicas en células meristemáticas de las raíces por el agua residual con tratamiento secundario, pero menores en relación a aguas residuales urbanas e industriales sin tratar.

Con respecto a las altas concentraciones de Pb y As en las raíces expuestas a los tratamientos secundario y primario que exhibieron daño genético significativo, concuerda con los estudios de Pourrut, Jean, Silvestre, & Pinelli en 2011, sobre el efecto genotóxico del Pb en raíces de

Vicia faba y Steinkellner et al. (1998) sobre el efecto genotóxico de los metales As, Pb, Cd y Zn en *Tradescantia* y *Vicia f.*, sus resultados indicaron que el As y Pb causaron la fragmentación del DNA de una manera dependiente de la dosis, además, el daño en el DNA aumentó en función del tiempo.

Conclusiones

El agua residual tratada por el CBR (secundario) presentó concentraciones altas de As y Pb. Las raíces expuestas al agua procesada por el sistema CBR no mostraron inhibición significativa del crecimiento con respecto al grupo control. Los tratamientos mostraron citotoxicidad sin diferencias estadísticamente significativas, por el contrario, se determinó que la inducción de genotoxicidad entre los tratamientos fue estadísticamente significativa, por tanto, el agua residual procesada por el tratamiento primario y secundario ocasionó daño genético en células de *A. sativum*

La genotoxicidad inducida por el agua tratada en los meristemos apicales de la raíz de *Allium s.* puede deberse en gran medida a los metales pesados encontrados en cantidades altas (Pb y As) y trazas de Cd, Cr y CN-, además de la presencia de otros compuestos químicos no medidos en este estudio que inhiben el crecimiento de las raíces y causan efectos carcinogénicos y mutagénicos

A pesar del tratamiento previo del agua residual, muchos compuestos xenobióticos aún permanecen e inducen daño genético que causan efectos perjudiciales en plantas, animales y, por lo tanto, en humanos.

Agradecimientos

Al Dr. Luis Daniel Ortega por la dirección del proyecto, a la Dra. Beatriz

Pérez Armendáriz, la Dra. María del Carmen Martínez Valenzuela, la Dra. Genoveva Rosano, Mtra. Laura Isabel, Mtra. Victoria Conde Ávila por sus acertadas observaciones y consejos.

Referencias

- Abrevaya, X. (20 de agosto de 2008). *IntraMed*. Recuperado el 29 de 03 de 2018, de ¿Qué es la genotoxicidad?: <http://www.intramed.net/contenidoover.asp?contenidoID=47111>
- Agua de Puebla para Todos. (2017). *PTAR Parque Ecológico*. Convención Anual y Expo, ANEAS, Puebla. Recuperado el 1 de 10 de 2018
- Alborghetti Nai, G., Casanova de Oliveira, M., de Oliveira Tavares, G., Fonseca Pereira, L. F., Lemes Soares, N. S., & Gatti Silva, P. (25 de julio de 2013). Evaluación de la genotoxicidad inducida por la administración repetida de anestésicos locales: un estudio experimental en ratones. (ELSEVIER, Ed.) *REVISTA BRASILEIRA DE ANESTESIOLOGIA*, 65(1), 21-26. Recuperado el 04 de 04 de 2018, de <https://doi.org/10.1016/j.bjanes.2013.07.008>
- Asita Asita, O., & Matebesi, L. (5 de 07 de 2010). Genotoxicity of hormoban and seven other pesticides to onion root tip meristematic cells. *AFRICAN JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY*, 9(27), 4225-4232. Recuperado el 1 de 12 de 2019, de <http://www.academicjournals.org/AJB>
- Barba HO, L. E. (2002). Conceptos básicos de la contaminación del agua y parámetros de medición. Universidad del Valle, Facultad de Ingenierías, Escuela de ingeniería de Recursos Naturales y del Ambiente, Santiago de Cali, Colombia.
- Conagua. (2015). *Estadísticas del Agua en México*. México: Conagua, Semarnat.
- Dutta, J., Ahmad, A., & Singh, J. (2018). Study of industrial effluents induced genotoxicity on *Allium cepa* L. *Caryologia*, 1-8. Recuperado el 15 de 06 de 2018, de <https://doi.org/10.1080/00087114.2018.1447631>
- EUPATI. (17 de 11 de 2015). *Academia Europea de Pacientes*. Recuperado el 26 de 03 de 2018, de <https://www.eupati.eu/es/glossary/estudio-de-genotoxicidad/>
- Feng, Y., Li, B., Guo, X., Duan, L., Cao, J., Wang, S., . . . Cui, L. (noviembre de 2011). Toxicity evaluation on the effluent water from a sewage treatment plant in Zhengzhou City. (MEDLINE, Ed.) *Journal of hygiene research*, 40(6), 738-740. Recuperado el 11 de 04 de 2018
- Fiskesjö, G. (1985). The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas*(102), 99-112. Recuperado el 11 de 02 de 2019, de <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1601-5223.1985.tb00471.x>
- Grant, W. F. (1994 de october de 1994). The present status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 310(2), 175-185. doi:10.1016/0027-5107(94)90112-0

- Hemachandra, C. K., & Pathiratne, A. (2016). Cytogenotoxicity screening of source water, wastewater and treated water of drinking water treatment plants using two in vivo test systems: *Allium cepa* root based and Nile tilapia erythrocyte based test. *Water Research*, 108, 320-329. Recuperado el 02 de 06 de 2019, de <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2016.11.009>
- Herrero Felipe, Ó., & De La Peña De Torres, E. (04 de marzo de 2004). Evaluación de Mutagenicidad y Genotoxicidad. En CSIC (Ed.), *Evaluación de Mutagenicidad y Genotoxicidad*. Madrid. Recuperado el 29 de 03 de 2018, de <http://ritsq.org/wp-content/uploads/cd-toxamb/Documentos/07%20Herrero%20FINAL.pdf>
- Iqbal, M. (2016). *Vicia faba* bioassay for environmental toxicity monitoring: A review. *Chemosphere*, 144, 785-802. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.09.048>
- Leme, M. D., & Marín Morales, M. A. (julio-agosto de 2009). Allium cepa test in environmental monitoring: A review on its application. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 682(1), 71-81. doi:10.1016/j.mrrev.2009.06.002
- LIU, D., JIANG, W., MENG, Q., ZOU, J., GU, J., & ZENG, M. (2009). Cytogenetical and ultrastructural effects of copper on root meristem cells of *Allium sativum* L. *BIOCELL*, 33(1), 25-32. doi:10.32604/biocell.2009.33.025
- Metcalf & Eddy, Inc., Tchobanoglous, G., Burton, F., & Stensel, H. (2003). *Wastewater Engineering: Treatment and Reuse* (4ta ed.). McGraw-Hill Education. Recuperado el 10 de Febrero de 2018
- Nodal Becerra, A. (2001). Procesos biológicos aplicados al tratamiento de agua residual. *Ingeniería Hidráulica y Ambiental*, 21(4), 52-56.
- NORMA MEXICANA MNX-AA-058-SCFI Análisis de aguas- Determinación de cianuros totales en aguas naturales, potables, residuales y residuales tratadas- Método de Prueba. (2001). *Diario de la Federación*. Recuperado el 10 de Agosto de 2018
- NORMA MEXICANA NMX-AA-003 Aguas Residuales- Muestreo. (1980). *Diario Oficial de la Federación*. Recuperado el 10 de Agosto de 2018
- NORMA MEXICANA NMX-AA-028-SCFI- Análisis de agua, Determinación de la demanda bioquímica de oxígeno en aguas naturales, residuales (DBO5), y residuales tratadas. (2001). *Diario Oficial de la Federación*. Recuperado el 10 de Septiembre de 2018
- NORMA MEXICANA NMX-AA-030/1- SCFI Análisis de Agua- Medición de la Demanda Química de Oxígeno en Aguas Naturales, Residuales y Residuales Tratadas. (2012). *Diario Oficial de la Federación*.
- NORMA MEXICANA NMX-AA-51, Aguas- Determinación de metales pesados- Método espectrofotométrico de absorción atómica. (s.f.). *Diario Oficial de la Federación*.
- Noyola, A., Morgan-Sagastume, J. M., & Güereca, L. P. (2013). *Selección de tecnologías para el tratamiento de aguas residuales municipales: Guía de apoyo para ciudades pequeñas y medianas*. México: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Pathiratne, A., Hemachandra, C. K., & De Silva, N. (7 de 11 de 2015). Efficacy of *Allium cepa* test system for screening cytotoxicity and genotoxicity of industrial effluents originated from different industrial activities. *Environ Monit Assess*, 187(730), 1-12. doi:10.1007/s10661-015-4954-z

- Pérez Aristizábal, J. D. (2010). *Aplicación y Evaluación de un Reactor de Contactores*. Universidad de Medellín, Facultad de ingenierías, Medellín.
- Pourrut, B., Jean, S., Silvestre, J., & Pinelli, E. (24 de diciembre de 2011). Lead-induced DNA damage in *Vicia faba* root cells: Potential involvement of oxidative stress. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 726(2), 123-128. doi:10.1016/j.mrgentox.2011.09.001
- Ramírez Concepción, H. R., Castro Velasco, L. N., & Martínez Santiago, E. (Mayo de 2016). *Efectos Terapéuticos del Ajo (Allium sativum)*. Salud y Administración, 3(8), 39-47. Recuperado el 13 de 06 de 2019, de http://www.unsis.edu.mx/revista/doc/vol3num8/A4_Efectos_Terapeuticos_Ajo.pdf
- Sáenz, M. E., & Di Marzio, W. D. (2013). *Ecotoxicología*. EUDEBA. Recuperado el 30 de 03 de 2018
- SEMARNAT. (6 de enero de 1997). NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-001-SEMARNAT. *Diario Oficial de la Federación*, 5-29. Recuperado el 10 de 9 de 2018
- SEMARNAT. (21 de septiembre de 1998). NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-003-SEMARNAT-1997. *Diario Oficial de la Federación*, 50-58. Recuperado el 10 de 9 de 2018
- SEMARNAT. (2012). *Informe de la Situación del Medio Ambiente en México. Compendio de Estadísticas Ambientales*. México. Recuperado el 6 de 9 de 2018
- SEMARNAT. (2015). *Informe de la Situación del Medio Ambiente en México. Compendio de Estadísticas Ambientales. Indicadores Clave, de Desempeño Ambiental y de Crecimiento Verde*. Semarnat. México. Recuperado el 6 de 9 de 2018
- Sharma, A., & Sharma, A. (1980). *Chromosome Techniques. Theory and Practice* (3dr ed.). Elsevier. Recuperado el 11 de 02 de 2019
- Smaka Kincl, V., Stegnar, P., Lovka, M., & Toman, M. (1996). The evaluation of waste, surface and ground water quality using the *Allium* test procedure. *Mutation Research*, 368, 171-179. Obtenido de [https://doi.org/10.1016/S0165-1218\(96\)90059-2](https://doi.org/10.1016/S0165-1218(96)90059-2)
- Steinkellner, H., Mun-Sik, K., Helma, C., Ecker, S., Ma, T., Horak, O., . . . Knasmüller, S. (1998). Genotoxic effects of heavy metals: comparative investigation with plant bioassays. *Environ Mol Mutagen*, 31(2), 189-191. Recuperado el 18 de 07 de 2019, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9544197>
- Tartar, G., Kaymak, F., & Gokalp Muranli, F. D. (2006). *Genotoxic Effects of Avenoxan on Allium cepa L. and Allium sativum L.* CARYOLOGIA, 59(3), 241-247. doi:10.1080/00087114.2006.10797921
- Tobón M., F., & López G., L. (Mayo-Agosto de 2011). Genotoxicity of water contaminated by plaguicidas in an area of Antioquia. *REVISTA MVZ CÓRDOBA*, 16(2), 2605-2615. Recuperado el 04 de 04 de 2018
- UNESCO. (2017). *Informe Mundial sobre el Desarrollo de los Recursos Hídricos de las Naciones Unidas*. UNESCO, División de Ciencias del Agua. Perugia: WWAP. Recuperado el 28 de 02 de 2018, de <http://unesdoc.unesco.org/images/0024/002475/247552s.pdf>
- UPAEP. (s.f.). MANUAL DE USO PARA EQUIPO DE ABSORCIÓN ATÓMICA “AA200Analyst” EN LA DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS DE CALIDAD DE AGUA. Recuperado el 10 de 01 de 2019

Valencia Quintana, R., Sánchez Alarcón, J., Gómez Arroyo, S., Córtes Eslava, J., Waliszewski, S. M., Fernández, S., & Villalobos Pietrini, R. (septiembre de 2013). Genotoxicidad de *Plaguicidas en Sistemas Vegetales*. *Rev. Int. Contam. Ambie*, 29, 133-157. Recuperado el 10 de 02 de 2018

BIBLIOGRAFÍA

Abrevaya, X. (20 de agosto de 2008). *IntraMed*. Recuperado el 29 de 03 de 2018, de ¿Qué es la genotoxicidad?: <http://www.intramed.net/contenido.asp?contenidoID=47111>

Agua de Puebla para Todos. (2017). *PTAR Parque Ecológico*. Convención Anual y Expo, ANEAS, Puebla. Recuperado el 1 de 10 de 2018

Alborghetti Nai, G., Casanova de Oliveira, M., de Oliveira Tavares, G., Fonseca Pereira, L. F., Lemes Soares, N. S., & Gatti Silva, P. (25 de julio de 2013). Evaluación de la genotoxicidad inducida por la administración repetida de anestésicos locales: un estudio experimental en ratones. (ELSEVIER, Ed.) *REVISTA BRASILEIRA DE ANESTESIOLOGIA*, 65(1), 21-26. Recuperado el 04 de 04 de 2018, de <https://doi.org/10.1016/j.bjanes.2013.07.008>

Arya, S., & Mukherjee, A. (junio de 2014). Sensitivity of *Allium cepa* and *Vicia faba* towards cadmium toxicity(Article). *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 14(2), 447-458. doi:10.4067/S0718-95162014005000035

Asita Asita, O., & Matebesi, L. (5 de 07 de 2010). Genotoxicity of hormoban and seven other pesticides to onion root tip meristematic cells. *AFRICAN JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY*, 9(27), 4225-4232. Recuperado el 1 de 12 de 2019, de <http://www.academicjournals.org/AJB>

Barba HO, L. E. (2002). *Conceptos básicos de la contaminación del agua y parámetros de medición*. Universidad del Valle, Facultad de Ingenierías, Escuela de ingeniería de Recursos Naturales y del Ambiente, Santiago de Cali, Colombia.

Beltrán Orbegoso, R. A., & Gonza Carnero, K. A. (10 de July de 2017). Citotoxicidad y genotoxicidad de las aguas de los ríos Jequetepeque y Moche mediante el bioindicador ambiental *Vicia faba* L. (U. N. Trujillo, Ed.) *Scientia Agropecuaria*, 8(3), 203-213. doi:10.17268/sci.agropecu.2017.03.03

Beringola Beringola, M. L. (1996). *Genotoxicidad de las aguas del Río Tajo*. Universidad Complutense de Madrid, Ecología, Madrid. Recuperado el 31 de 03 de 2018

Bonciu, E., Firbas, P., Fontanetti, C., Wusheng, J., Cengis, K., Liu, D., . . . Papini, A. (2018). An evaluation for the standardization of the *Allium cepa* test as cytotoxicity and genotoxicity assay. *Caryologia*. doi:10.1080/00087114.2018.1503496

- Carbajal Azcona, Á., & González Fernández, M. (2012). Propiedades y funciones biológicas del agua. En Vaquero , & Toxqui, *Agua para la Salud. pasado, presente y futuro* (págs. 33-45). Madrid, España: CSIC.
- Conagua. (2015). *Estadísticas del Agua en México*. México: Conagua, Semarnat.
- Cumpa Yumpton, C., & Zavala de la Cruz, F. (2013). MITOTIC INDEX DETERMINATION OF *Allium cepa* ROOT MERISTEMS EXPOSED TO THE ETHANOLIC EXTRACT OF *Erythroxylum coca* "coca" LEAVES AT DIFFERENT CONCENTRATIONS AND EXPOSURE TIME AND TIME EXPOSURE. *SAGASTEGUIANA*, 1(1), 29-38. Recuperado el 13 de 06 de 2019
- Díaz Báez, C., Ronco, A., & Pica Granados, Y. (2004). Ensayo de toxicidad aguda con *Allium cepa* L mediante la evaluación de la inhibición del crecimiento promedio de raíces de cebolla. En G. Castillo Morales (Ed.), *ENSAYOS TOXICOLÓGICOS Y MÉTODOS DE EVALUACIÓN DE CALIDAD DE AGUAS, Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones* (págs. 47-52). México: IMTA. Recuperado el 16 de 06 de 2019, de https://www.idrc.ca/sites/default/files/openbooks/147-7/index.html#page_47
- Dong, Y., & Zhang, J. (29 de enero de 2010). Testing the genotoxicity of coking waste water using *Vicia faba* and *Hordeum. vulgare* bioassays, 73, 944-948. doi:10.1016/j.ecoenv.2009.12.026
- Dutta, J., Ahmad, A., & Singh, J. (2018). Study of industrial effluents induced genotoxicity on *Allium cepa* L. *Caryologia*, 1-8. Recuperado el 15 de 06 de 2018, de <https://doi.org/10.1080/00087114.2018.1447631>
- EUPATI. (17 de 11 de 2015). *Academia Europea de Pacientes*. Recuperado el 26 de 03 de 2018, de <https://www.eupati.eu/es/glossary/estudio-de-genotoxicidad/>
- Feng, Y., Li, B., Guo, X., Duan , L., Cao, J., Wang, S., . . . Cui, L. (noviembre de 2011). Toxicity evaluation on the effluent water from a sewage treatment plant in Zhengzhou City. (MEDLINE, Ed.) *Journal of hygiene research*, 40(6), 738-740. Recuperado el 11 de 04 de 2018
- Fiskesjö, G. (1985). The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas*(102), 99-112. Recuperado el 11 de 02 de 2019, de <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1601-5223.1985.tb00471.x>
- Giorgetti, L., Taloiuzte, H., Merzouki, M., Caltavuturo, L., Geri, C., & Frassinetti, S. (11 de 2011). Genotoxicity evaluation of effluents from textile industries of the region Fez-Boulmane, Morocco: A case study. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74(8), 2275-2283. Recuperado el 25 de 01 de 2019, de <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.08.002>
- Gómez Sandoval, L., Páez Bristain, R., & Flores Díaz, A. (2013). *Comportamiento de los sólidos en suspensión y sedimentales en cuerpos de agua: búsqueda de métodos aplicables al monitoreo comunitario*. En: *Memorias del Tercer Congreso Nacional de Manejo de Cuencas Hidrográficas*. UNAM, Centro de Investigaciones en Geografía Ambienta l., México.

- González, M. (10 de febrero de 2018). *¿Que es el tratamiento biológico o secundario?*. Obtenido de Tratamiento del Agua: <http://www.tratamientodelagua.com.mx/>
- Grant, W. F. (1994 de october de 1994). The present status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 310(2), 175-185. doi:10.1016/0027-5107(94)90112-0
- Hemachandra, C. K., & Pathiratne, A. (2016). Cytogenotoxicity screening of source water, wastewater and treated water of drinking water treatment plants using two in vivo test systems: Allium cepa root based and Nile tilapia erythrocyte based test. *Water Research*, 108, 320-329. Recuperado el 02 de 06 de 2019, de <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2016.11.009>
- Henze, M., Brdjanovic, D., van Loosdrecht, M., & Ekama, G. A. (2017). Caracterización de las Aguas Residuales. En H. Mogens , & Y. Comeau, *Tratamiento biológico de aguas residuales, Principios, modelacion y diseño* (págs. 35-56). Reino Unido: IWA Publishing.
- Hernández Benavides, D. M. (2017). *Evaluación de la genotoxicidad y su relación con la exposición a Contaminantes Orgánicos Persistentes en familias de jornaleros de la caña de azúcar en el Sureste de México*. Tesis, El Colegio de la Frontera Sur, Chiapas. Recuperado el 06 de 04 de 2018
- Herrero Felipe, Ó., & De La Peña De Torres, E. (04 de marzo de 2004). Evaluación de Mutagenicidad y Genotoxicidad. En CSIC (Ed.), *Evaluación de Mutagenicidad y Genotoxicidad*. Madrid. Recuperado el 29 de 03 de 2018, de <http://ritsq.org/wp-content/uploads/cd-toxamb/Documentos/07%20Herrero%20FINAL.pdf>
- Iqbal, M. (2016). Vicia faba bioassay for environmental toxicity monitoring: A review. *Chemosfere*, 144, 785-802. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.09.048>
- Jaramillo Juárez, F., Rincón Sánchez, A. R., & Rico Martínez, R. (2009). *TOXICOLOGÍA AMBIENTAL*. Aguascalientes, México: UAA. Recuperado el 06 de 04 de 2018
- Klaassen, C. D., & Watkins, J. B. (2005). *Fundamentos de Toxicología*. Casarett y Doull. (M. López Rivadulla, Ed.) Madrid, España: McGraw-Hill-Interamericana.
- Leme, M. D., & Marín Morales, M. A. (julio-agosto de 2009). Allium cepa test in environmental monitoring: A review on its application. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 682(1), 71-81. doi:10.1016/j.mrrev.2009.06.002
- LIU, D., JIANG, W., MENG, Q., ZOU, J., GU, J., & ZENG, M. (2009). Cytogenetical and ultrastructural effects of copper on root meristem cells of Allium sativum L. *BIOCELL*, 33(1), 25-32. doi:10.32604/biocell.2009.33.025
- Mazari Hiriart, M., Espinosa, A., López Vidal, Y., Arredondo Hernández, R., Díaz Torres, E., & Equihua Zamora, C. (2010). Visión integral sobre el agua y. En B. Jiménez Cisneros, M. L. Torregrosa y Armentia, & L. Aboites Aguilar, *El agua en México: cauces y encauces, Primera edición*. México: Academia Mexicana de Ciencias.

- Merli, G. F., & Ricciuti, N. O. (2009). *Microbiología de las las Aguas Residuales, Aplicación de Biosólidos en Suelo, Procesos Fundamentales Físico-Químicos y Microbiológicos*. UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA NACIONAL, Facultad Regional Bahía Blanca. Argentina: edUTecNe.
- Metcalf & Eddy, Inc., Tchobanoglous, G., Burton, F., & Stensel, H. (2003). *Wastewater Engineering: Treatment and Reuse* (4ta ed.). McGraw-Hill Education. Recuperado el 10 de Febrero de 2018
- Nodal Becerra, A. (2001). Procesos biológicos aplicados al tratamiento de agua residual. *Ingeniería Hidráulica y Ambiental*, 21(4), 52-56.
- NORMA MEXICANA MNX-AA-058-SCFI Análisis de aguas- Determinación de cianuros totales en aguas naturales, potables, residuales y residuales tratadas- Método de Prueba. (2001). *Diario de la Federación*.
- NORMA MEXICANA NMX-AA-003 Aguas Residuales- Muestreo. (1980). *Diario Oficial de la Federación*.
- NORMA MEXICANA NMX-AA-028-SCFI- Análisis de agua, Determinación de la demanda bioquímica de oxígeno en aguas naturales, residuales (DBO5), y residuales tratadas. (2001). *Diario Oficial de la Federación*.
- NORMA MEXICANA NMX-AA-030/1- SCFI Análisis de Agua- Medición de la Demanda Química de Oxígeno en Aguas Naturales, Residuales y Residuales Tratadas. (2012). *Diario Oficial de la Federación*.
- NORMA MEXICANA NMX-AA-51, Aguas- Determinación de metales pesados- Método espectrofotométrico de absorción atómica. (s.f.). *Diario Oficial de la Federación*.
- Noyola, A., Morgan-Sagastume, J. M., & Güereca, L. P. (2013). *Selección de tecnologías para el tratamiento de aguas residuales municipales: Guía de apoyo para ciudades pequeñas y medianas*. México: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Olivares, Y., Gaete, H., & Neaman, A. (febrero de 2015). EVALUACIÓN DE LA FITOTOXICIDAD Y LA GENOTOXICIDAD DE SUELOS AGRÍCOLAS DE ZONAS CON ACTIVIDADES MINERAS DE COBRE DE LA CUENCA DEL RÍO ACONCAGUA (CHILE CENTRAL). *Rev. Int. Contam. Ambie*, 31(3), 237-243. Recuperado el 12 de 02 de 2018
- Patlolla, A. K., Berry, A., May, L., & Tchounwou, P. B. (2012). Genotoxicity of Silver Nanoparticles in Vicia faba: A Pilot Study on the Environmental Monitoring of Nanoparticles. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 9(5), 1649-1662. doi:10.3390/ijerph9051649
- Pathiratne, A., Hemachandra, C. K., & De silva, N. (7 de 11 de 2015). Efficacy of Allium cepa test system for screening cytotoxicity and genotoxicity of industrial effluents originated from different industrial activities. *Environ Monit Assess*, 187(730), 1-12. doi:10.1007/s10661-015-4954-z

- Peña, C. A., Carter, D. E., & Ayala Fierro, F. (2001). *Toxicología Ambiental: Evaluación de Riesgos y Restauración Ambiental*. Arizona, EU: Southwest Hazardous Waste Program. Recuperado el 26 de 03 de 2018, de <http://toxamb.pharmacy.arizona.edu/toxamb.pdf>
- Pérez Aristizábal, J. D. (2010). *Aplicación y Evaluación de un Reactor de Contactores*. Universidad de Medellín, Facultad de ingenierías, Medellín.
- Petriccione, M., Forte, V., Valente, D., & Ciniglia, C. (10 de julio de 2013). DNA integrity of onion root cells under catechol influence. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(7), 4859-4871. doi:<https://doi.org/10.1007/s11356-012-1422-y>
- Pourrut, B., Jean, S., Silvestre, J., & Pinelli, E. (24 de diciembre de 2011). Lead-induced DNA damage in Vicia faba root cells: Potential involvement of oxidative stress. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 726(2), 123-128. doi:10.1016/j.mrgentox.2011.09.001
- Prieto González, E. A. (s.f.). BIOMARCADORES DE DANO GENETICO. UN ENFOQUE PRÁCTICO. Recuperado el 6 de 04 de 2018, de https://www.researchgate.net/profile/Elio_A_Gonzalez/publication/273762109_BIOMARCADORES_DE_DANO_GENETICO_Una_mirada_Practica/links/550aee4c0cf290bdc1113d6c/BIMARCADORES-DE-DANO-GENETICO-Una-mirada-Practica.pdf
- Ramírez Concepción, H. R., Castro Velasco, L. N., & Martínez Santiago, E. (Mayo de 2016). Efectos Terapéuticos del Ajo (*Allium sativum*). *Salud y Administración*, 3(8), 39-47. Recuperado el 13 de 06 de 2019, de http://www.unsis.edu.mx/revista/doc/vol3num8/A4_Efectos_Terapeuticos_Ajo.pdf
- Sáenz, M. E., & Di Marzio, W. D. (2013). *Ecotoxicología*. EUDEBA. Recuperado el 30 de 03 de 2018
- Saxena, P., Chauhan, L., & Gupta, S. (13 de 08 de 2005). Cytogenetic effects of commercial formulation of cypermethrin in root meristem cells of *Allium sativum*: Spectroscopic basis of chromosome damage. *TOXICOLOGY*(216), 244-252. doi:10.1016/j.tox.2005.08.008
- SEMARNAT. (6 de enero de 1997). NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-001-SEMARNAT. *Diario Oficial de la Federación*, 5-29. Recuperado el 10 de 9 de 2018
- SEMARNAT. (21 de septiembre de 1998). NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-003-SEMARNAT-1997. *Diario Oficial de la Federación*, 50-58. Recuperado el 10 de 9 de 2018
- Semarnat. (2012). *Informe de la Situación del Medio Ambiente en México. Compendio de Estadísticas Ambientales*. México.
- Semarnat. (2015). *Informe de la Situación del Medio Ambiente en México. Compendio de Estadísticas Ambientales. Indicadores Clave, de Desempeño Ambiental y de Crecimiento Verde*. Semarnat. México: Semarnat.
- Sharma, A., & Sharma, A. (1980). *Chromosome Techniques. Theory and Practice* (3dr ed.). Elsevier. Recuperado el 11 de 02 de 2019

- Smaka Kincl, V., Stegnar, P., Lovka, M., & Toman, M. (1996). The evaluation of waste, surface and ground water quality using the Allium test procedure. *Mutation Research*, 368, 171-179. Obtenido de [https://doi.org/10.1016/S0165-1218\(96\)90059-2](https://doi.org/10.1016/S0165-1218(96)90059-2)
- Srivastava, K., & Mishra, K. K. (enero de 2009). Cytogenetic effects of commercially formulated atrazine on the somatic cells of *Allium cepa* and *Vicia faba*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 93(1), 8-12. doi:10.1016/j.pestbp.2008.08.001
- Steinkellner, H., Mun-Sik, K., Helma, C., Ecker, S., Ma, T., Horak, O., . . . Knasmüller, S. (1998). Genotoxic effects of heavy metals: comparative investigation with plant bioassays. *Environ Mol Mutagen*, 31(2), 189-191. Recuperado el 18 de 07 de 2019, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9544197>
- Tartar, G., Kaymak, F., & Gokalp Muranli, F. D. (2006). Genotoxic Effects of Avenoxan on *Allium cepa* L. and *Allium sativum* L. *CARYOLOGIA*, 59(3), 241-247. doi:10.1080/00087114.2006.10797921
- Tedesco, S. B., & Laughinghouse IV, H. D. (29 de 02 de 2012). Bioindicator of Genotoxicity: The *Allium cepa* Test. *Environmental Contamination*, 137-156. doi:10.5772/31371
- Tobón M., F., & López G., L. (Mayo-Agosto de 2011). Genotoxicity of water contaminated by plaguicidas in an area of Antioquia. *REVISTA MVZ CÓRDOBA*, 16(2), 2605-2615. Recuperado el 04 de 04 de 2018
- Ulloa Carbajal, L., Zavala de la Cruz, F., & Sisniegas, M. (2015). Cytotoxic effect of Tartrazine in the mitotic index of meristematic cells of *Allium cepa*. *REBIOL*, 35(1), 43-48. Recuperado el 15 de 06 de 2019, de <http://revistas.unitru.edu.pe/index.php/facccbiol/article/view/874>
- UNESCO. (2017). *Informe Mundial sobre el Desarrollo de los Recursos Hídricos de las Naciones Unidas*. UNESCO, División de Ciencias del Agua. Perugia: WWAP. Recuperado el 28 de 02 de 2018, de <http://unesdoc.unesco.org/images/0024/002475/247552s.pdf>
- UPAEP. (s.f.). MANUAL DE USO PARA EQUIPO DE ABSORCIÓN ATÓMICA "AA200Analyst" EN LA DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS DE CALIDAD DE AGUA. Recuperado el 10 de 01 de 2019
- Valencia Quintana, R., Sánchez Alarcón, J., Gómez Arroyo, S., Córtes Eslava, J., Waliszewski, S. M., Fernández, S., & Villalobos Pietrini, R. (septiembre de 2013). Genotoxicidad de Plaguicidas en Sistemas Vegetales. *Rev. Int. Contam. Ambie*, 29, 133-157. Recuperado el 10 de 02 de 2018
- Velandia, S. A., Flechas, M. C., Stashenko, E., & Ocazone, R. (2016). PROPOSAL TO SELECT ESSENTIAL OILS FROM COLOMBIAN PLANTS FOR RESEARCH BASED ON ITS CYTOXICITY. *VITAE*, 23(1), 19-29. Recuperado el 15 de 06 de 2019, de <http://dx.doi.org/10.17533/udea.vitae.v23n1a03>
- Waters, M. D., Brady, A. L., Stack, H. F., & Brockman, H. E. (January de 1990). Antimutagenicity profiles for some model compounds. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 238(1), 57-85. doi:10.1016/0165-1110(90)90039-E

Capítulo IV

Anexos

Norma Mexicana NMX-AA-003-1980 Aguas Residuales-Muestreo.
Plan de muestreo (procedimiento CAGC4-03), modificado de IMTA.

Plan de muestreo				
Proyecto: Investigación de tesis: Genotoxicidad Y Citotoxicidad por Aguas Residuales Tratadas				
Dirección: PTAR Parque Ecológico, Juan de Palafox y Mendoza, colonia Resurgimiento s/n.				
Objetivo: Obtención de muestras simples de aguas residuales tratadas por un sistema CBR para la determinación de la genotoxicidad y citotoxicidad en células de <i>A. sativum</i> mediante el IM, micronúcleos y anomalías nucleares para la prevención del riesgo de exposición.				
Justificación: En la ciudad de Puebla parte del agua residual sanitaria tratada por el sistema CBR se destina a ríos y a la reutilización en servicios al público con contacto directo como; riego en áreas verdes, relleno de cuerpos de agua, fuentes ornamentales y venta a usuarios que la demanden (Agua de Puebla para Todos, 2017). Debido al contacto directo e indirecto del agua tratada con la población, es necesario realizar pruebas de genotoxicidad para determinar si existe inducción de micronúcleos o aberraciones nucleares y citotoxicidad por aguas residuales tratadas mediante el sistema de discos rotatorios utilizando el bioindicador <i>A. sativum</i> , para prevenir el riesgo de exposición.				
Antecedentes: Smaka Kincl, Stegnar, Lovka, y Toman (1996), utilizaron a <i>Allium cepa</i> como prueba de monitoreo ambiental para la detección de sustancias citotóxicas y genotóxicas potenciales en aguas residuales industriales y municipales sin diluir; agua de salida de una planta de tratamiento biológica; agua arriba del río Drava y aguas abajo de la ciudad de Maribor en Eslovenia, y agua potable no clorada como prueba de control negativo. Los líquidos de prueba más contaminados (aguas residuales industriales y municipales no tratadas) causaron efectos subletales e incluso letales. El agua más contaminada causó la inhibición del crecimiento de la raíz por encima del 50% (incluso hasta el 74%), una disminución del índice mitótico sobre el 36%				
Visita Prospectiva:				
Fecha de entrega:	N° de control:	Elaboró: Karen del Carmen Morales Ramírez	VoBo:	Hoja 1

Personal participante y asignación de actividades				
Nombre		Actividad		Fecha de cumplimiento
		Responsable de muestreo		
		Preparación de envases		
		Preparación y calibración de equipos		
		Preparación de hojas de campo		
		Responsable de entrega de muestras		
		Responsable de entrega de muestras		
Datos generales				
Lugar de muestreo: PTAR Parque Ecológico, Juan de Palafox y Mendoza, colonia Resurgimiento s/n.		Fecha de muestreo:		Fecha de entrega de muestras: Tipo de muestra: Agua residual municipal
Tipo de muestreo: Simple (X) Compuesto ()		Número total de muestras: Simples: Compuestas:		Número total de frascos: Simples: Compuestas: Se comparará con la norma: NOM-003-1997
Fecha de entrega:	N° de control:	Elaboró: Karen del Carmen Morales Ramírez		VoBo: Hoja 2

LUGAR DE MUESTREO: PTAR Parque Ecológico- Puebla Pue.		TIPO DE MUESTREO: Simple (X), Compuesto ()		TIPO DE MUESTRA: Agua residual municipal	
FECHA DE MUESTREO:		FECHA PROGRAMADA DE ENTREGA DE MUESTRAS:		NÚMERO TOTAL DE MUESTRAS:	
Parámetros a muestrear (marque con una X los parámetros de interés)					
Q-A FISCOQUÍMICOS			Absorción atómica		
FQ1: (preservación sólo hielo)		FG2 (preservación con H ₂ SO ₄)		AA: (preservadas con HNO ₃) 500 ml	
SOLIDOS TOTALES () 500 mL		NITRÓGENO TOTAL () 1200 mL		As (X) Cd (X) Cu () Cr (X) Hg () Ni ()	
SÓLIDOS SUSPENDIDOS TOTALES () 100 - 500 mL		NITRÓGENO ORGANICO () 500 mL		Pb (X) Zn (X) Ag () Al () B () Ba ()	
SOLIDOS SEDIMENTABLES () 1000 mL		NITRÓGENO AMONICAL () 500 mL		AA: (preservadas con NaOH) 500 ml	
DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXIGENO (X) 100 -1000 mL		DEMANDA QUÍMICA DE OXÍGENO (X) 100-1000 mL		CN ⁻ (X)	
Volumen total:		Volumen total:		Volumen total:	
HIDROBIOLOGÍA Y EVALUACION AMBIENTAL			PARÁMETROS DE CAMPO (CAGC4-02)		
PRESERVACIÓN: sólo hielo			Potencial de hidrogeno, pH. (X)		
GENOTOXICIDAD (X) 1000 - 4000 mL			Temperatura (X)		
			Oxigeno disuelto ()		
			Otro ()		
Observaciones:					
Fecha de entrega:		N° de control:	Elaboró: Karen del Carmen Morales Ramírez		VoBo. Hoja 3

Registro de Campo

Fecha de muestreo:		Nombre/firma del muestreador: Karen del Carmen Morales Ramírez				RESP. DE ENTREGA DE MUESTRAS:					
FECHA DE RECEPCIÓN:		Hora:		NOMBRE/FIRMA RECEPTOR:				Control No:			
Proyecto: Investigación de tesis: Daño Genotóxico en Sistemas Vegetales por Aguas Tratadas						Tipo de Muestra: Agua residual municipal					
No.	Nombre de la Muestra	Hora	pH	No. RECIPIENTES POR PRESERVACIÓN (4°C)					Total recipientes Plástico		
				Solo Hielo	H ₂ SO ₄ pH< 2	HNO ₃ pH< 2	NaOH pH> 12	Cantidad			
1	DBO Influyente			✓				1 L	1		
2	DBO Efluente			✓				1 L	1		
3	DQO Influyente				✓			1 L	1		
4	DQO Efluente				✓			1 L	1		
5	Metales Influyente					✓		.5 L	1		
6	Metales Efluente					✓		.5 L	1		
7	Genotoxicidad Influyente			✓				.5 L	1		
8	Genotoxicidad Efluente			✓				.5 L	1		
9	Cianuros Influyente						✓	.5 L	1		
10	Cianuros Efluente						✓	.5 L	1		
								Total: 7 L	TOTAL: 10		
PARÁMETROS POR PRESERVACIÓN: () DE ACUERDO CON EL PLAN DE MUESTREO SOLO HIELO: DBO H ₂ SO ₄ : DQO HNO ₃ : Metales NaOH: Cianuros OTROS:											
Verificación		Preservación		Identificación		Recipiente		Volumen		Tiempo	
		C	NC	C	NC	C	NC	C	NC	C	NC
Observaciones:											
Fecha de entrega:		N° de control:		Elaboró: Karen del Carmen Morales Ramírez				VoBo.:		Hoja 1	

Cadena de custodia						
GENERALES						
Fecha:		Ubicación de la Zona: PTAR Parque Ecológico, Juan de Palafox y Mendoza, colonia Resurgimiento s/n.				
Hora:						
Temperatura ambiental:		Descripción de la zona: Planta de tratamiento de agua residual mediante discos rotatorios				
Tipo de muestra: Agua municipal residual (SIMPLE)						
Identificación de la muestra:		Ident. Muestra laboratorio:				
Observaciones:						
MUESTREO						
Parámetro	Nombre	Firma	pH	Tepm.	OD	otro
DBO Influyente						
DBO Efluente						
DQO Influyente						
DQO Efluente						
Metales Influyente						
Metales Efluente						
Genotoxicidad Influyente						
Genotoxicidad Efluente						
Cianuros Influyente						
Cianuros Efluente						
TRANSPORTE						
Responsable	Nombre	Firma	Descripción	Observaciones		
LABORATORIO						
Responsable:	Recepción:		Análisis:		Observaciones	
	Fecha	Hora	Fecha	Hora		
Responsable	Recepción:		Análisis:		Observaciones	
	Fecha	Hora	Fecha	Hora		
Responsable:	Recepción:		Análisis:		Observaciones	
	Fecha	Hora	Fecha	Hora		

Responsable:	Recepción:		Análisis:		Observaciones
	Fecha	Hora	Fecha	Hora	
Responsable:	Recepción:		Análisis:		Observaciones
	Fecha	Hora	Fecha	Hora	
Responsable:	Recepción:		Análisis:		Observaciones
	Fecha	Hora	Fecha	Hora	
Responsable	Recepción:		Análisis:		Observaciones
	Fecha	Hora	Fecha	Hora	
Responsable:	Recepción:		Análisis:		Observaciones
	Fecha	Hora	Fecha	Hora	
Responsable	Recepción:		Análisis:		Observaciones
	Fecha	Hora	Fecha	Hora	
Responsable:	Recepción:		Análisis:		Observaciones
	Fecha	Hora	Fecha	Hora	
Responsable:	Recepción:		Análisis:		Observaciones
	Fecha	Hora	Fecha	Hora	
Responsable:	Recepción:		Análisis:		Observaciones
	Fecha	Hora	Fecha	Hora	

Lista de verificación			
Accesorios de seguridad	Muestreo	Medición de parámetros en campo	Limpieza y descontaminación
• Credencial • Permiso para muestrear la zona • Botas • Cubrebocas • Mascarilla • Guantes de nitrilo	• Cubeta • Cuerda • 8 Recipientes de muestreo ✓ 6 de 500 ml ✓ 2 de 1000 ml • GPS • Hielera • Procedimientos • Hoja de campo • Cadena de custodia • Formato de salida de equipo ya autorizado • Programa de muestreo e itinerario • Procedimientos de muestreo • Procedimientos de operación del equipo campo • Etiquetas • Lapicero de tinta indeleble • Diurex • Maskin tape o papel Parafilm • Hielo	• Pipetas pasteur • Vaso de precipitado de plástico • Buffer pH 4, 7 y 10 • Reactivos (H_2SO_4, HNO_3) • Papel pH • Sonda multiparámetros pH y conductividad • Pilas repuesto para los equipos • Caja de plástico	• Agua destilada • Pizeta • Bolsa para basura • Gel desinfectante • Papel higiénico • Franela