



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

DETERMINACION DEL GRADO DE CONTAMINACION DE
LAS AGUAS DE RIEGO UTILIZADAS EN EL MUNICIPIO DE
HUEHUETOCA, ESTADO DE MEXICO, A TRAVES DE LA
PRUEBA DE MICRONUCLEOS USANDO COMO
BIOINDICADOR A *Vicia Faba*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

INGENIERO AGRICOLA

P R E S E N T A :

JAIME MACIEL MERCADO

ASESOR: ING. AGR. OSCAR HORACIO GUILLEN AYALA



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES-CUAUTITLAN



DEPARTAMENTO DE

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Determinación del grado de contaminación de las aguas de riego utilizadas
en el Municipio de Huehuetoca, Estado de México, a través de la prueba de
micronúcleos usando como bioindicador a Vicia faba.
que presenta el pasante: Jaime Maciel Mercado
con número de cuenta: 7627351-5 para obtener el título de :
Ingeniero Agrícola

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 28 de Febrero de 2005

PRESIDENTE	<u>Q. Celia Elena Valencia Islas</u>	
VOCAL	<u>Ing. Javier Medina Barrón</u>	
SECRETARIO	<u>Ing. Oscar Horacio Guillén Ayala</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>Ing. Juan Carlos Colorado Yáñez</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>Ing. Asunción Martínez Vázquez</u>	

AGRADECIMIENTO.

A mi familia:

En especial a mis hermanos que asumieron una responsabilidad que no les correspondía Jesús, Roberto, Juan y José Angel.

A Chayo:

Tu amor incondicional como hermana transmite una energía que impulsa para alcanzar lo que uno se propone.

A los profesores:

Que aman su profesión y dedicaron su tiempo en mi formación.

En especial al Ing. Agr. Oscar Horacio Guillen Ayala, por el tiempo que me dio para explicar y orientar en el trabajo de tesis.

Ing. Agr. Javier Medina Barrón por su ayuda para concluir mis estudios.

A Martha Nava Nava y José Luis Muñoz. Gracias por sus sugerencias para dar forma y corregir este trabajo de tesis.

A mi amigo de toda la vida:

Dr. José Guillermo Avila Acevedo, una vez mas estuviste ahí para ayudar.

DEDICATORIA

A la memoria de mis padres:

**Antonio Maciel Montoya
Isidra Mercado Carrillo
Quienes dieron lo mejor de sí.**

A mis hermanos:

**Jesús, Roberto, Juan, José Angel y Chayo
Su apoyo me permitió alcanzar lo que
nuestra madre quería para sus hijos.
Educación y un título!**

A la familia Zavala Maciel:

**Sin ustedes no se hubiera podido
Alcanzar la meta.**

INDICE

	Pagina
Índice de figuras	I
Índice de tablas	II
Resumen	V
1. Introducción	1
2. Objetivo general	5
2.1. Objetivos particulares	5
2.2. Hipótesis	5
3. - Revisión de literatura	7
3.1. Importancia de la calidad del agua utilizada para el riego agrícola	7
3.2. Antecedentes del uso de aguas residuales para el riego agrícola en México	8
3.3. Clasificación de las aguas residuales según su origen	9
3.4. Criterios y normas de calidad de las aguas residuales	11
3.5. Efecto del riego con aguas residuales en el suelo y las plantas cultivadas	15
3.5.1. Efecto en el suelo	15
3.5.2. Efecto en las plantas cultivadas	16
3.6. Contaminación del agua por metales pesados	17
3.6.1. Generalidades de los metales pesados	18
Plomo (Pb)	
Cromo (Cr)	
Cadmio(Cd)	
3.6.2. Efectos tóxicos de los metales pesados en las plantas	20
3.7. División celular en células meristemáticas	23
3.8. Importancia de la evaluación genotóxica	27
3.9. Definición e importancia de la prueba de micronúcleos	28
3.10. El haba (<i>Vicia faba</i> L.) como sistema biológico de prueba	30
4. Materiales y métodos	33
4.1. Ubicación de los sitios de muestreo	33
4.2. Metodología para el muestreo del agua	33

4.3.	Sitio de experimentación	34
4.4.	Material biológico	35
4.5.	Metodología	35
4.6.	Diseño experimental	37
4.7.	Análisis estadístico	37
4.8.	Análisis Citogenético	37
4.9.	Criterios para seleccionar células micronucleadas	38
5.	Resultados	40
6.	Discusión de resultados	62
7.	Conclusiones	69
8.	Recomendaciones	71
9.	Referencias	72

INDICE DE FIGURAS

	Pagina
Figura 1. Ubicación geográfica del municipio de Huehuetoca en el Estado de México	6
Figura 2. Célula meristemática de raíz de <i>Vicia faba</i> en profase	26
Figura 3. Célula meristemática de raíz de <i>Vicia faba</i> en metafase	26
Figura 4. Célula meristemática de raíz de <i>Vicia faba</i> en anafase	26
Figura 5. Célula meristemática de raíz de <i>Vicia faba</i> en telofase	26
Figura 6. Ciclo celular en células meristemáticas de <i>Vicia faba</i>	32
Figura 7. Ubicación de los sitios de muestreo en el municipio de Huehuetoca	39
Figura 8. Células meristemáticas de <i>Vicia faba</i> observadas en interfase con presencia de micronúcleos	43
Figura 9. Célula meristemática de <i>Vicia faba</i> que se observó en Profase	44
Figura 10. Célula meristemática de <i>Vicia faba</i> que se observó en Metafase	44
Figura 11. Célula meristemática de <i>Vicia faba</i> que se observó en Anafase	45
Figura 12. Célula meristemática de <i>Vicia faba</i> que se observó en Telofase	45

INDICE DE TABLAS

pagina

Tabla 1. Límites máximos permisibles de los parámetros de contaminantes para las aguas residuales que se dispongan para el riego agrícola (Norma Oficial Mexicana,1996).	14
Tabla 2. Análisis de varianza para la frecuencia de micronúcleos.	46
Tabla 3. Análisis de varianza para la frecuencia del índice mitótico	46
Tabla 4. Frecuencia de micronúcleos en los tratamientos evaluados para los 3 sitios de muestreo.	47
Tabla 5. Prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer para los tratamientos de la frecuencia de micronúcleos en el sitio de muestreo # 1.	48
Tabla 6. Prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer para los tratamientos de la frecuencia de micronúcleos en el sitio de muestreo # 2.	49
Tabla 7. Prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer para los tratamientos de la frecuencia de micronúcleos en el sitio de muestreo # 3.	50
Tabla 8. Prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer para la frecuencia de micronúcleos con el tratamiento de 1 hora de exposición para los 3 sitios de muestreo.	51
Tabla 9. Prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer para la frecuencia de micronúcleos con el tratamiento de 2 horas de exposición para los 3 sitios de muestreo.	51

Tabla 10. Prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer para la frecuencia de micronúcleos con el tratamiento de 3 horas de exposición para los 3 sitios de muestreo.	52
Tabla 11. Prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer para la frecuencia de micronúcleos con el tratamiento de 4 horas de exposición y 2 horas de recuperación para los 3 sitios de muestreo.	52
Tabla 12. Prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer para la frecuencia de micronúcleos con el tratamiento de 4 horas de exposición y 14 horas de recuperación para los 3 sitios de muestreo.	53
Tabla 13. Prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer para la frecuencia de micronúcleos con el tratamiento de 4 horas de exposición y 18 horas de recuperación para los 3 sitios de muestreo.	53
Tabla 14. Prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer para la frecuencia de micronúcleos con el tratamiento de 4 horas de exposición y 42 horas de recuperación para los 3 sitios de muestreo.	54
Tabla 15. Prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer para la frecuencia de micronúcleos con el tratamiento de 4 horas de exposición y 44 horas de recuperación para los 3 sitios de muestreo.	54
Tabla 16. Valores obtenidos en los testigos de cada tratamiento evaluado para la frecuencia de micronúcleos.	55
Tabla 17. Prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer para los tratamientos con sus respectivos testigos para la frecuencia de micronúcleos.	56

Tabla 18. Frecuencia del índice mitótico en los tratamientos evaluados para los 3 sitios de muestreo.	57
Tabla 19. Valores obtenidos en los testigos de cada tratamiento evaluado para la frecuencia del índice mitótico.	58
Tabla 20. Prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer para los tratamientos con sus respectivos testigos para la frecuencia del índice mitótico.	59
Tabla 21. Valores obtenidos para los metales pesados analizados por espectrofotometría de absorción atómica para el sitio de muestreo # 1.	60
Tabla 22. Valores obtenidos para los metales pesados analizados por espectrofotometría de absorción atómica para el sitio de muestreo # 2.	60
Tabla 23. Valores obtenidos para los metales pesados analizados por espectrofotometría de absorción atómica para el sitio de muestreo #3.	61

RESUMEN

En México, la escasez de agua apropiada para riego en la agricultura ha generado la necesidad de usar fuentes alternas de este elemento. Esto ha provocado que varias regiones del país estén siendo afectadas por el uso de aguas residuales que tienen un origen industrial y urbano. Entre estas regiones se encuentra el municipio de Huehuetoca, ubicado en el Estado de México, que se ve afectado por utilizar aguas residuales provenientes de la zona urbana de la ciudad de México y municipios conurbanos. Por lo que este trabajo tiene por objetivo evaluar mediante la prueba de micronúcleos y el índice mitótico, los efectos genotóxico y citotóxico, respectivamente, ocasionados en células meristemáticas de raíz de *Vicia faba*. Para lo anterior se sometieron las raíces de *Vicia faba* a diversos tiempos de exposición (1, 2, 3, y 4 horas) en las muestras de agua colectada y con diferentes tiempos de recuperación en agua destilada (2, 14, 18, 42 y 44 horas). Se pudo observar, que las sustancias químicas presentes en el agua, produjeron micronúcleos en células en interfase a partir del tiempo de menor exposición (1 hora), y manifestándose un incremento de células micronucleadas conforme aumentaba el tiempo de exposición y de recuperación. La evaluación del índice mitótico mostró que desde la primera hora de exposición se tuvo un efecto inhibitor de la división celular, presentándose una disminución de la frecuencia de células mitóticas conforme se incrementaba el tiempo de exposición y de recuperación. De acuerdo con los resultados obtenidos es necesario que este tipo de aguas reciba algún tipo de tratamiento para su uso agrícola, ya que de lo contrario representan un riesgo genético potencial para todos los seres vivos.

1. INTRODUCCIÓN.

La justificación de realizar el presente estudio es que en el municipio de Huehuetoca, Estado de México, se están utilizando para el riego aguas residuales de origen industrial y urbano provenientes del área metropolitana de la ciudad de México y de municipios conurbanos como Naucalpan, Tlalnepantla, Atizapan, Tultitlan, Cuautitlan Izcalli, Cuautitlán, Tepotzotlán y Teoloyucan. Estas aguas residuales no son tratadas por ningún método y se les usa para el riego de diferentes cultivos cuando no es temporada de lluvias. Por comunicación personal con varios agricultores del municipio, se sabe que gran parte de la producción obtenida se destina para el autoconsumo y otra parte se comercializa fuera del municipio, principalmente en las centrales de abasto de Cuautitlán y Tultitlán, incrementando el ingreso de los productores. Aunque existen antecedentes bien documentados que mencionan los efectos dañinos de las aguas residuales a los humanos, los animales, las plantas y al medio ambiente, asimismo existe información obtenida de estudios físicos y químicos que se han efectuado en este tipo de aguas usadas para riego en el municipio, pero no existe ningún tipo de estudio genotóxico que se haya realizado a estas aguas residuales. De aquí la importancia de llevar a cabo una evaluación genotóxica para conocer el daño genético que ocasionan estas aguas a las plantas cultivadas específicamente, siendo este el objetivo principal de este trabajo y de esta manera generar información que ayude a prevenir la pérdida de material genético debido a daños que ocurren a nivel cromosómico y así evitar una disminución en el germoplasma de los cultivos que se producen en el municipio.

En México, la escasez de agua apropiada para el riego en la agricultura, ha generado la necesidad de utilizar fuentes alternas de este elemento vital, aunque en muchos casos están afectadas por desechos industriales y domésticos principalmente. Estas aguas muchas veces no son sometidas a tratamiento alguno para eliminar los residuos químicos, ya sean líquidos, sólidos o gaseosos, incrementando el contenido en el agua de sustancias nocivas y tóxicas, como las sales solubles, los detergentes, los metales pesados, los compuestos corrosivos, los sólidos volátiles, los sólidos sedimentables, las grasas, los aceites y los microorganismos patógenos, todos ellos provocan un impacto negativo en su trayecto y en los lugares receptores (Guerrero, 1997), y además en las plantas cultivadas afectando principalmente su crecimiento, desarrollo y rendimiento (Guerrero, 1997; Palafox, 2003; Rank y Nielsen, 1994). Estas sustancias, también ocasionan graves problemas de salud pública (BGS, 1994; Castro de Esparza, 1997; Saéñz, 1997) y en los animales creando graves alteraciones fisiológicas (Guerrero, 1997; Saéñz, 1997), debido a la falta de tratamiento provocan la contaminación y degradación de los suelos (Knasmüller et al, 1998) y contaminan los recursos hídricos (Moreton, 1999; Rank y Nielsen, 1994).

Cada vez es más común que las aguas residuales utilizadas para riego agrícola, presenten un incremento en la concentración de metales pesados, como consecuencia directa de emplear aguas de baja o nula depuración (Avilés, 2000; Cajuste y Carrillo, 1992; Cala, 1995; Cruz, 1997).

El peligro que pueden presentar los metales pesados, tales como el plomo, cromo, mercurio, arsénico, cadmio, etc., contenidos en las aguas residuales para riego, es que pueden acumularse en los tejidos vegetales (alterando su funcionamiento genético, bioquímico y fisiológico) y entrar a la cadena alimenticia de tal forma que se rebasen

los límites máximos permitidos para preservar la salud de los consumidores (Knasmüller et al, 1998; Majer et al, 2002; Steinkellner et al, 1998).

Diversos autores señalan que en México, existe un alto porcentaje de uso de aguas residuales urbanas e industriales, que no son tratadas y se emplean para el riego agrícola, sobre todo en áreas rurales cercanas a los grandes polos de desarrollo como son las ciudades de Monterrey, Guadalajara, Toluca y la zona metropolitana del Valle de México, entre otros (Arango, 1996; Cuellar, 1988; Guerrero, 1997; Tejeda, 1993).

Específicamente, el Estado de México, tiene varios municipios que presentan diversas regiones agrícolas que se ven afectadas por el uso de aguas residuales de origen urbano e industrial. Uno de estos municipios es el de Huehuetoca ubicado al norte de la ciudad de México (figura 1), que recibe los afluentes de aguas residuales urbanas e industriales provenientes del área metropolitana de la ciudad de México y municipios conurbanos como Tlalnepantla, Naucalpan, Atizapán, Tultitlán, Cuautitlán, Tepotzotlán, Cuautitlán Izcalli, Teoloyucan y Coyotepec. Las aguas son usadas, sin tratamiento convencional alguno, para regar diversos cultivos básicos como maíz, alfalfa, trigo y avena, así como diversas hortalizas que son para el autoconsumo principalmente, y que también, en pequeña escala, se comercializan en las centrales de abasto de Cuautitlán, Tultitlán y de la ciudad de México (López, 1999; comunicación personal de diversos agricultores).

Una de las consecuencias que ocasionan las sustancias químicas (presentes en este tipo de aguas) a los vegetales, es un daño genético, el cual se puede evaluar mediante diversos estudios genotóxicos que permiten hacer una evaluación temprana del daño que manifiestan estas sustancias (Grant, 1994; Grover y Satwinderjeet, 1999;

Ma et al, 1997), efecto que se detecta antes de que se presente a un nivel fisiológico y morfológico en las plantas ya establecidas (Palafox, 2003).

Para realizar el presente trabajo, el estudio seleccionado para identificar el potencial genotóxico de sustancias presentes en el agua, es la llamada prueba de micronúcleos que se encuentra entre los ensayos que detectan alteraciones de estructura cromosómica y es considerada una prueba sencilla, confiable y de alta sensibilidad, para determinar el efecto genotóxico de una sustancia química en agua, suelo y aire, utilizando como bioindicador a las plantas (Evans, 1997; Grover y Satwinderjeet, 1999; Minissi et al, 1997).

Entre las metodologías existentes, la aplicación de biomonitores de toxicidad en plantas vasculares está siendo considerada de manera creciente en grupos de ensayo para el diagnóstico genotóxico. Un sistema de prueba vegetal muy útil para la detección de la actividad genotóxica de contaminantes en agua, lo constituyen las células meristemáticas de la raíz de haba (*Vicia faba* L.) que ofrecen un amplio rango de posibilidades para efectuar análisis genotóxicos (Grant, 1994; Ma et al, 1997; Minissi et al, 1997).

2. OBJETIVO GENERAL.

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

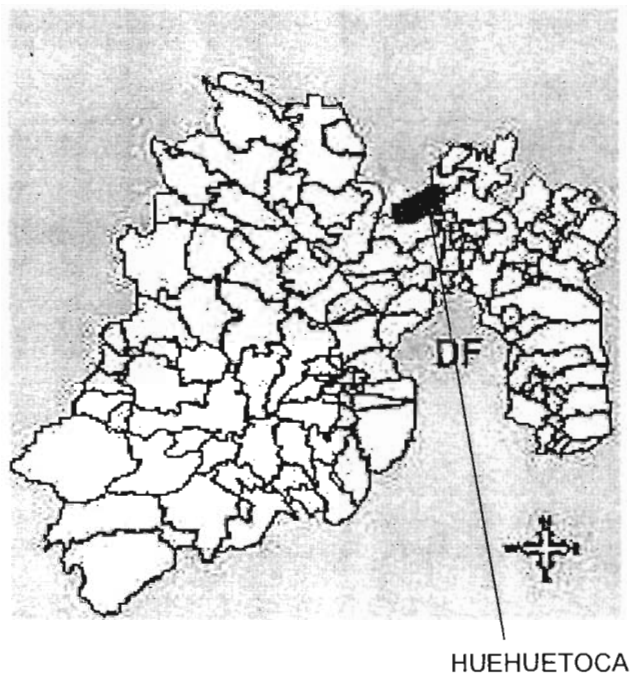
2.1. OBJETIVOS PARTICULARES.

- Cuantificar la concentración de plomo, cadmio y cromo, en las aguas usadas para riego en el municipio de Huehuetoca, Estado de México.
- Evaluar mediante la prueba de micronúcleos, el daño clastogénico, ocasionado por las sustancias presentes en las aguas residuales, en células meristemáticas de raíz de haba (*Vicia faba* L.).
- Determinar si las sustancias presentes en las aguas ocasionan modificaciones en la proliferación de células del meristemo apical de raíz en haba (*Vicia faba* L.).

2.2. HIPÓTESIS.

Las sustancias contaminantes presentes en las aguas residuales que se utilizan para riego en el municipio de Huehuetoca, Estado de México, actúan como agentes clastogénicos induciendo cambios cromosómicos y alterando la división en las células meristemáticas en raíz de haba (*Vicia faba* L.), se observará un aumento en la frecuencia de micronúcleos y una disminución del índice mitótico.

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



3. REVISIÓN DE LITERATURA.

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

La definición de calidad del agua para riego, se refiere a las características particulares del agua que pueden afectar su uso específico, de acuerdo a las necesidades del usuario (Pescod, 1992; Seoáñez y Angulo, 1999). Algunos autores sugieren, que en la calidad del agua para riego es primordial considerar las propiedades físicas, químicas y biológicas que esta presenta (Metcalf y Eddy, 1996; Nakayama y Bucks, 1991; Ramalho, 1996; Seoáñez y Angulo, 1999).

Por otro lado, se considera que para determinar la calidad del agua usada en la agricultura bajo condiciones específicas, es esencial tomar en cuenta las variaciones e interacciones de suelos, plantas, clima y el sistema de riego que se emplea (Pescod, 1992; Tebbutt, 2002).

En la determinación de la calidad del agua para uso agrícola, los criterios usados han sido definidos por el origen, tipo y concentración de contaminantes que existen en ella. En México, las principales fuentes de contaminación del agua, son los desechos provenientes de la actividad industrial y urbana. Los residuos domésticos se componen principalmente de materia orgánica en forma de sólidos, que son originados por la actividad humana diaria y desechados al sistema de alcantarillado. Este tipo de aguas igualmente tiene la peculiaridad de llevar un alto contenido de organismos patógenos que causan enfermedades diversas al ser humano. Asimismo, contienen cantidades significativas de materia inorgánica, siendo característicos los compuestos que provienen de detergentes, así como altas concentraciones de grasas y aceites. Las industrias desechan aguas que presentan sustancias orgánicas e

inorgánicas que constituyen una de las principales fuentes de contaminación de las aguas ya que contienen compuestos tóxicos de diversos tipos. Las industrias que aportan la mayor cantidad de contaminantes a las aguas son: la industria del aluminio, automotriz, conservas y enlatados, lácteos, fertilizantes, vidrio, cemento y concreto, asbestos, química, curtiduría, alimenticia, metales, petroquímica, plásticos, papel, termoeléctrica, acero y textil (Avilés, 2000; Cajuste y Carrillo, 1992).

La Norma Oficial Mexicana NOM-001-ECOL-1996 se publicó en el Diario Oficial de la Federación, con el objeto de proteger la calidad del agua y posibilitar sus usos, en dicha norma se prohíbe el riego con aguas residuales parcialmente tratadas o sin ningún tratamiento en hortalizas, huertos, o frutas. De igual manera esta prohibido el riego de viñedos en los que el fruto yace sobre el suelo, además, no se permite el pastoreo de vacas y cabras lecheras sobre terrenos húmedos irrigados con aguas residuales y se les debe mantener alejadas de los canales de riego que conduzcan estas aguas. Aún en aquellos casos en los que, los productos obtenidos de áreas irrigadas con dichas aguas se les cocine antes de su consumo, el riego tiene que suspenderse por lo menos un mes antes de la cosecha.

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

La necesidad del agua sobre todo en regiones áridas y semiáridas es mayor que en aquellas áreas en donde el temporal es regular y se cuenta con fuentes de abasto para riego cuando los cultivos requieren del agua. Se sabe que los agricultores han recurrido al uso de aguas residuales domésticas e industriales, pues no cuentan con fuentes

alternativas de mejor calidad. Los agricultores aplican este tipo de aguas con gran frecuencia en las áreas ya mencionadas (Tejeda, 1993).

En México, esta práctica comenzó desde inicios del siglo XX, en el Valle del Mezquital, Hidalgo, en donde inicialmente se aprovechaba un volumen muy elevado que provenía principalmente del gran canal de desagüe, el cual aún en la actualidad conduce las aguas residuales provenientes de la ciudad de México y municipios conurbanos. En el Valle del Mezquital, el aprovechamiento de estas aguas se destina al riego de varios cultivos, pero desafortunadamente el uso de las aguas se lleva a cabo sin que haya un tratamiento previo y se les utiliza en toda el área regable. En la zona citada, antes de que se aprovechara esta clase de aguas existían suelos infértiles y por consiguiente su productividad era baja, con la introducción del riego usando dichas aguas aumentaron su espesor y productividad (Arango, 1996; SARH, 1994; Tejeda, 1993). Posteriormente esta actividad se extendió a otras regiones del país, llevándose a cabo sin ningún tipo de tratamiento y con tecnologías inadecuadas de riego, lo cual ocasiono que en algunas regiones del país se hayan presentado problemas de salud y ambientales (Arango, 1996; SARH, 1994; Tejeda, 1993).

En lo que respecta a la superficie total regada con aguas residuales, Arango (1996), indica que en el año de 1995 la superficie agrícola regada con aguas residuales era de 314 000 hectáreas en trece estados y los principales cultivos en los que se utilizaban eran maíz, frijol, trigo, alfalfa, sorgo, algodón, hortalizas, cítricos y frutales.

3.3. Clasificación de las aguas residuales según su origen.

Debido a las múltiples actividades que el ser humano desempeña y la gran

diversidad de usos que ello implica, esto ha provocado que se tengan altos volúmenes en las descargas de aguas que llevan diferentes tipos de contaminantes.

Las aguas residuales pueden ser agrupadas de acuerdo a su procedencia según Palacios (2002), dependiendo del origen de éstas y se les clasifica de la siguiente forma:

- a) **Domésticas o urbanas.** Son aguas que provienen de viviendas y contienen excrementos humanos, restos de comida y papel. Estos desperdicios se generan al realizar el ser humano sus actividades cotidianas, creándose así aguas que se componen principalmente de materia orgánica en forma de sólidos, evacuados a través del sistema de drenaje. Este tipo de aguas se caracterizan además, por su contenido de organismos patógenos provenientes del tracto intestinal humano, entre los que se pueden mencionar los siguientes: coliformes fecales, estreptococos, huevecillos de nemátodos y quistes amibianos, estas aguas llevan con ellas el peligro potencial de causar enfermedades gastrointestinales a todo ser humano que entre en contacto con ellas. También contienen cantidades significativas de sustancias inorgánicas que provienen del uso de productos de limpieza en el hogar, los centros comerciales, las casas habitación y las calles, siendo típicos los compuestos que forman los detergentes y altas concentraciones de grasas y aceites.
- b) **Industriales.** Las aguas residuales provenientes de la industria tienen la peculiaridad de llevar una extensa variedad de sustancias tóxicas y metales pesados, estos componentes van en suspensión en las aguas y disueltos. Lo mencionado anteriormente le da características al agua que condiciona su uso, así mismo determinan el impacto que tienen en el ambiente cuando se dispone

de ellas. El tipo de industria y su tamaño influyen en el grado y tipo de contaminantes que se generan, siendo las principales y que por supuesto aportan la mayor cantidad de aguas residuales: la industria del aluminio, automotriz, azucarera, vitivinícola, conservas y enlatados, lácteos, fertilizantes, vidrio, cemento y concreto, asbestos, química, curtiduría, metales, petróleo, plásticos, papel, termoeléctrica, acero y textil.

- c) **Agrícolas.** Son aguas que se han usado en los campos que no fueron absorbidas por los cultivos ni filtradas o retenidas por el suelo, llevando con ellas altos contenidos de nutrientes y plaguicidas. Estas aguas, al llevar nutrientes que fueron aplicados con los fertilizantes provocan la aceleración de los procesos de eutrofización cuando llegan a los cuerpos de agua, asimismo son contaminantes de la flora y la fauna.
- d) **Municipales.** En esta categoría de aguas se incluyen las domésticas y las industriales, partiendo de que la mezcla es muy compleja su tratamiento es más complicado que los otros tipos, debido a que normalmente el tratamiento de las aguas de procedencia doméstica difiere al de las industriales y en ocasiones pueden antagonizar.

3.4.Criterios y normas de calidad de las aguas residuales.

En el siglo pasado al final de la década de los sesentas, se comenzaron estudios acerca del uso de las aguas residuales para uso agrícola, estos aún se llevan a cabo en la actualidad. Los estudios realizados han servido para el establecimiento de criterios que rigen la aplicación de aguas residuales en la agricultura y en estos se determinó en que cultivos era factible su uso sin que representara un peligro a las

plantas, animales o humanos. Así se tiene que desde el año de 1970, la Secretaría de Recursos Hidráulicos, a través de la Comisión Hidrológica de la Cuenca del Valle de México, propuso un reglamento para el riego de cultivos con aguas residuales, que fue publicado en el Diario Oficial de la Federación en el mes de marzo de 1973. Dicho reglamento se basa en los criterios de que pueden regarse con aguas residuales sedimentadas, cultivos como el maíz, frijol, trigo, cebada, remolacha, coliflor, espárragos, papa, calabaza, chayote, soya, cártamo y ajonjolí. En lo que concierne a los árboles frutales como cítricos, plátano, nogal, aguacate, mango y membrillo se permite su uso siempre y cuando el riego se suspenda por lo menos un mes antes de la cosecha. En flores y plantas ornamentales de invernadero se recomienda el riego con dichas aguas. El reglamento indica que las aguas residuales pueden usarse en cultivos forrajeros para alimentación del ganado lechero, como alfalfa, pastos, avena y sorgo, siendo obligatoria la pasteurización de la leche. Por el contrario, se excluye a cultivos destinados a la producción de semilla y también a los cultivos que a continuación se mencionan apio, ajo, berro, cilantro, col, espinacas, jitomate, lechuga, perejil y zanahoria (SARH, 1994).

En la actualidad, existen normas que establecen de manera clara y precisa la calidad que deben tener los diferentes tipos de aguas que se utilizan para el riego. En la tabla 1, se presentan los límites máximos permisibles de diversos parámetros que deben tener las aguas residuales para que se puedan utilizar para riego agrícola, según la Norma Oficial Mexicana NOM-001-ECOL-1996, que se publicó el 24 de diciembre de 1996 en El Diario Oficial de la Federación, se indica que los contaminantes básicos son aquellos compuestos que pueden ser eliminados o estabilizados a través de procesos convencionales. En lo que atañe a contaminantes

patógenos y parasitarios la Norma Oficial Mexicana considera a los microorganismos, quistes y huevos de parásitos que pueden estar presentes en las aguas residuales y que representan un riesgo a la salud humana, la flora o la fauna. Igualmente corresponde a esta Norma establecer un límite a los coliformes fecales, los que son medidos como NMP (número más probable) o UFC (unidades formadoras de colonias), ambos medidos en un volumen de 100 ml y los huevos de helminto medidos como h/l (huevos por litro). En lo referente a metales pesados, la Norma Oficial indica que aquellos elementos que se encuentren en concentraciones por encima de determinados límites, pueden producir efectos negativos en la salud humana, la flora o la fauna y sólo considera a los siguientes metales: arsénico, cadmio, cobre, cromo, mercurio, níquel, plomo y zinc.

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

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

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

3.5.1. Efecto en el suelo.

La aplicación de aguas residuales en un suelo origina en éste una serie de alteraciones que pueden ser benéficas en ciertas condiciones. Muchos de los constituyentes del agua residual son compuestos que pueden mejorar la fertilidad, ya que son elementos y nutrientes que los cultivos requieren, de igual manera la calidad de la textura se puede mejorar con la adición de materia orgánica (SARH, 1994). Por el contrario, se presentan situaciones en las que el vertido puede ser contraproducente por la toxicidad de ciertas sustancias presentes en el agua, por ejemplo con la aplicación de las aguas mencionadas se puede producir un aumento en el contenido en sales y metales pesados en el suelo, dependiendo de la concentración y tipo de éstos, aunque existen otros factores como la frecuencia del riego, la textura, el pH del suelo y la intensidad del riego que también se ven afectados por el uso de aguas residuales (Cruz, 1997; Durán y Hernández, 1998).

Es necesario saber la composición química y física de las aguas que se van a utilizar para el riego, asimismo conocer la capacidad y tipo de suelo para asimilar e incorporar en forma de fracción insoluble y no asimilable aquellos compuestos que se conoce puedan afectar cultivos, los suelos y al ser humano (Cruz, 1997; Durán y Hernández, 1998).

En lo que respecta al exceso de materia orgánica, ésta afecta debido al crecimiento desmedido de organismos quienes demandan altas cantidades de oxígeno para su degradación llevando a un abatimiento del oxígeno en el suelo y un efecto

nocivo en el desarrollo de la planta. La alta concentración de sólidos que van suspendidos en las aguas residuales disminuye la aireación tapando los poros, dificultando la infiltración del agua y con ello el desarrollo de las plantas, así mismo las grasas y aceites debido a la película que producen en la superficie del suelo crean un efecto similar (SARH, 1994).

3.5.2. Efecto en las plantas cultivadas.

El alto contenido de materia orgánica y elementos nutritivos presentes en las aguas residuales, se ha reportado que benefician a los cultivos pues aumentan el rendimiento que se obtiene, sin embargo se tienen datos en donde ocurre lo contrario como es el caso de los cultivos de alfalfa, jitomate y frijol. Específicamente en alfalfa, se ha observado disminución en el número de cortes que se le dan, y dicha disminución se atribuye a la presencia de espuma de detergentes, también se sabe que la salinidad aumenta en el suelo y ésta a su vez limita el establecimiento de algunos cultivos que son sensibles a las sales, de igual manera las sustancias tóxicas afectan su desarrollo y rendimiento (Durán y Hernández, 1998).

El uso frecuente y prolongado del riego con aguas residuales, satura el suelo presentándose condiciones anaeróbicas que limitan los procesos de oxidación, cuando se presentan estas condiciones se producen sustancias tóxicas y las raíces se asfixian provocando marchites en las plantas (Palacios, 2002). Además de lo anterior, condiciones anaeróbicas también causan fermentaciones y se liberan sustancias como el etileno que influye negativamente sobre la germinación y crecimiento de raíces (Avilés, 2000; Durán y Hernández, 1998).

A pesar de las ventajas que las aguas residuales tienen en las plantas, también presentan desventajas y en años recientes debido a la industrialización principalmente

el volumen de descarga se ha incrementado, modificando la composición física, química y biológica de las aguas residuales en los últimos años, deteriorando aún mas la calidad por la carga de sustancias toxicas que llevan los canales, esto se debe a que dichas industrias descargan sus desechos al drenaje y contaminan las aguas con gran cantidad de compuestos tóxicos (Durán y Hernández, 1998).

3.6. Contaminación del agua por metales pesados.

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

El uso del termino metal pesado, esta dado en función de la toxicidad para los sistemas biológicos y se aplica a aquellos elementos no esenciales como Pb, Cd, Hg, As y U, metales considerados tóxicos y contaminantes (Alloway, 1993).

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

La concentración de los metales pesados en el agua residual se relaciona con la procedencia de estas, así tenemos que las aguas domésticas tienen baja concentración, en contraste con la concentración alta de aquellas que provienen de industrias y de éstas últimas hay algunas que desechan mayor cantidad de metales que otras (Avilés, 2000; Cajuste y Carrillo, 1992; Durán y Hernández, 1998).

El riesgo que pueden manifestar los metales pesados tales como el plomo, cromo, mercurio, arsénico y cadmio, contenidos en las aguas residuales para riego, es que éstos se pueden acumular en los tejidos vegetales y alterar el funcionamiento genético, bioquímico y fisiológico. La entrada de dichos elementos a la cadena alimenticia se propicia por su acumulación y se puede rebasar los límites máximos permitidos para preservar la salud de los consumidores (Knasmüller *et al*, 1998; Majer *et al*, 2002; Steinkellner *et al*, 1998).

3.6.1. Generalidades de los metales pesados.

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

Plomo (Pb).

El plomo es miembro del grupo IVB en la tabla periódica de los elementos, presenta dos estados de oxidación estables Pb^{2+} y Pb^{4+} , su color en estado natural es gris-azul, tiene una densidad de $11.39g/cm^3$, un punto de fusión de $327\text{ }^{\circ}C$ y un punto de ebullición de $1744\text{ }^{\circ}C$ (García, 1993). Se le encuentra en forma natural en la corteza terrestre y su extracción es a partir de la galena (PbS), la cerusita ($PbCO_3$) y la anglesita ($PbSO_4$), tiene fuerte afinidad con el azufre y se le puede encontrar en rocas ígneas como el granito ($18\mu g/g$), metamórficas ($20\mu g/g$) y en menor cantidad en rocas

ígneas basálticas ($6\mu\text{g/g}$). Se le conoce desde la antigüedad, sin embargo no se sabe quien fue su descubridor ni la fecha, el plomo es un metal blando fácil de cortar y darle forma, estas propiedades además de sus puntos de fusión y ebullición facilitan su empleo en la industria.

El uso del plomo se ha incrementado en los últimos 30 años, siendo las industrias que más lo usan la automotriz en la gasolina y en la producción de baterías (Davies, 1993), también se le usa extensamente en la alfarería, en la fabricación de pinturas, como estabilizador de PVC y en la de tintes para el cabello. La actividad de la minería para extraer el metal es la más peligrosa por el desprendimiento de partículas presentes en el aire $200\text{-}300\ \mu\text{g cm}^{-3}$, (Flores, 2003).

Cromo (Cr).

Este metal forma parte del grupo IVB en la tabla periódica bloque -D de transición. Su nombre viene del griego "croma" que significa color, llamado así por los muchos compuestos coloreados por el cromo que se conocen, se le descubrió por primera vez en Francia por Louis Nicholas Vauquelin a partir de lo que en el siglo XVIII llamaban plomo rojo (PbCrO_4), en forma natural se le encuentra en cromita (FeOCr_2O_3), también se le encuentra en rocas ultrabásicas como la dunita, peridotita y serpentinita $3400\ \mu\text{g kg}^{-1}$, en menor concentración se le encuentra en rocas ígneas del tipo de las graníticas $4\ \mu\text{g kg}^{-1}$. El cromo tiene un punto de fusión a los $1907\ ^\circ\text{C}$ y un punto de ebullición a los $2671\ ^\circ\text{C}$ (Alloway, 1993). Las formas iónicas del cromo son Cr^{2+} , Cr^{3+} , Cr^{6+} , de estas las más importantes por su interacción con los sistemas biológicos son Cr^{3+} y Cr^{6+} , siendo Cr^{6+} el más tóxico para los seres vivos (Armienta *et al.*, 2001, Sainz *et al.*, 2004).

Al cromo se le usa en la industria para proteger metales revistiéndolos, también se le usa en la decoración, la metalurgia en aleaciones, materiales fotográficos, fabricación de pinturas, cemento y colorantes (Flores, 2003).

Cadmio (Cd).

Descubierto en Alemania en el año de 1817 por Friedrich Strohmeyer, ubicado en el grupo IIB en la tabla periódica de los elementos. Se le extrajo por primera vez a partir de una impureza en muestras de carbonato de zinc, su punto de fusión es 321.07 °C y el de ebullición 767 °C. Su asociación geoquímica con el zinc es muy cercana, dándoles a ambos un potencial de ionización de +2. El cadmio es un metal blanquiazul, fácil de cortar con navaja, no tiene ninguna función biológica esencial, es muy tóxico para las plantas y animales. Las industrias han incrementado su uso en años recientes y se le usa en aleación con otros metales, el plateado y el chapado protector en el acero. Otras industrias lo usan en pigmentos para plástico y esmaltes, en la estabilización de plásticos y en la fabricación de baterías secas junto con el níquel. Aún más, en la producción de fertilizantes fosfatados, que pueden ser una de las principales fuentes de contaminación por cadmio en el suelo, las plantas y animales, el uso de fertilizantes de roca fosfórica con alto contenido de cadmio debería evitarse, deteniendo con esta práctica la contaminación por cadmio (Alloway, 1993). Otra forma importante de contaminación son los aerosoles que llegan directamente a la planta cuando se precipita. Además de los anteriores, las minas y fabricas que manejan el zinc son otra fuente importante de contaminación por su fuerte asociación con el cadmio (Flores, 2003).

3.6.2. Efectos tóxicos de los metales pesados en las plantas.

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

- a) La concentración en el agua.
- b) La especie vegetal.
- c) La periodicidad de aplicación de riegos con aguas contaminadas.
- d) Tipo de riego.

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

Plomo (Pb).

La literatura disponible acerca del impacto del Pb^{2+} en el medio ambiente, demuestra que las plantas son susceptibles a este metal, su acumulación en la planta y sus efectos varían dependiendo de la especie, su concentración y la composición de nutrientes en el suelo. La severidad de sus efectos es atenuada por el contenido de materia orgánica, minerales, sales fosfatadas y el potasio. Pero cuando alcanza niveles tóxicos afecta varios procesos en la planta a nivel fisiológico y bioquímico, lo anterior debido a que el metal reacciona con grupos funcionales importantes como las macromoléculas afectando la actividad enzimática en la fotosíntesis y el metabolismo del nitrógeno (Singh *et al*, 1997). Los efectos visibles de toxicidad en las plantas por este metal, han sido reportados como hojas color verde oscuro, escaso follaje y raíces pequeñas (Pendias y Pendias, 1992), por otro lado así mismo se ha encontrado que este metal actúa a nivel genético inhibiendo la función de enzimas que reparan el DNA (Stenkeillner *et al*, 1998).

Cromo (Cr).

La toxicidad en las plantas depende de su movilidad en el suelo, como se menciono anteriormente la forma Cr^{6+} es la más tóxica debido a la movilidad que tiene, su solubilidad e ingreso a las plantas a partir de las formas CrO_4^- y HCrO_4^- , que interfieren en varios procesos metabólicos, limitando el crecimiento de las raíces y la planta, además de la acción que ejerce a nivel bioquímico disminuyendo la producción de proteínas (Vajpayee et al, 1999), también se sabe que la toxicidad del cromo produce efectos específicos a nivel celular, ya que pueden existir interacciones entre el metal y los sistemas enzimáticos, membranas celulares, organelos y sobre el metabolismo celular en general (Melo et al, 2003). En lo que respecta a síntomas visibles de toxicidad por cromo, se reporta clorosis en hojas nuevas, necrosis de tejidos y daños en el desarrollo de raíces (Pendias y Pendias, 1992), además reduce el tamaño de las plántulas (Armienta et al, 2001; Gardea et al, 2004).

Este metal, también disminuye el índice mitótico e induce aberraciones cromosómicas formando micronúcleos (Zhang y Xiao, 1998) y se ha determinado que el Cr^{6+} puede ser transportado a través de la membrana celular ejerciendo su genotoxicidad directamente por su poder oxidante e indirectamente al sufrir una reducción a Cr^{3+} el cual es viable e interactúa con el material genético (De Marco et al, 1988).

Cadmio (Cd).

El cuidado que se ha puesto en el estudio de este elemento, parte del daño que provoca acumulándose en los mamíferos, remplazando enzimas, destruyendo eritrocitos, daño testicular y la contaminación con bajos niveles crónicos altera las funciones respiratoria, gástrica e intestinal. (Flores, 2003).

En las plantas, los síntomas de toxicidad son fáciles de identificar y los más comunes son clorosis e impedimento. La clorosis por exceso de cadmio parece ser debido a una interacción directa con el hierro foliar (Das et al, 1997) y dicha clorosis es debida a una reducción en el contenido de clorofila, además de que ocurre marchitez, en ocasiones necrosis, raíces oscuras y cortas (Marcano et al, 1999) Se reporta así mismo en otro estudio hecho con maíz que el cadmio indujo clorosis en las hojas debido a cambios en la proporción de Fe:Zn (Das et al, 1997). También se ha establecido que el efecto tóxico del cadmio se refleja en un bloqueo del crecimiento en las raíces y tallos de varias especies (Chakravarty y Srivastava, 1992). En otros trabajos de investigación, pareció inducir deficiencias de manganeso o la reducción del transporte de este nutriente (Das et al, 1997), así mismo, se reportaron resultados en experimentos llevados a cabo en varios países y diversos tipos de suelos que la exposición de cultivos al cadmio produjo coloración café en los bordes y las hojas, clorosis, una severa reducción del crecimiento de las raíces, enrojecimiento de las nervaduras y enrizado de las hojas (Pendias y Pendias, 1992).

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

3.7. División celular en células meristemáticas.

La división celular en células meristemáticas es llamada mitosis, la cual es un fenómeno en donde el material genético se divide en partes iguales entre las células hijas. Este proceso es sólo la parte final de un cambio subyacente que ha ocurrido en el

plano bioquímico macromolecular en las restantes etapas del ciclo celular, particularmente en la etapa S (Griffiths et al, 2000).

En los vegetales, la mitosis ocurre en tejidos específicos como son los meristemos que se encuentran en los ápices de la raíz, el tallo y en el cambium vascular (Curtis, 1986), para su estudio se divide en cinco fases denominadas: profase, prometafase, metafase, anafase y telofase. La profase habitualmente es la más larga, seguida de la telofase, mientras que la metafase y anafase son etapas cortas y rápidas. La prometafase es de muy breve duración (Griffiths et al, 2000; Klug y Cummings, 1999).

La profase (figura 2) comienza cuando los cromosomas aparecen como delicados filamentos extendidos dentro de la esfera nuclear (Griffiths et al, 2000). Cada cromosoma está compuesto por dos filamentos denominados cromátidas, que se encuentran asociados estrechamente a todo lo largo, a medida que la profase avanza, ambas cromátidas van acortándose y engrosándose unidas por el centrómero (Gardner et al, 1999). Con el aumento en espesor de los cromosomas, la región del centrómero se hace más acentuada hasta llegar a aparecer como una constricción. A medida que avanza la profase, los cromosomas tienden a acercarse al borde del núcleo, mientras simultáneamente a estos fenómenos la membrana nuclear y el nucléolo se van disgregando (Klug y Cummings, 1999). Durante la profase tiene lugar la formación del huso mitótico, que se forma fuera de la envoltura nuclear. Esta etapa termina con la disgregación de la membrana nuclear (Gardner et al, 1999; Griffiths et al, 2000; Klug y Cummings, 1999).

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

La metafase (figura 3) comienza cuando los cromosomas alcanzan el plano ecuatorial y se disponen irregularmente ocupando toda la superficie del ecuador y se "enganchan" a las fibras del huso mitótico, a través de su centrómero (Gardner et al, 1999; Griffiths et al, 2000; Klug y Cummings, 1999).

En la anafase (figura 4), se lleva a cabo la separación de las cromátidas en cada cromosoma dirigiéndose hacia los polos opuestos de la célula, a estos se les denomina cromosomas hijos (Gardner et al, 1999; Griffiths et al, 2000; Klug y Cummings, 1999).

La telofase es la etapa final de la mitosis (figura 5), comienza con el final de la migración de los cromosomas hacia los polos, en donde empiezan a desenrollarse y se hacen cada vez menos condensados y se agrupan finalmente en masas de cromatina rodeados de segmentos discontinuos de envoltura nuclear que finalmente se fusionan para formar la envoltura nuclear completa y la célula se divide. Al final de la telofase reaparecen los nucléolos a partir de los organizadores nucleolares localizados en las constricciones secundarias de los satélites de los cromosomas.

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

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

FASES DE LA MITOSIS EN CÉLULAS MERISTEMÁTICAS DE RAÍZ DE

Vicia faba



Figura 2. Profase



Figura 3. Metafase



Figura 4. Anafase



Figura 5. Telofase

3.8. Importancia de la evaluación genotóxica.

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

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

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

Muchos trabajos han demostrado que la realización de bioensayos utilizando como sistemas de prueba a los vegetales, dan excelentes resultados como bioindicadores para evaluar el daño genético ocasionado por diversos tipos de agentes. Entre las plantas que más se emplean como sistema de prueba está la cebolla (*Allium cepa* L.), tradescantia (*Tradescantia sp.*) y el haba (*Vicia faba* L.), estas especies se han usado por más de 60 años en diferentes tipos de investigaciones (Fiskesjo, 1993; Kanaya et al, 1994; Rank y Nielsen, 1994). Su empleo inicial fue para el estudio de los efectos mutagénicos ocasionado por las radiaciones iónicas y las sustancias químicas, así mismo han demostrado que son excelentes indicadores para evaluar la mutagenicidad

y clastogenicidad de contaminantes ambientales pues son muy sensitivas a la presencia de éstos (Duan et al, 1999). Todo esto, unido con la simplicidad para realizar dichos ensayos y su bajo costo, los hacen una prueba de ensayo confiable y recomendable para un constante monitoreo ambiental, ya que constituyen una primera alerta de riesgo a la presencia de agentes mutágenos en el agua, aire y suelo, elementos que son esenciales para la vida (Gopalan, 1999; Knasmüller et al, 1998; Miao et al, 1999; Steinkellner et al, 1998)

3.9. Definición e importancia de la prueba de micronúcleos.

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

La prueba de micronúcleos está desarrollada con base a las rupturas de fibras que se producen en el DNA dejando cromosomas incompletos o por los rompimientos en las fibras del huso mitótico rezagando a los cromosomas (Cotelle et al, 1999; Evans, 1997; Grover y Satwinderjeet, 1999; Ji et al, 1999).

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

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

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

Esta prueba permite estudiar y evaluar el efecto mutagénico en diversos sistemas biológicos, como en linfocitos humanos (Fenech y Crott, 2002; Müller y Rode, 2002), en células de hámster chino (Frieauff et al, 1998; Liu et al, 1998), en eritrocitos policromáticos de ratones (Ashby y Tinwell, 2001), en ratas (Robbiano et al, 1998; Trosic et al, 2002), en peces (Ateeq et al, 2002; Campana et al, 1999). Los bioensayos vegetales son extensamente usados para estudiar los efectos mutagénicos ocasionados por agentes físicos y químicos desde los inicios de los años treinta del siglo XX (Duan et al, 1999). Con el aumento del conocimiento sobre genotoxicidad de diferentes agentes en agua, aire y suelo, se han establecido varios sistemas vegetales para detectar el daño genético por contaminantes ambientales, usando células meristemáticas de raíz en *Allium cepa* (Grover y Satwinderjeet, 1999; Rank y Nielsen, 1994), *Tradescantia sp.* (Cotelle et al, 1999; Rodríguez et al, 1998; Majer et al, 2002), *Hordeum vulgare* (Joutchev et al, 2002; Zhang y Xiao, 1998), y *Vicia faba* (Duan et al, 1999; Kanaya et al, 1994; Ma et al, 1995; Miao et al, 1999).

La prueba de micronúcleos empleando células meristemáticas de raíz de haba (*Vicia faba* L.) como sistema biológico de detección, es de gran utilidad para mostrar y medir el potencial genotóxico de diversos agentes contaminantes presentes en el ambiente y se le usa ampliamente en diferentes condiciones, ya sea in vitro e in situ (Ji et al, 1999; Ma et al, 1995). Por ejemplo, este bioensayo ha servido para determinar los

efectos clastogénicos de una gran variedad de compuestos químicos presentes en aguas residuales (Duan et al, 1999; Knasmüller et al, 1998; Miao et al, 1999; Minissi y Lombi, 1997; Steinkellner et al, 1998; Yang, 1999).

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

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

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

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

Un sistema de prueba vegetal muy útil para detectar actividad genotóxica son las células meristemáticas de raíz de haba (*Vicia faba* L.), este sistema ofrece ventajas por ser barato, de fácil manejo, de fácil adquisición y no requiere equipo sofisticado ni condiciones estériles. Los meristemas de su raíz contienen células en diversas etapas de la mitosis y poseen un ciclo celular corto. En el caso particular de las células meristemáticas de raíz de haba (*Vicia faba* L.) tienen un ciclo celular con una duración total de 19.3 horas a una temperatura de 19 °C, aproximadamente, en donde la mitosis

tiene una duración de dos horas, y la interfase se divide en los períodos G1 con 4.9 horas, S con 7.5 horas y G2 con 4.9 horas (figura 6) (Curtis, 1986). El número ($2n = 12$) y tamaño de cromosomas facilitan su observación al microscopio, dándole al haba características que la hacen un material excelente para observar daños citogenéticos producidos por agentes tóxicos (Grant, 1994). Por otra parte, las células meristemáticas presentan una fracción metabólica llamada S10, que es capaz de transformar compuestos promutágenos en mutágenos, característica importante ya que muchos agentes químicos que no son mutágenos por si mismos, requieren del metabolismo animal o vegetal para activarse y provocar daños al DNA (Gómez y Villalobos, 1997).

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

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

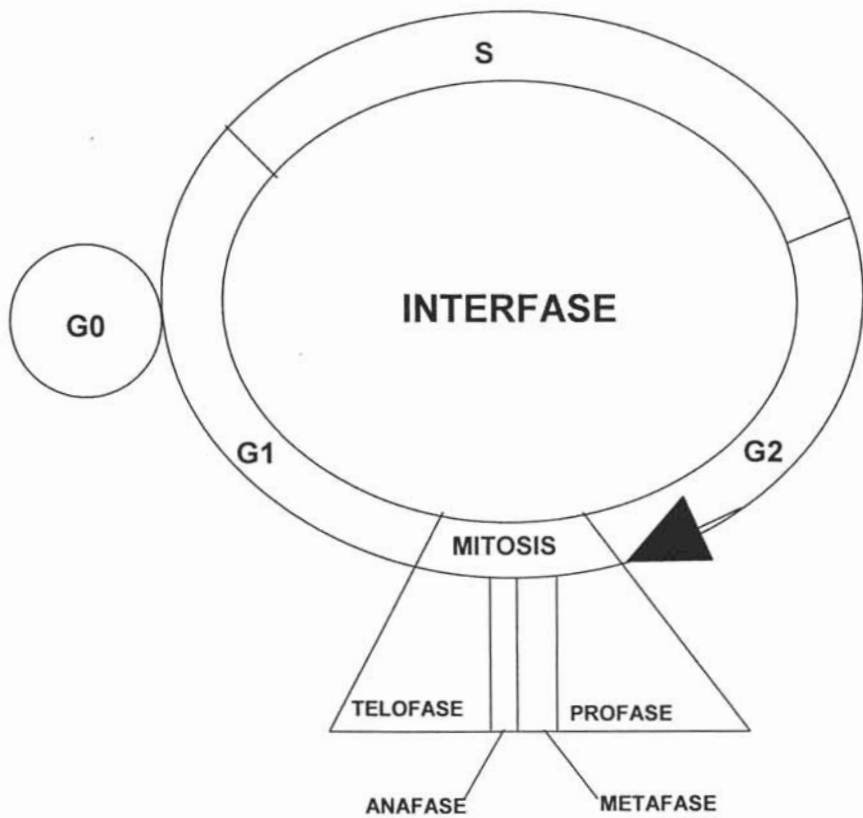


Figura 6. Ciclo celular en células meristemáticas de *Vicia faba*

4. MATERIALES Y MÉTODOS.

4.1. Ubicación de los sitios de muestreo.

En el municipio de Huehuetoca, Estado de México, se realizó el muestreo de agua en tres sitios diferentes y cada uno correspondió a un canal de riego, los cuales pasan próximos a las tierras de cultivo y son afluentes del canal llamado "río Cuautitlán", que cruza de sur a norte por la cabecera municipal conduciendo las aguas residuales provenientes del área metropolitana de la ciudad de México con destino al estado de Hidalgo. La ubicación de los sitios de muestreo es al suroeste de la cabecera municipal, aproximadamente a una distancia de 2 Km. El sitio de muestreo 1, tiene una distancia con respecto al sitio 2 de 600 m aproximadamente, y la distancia del sitio 2 al sitio 3 es de 300 m (figura 7). La zona donde se efectuó el muestreo tiene clima templado subhúmedo con lluvias en el verano, la temperatura media anual es de 15.4 grados centígrados, la máxima es de 23.8 grados centígrados y la mínima extrema es de 6.9 grados centígrados. Los meses de lluvia son de junio a septiembre y la precipitación pluvial es de 627.8 mm. La zona está compuesta por suelos altamente orgánicos como el aluvial y el toba. La vegetación se caracteriza por árboles de pirul, sauce, sauce llorón, eucalipto, casuarina y huisache (IGECM, 2003; López, 1999).

4.2. Metodología para el muestreo del agua.

Los muestreos se efectuaron a finales del mes de noviembre de 2004, cuando no hay lluvias en esa región y los diferentes cultivos son regados con las aguas residuales. Siguiendo el método de muestreo indicado por la American Public Health Association

(APHA) (1996), y mencionado en la Norma Oficial Mexicana NOM-001-ECOL-1996, las muestras se tomaron directamente de los canales de riego. El muestreo fue de tipo simple colectándose 5 litros de agua en cada muestra, de los cuales 1 litro se destino para la determinación de metales pesados y los otros 4 litros se emplearon en los diferentes tratamientos de genotoxicidad que se evaluaron. La colecta del agua se realizo a la mitad de profundidad del canal, más o menos, para tener un mínimo de turbulencia, evitando con esto una mayor acumulación de partículas en suspensión como materia coloidal, arcillas, limos y gránulos de sílice. El agua se almacenó en recipientes de plástico de polietileno que fueron colocados en una hielera, a una temperatura de 4 °C, aproximadamente. La toma de muestras se realizó el mismo día en un solo punto en cada sitio de muestreo, aproximadamente entre las 7 y 8 de la mañana, hora en que la temperatura del agua es baja y así evitar una mayor velocidad de las reacciones químicas que se llevan a cabo entre las sustancias presentes en el agua. Las muestras inmediatamente se trasladaron a las instalaciones de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.

4.3. Sitio de la experimentación.

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

La determinación de metales pesados se realizó en el laboratorio central universitario del Departamento de Suelos de la Universidad Autónoma Chapingo, empleando un espectrofotómetro de absorción atómica Perkin-Elmer modelo 460, utilizando el método de emisión a la flama.

4.4. Material Biológico.

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

4.5. Metodología.

Las semillas de haba se desinfectaron, primeramente lavándolas con agua de la llave y posteriormente en 400 ml de agua destilada se agregaron 50 ml de cloro y 10 gotas de Tween 20 y se agitaron durante 20 minutos. A continuación las semillas se dejaron remojando en un recipiente con agua destilada durante 24 horas, a temperatura ambiente y en la oscuridad, con la finalidad de que las semillas absorbieran la mayor cantidad de agua y acelerar la germinación. Enseguida, las semillas se sembraron en cajas de plástico utilizando como sustrato vermiculita para tener una germinación uniforme y evitar la contaminación por hongos, se usó este sustrato por ser inerte, estéril y tener la propiedad de proporcionar humedad a la semilla (Kanaya et al, 1994; Minissi et al, 1998).

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

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

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

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

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

Las preparaciones se realizaron, primeramente, cortando los ápices de la raíz a una longitud aproximada de 2 mm. Se lavaron con agua corriente e inmediatamente se fijaron en una solución de etanol-ácido acético (Sigma) en proporción 3:1, durante 24 horas. A continuación, los ápices se lavaron con agua corriente, se colocaron en un vidrio de reloj y se les agregó unas gotas de HCl (Sigma) 5N para que se hidrolizaran durante 10 minutos. Posteriormente se les retiró el ácido, se volvieron a lavar con agua corriente y se les añadió unas gotas del colorante de "aceto-orceína*" donde se dejaron durante 10 minutos. Seguidamente, los ápices fueron colocados sobre portaobjetos a los cuales previamente se les colocó una gota de ácido acético (Sigma) al 45%. Rápidamente se colocó el cubreobjetos y se efectuó una presión con la goma de un lápiz. A continuación se observaron las preparaciones al microscopio con el objetivo 40X.

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

4.6. Diseño experimental.

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar, con un total de 16 tratamientos y 5 repeticiones por tratamiento teniéndose un total de 80 unidades experimentales. Cada unidad experimental consistió de una preparación que contiene las células meristemáticas de raíz de haba. Los parámetros evaluados fueron la frecuencia de micronúcleos e índice mitótico.

4.7. Análisis Estadístico.

Se utilizó el programa estadístico INSTAT2 versión 2.03. Para evaluar la frecuencia de micronúcleos e índice mitótico se efectuó primeramente un análisis de varianza con la finalidad de determinar la significancia estadística entre los tratamientos evaluados y a continuación se compararon los tratamientos por medio de la prueba de significación de Tukey-Kramer. Se manejó un nivel de probabilidad de error de 0.05 y 0.01 para establecer niveles significativos de confiabilidad tanto en el análisis de varianza como en la prueba de Tukey-Kramer.

4.8. Análisis Citogenético.

Para la determinación de la frecuencia de micronúcleos e índice mitótico, por cada repetición se contaron 1000 células, resultando un total de 5000 células por

tratamiento, contando el número de células que presentaran micronúcleos o alguna fase mitótica.

4.9. Criterios para seleccionar células micronucleadas.

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

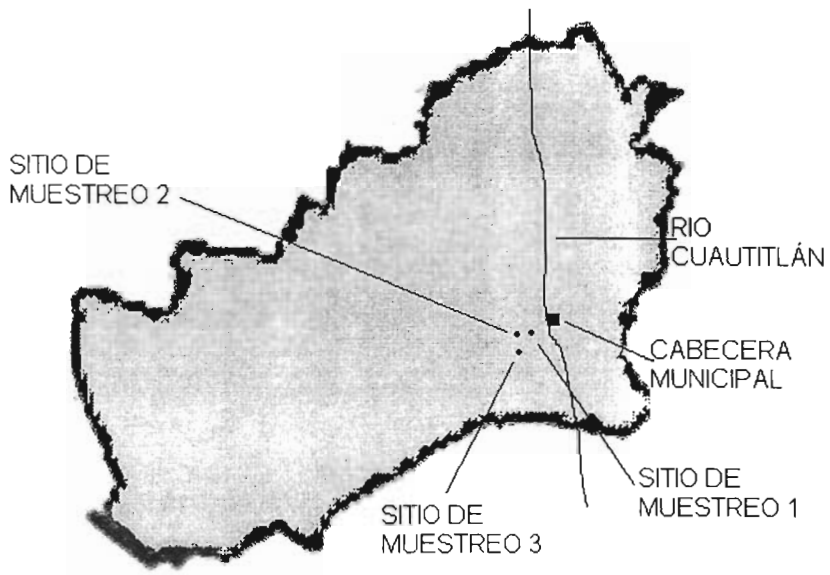


Figura 7. Ubicación de los sitios de muestreo en el municipio de Huehuetoca.

5. RESULTADOS.

Los efectos producidos en los cromosomas de las células meristemáticas del ápice de raíz de *Vicia faba*, se evaluaron mediante el análisis de la frecuencia de micronúcleos que se presentaron en células en interfase (figura 8), y el índice mitótico (figuras 9, 10 11 y 12). Para esto se realizó el análisis estadístico de los resultados obtenidos, efectuando primeramente el análisis de varianza para la frecuencia de micronúcleos e índice mitótico para determinar el grado de significancia entre los tratamientos evaluados, presentándose una diferencia estadística entre los tratamientos para la frecuencia de micronúcleos (tabla 2), y en los tratamientos de la frecuencia del índice mitótico no se presentó una diferencia estadística (tabla 3).

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

En la tabla 4 se muestran las frecuencias de micronúcleos producidas en los diferentes tiempos de exposición y de recuperación para los tres sitios de muestreo. Se puede observar que, en los tres sitios, los micronúcleos aparecen a partir de la primera hora de exposición. En general se presenta que al aumentar el tiempo de exposición se incrementa el número de células micronucleadas. También se manifiesta que en los tratamientos de 4 horas de exposición, y conforme aumenta el tiempo de recuperación, crece el promedio de micronúcleos presentes.

Al aplicar la prueba de Tukey-Kramer, en los tratamientos de cada sitio de muestreo (tablas 5, 6 y 7), se observa que existe una diferencia estadística altamente

significativa entre los tratamientos de 4 horas de exposición con 42 y 44 horas de recuperación con respecto a los tratamientos de 1, 2 y 3 horas de exposición, y 4 horas con 2 horas de recuperación. También, se puede observar que, en general, para los tratamientos de 4 horas de exposición con 14, 18, 42 y 44 horas de recuperación no existió una diferencia estadística. Todo lo anterior indica que las células meristemáticas de *Vicia faba* necesitan de períodos largos para recuperarse y así manifestar en su máxima potencialidad el daño ocasionado por diversos agentes mutágenos.

Comparando cada uno de los tratamientos en los tres sitios de muestreo (tablas 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, y 15) se obtuvo que no hay diferencia estadística para ningún tratamiento, esto indica que la presencia de micronúcleos no está determinada por el lugar donde se muestreo, sino que la concentración presente de agentes contaminantes en esos sitios debe ser muy similar.

En la tabla 16, se muestran los valores obtenidos de los testigos o controles negativos de cada tratamiento. Comparando los tratamientos con sus respectivos testigos, se presentó una diferencia estadística altamente significativa (tabla 17) lo que indica presencia de sustancias mutágenas en las aguas residuales evaluadas, y que son muy estimulantes para inducir daños en la estructura de los cromosomas de *Vicia faba*.

En el caso del índice mitótico, los valores obtenidos de los tres sitios de muestreo se presentan en la (tabla 18), observándose que a mayor tiempo de exposición es menor el índice mitótico, sin que éste se inhiba totalmente. Para los tratamientos de 4 horas de exposición y sus respectivos tiempos de recuperación, se obtuvo que conforme aumenta el tiempo de recuperación disminuye el número de células mitóticas. Como se mencionó anteriormente el análisis de varianza mostró que no existe una

diferencia estadística entre los tratamientos del índice mitótico, debido a lo cual no pudo llevar a cabo la prueba de Tukey-Kramer. Estos resultados indican que independientemente del lugar muestreado, la cantidad de sustancias contaminantes debe ser muy similar para influir negativamente en la división de las células de *Vicia faba*.

En la (tabla 19), se presentan los valores obtenidos de los testigos de cada tratamiento. Con respecto a la comparación de los tratamientos con sus respectivos testigos o controles negativos, se obtuvo una diferencia estadística altamente significativa (tabla 20), debido a que todos los tratamientos presentaron un promedio muy bajo de células mitóticas en comparación con los testigos que tuvieron promedios muy altos de células en división, lo cual indica que los agentes contaminantes presentes en los diferentes tratamientos si inhiben la división celular, a través de diferentes mecanismos.

Los resultados de los análisis de los metales pesados se observan en las tablas 21, 22 y 23, en donde se puede apreciar que, para los tres sitios de muestreo, en el caso del plomo no se detectó ninguna concentración, y para los otros elementos cromo y cadmio los valores obtenidos no exceden al valor máximo permisible de la Norma Oficial Mexicana NOM-001-ECOL-1996 (tabla 1), por lo cual, supuestamente, los cultivos que se producen en los lugares donde se muestreo, no están de forma permanente expuestos a un elevado índice de toxicidad por estos elementos.

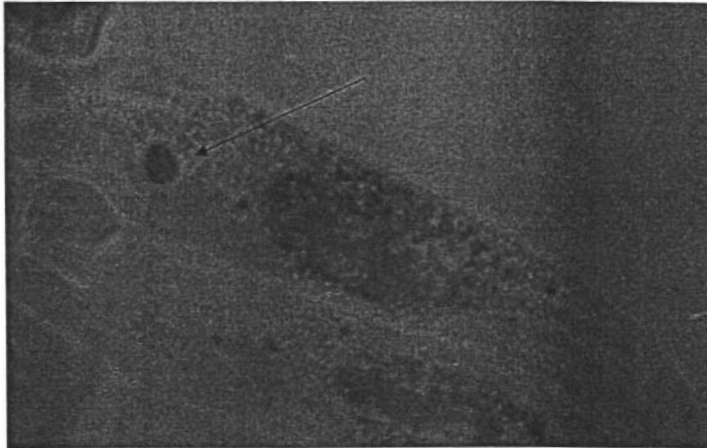
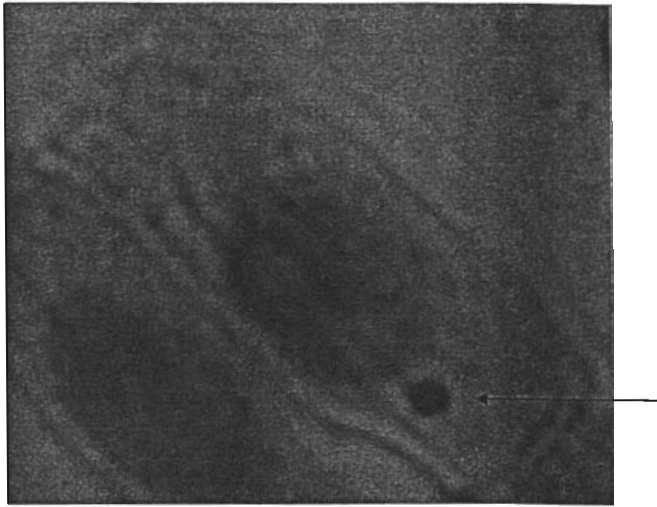


Figura 8. Células meristemáticas de *Vicia faba* observadas en interfase con presencia de micronúcleos

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

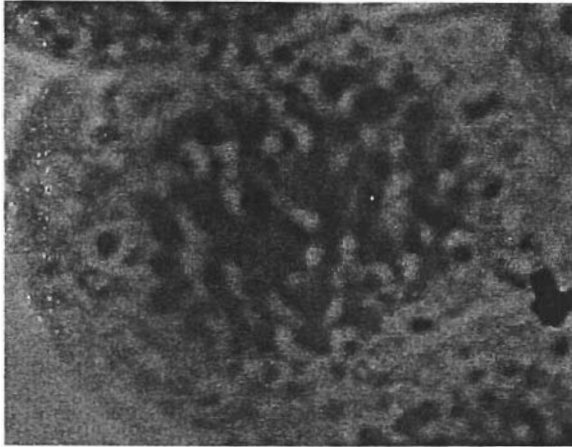


Figura 9. Profase

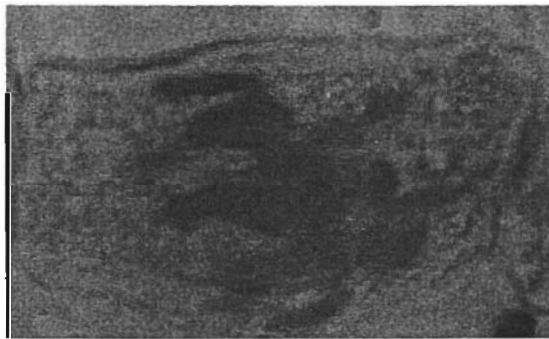


Figura 10. Metafase

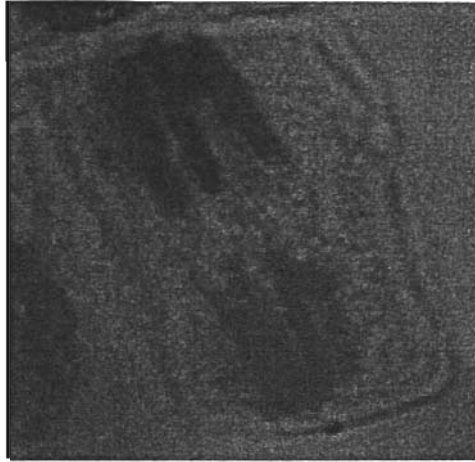


Figura 11. Anafase

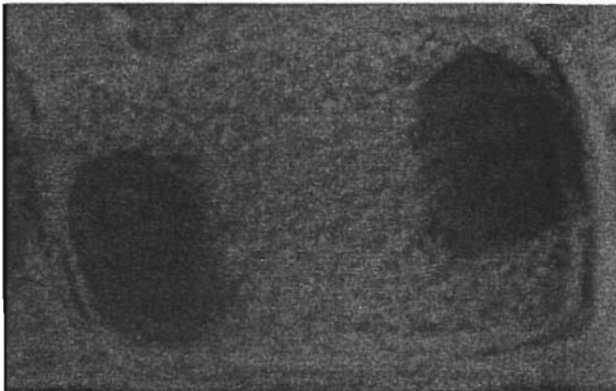


Figura 12. Telofase

Tabla 2. Análisis de varianza para la frecuencia de micronúcleos.

fuentes de variación	grados de libertad	suma de cuadrados	cuadrado medio
tratamientos	23	2044.3	88.881
Error	96	326.4	3.400
Total	119	2370.7	

f = 26.142

Tabla 3. Análisis de varianza para la frecuencia del índice mitótico.

fuentes de variación	grados de libertad	suma de cuadrados	cuadrado medio
tratamientos	23	44358	1928.6
Error	97	134436	1385.9
Total	120	178794	

f = 1.392

Tabla 4. Frecuencia de micronúcleos en los tratamientos evaluados para los 3 sitios de muestreo.

sitio de muestreo	tiempo de exposición (horas)	tiempo de recuperación (horas)	total de células micronucleadas	promedio	desviación estándar
1	1	0	7	1.4	1.14
2	1	0	12	2.4	2.07
3	1	0	8	1.6	1.51
1	2	0	36	7.2	1.92
2	2	0	36	7.2	1.92
3	2	0	32	6.4	2.07
1	3	0	40	8.0	3.16
2	3	0	39	7.8	1.30
3	3	0	39	7.8	1.30
1	4	2	48	9.6	2.60
2	4	2	45	9.0	1.58
3	4	2	48	9.6	1.94
1	4	14	54	10.8	2.38
2	4	14	58	11.6	1.14
3	4	14	50	10.0	1.58
1	4	18	68	13.6	1.81
2	4	18	56	11.2	1.78
3	4	18	60	12.0	1.58
1	4	42	75	15.0	1.58
2	4	42	78	15.6	1.81
3	4	42	68	13.6	1.81
1	4	44	70	14.0	2.55
2	4	44	74	14.8	1.92
3	4	44	79	15.8	0.83

Tabla 5. Prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer para los tratamientos de la frecuencia de micronúcleos en el sitio de muestreo # 1.

Comparación		diferencia estadística	probabilidad
tratamiento	vs tratamiento		
1 hora	2 horas	**	0.01
1 hora	3 horas	**	0.01
1 hora	4 horas 2 ^R	**	0.01
1 hora	4 horas 14 ^R	**	0.01
1 hora	4 horas 18 ^R	**	0.01
1 hora	4 horas 42 ^R	**	0.01
1 hora	4 horas 44 ^R	**	0.01
2 horas	3 horas	n s	0.05
2 horas	4 horas 2 ^R	n s	0.05
2 horas	4 horas 14 ^R	**	0.01
2 horas	4 horas 18 ^R	**	0.01
2 horas	4 horas 42 ^R	**	0.01
2 horas	4 horas 44 ^R	**	0.01
3 horas	4 horas 2 ^R	n s	0.05
3 horas	4 horas 14 ^R	n s	0.05
3 horas	4 horas 18 ^R	**	0.01
3 horas	4 horas 42 ^R	**	0.01
3 horas	4 horas 44 ^R	**	0.01
4 horas 2 ^R	4 horas 14 ^R	n s	0.05
4 horas 2 ^R	4 horas 18 ^R	n s	0.05
4 horas 2 ^R	4 horas 42 ^R	**	0.01
4 horas 2 ^R	4 horas 44 ^R	*	0.05
4 horas 14 ^R	4 horas 18 ^R	n s	0.05
4 horas 14 ^R	4 horas 42 ^R	n s	0.05
4 horas 14 ^R	4 horas 44 ^R	n s	0.05
4 horas 18 ^R	4 horas 42 ^R	n s	0.05
4 horas 18 ^R	4 horas 44 ^R	n s	0.05
4 horas 42 ^R	4 horas 44 ^R	n s	0.05

Claves: 2^R = 2 horas de recuperación

14^R = 14 horas de recuperación

18^R = 18 horas de recuperación

42^R = 42 horas de recuperación

44^R = 44 horas de recuperación

n s = no existe diferencia estadística

* = diferencia estadística
significativa

** = diferencia estadística
altamente significativa

Tabla 6. Prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer para los tratamientos de la frecuencia de micronúcleos en el sitio de muestreo # 2.

Comparación		diferencia estadística	probabilidad
tratamiento	vs tratamiento		
1 hora	2 horas	*	0.05
1 hora	3 horas	**	0.01
1 hora	4 horas 2 ^R	**	0.01
1 hora	4 horas 14 ^R	**	0.01
1 hora	4 horas 18 ^R	**	0.01
1 hora	4 horas 42 ^R	**	0.01
1 hora	4 horas 44 ^R	**	0.01
2 horas	3 horas	n s	0.05
2 horas	4 horas 2 ^R	n s	0.05
2 horas	4 horas 14 ^R	*	0.05
2 horas	4 horas 18 ^R	n s	0.05
2 horas	4 horas 42 ^R	**	0.01
2 horas	4 horas 44 ^R	**	0.01
3 horas	4 horas 2 ^R	n s	0.05
3 horas	4 horas 14 ^R	n s	0.05
3 horas	4 horas 18 ^R	n s	0.05
3 horas	4 horas 42 ^R	**	0.01
3 horas	4 horas 44 ^R	**	0.01
4 horas 2 ^R	4 horas 14 ^R	n s	0.05
4 horas 2 ^R	4 horas 18 ^R	n s	0.05
4 horas 2 ^R	4 horas 42 ^R	**	0.01
4 horas 2 ^R	4 horas 44 ^R	**	0.01
4 horas 14 ^R	4 horas 18 ^R	ns	0.05
4 horas 14 ^R	4 horas 42 ^R	n s	0.05
4 horas 14 ^R	4 horas 44 ^R	n s	0.05
4 horas 18 ^R	4 horas 42 ^R	*	0.05
4 horas 18 ^R	4 horas 44 ^R	n s	0.05
4 horas 42 ^R	4 horas 44 ^R	n s	0.05

Claves: 2^R = 2 horas de recuperación
14^R = 14 horas de recuperación
18^R = 18 horas de recuperación
42^R = 42 horas de recuperación
44^R = 44 horas de recuperación

n s = no existe diferencia estadística
* = diferencia estadística significativa
** = diferencia estadística altamente significativa

Tabla 7. Prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer para los tratamientos de la frecuencia de micronúcleos en el sitio de muestreo # 3.

Comparación		diferencia estadística	probabilidad
tratamiento	vs tratamiento		
1 hora	2 horas	*	0.05
1 hora	3 horas	**	0.01
1 hora	4 horas 2 ^R	**	0.01
1 hora	4 horas 14 ^R	**	0.01
1 hora	4 horas 18 ^R	**	0.01
1 hora	4 horas 42 ^R	**	0.01
1 hora	4 horas 44 ^R	**	0.01
2 horas	3 horas	n s	0.05
2 horas	4 horas 2 ^R	n s	0.05
2 horas	4 horas 14 ^R	n s	0.05
2 horas	4 horas 18 ^R	**	0.05
2 horas	4 horas 42 ^R	**	0.01
2 horas	4 horas 44 ^R	**	0.01
3 horas	4 horas 2 ^R	n s	0.05
3 horas	4 horas 14 ^R	n s	0.05
3 horas	4 horas 18 ^R	n s	0.05
3 horas	4 horas 42 ^R	**	0.01
3 horas	4 horas 44 ^R	**	0.01
4 horas 2 ^R	4 horas 14 ^R	n s	0.05
4 horas 2 ^R	4 horas 18 ^R	n s	0.05
4 horas 2 ^R	4 horas 42 ^R	n s	0.05
4 horas 2 ^R	4 horas 44 ^R	**	0.01
4 horas 14 ^R	4 horas 18 ^R	n s	0.05
4 horas 14 ^R	4 horas 42 ^R	n s	0.05
4 horas 14 ^R	4 horas 44 ^R	**	0.01
4 horas 18 ^R	4 horas 42 ^R	n s	0.05
4 horas 18 ^R	4 horas 44 ^R	n s	0.05
4 horas 42 ^R	4 horas 44 ^R	n s	0.05

Claves: 2^R = 2 horas de recuperación

14^R = 14 horas de recuperación

18^R = 18 horas de recuperación

42^R = 42 horas de recuperación

44^R = 44 horas de recuperación

n s = no existe diferencia estadística

* = diferencia estadística significativa

** = diferencia estadística altamente significativa

Tabla 8. Prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer para la frecuencia de micronúcleos con el tratamiento de 1 hora de exposición para los 3 sitios de muestreo.

Comparación			diferencia estadística	probabilidad
tratamiento	vs	tratamiento		
1 hora (1M)		1 hora (2M)	n s	0.05
1 hora (1M)		1 hora (3M)	n s	0.05
1 hora (2M)		1 hora (3M)	n s	0.05

Claves: 1M = Sitio de muestreo # 1

2M = Sitio de muestreo # 2

3M = Sitio de muestreo # 3

n s = No existe diferencia estadística

Tabla 9. Prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer para la frecuencia de micronúcleos con el tratamiento de 2 horas de exposición para los 3 sitios de muestreo.

Comparación			diferencia estadística	probabilidad
tratamiento	vs	tratamiento		
2 horas (1M)		2 horas (2M)	n s	0.05
2 horas (1M)		2 horas (3M)	n s	0.05
2 horas (2M)		2 horas (3M)	n s	0.05

Claves: 1M = Sitio de muestreo # 1

2M = Sitio de muestreo # 2

3M = Sitio de muestreo # 3

n s = No existe diferencia estadística

Tabla 10. Prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer para la frecuencia de micronúcleos con el tratamiento de 3 horas de exposición para los 3 sitios de muestreo.

Comparación			diferencia estadística	probabilidad
tratamiento	vs	tratamiento		
3 horas (1M)		3 horas (2M)	n s	0.05
3 horas (1M)		3 horas (3M)	n s	0.05
3 horas (2M)		3 horas (3M)	n s	0.05

Claves: 1M = Sitio de muestreo # 1 3M = Sitio de muestreo # 3
 2M = Sitio de muestreo # 2 n s = No existe diferencia estadística

Tabla 11. Prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer para la frecuencia de micronúcleos con el tratamiento de 4 horas de exposición y 2 horas de recuperación para los 3 sitios de muestreo.

Comparación			diferencia estadística	probabilidad
tratamiento	vs	tratamiento		
4 horas 2 ^R (1M)		4 horas 2 ^R (2M)	n s	0.05
4 horas 2 ^R (1M)		4 horas 2 ^R (3M)	n s	0.05
4 horas 2 ^R (2M)		4 horas 2 ^R (3M)	n s	0.05

Claves: 1M = Sitio de muestreo # 1 n s = No existe diferencia estadística
 2M = Sitio de muestreo # 2 2^R = 2 horas de recuperación
 3M = Sitio de muestreo # 3

Tabla 12. Prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer para la frecuencia de micronúcleos con el tratamiento de 4 horas de exposición y 14 horas de recuperación para los 3 sitios de muestreo.

Comparación			diferencia estadística	probabilidad
tratamiento	vs	tratamiento		
4 horas 14 ^R (1M)		4 horas 14 ^R (2M)	n s	0.05
4 horas 14 ^R (1M)		4 horas 14 ^R (3M)	n s	0.05
4 horas 14 ^R (2M)		4 horas 14 ^R (3M)	n s	0.05

Claves: 1M = Sitio de muestreo # 1 n s = No existe diferencia estadística
 2M = Sitio de muestreo # 2 14^R = 14 horas de recuperación
 3M = Sitio de muestreo # 3

Tabla 13. Prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer para la frecuencia de micronúcleos con el tratamiento de 4 horas de exposición y 18 horas de recuperación para los 3 sitios de muestreo.

Comparación			diferencia estadística	probabilidad
tratamiento	vs	tratamiento		
4 horas 18 ^R (1M)		4 horas 18 ^R (2M)	n s	0.05
4 horas 18 ^R (1M)		4 horas 18 ^R (3M)	n s	0.05
4 horas 18 ^R (2M)		4 horas 18 ^R (3M)	n s	0.05

Claves: 1M = Sitio de muestreo # 1 n s = No existe diferencia estadística
 2M = Sitio de muestreo # 2 18^R = 18 horas de recuperación
 3M = Sitio de muestreo # 3

Tabla 14. Prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer para la frecuencia de micronúcleos con el tratamiento de 4 horas de exposición y 42 horas de recuperación para los 3 sitios de muestreo.

Comparación			diferencia estadística	probabilidad
tratamiento	vs	tratamiento		
4 horas 42 ^R (1M)		4 horas 42 ^R (2M)	n s	0.05
4 horas 42 ^R (1M)		4 horas 42 ^R (3M)	n s	0.05
4 horas 42 ^R (2M)		4 horas 42 ^R (3M)	n s	0.05

Claves: 1M = Sitio de muestreo # 1 n s = No existe diferencia estadística
 2M = Sitio de muestreo # 2 42^R = 42 horas de recuperación
 3M = Sitio de muestreo # 3

Tabla 15. Prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer para la frecuencia de micronúcleos con el tratamiento de 4 horas de exposición y 44 horas de recuperación para los 3 sitios de muestreo.

comparación			Diferencia estadística	probabilidad
tratamiento	vs	tratamiento		
4 horas 44 ^R (1M)		4 horas 44 ^R (2M)	n s	0.05
4 horas 44 ^R (1M)		4 horas 44 ^R (3M)	n s	0.05
4 horas 44 ^R (2M)		4 horas 44 ^R (3M)	n s	0.05

Claves: 1M = Sitio de muestreo # 1 n s = No existe diferencia estadística
 2M = Sitio de muestreo # 2 44^R = 44 horas de recuperación
 3M = Sitio de muestreo # 3

Tabla 16. Valores obtenidos en los testigos de cada tratamiento evaluado para la frecuencia de micronúcleos.

testigo	total de células micronucleadas	promedio	desviación estándar
1 hora	1	0.2	0.44
2 horas	0	0.0	0.22
3 horas	2	0.4	0.54
4 horas 2 ^R	1	0.2	0.44
4 horas 14 ^R	0	0.0	0.22
4 horas 18 ^R	2	0.4	0.54
4 horas 42 ^R	3	0.6	0.54
4 horas 44 ^R	1	0.2	0.44

Claves: 2^R = 2 horas de recuperación

14^R = 14 horas de recuperación

18^R = 18 horas de recuperación

42^R = 42 horas de recuperación

44^R = 44 horas de recuperación

Tabla 17. Prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer para los tratamientos con sus respectivos testigos para la frecuencia de micronúcleos.

comparación (promedios)		testigo	diferencia estadística	probabilidad
tratamiento	vs			
1 hora 1M (1.4)		0.2	**	0.01
1 hora 2M (2.4)		0.2	**	0.01
1 hora 3M (1.6)		0.2	**	0.01
2 horas 1M (7.2)		0.0	**	0.01
2 horas 2M (7.2)		0.0	**	0.01
2 horas 3M (6.4)		0.0	**	0.01
3 horas 1M (8.0)		0.4	**	0.01
3 horas 2M (7.8)		0.4	**	0.01
3 horas 3M (7.8)		0.4	**	0.01
4 horas 2 ^R 1M (9.6)		0.2	**	0.01
4 horas 2 ^R 2M (9.0)		0.2	**	0.01
4 horas 2 ^R 3M (9.6)		0.2	**	0.01
4 horas 14 ^R 1M (10.8)		0.0	**	0.01
4 horas 14 ^R 2M (11.6)		0.0	**	0.01
4 horas 14 ^R 3M (10.0)		0.0	**	0.01
4 horas 18 ^R 1M (13.6)		0.4	**	0.01
4 horas 18 ^R 2M (11.2)		0.4	**	0.01
4 horas 18 ^R 3M (12.0)		0.4	**	0.01
4 horas 42 ^R 1M (15.0)		0.6	**	0.01
4 horas 42 ^R 2M (15.6)		0.6	**	0.01
4 horas 42 ^R 3M (13.6)		0.6	**	0.01
4 horas 44 ^R 1M (14.0)		0.2	**	0.01
4 horas 44 ^R 2M (14.8)		0.2	**	0.01
4 horas 44 ^R 3M (15.8)		0.2	**	0.01

Claves: 2^R = 2 horas de recuperación

14^R = 14 horas de recuperación

18^R = 18 horas de recuperación

42^R = 42 horas de recuperación

44^R = 44 horas de recuperación

** = diferencia estadística altamente significativa

1M = sitio de muestreo # 1

2M = sitio de muestreo # 2

3M = sitio de muestreo # 3

Tabla 18. Frecuencia del índice mitótico en los tratamientos evaluados para los 3 sitios de muestreo.

sitio de muestreo	tiempo de exposición (horas)	tiempo de recuperación (horas)	total de células en alguna fase mitótica	promedio	desviación estándar
1	1	0	625	125.0	19.15
2	1	0	533	106.6	27.12
3	1	0	541	108.2	15.80
1	2	0	483	96.6	15.79
2	2	0	495	99.0	14.69
3	2	0	496	99.2	11.45
1	3	0	449	89.8	12.43
2	3	0	475	95.0	7.81
3	3	0	468	93.6	11.61
1	4	2	429	85.8	3.96
2	4	2	433	86.6	4.03
3	4	2	426	85.2	4.97
1	4	14	425	85.0	6.36
2	4	14	421	84.2	4.97
3	4	14	423	84.6	4.03
1	4	18	415	83.0	6.36
2	4	18	412	82.4	5.45
3	4	18	409	81.8	3.96
1	4	42	394	78.8	3.96
2	4	42	402	80.4	6.18
3	4	42	403	80.6	5.72
1	4	44	396	79.2	5.80
2	4	44	393	78.6	4.15
3	4	44	398	79.6	2.70

Tabla 19. Valores obtenidos en los testigos de cada tratamiento evaluado para la frecuencia del índice mitótico.

Testigo	total de células micronucleadas	promedio	desviación estándar
1 hora	940	188.0	28.55
2 horas	897	179.4	25.12
3 horas	950	190.0	29.41
4 horas 2 ^R	867	173.4	16.85
4 horas 14 ^R	911	182.2	25.60
4 horas 18 ^R	924	184.8	26.03
4 horas 42 ^R	940	188.0	28.55
4 horas 44 ^R	948	189.6	29.02

Claves: 2^R = 2 horas de recuperación

14^R = 14 horas de recuperación

18^R = 18 horas de recuperación

42^R = 42 horas de recuperación

44^R = 44 horas de recuperación

Tabla 20. Prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer para los tratamientos con sus respectivos testigos para la frecuencia del índice mitótico.

comparación (promedios)		diferencia	probabilidad
tratamiento	vs testigo	estadística	
1 hora 1M (125.0)	188.0	**	0.01
1 hora 2M (106.6)	188.0	**	0.01
1 hora 3M (108.2)	188.0	**	0.01
2 horas 1M (96.6)	179.4	**	0.01
2 horas 2M (99.0)	179.4	**	0.01
2 horas 3M (99.2)	179.4	**	0.01
3 horas 1M (89.8)	190.0	**	0.01
3 horas 2M (95.0)	190.0	**	0.01
3 horas 3M (93.6)	190.0	**	0.01
4 horas 2 ^R 1M (85.8)	173.4	**	0.01
4 horas 2 ^R 2M (86.6)	173.4	**	0.01
4 horas 2 ^R 3M (85.2)	173.4	**	0.01
4 horas 14 ^R 1M (85.0)	182.2	**	0.01
4 horas 14 ^R 2M (84.2)	182.2	**	0.01
4 horas 14 ^R 3M (84.6)	182.2	**	0.01
4 horas 18 ^R 1M (83.0)	184.8	**	0.01
4 horas 18 ^R 2M (82.4)	184.8	**	0.01
4 horas 18 ^R 3M (81.8)	184.8	**	0.01
4 horas 42 ^R 1M (78.8)	188.0	**	0.01
4 horas 42 ^R 2M (80.4)	188.0	**	0.01
4 horas 42 ^R 3M (80.6)	188.0	**	0.01
4 horas 44 ^R 1M (79.2)	189.6	**	0.01
4 horas 44 ^R 2M (78.6)	189.6	**	0.01
4 horas 44 ^R 3M (79.6)	189.6	**	0.01

Claves: 2^R = 2 horas de recuperación

14^R = 14 horas de recuperación

18^R = 18 horas de recuperación

42^R = 42 horas de recuperación

44^R = 44 horas de recuperación

1M = sitio de muestreo # 1

2M = sitio de muestreo # 2

3M = sitio de muestreo # 3

** = diferencia estadística
altamente significativa

Tabla 21. Valores obtenidos para los metales pesados analizados por espectrofotometría de absorción atómica para el sitio de muestreo # 1.

elemento	resultado (mg/l)
Plomo	no detectado
Cromo hexavalente	0.02
Cadmio	0.02

Tabla 22. Valores obtenidos para los metales pesados analizados por espectrofotometría de absorción atómica para el sitio de muestreo # 2.

elemento	resultado (mg/l)
Plomo	no detectado
cromo hexavalente	0.02
Cadmio	0.02

Tabla 23. Valores obtenidos para los metales pesados analizados por espectrofotometría de absorción atómica para el sitio de muestreo #3.

elemento	resultado (mg/l)
Plomo	no detectado
chromo hexavalente	0.03
Cadmio	0.01

6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

Los resultados obtenidos en este trabajo confirman el daño genético ocasionado por los agentes químicos presentes en las aguas residuales provenientes del área metropolitana de la ciudad de México y municipios conurbanos, y que son usadas para el riego agrícola en el municipio de Huehuetoca, Estado de México. Esto coincide con los reportes de diversos autores (Duan et al, 1999; Grover y Satwinderjeet, 1999; Ji et al, 1999; Jiang et al, 1999; Miao et al, 1999; Ruiz et al, 1992; Steinkellner et al, 1999; Yang et al, 1999), quienes utilizando diferentes sistemas vegetales, establecen un efecto genotóxico de aguas residuales provenientes de actividades domésticas, industriales, minería y de plantas químicas, debido a que inducen una elevada presencia de micronúcleos.

En el presente estudio se registraron micronúcleos en células en interfase porque es la etapa del ciclo celular en donde generalmente se manifiestan, ya que en esta etapa los micronúcleos son la expresión de los fragmentos acéntricos (Evans, 1997; Miao et al, 1999) y de cromosomas retardados (Cotelle et al, 1999; Ji et al, 1999) que fueron excluidos de los núcleos hijos durante la división celular debido a disturbios en el huso mitótico.

Se aplicaron tratamientos cortos de 1, 2 y 3 horas de exposición, así como de 4 horas con diferentes tiempos de recuperación para poder evaluar el efecto que producen las sustancias tóxicas de las aguas residuales en las diversas etapas del ciclo celular.

En todos los tratamientos, para los tres sitios de muestreo, se manifestó una relación directa entre la presencia de micronúcleos con el tiempo de exposición y recuperación de las células de *Vicia faba*, es decir, que conforme aumentaban los tiempos se incrementó la presencia de células micronucleadas.

Para los tratamientos de 1, 2 y 3 horas de exposición, así como para el de 4 horas con 2 horas de recuperación, se sugiere que el daño fue ocasionado porque existen sustancias químicas, en estas aguas, que pertenecen al grupo de agentes cuyos efectos no requieren de la síntesis de DNA para ser expresados como aberraciones, es decir, tienen un efecto S-independiente, que inducen directamente roturas en la cadena del DNA, e inducen aberraciones a partir de la reparación incorrecta o no-reparación de las roturas, lo que indica que los efectos de estas sustancias dependen del estado del ciclo celular en el cual se encuentran las células sobre las que actúan (Kihlman et al, 1978), ya que si las aberraciones se inducen en células que se encuentran en las fases S y G2, del ciclo celular, se tendrán micronúcleos de origen cromatídico, mientras que los micronúcleos de origen cromosómico se forman en células que estén en la fase G1 del ciclo celular. Los micronúcleos, también se pueden originar en la mitosis existente durante el tratamiento, ya que los contaminantes pueden inhibir la formación de las fibras del huso mitótico (Kanaya et al, 1994; Grover y Satwinderjeet, 1999), debido a que los micronúcleos pueden ser inducidos por compuestos que ocasionan disturbios en el proceso metabólico básico a nivel celular sobretodo por desórdenes en la síntesis de proteínas, como es el caso de la tubulina que es la proteína que forma los

microtubulos de las fibras del huso mitótico (De Marco et al, 1988; Samborska, 1987).

Por otra parte, en los resultados obtenidos con los tratamientos de 4 horas de exposición con 14, 18, 42 y 44 horas de recuperación, se encontró una relación entre la producción de micronúcleos y el tiempo de recuperación en las células de *Vicia faba*, aspecto que coincide con otros trabajos realizados (De Marco et al, 1986; Gustavino et al, 1987). La presencia de micronúcleos en estos tratamientos, se estima que se debió a que en estas aguas también, se presentan sustancias que tienen un efecto S-dependiente que no inducen directamente roturas sobre el DNA, y se considera que los micronúcleos se forman a partir de la interacción de lesiones secundarias producidas durante la replicación del DNA dañado, es decir, las lesiones sobre los cromosomas sucedieron en cualquier fase del ciclo celular y para su manifestación se requirió de la síntesis de DNA para que estas lesiones se transformen en aberraciones, las cuales únicamente son de tipo cromatídico, además que la aparición de las mismas son de efecto retardado (De Marco et al, 1986; González y López, 1982). La presencia de cromosomas retardados indica que los compuestos presentes tienen una acción directa e inmediata sobre el centrómero en todas las fases del ciclo celular produciendo cromosomas con el centrómero inactivado (Chauhan et al, 1986), así como provocando una ruptura del mismo en un plano perpendicular al normal (Nicoloff y Gecheff, 1976). Estos cromosomas retardados quedan fuera de la cinética normal del anafase y pueden formar micronúcleos en células en interfase.

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

En el presente trabajo, se propone que en todos los tratamientos evaluados, para los tres sitios de muestreo, actuaron diversos agentes químicos que influyeron notablemente en ciertas fases de la división celular, así como otros que impidieron la entrada de las células en mitosis o que inhibieron la formación del huso mitótico o la citocinesis. Se considera que en las aguas estudiadas existen agentes que inhiben la división celular, afectando a las células en la etapa de interfase, pudiendo actuar en G1, S o G2, y en ocasiones en la profase temprana. Los que actuaron en G1 o S inhibieron la replicación cromosómica y la división de cromosomas, mientras que los que lo hicieron principalmente en G2, solo afectaron la separación de las cromátidas (Chauhan et al, 1986; De Marco et al, 1986). También, se considera que la supresión de los procesos necesarios para que se lleve a cabo el ciclo celular, como son la síntesis de DNA, RNA, proteínas y la formación del huso mitótico, puede interferir en la proliferación de células (Chauhan et al, 1986).

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

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

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

Otra causa que puede provocar la disminución de la frecuencia de divisiones celulares, es la producción de alteraciones cromosómicas, ya que éstas causan la muerte celular (De Marco et al, 1986).

Los resultados de los análisis de los metales pesados indican que en todos los casos, los valores obtenidos del cromo y cadmio no exceden al valor máximo permisible establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-001-ECOL-1996, y con respecto al plomo no se detecto ningún valor por el método utilizado, pero tal vez si se encuentre presente en este tipo de aguas. Estas situaciones se deben posiblemente a que el sitio de muestreo son los canales de riego próximos a las parcelas de cultivo, y dichos canales no están revestidos por ningún tipo de material, considerando que en el suelo se presenta una acumulación de metales

pesados. Pero existen reportes que indican que, aún presentes en bajas concentraciones, los metales pesados ocasionan daños clastogénicos en diferentes cultivos celulares.

Con respecto al cromo, este elemento en los suelos se encuentra principalmente en el estado de oxidación como Cr^{3+} precipitado como $\text{Cr}(\text{OH})_3$ o adsorbido a las partículas del suelo, lo que dificulta su movimiento hacia el agua (Armienta et al., 2001; Kotas y Stasicka, 2000), pero se ha reportado que el Cr^{6+} es el estado de oxidación en que se encuentra el cromo en el agua y que su movilidad ambiental es mayor que la del Cr^{3+} (Kotas y Stasicka, 2000). En este estudio, posiblemente, lo que sucedió es que el Cr^{6+} manifestó su efecto genotóxico ejercido directamente de su poder oxidante e interactuó con el material genético ocasionando daño al DNA (De Marco et al., 1988; Knasmüller_ et al., 1998) induciendo aberraciones cromosómicas y la formación de micronúcleos, además de que disminuye la división celular (Zhang y Xiao, 1998). También puede ser que los mecanismos moleculares del Cr^{6+} compliquen la instalación del complejo DNA-proteínas y que esta situación pueda ocasionar un daño al DNA (Knasmüller et al., 1998).

Por lo que corresponde al cadmio, se ha encontrado que el efecto de prolongar el tiempo de exposición a bajas concentraciones del metal es más significativo que a concentraciones altas por poco tiempo de exposición. Esto puede explicarse debido a las propiedades que presenta el metal al acumularse hasta alcanzar un umbral de toxicidad a partir del cual el efecto se hace más evidente (Gesta et al., 1990). En este trabajo, la actividad clastogénica del cadmio puede ser de que es un

metal antagonista del calcio, este último indispensable para la formación del huso mitótico, por lo que competitivamente al superar la concentración de cadmio a la del calcio se produce el bloqueo en la migración de los cromosomas metafísicos (Marcano et al, 1999), además se considera que, posiblemente, el cadmio puede interactuar con sitios nucleofílicos en el DNA, con proteínas cromosomales y con DNAPolimerasas, ocasionando una interferencia con el proceso de reparación del DNA (De Marco et al, 1988; Steinkeller et al, 1998) llegando a inducir la formación de aberraciones cromosómicas y de micronúcleos (Gómez et al, 1989; Marcano et al, 1999). Por otra parte, puede ser que el cadmio, también, influyó en la disminución del índice mitótico en las células meristemáticas de *Vicia faba*, lo que demuestra el grado de sensibilidad de esta especie a la toxicidad de este elemento, lo cual concuerda con Marcano et al (1999), Zhang y Yang (1994).

7. CONCLUSIONES.

- Las aguas residuales evaluadas presentan sustancias químicas que son potencialmente inductoras de células micronucleadas en *Vicia faba*, manifestando su efecto clastogénico. Presentándose que a mayor tiempo de exposición y de recuperación se incrementa la frecuencia de micronúcleos.
- En todos los tratamientos se encontró una disminución en la frecuencia del índice mitótico en las células meristemáticas de *Vicia faba*, lo que manifiesta un efecto citotóxico por parte de las aguas evaluadas, debido a una alta presencia de sustancias contaminantes. Se manifestó que a mayor tiempo de exposición y de recuperación de las células, los contaminantes ejercieron un mayor efecto inhibitorio sobre la división celular.
- Los metales pesados son una clase de contaminantes ambientales que son potencialmente mutágenos e inducen la presencia de micronúcleos, pero con los datos obtenidos en este estudio se puede decir que cumplen con los límites permisibles propuestos por la Norma Oficial Mexicana NOM-001-ECOL-1996, y por lo tanto, supuestamente, no representan un mayor riesgo para las plantas cultivadas de la región.
- Los relativamente bajos niveles de metales pesados que se manifestaron, en las muestras de agua, sugieren una remoción de estos elementos, en su trayecto, desde su fuente de origen hasta los

sitios donde se muestreo, debido a la acumulación que presentan los metales al suelo.

8. RECOMENDACIONES.

- Se recomienda realizar este tipo de estudio en más sitios de muestreo y en diferentes épocas del año, para verificar si este tipo de aguas presentan una acción genotóxica y citotóxica, así como probando otros sistemas vegetales como *Allium cepa* y *Tradescantia*.
- Se sugiere efectuar estudios genotóxicos en muestras de suelo y de tejidos vegetales, sobre todo en plantas que se producen en el municipio.
- Es recomendable llevar a cabo, por algún método, el tratamiento de las aguas residuales para su uso agrícola.
- Debe existir la restricción en la producción de cultivos sobre todo de hortalizas que se consumen crudas.
- Se debe tener una atención sanitaria para las plantas cultivadas, así como para los agricultores y los consumidores expuestos.

9. REFERENCIAS.

- 1.- Alloway B. J. 1993. Heavy metals in soils. Third edition. John Wiley and Sons. New Jersey, USA. pp: 3-27.
- 2.- American Public Health Association (APHA). 1996. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 19a. edition. Washington, DC, USA.
- 3.- Arango, M. J. M. 1996. Panorama general sobre la reutilización del agua en el riego agrícola en México. Memorias del taller experimental de reuso del agua en la agricultura México-Israel. México. pp.: 19-23.
- 4.- Armienta, M. A.; Morton, O.; Rodríguez, R.; Cruz, O.; Aguayo, A.; Cenicerros, N. 2001. Chromium in a tannery wastewater irrigated area, León valley, México. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 66: 189-195.
- 5.- Ashby, J. Y Tinwell, H. 2001. Continuing ability of the rodent bone marrow micronucleus assay to act as a predictor of the possible germ cell mutagenicity of chemicals. Mutat. Res. 478: 211-213.
- 6.- Ateeq, B.; Abul-farah, M.; Niamat, M.; Waseem, A. 2002. Induction of micronuclei and erythrocyte alterations in the catfish (*Clarias batrachus*) by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and butachlor. Mutat. Res. 518: 135-144.
- 7.- Avilés, H. G. 2000. Identificación de especies vegetales con capacidad para remover metales pesados en suelos contaminados. Tesis Profesional. Departamento de Suelos. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. pp: 5-31.
- 8.- British Geological Survey (BGS). 1994. Effects of wastewater reuse on urban groundwater resources, León, México. Phase I Report. Preparado por: British Geological Survey; Comisión of the European Community Overseas Development Administration; Comisión Nacional del Agua y Universidad Autónoma de Chihuahua. pp: 7-25.
- 9.- Cajuste, L. J. y Carrillo, G. R. 1992. Estudio de metales pesados en agua, suelo y plantas en el Valle del Mezquital y su incidencia en la cadena alimenticia en la región del estado de Hidalgo. Colegio de Postgraduados. Montecillos, México. pp: 16-45.

- 10.- Cala, R. V. 1995. Contaminación y depuración de suelos. Instituto Tecnológico Geominero de España. Madrid, España. pp: 49-75.
- 11.- Campana, M. A.; Panzeri, A. M.; Moreno, V. J.; Dulot, F. N. 1999. Genotoxic evaluation of the pyrethroid lambda-cyhalothrin using the micronucleus test in erythrocytes of the fish (*Cheirodon interruptus*). *Mutat. Res.* 438: 155-161.
- 12.- Castro de Esparza, M. L. 1997. Evaluación de riesgos para la salud por el uso de las aguas residuales en la agricultura. Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente (CEPIS). Lima, Perú. pp: 1-7.
- 13.- Chakravarty, B. y Srivastava, S. 1992. Toxicity of some heavy metals in vivo and in vitro in *Helianthus annuus*. *Mutat. Res.* 283: 287-294.
- 14.- Chauhan, L. K. S.; Dikshith, T. S. S.; Sundararaman, V. 1986. Effect of deltamethrin on plant cells I. Cytological effects on the root meristems of *Allium cepa*. *Mutat. Res.* 171: 25-30.
- 15.- Cotelle, S.; Masfaraud, J. F.; Férad, J. F. 1999. Assessment of the genotoxicity of contaminated soil with the *Allium/Vicia*-micronucleus and the *Tradescantia*-micronucleus assays. *Mutat. Res.* 426: 167- 171.
- 16.- Cruz, C. J. L. 1997. Contaminación por metales pesados en cultivos regados con aguas del río Lerma, en la región de Salamanca, Guanajuato. Tesis Profesional. Departamento de Suelos. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. pp: 4-40.
- 17.- Cuellar, R. C. H. 1988. Alternativas para el control de descargas de aguas residuales en México. Primer congreso Nacional de Ingeniería Sanitaria y Ambiental. Guadalajara, Jalisco. pp: 7-21.
- 18.- Curtis, P. J. 1986. Introducción a la citología vegetal. Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. pp: 115-123.
- 19.- Das, P.; Samantaray, S. y Rout, G.R. 1997. Studies on cadmium toxicity in plants: a review. *Env. Pol.* 98: 29-36.
- 20.-Davies B. E. 1993. Lead. En: Alloway B. J. 1993. Heavy metals in soils. Third edition. John Wiley and Sons. New Jersey, USA. pp: 177-193
- 21.- De Marco, A.; Romanelli, M.; Stazi, M. A.; Vitagliano, E. 1986. Induction of micronucleated cells in *Vicia faba* and *Allium cepa* root tips treated with nitrilotriacetic acid (NTA). *Mutat. Res.* 171: 145-148.

- 22.- De Marco, A.; Paglialunga, S.; Rizzoni, M.; Testa, A.; Trinca, S. 1988. Induction of micronuclei in *Vicia faba* root tips treated with heavy metals (cadmium and chromium) in the presence of NTA. *Mutat. Res.* 206: 311-315.
- 23.- Duan, Ch. Q.; Hu, B.; Jiang, X. H.; Wen, Ch. H.; Wang, Z.; Wang, Y. X. 1999. Genotoxicity of water samples from Dianchi lake detected by the *Vicia faba* micronucleus test. *Mutat. Res.* 426: 121-125.
- 24.- Durán, C. R. y Hernández, G. R. 1998. Efecto de las aguas residuales en la agricultura, con énfasis a la horticultura. Departamento de Irrigación. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. pp: 83-103.
- 25.- Evans, J. H. 1997. Historical perspectives on the development of the in vitro micronucleus test: a personal view. *Mutat. Res.* 392: 5-10.
- 26.- Fenech, M. y Crott, J. W. 2002. Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes evidence for breakage-fusion-bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutat. Res.* 504: 131-136.
- 27.- Fiskesjo, G. 1993. The *Allium* test in wastewater monitoring. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 8: 291-298.
- 28.- Flores, R. A. 2003. Presencia de Pb, Cr, Co, Ni y Cd en las aguas residuales de la presa Manuel Avila Camacho, Edo. de Puebla y sus efectos en la agricultura. Tesis de maestría, Division de estudios de Posgrado, Facultad de Ciencias, UNAM. Mexico.
- 29.- Frieauff, W.; Pötter, L. F.; Cordier, A. ; Suter, W. 1998. Automatic analysis of the in vitro micronucleus test on V79 cells. *Mutat. Res.* 423: 57-68.
- 30.- García, M. M. R. 1993. Contaminantes tóxicos prioritarios en agua. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. pp: 71-102.
- 31.- Gardea, T. J. L.; Peralta, V. J. R.; Montes, M. R.; Corral, D.B. 2004. Bioaccumulation of cadmium, chromium and copper by *Convolvulus arvensis* L.: impact on plant growth and uptake of nutritional elements. *Bio. Tech.* 92: 229-235.
- 32.- Gardner, E. J.; Simmons, M. J.; Snustad, P. D. 1999. Principios de Genética. 4a. edición. Uteha-Noriega editores. México. pp: 54-57.
- 33.- Gesta, Ch.; Jaswant, S. y Viswana, T. 1990. Effect of pH and temperature on the uptake of cadmium by *Lemna minor*. *Environ. Contam. Toxicol.* 47: 84-90
- 34.- Gómez, A. S.; Abarca, H. J.; Villalobos, P. R. 1989. Sister chromatid exchanges induced by cadmium in *Vicia faba*. *Contam. Ambient.* 5: 71-82

- 35.- Gómez, A. S. y Villalobos, P. R. 1997. El intercambio de Cromátidas Hermanas en *Vicia faba* como monitor genético de contaminantes ambientales. En: Resúmenes del VII Congreso Nacional de Genética. Universidad Autónoma de Baja California. Ensenada, Baja California Norte.
- 36.- Gollapudi, B. B.; Mendrala, A. L.; Linscombe, V. A. 1995. Evaluation of the genetic toxicity of the organophosphate insecticide chlorpyrifos. *Mutat. Res.* 342: 25-36.
- 37.- González, F. A. y López, S. J. F. 1982. Effect of caffeine en G2 repair and its reversion by adenosine. *Mutat. Res.* 106: 255-264.
- 38.- Gopalan, H. N. B. 1999. Ecosystem health and human well being: the mission of the international programme on plant bioassays. *Mutat. Res.* 426: 99-102.
- 39.- Grant, W. F. ; Lee, H. G. ; Logan, D. M. ; Salamone, M. F. 1992. The use of *Tradescantia* and *Vicia faba* bioassays for the in situ detection of mutagens in an aquatic environment. *Mutat. Res.* 270: 53-64.
- 40.- Grant, W. F. 1994. The present status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens. *Mutat. Res.* 310 (2): 175-185.
- 41.- Griffiths, A. J. F.; Gelbart, W. M.; Miller, J. H.; Lewontin, R. C. 2000. Genética Moderna. McGraw-Hill-Interamericana. Madrid, España. pp: 92-96.
- 42.- Grover, I. S. y Satwinderjeet, K. 1999. Genotoxicity of wastewater samples from sewage and industrial effluent detected by the *Allium* root anaphase aberration and micronucleus assays. *Mutat. Res.* 426 (2): 183-188.
- 43.- Guerrero, L. M. 1997. El agua. 2ª. Reimpresión. Fondo de Cultura Económica. México. pp: 61-87.
- 44.- Gustavino, B.; Vitagliano, E.; Sottili, A.; Rizzoni, M. 1987. A comparison between short-term evolution of micronuclei induced by X-rays and colchicine in root tips of *Vicia faba*. *Mutat. Res.* 192: 109-119.
- 45.- Instituto de Información e Investigación Geográfica Estadística y Catastral del Gobierno del Estado de México (IGECEM). 2003. <http://www.edomexico.gob.mx>
- 46.- Ji, Q.; Yang, H.; Zhang, X. 1999. *Vicia* root-micronuclei assays on the clastogenicity of water samples from the Kui river near Xuzhou city, People's Republic of China. *Mutat. Res.* 426: 133-135.

- 47.- Jiang, Y. G.; Yu, Z. D.; Liu, G. Z.; Chen, R. Z.; Peng, G. Y. 1999. Genotoxicity of water samples from the scenic Lijang river in the Guilin area, China, evaluated by *Tradescantia* bioassays. *Mutat. Res.* 426: 137-141.
- 48.- Joutchev, G.; Stergios, M.; Schubert, I. 2002. A comparison of N-methyl-N-nitrosourea-induced chromatid aberrations and micronuclei in barley meristems using FISH techniques. *Mutat. Res.* 517: 47-51.
- 49.- Kanaya, N.; Gill, B. S.; Grover, I. S.; Murin, A.; Osiecka, R.; Sandhu, S. S.; Andersson, H. C. 1994. *Vicia faba* chromosomal aberration assay. *Mutat. Res.* 310: 231-247.
- 50.- Kilhman, B. A.; Natarajan, A. T. y Anderson, H. C. 1978. Use of the 5-bromodeoxyuridine labeling technique for exploring mechanisms involved in the formation of chromosomal aberrations. *Mutat. Res.* 52: 181-198.
- 51.- Klug, W. S. y Cummings, M. R. 1999. *Conceptos de Genética*. 5ª. Edición. Prentice Hall. Madrid, España. pp: 25-27.
- 52.- Knasmüller, S.; Gottmann, E.; Steinkellner, H.; Fomin, A.; Pickl, Ch.; Paschke, A.; Göd, R.; Kundi, M. . 1998. Detection of genotoxic effects of heavy metal contaminated soils with plant bioassays. *Mutat. Res.* 420: 37-48.
- 53.- Kong, M. S. y Ma, T. H. 1999. Genotoxicity of contaminated soil and shallow well water detected by plant bioassays. *Mutat. Res.* 426: 224-228.
- 54.- Kotas, J. y Stasicka, Z. 2000. Chromium occurring in the environment and methods of its speciation. *Environ. Pollut.* 107: 263-283.
- 55.- Liu, Y.; Wu, Z.; Chen, J. 1998. Differential effects of aneugens and clastogens on incidences of multinucleated cell and micronucleated cells in Chinese hamster lung (V79) cell line in vitro. *Mutat. Res.* 413: 39-45.
- 56.- López, M. E. 1999. Monografía Municipal de Huehuetoca. Versión preliminar. <http://www.edomex.gob.mx/Se/huehuetoca.htm>
- 57.- Ma, T. H.; Cabrera, G. L.; Chen, R.; Gill, B. S.; Sandhu, S. S.; Vandenberg, A. L.; Salamone, M. F. 1994. *Tradescantia* micronucleus bioassay. *Mutat. Res.* 310: 221-230.
- 58.- Ma, T. H.; Xu, Z.; Xu, Ch.; McConnell, H.; Valtierra, R. E.; Arreola, G. A.; Zhang, H. 1995. The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. *Mutat. Res.* 334: 185-195.

- 59.- Ma, T. H.; Grant, W. F. ; de Serres, F. J.. 1997. The genotoxicity monitoring of air, water and soil. A preliminary report of the International Programme on Plant Bioassays (IPPB). *Mutat. Res.* 379 (1), Supplement 1, page 599.
- 60.- Majer, B. J. ; Tscherko, D. ; Daschke, A.; Wennrich, R.; Kundi, M.; Kandeler, E.; Knasmüller, S. 2002. Effects of heavy metal contamination of soils on micronucleus induction in *Tradescantia* and on microbial enzyme activities: a comparative investigation. *Mutat. Res.* 515: 111-124.
- 61.- Marcano, L.; Carruyo, I.; Montirl, X.; Bracho, M.; Soto, L. M. 1999. Valoración del efecto tóxico del cadmio en células meristemáticas de cebolla *Allium cepa* L. *Rev. Fac. Agron.* 16: 476-487.
- 62.- Melo, S. F. M.; Márquez, E. C.; Juárez, J. M.; Martínez, M. F.; Miranda, R. P.; Esquivel, R. L. 2003. Análisis de metales pesados en las aguas residuales del río San Javier y repercusión en la salud e impacto ambiental. Departamento de Química, Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, Instituto Politécnico Nacional. México.
- 63.- Metcalf y Eddy. 1996. Ingeniería de aguas residuales. Tratamiento, vertido y reutilización. 3ª. Edición. McGraw-Hill. México. pp: 53-135.
- 64.- Miao, M.; Fu, R.; Yang, D.; Zheng, L. 1999. *Vicia* root micronucleus assay on the clastogenicity of water samples from the Xiaoqing river in Shandong Province of the People's Republic of China. *Mutat. Res.* 426: 143-145.
- 65.- Minissi, S. y Lombi, E. 1997. Heavy metal content and mutagenic activity, evaluated by *Vicia faba* micronucleus test, of Tiber river sediments. *Mutat. Res.* 393: 17-21.
- 66.-Minissi, S.; Caccese, D.; Passafiume, F.; Grella, A. ; Ciccotti, E. ; Rizzoni, M. 1998. Mutagenicity (micronucleus test in *Vicia faba* root tips) polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metal content of sediments collected in Tiber river an its tributaries within the urban area of Rome. *Mutat. Res.* 420: 77-84
- 67.- Mohamed, K. B. y Ma, T. H. 1999. *Tradescantia*-micronucleus and stamen hair mutation assays on genotoxicity of the gaseous and liquid forms of pesticides. *Mutat. Res.* 426: 193-199.
- 68.- Moreno, L. J. F. 2001. Genotoxicidad del insecticida clorpirifos en células apicales de raíz de haba (*Vicia faba* L.). Tesis de Licenciatura. Ingeniería Agrícola. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM. Cuautitlán Izcalli, México.

- 69.- Moreton, J. A. 1999. Estudio de la genotoxicidad de afluentes industriales y del impacto en los cursos de agua a los que se vierten. Cátedra de Higiene y Sanidad. <http://www.rec.uba.ar/ubacyt/fa/fa092.htm>
- 70.- Müller, W. U. y Rode, A. 2002. The micronucleus assay in human lymphocytes after high radiation doses (5-15 Gy). *Mutat. Res.* 502: 47-51.
- 71.- Nakayama, F. S. y Bucks, D. A. 1991. Water quality in drip/trickle irrigation: A review. *Irrigation Science* 12: 187-192.
- 72.- Nicoloff, H. Y Gecheff, K. 1976. Methods of scoring induced chromosome structural changes in barley. *Mutat. Res.* 34: 233-244.
- 73.- Norma Oficial Mexicana NOM-001-ECOL-1996. Establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales. Publicada en el Diario Oficial de la Federación, 6 de enero de 1997.
- 74.- Palacios, O. J. 2002. Estudio del efecto de aguas residuales en diversos cultivos en el Valle del Mezquital, Hidalgo. Tesis de Licenciatura. Departamento de Suelos, Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México.
- 75.- Palafox, M. D. 2003. Evaluación genotóxica de aguas residuales de la actividad de tenería utilizadas para riego en el municipio de León, Guanajuato. Tesis de Licenciatura. Ingeniería Agrícola. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM. Cuautitlán Izcalli, México.
- 76.- Pendias A. y Pendias K. 1992. Excessive trace metal contents of soils. En: Salomons W. y Förstner, U. 1995. Heavy metals: problems and solutions. Springer-Verlag, Berlin, Germany. pp. 3-17
- 77.- Pescod, M. M. 1992. Wastewater treatment and use in agriculture. FAO. Irrig & Drain. Paper No. 47. Roma. pp: 1-7.
- 78.- Ramalho, R. S. 1996. Tratamiento de aguas residuales. Reverté. México. pp: 1-64.
- 79.- Rank, J. y Nielsen, M. H. 1994. Evaluation of the *Allium* anaphase-telophase test in relation to genotoxicity screening of industrial wastewater. *Mutat. Res.* 312 (1): 17-24.
- 80.- Rizzoni, M.; Vitagliano, E.; Marconi, M. C.; Sottili, A.; Gustavino, B. 1987. Micronucleus induction by low doses of X-rays in *Vicia faba* root tips. *Mutat. Res.* 176: 205-209.

- 81.- Robbiano, L.; Mereto, E.; Mgliuzzi, M. A.; Pastore, P.; Brambilla, G. 1998. Increased frequency of micronucleated kidney cell in rats exposed to halogenated anaesthetics. *Mutat. Res.* 413: 1-6.
- 82.- Rodríguez, G. S.; Pimentel, D.; Weinstein, L. H. 1998. In situ assessment of pesticide genotoxicity in an integrated pest management program I-*Tradescantia* micronucleus assay. *Mutat. Res.* 412: 235-244.
- 83.- Ruiz, E. F.; Rabago, V. M. E.; Lecona, S. U.; Pérez, A. B.; Ma, T. H. 1992. *Tradescantia*-micronucleus (Trad-MCN) bioassay on clastogenicity of wastewater and in situ monitoring. *Mutat. Res.* 270: 45-51.
- 84.- Saénz, F. R. 1997. Modernización y avances en el uso de aguas negras para la irrigación. Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente (CEPIS). Lima, Perú. pp: 27-34.
- 85.- Sainz, A.; Grande, J. A.; de la Torre, M. L. 2004. Characterization of heavy metal discharge into the Ria of Huelva. *Environ. Int.* 30: 557-566.
- 86.- Samborska, C. A. 1987. Cytogenetic disturbances in germinating seeds of broad bean (*Vicia faba* L. var. minor) caused by herbicide Avadex B. *W. Genetica Polonica* 28 (3): 277-287.
- 87.- Sawger, T. W. 1994. Cellular methods of genotoxicity and carcinogenicity. In: Introduction to in vitro cytotoxicology. Mechanisms and methods. CRC Press Inc. Boca Raton, Florida. pp: 75-105.
- 88.- Secretaria de Agricultura y Recursos Hidráulicos (SARH). 1994. Manual de aprovechamiento de aguas residuales en el riego agrícola. Dirección General de Usos del Agua y Prevención de la contaminación. Secretaria de Agricultura y Recursos Hidráulicos. México. pp: 245-263.
- 89.- Seoáñez, C. M. y Angulo, A. I. 1999. Aguas residuales urbanas. Tratamientos naturales de bajo costo y aprovechamiento. Mundi-Prensa. México. pp: 47-87.
- 90.- Singh, R.P.; Tripathi, R.D.; Maheshworl, R. y Srivastava, H, S. 1997. Response of higher plants to lead contaminated environment. *Chemosphere*, 34 (11): 2467-2493.
- 91.- Steinkellner, H.; Mun-Sik, K.; Helma, Ch.; Ecker, S.; Ma, T. H.; Horak, O.; Kundi, M.; Knasmüller, S. 1998. Genotoxic effects of heavy metal: comparative investigation with plant bioassays. *Environ. Mol. Mutat.* 31: 189-191.

- 92.- Tebbutt, T. H. Y. 2002. Fundamentos de control de la calidad del agua. Limusa-Noriega Editores. México. pp: 19-53.
- 93.- Tejeda, G. C. 1993. Programa Nacional para el aprovechamiento de aguas residuales. Secretaria de Agricultura y Recursos Hidráulicos (SARH). México. pp: 87-93.
- 94.- Trosic, I.; Busljeta, I.; Kasuba, V.; Rozgas, R. 2002. Micronucleus induction alter whole-body microwave irradiation of rats. *Mutat. Res.* 521: 73-79.
- 95.- Vajpayee, P. ; Sharma, S.C. ; Tripathi R.D. ; Rai, U.N. and Yunus, M.1999. Bioaccumulation of chromium and toxicity to photosynthetic pigments, nitrate reductase activity and protein content of *Nelumbo nucifera* Gaertn. *Chemosphere*, 39 : 2159-2169.
- 96.- Wang, S. y Wang, X. 1999. The *Tradescantia*-micronucleus test on the genotoxicity of UV-B radiation. *Mutat. Res.* 426: 151-153.
- 97.- Yang, G. 1999. *Tradescantia*-micronucleus assay on the water quality of lake Hongzhe in Jiangsu Province, China. *Mutat. Res.* 426: 155-157.
- 98.- Zhang, Y. y Yang, X. L.1994. The toxic effects of cadmium on cell division and chromosomal morphology of *Hordeum vulgare*. *Mutat. Res.* 312: 121-126.
- 99.- Zhang, Y. y Xiao, H. 1998. Antagonistic effect of calcium, zinc and selenium against cadmium induced chromosomal aberrations and micronuclei in root cell of *Hordeum vulgare*. *Mutat. Res.* 420: 1-6.