



**UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS**  
**SECRETARÍA GENERAL**  
**DIRECCIÓN DE SERVICIOS ESCOLARES**  
**DEPARTAMENTO DE CERTIFICACIÓN ESCOLAR**  
**AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN**

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas a 20 de junio de 2023

C. Areli Jiménez Márquez

Pasante del Programa Educativo de: Ingeniería ambiental

Realizado el análisis y revisión correspondiente a su trabajo recepcional denominado:

Análisis de micronúcleos en células de haba (*Vicia faba*) expuestas a lixiviados

En la modalidad de: Informe técnico

Nos permitimos hacer de su conocimiento que esta Comisión Revisora considera que dicho documento reúne los requisitos y méritos necesarios para que proceda a la impresión correspondiente, y de esta manera se encuentre en condiciones de proceder con el trámite que le permita sustentar su Examen Profesional.

ATENTAMENTE

**Revisores**

M. en C. Carlos Narcía López

Dr. Hugo Alejandro Nájera Aguilar

Dra. Rebeca Isabel Martínez Salinas

**Firmas:**

Ccp. Expediente

**UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y  
ARTES DE CHIAPAS  
FACULTAD DE INGENIERÍA  
PROGRAMA EDUCATIVO DE INGENIERÍA AMBIENTAL**

**INFORME TÉCNICO**

**TRABAJO DOCUMENTAL**

**ANÁLISIS DE MICRONÚCLEOS EN CÉLULAS DE HABA  
(*Vicia faba*) EXPUESTAS A LIXIVIADOS**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
INGENIERO AMBIENTAL**

**PRESENTA:  
ARELI JIMÉNEZ MÁRQUEZ**

**DIRECTOR:  
DRA. REBECA ISABEL MARTÍNEZ SALINAS  
DRA. ANAHÍ ARMAS TIZAPANTZI**

**TUXTLA GUTIÉRREZ, CHIAPAS**

**JUNIO 2023**



## **Agradecimientos**

Quiero agradecer a la Dra. Rebeca Isabel Martínez Salinas y a la Dra. Anahí Armas Tizapantzi, por la dedicación y apoyo que me han brindado, por su gran conocimiento, comprensión y empatía sin las que no hubiera sido posible realizar el presente informe.

Gracias a mis padres y hermanos que siempre me han brindado su apoyo incondicional para poder cumplir con mis objetivos personales y académicos. Que con su cariño me han impulsado siempre a perseguir mis metas y nunca abandonarlas frente a las adversidades. También son los que me han brindado el soporte material y económico para poder concentrarme en los estudios y nunca abandonarlos.

Gracias a mi novio porque en todo momento fue un apoyo incondicional en mi vida; eres mi inspiración y motivación.

Gracias a mis amigos, que siempre me han prestado un gran apoyo moral y humano, necesarios en los momentos más difíciles de este trabajo y esta profesión.

Nada de esto hubiera sido posible sin ustedes y cada una de las personas involucradas en la realización de este trabajo.

## Índice General

<b>I. Introducción .....</b>	<b>7</b>
<b>II. Marco teórico .....</b>	<b>9</b>
2.1 Lixiviados .....	9
2.2 Bioensayos de toxicidad .....	10
2.3 Genotoxicidad .....	12
2.4 Ensayo de MN .....	13
2.5 Relación ante la presencia de MN con daño genotóxico .....	16
2.6 Características generales de la semilla de <i>Vicia faba</i> .....	18
2.7 Ensayo de viabilidad .....	20
2.7 Células meristemáticas en plantas .....	21
<b>III Objetivo general .....</b>	<b>23</b>
3.1 Objetivos específicos .....	23
<b>IV. Metodología .....</b>	<b>24</b>
4.1 Almacenamiento .....	25
4.2 Ensayo de viabilidad .....	25
4.3 Preparación y germinación de las semillas .....	26
4.4 Ensayo de MN .....	27
4.4.1 Exposición .....	27
4.4.2 Tinción .....	28
4.4.3 Montaje .....	29
4.5 Cuantificación de MN .....	30
4.6 Análisis estadístico .....	30
4.7 Antecedente; caracterización de los lixiviados .....	30
<b>V. Resultados .....</b>	<b>32</b>
5.1 Prueba de viabilidad y germinación .....	32
5.2. Inducción de MN .....	33
5.3 Análisis estadístico .....	38
<b>VI Conclusión .....</b>	<b>41</b>
<b>VII Limitaciones y recomendaciones .....</b>	<b>43</b>
<b>VIII Referencias .....</b>	<b>45</b>

<b>IX Anexos.....</b>	<b>56</b>
Anexo 1. Reactivos .....	56
Anexo 2. Preparación de reactivos .....	57
Anexo 3. Evidencia fotográfica.....	59
Anexo 4. Tablas de resultados.....	62

	<b>Índice de figuras</b>	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1</b>	Estructura de un cromosoma .....	14
<b>Figura 2</b>	Esquema de la formación de MN.....	15
<b>Figura 3</b>	MN en célula de <i>Vicia faba</i> .....	15
<b>Figura 4</b>	Fisiología de la semilla <i>V. faba</i> .....	18
<b>Figura 5</b>	Etapas de germinación de la semilla <i>V. faba</i> .....	19
<b>Figura 6</b>	Esquema de la raíz de <i>V. faba</i> .....	22
<b>Figura 7</b>	Semilla de haba de la marca Horta flor.....	24
<b>Figura 8</b>	Diseño experimental.....	25
<b>Figura 9</b>	Imbibición de la semilla.....	26
<b>Figura 10</b>	Semillas acomodadas para germinar.....	26
<b>Figura 11</b>	Eliminación de cofia.....	27
<b>Figura 12</b>	Exposición de semillas.....	28
<b>Figura 13</b>	Laminillas listas para análisis.....	29
<b>Figura 14</b>	Inducción de MN tras exposición de raíces.....	33
<b>Figura 15</b>	Diferencias observadas en las muestras de control y lixiviado crudo...	35

	<b>Índice de tablas</b>	<b>Pág.</b>
<b>Tabla 1</b>	Ventaja de los bioensayos de genotoxicidad.....	11
<b>Tabla 2</b>	Especificaciones de la semilla de <i>V. faba</i> .....	25
<b>Tabla 3</b>	Análisis de parámetros físicoquímicos de lixiviado .....	30
<b>Tabla 4</b>	Porcentaje de viabilidad y germinación.....	32

<b>Tabla 5</b>	Numero de MN contabilizados por laminilla.....	36
<b>Tabla 6</b>	Frecuencia de MN por laminilla.....	36
<b>Tabla 7</b>	Resultado del efecto genotóxico en los tratamientos.....	37
<b>Tabla 8</b>	Prueba de homogeneidad de varianzas.....	38
<b>Tabla 9</b>	Prueba de ANOVA de un factor.....	39
<b>Tabla 10</b>	Prueba de homogeneidad de varianzas.....	61
<b>Tabla 11</b>	ANOVA.....	61
<b>Tabla 12</b>	Comparaciones múltiples-método de Scheffe.....	61

#### índice de ecuaciones

Pág.

<b>Ecuación 1</b>	Ecuación para calcular el porcentaje de germinación.....	16
<b>Ecuación 2</b>	Ecuación para calcular el porcentaje de viabilidad.....	21
<b>Ecuación 3</b>	Ecuación para calcular la frecuencia de MN.....	21

#### índice de gráfica

Pág.

<b>Gráfica 1</b>	Frecuencia de MN en raíces de <i>Vicia faba</i> .....	39
------------------	---	----

## Abreviaturas

<i>V. faba</i>	<i>Vicia faba</i> (haba)
MN	Micronúcleos
MMAyA	Ministerio de Medio Ambiente y Agua
RSU	Residuo Sólido Urbano
SDF	Sitio de Disposición Final
EPA	Agencia de Protección Ambiental
BEME	Biorreactor Empacado con Materiales Estabilizado
SEMARNAT	Secretaria del Medio Ambiente y Recursos Naturales

## I. Introducción

El incremento de la población y la correlación que esta tiene con las actividades humanas como la producción, consumo de bienes y servicios, generan irremediablemente algún tipo de residuo, que en conjunto son transportados a Sitios de Disposición Final (SDF), y si no se cuenta con un adecuado manejo de los residuos, estos llegan a mezclarse con materia orgánica en descomposición y productos de la oxidación de metales humedecidos (incluyendo materiales peligrosos para el ambiente y la salud humana) dando origen al lixiviado, el cual se clasifica de acuerdo al tiempo de vida del mismo, y cuya composición es difícil de establecer como tal, pues dependerá de la combinación de los tipos y cantidades de uno u otro residuo contenidos en determinado lote de desechos. Cabe mencionar que, en México, los SDF no controlados refiriéndose a estos como tiraderos a cielo abierto siguen siendo frecuentes [1]-[2]-[3].

Los lixiviados son considerados uno de los contaminantes líquidos de mayor impacto ambiental y con dificultad para su tratamiento debido a la variabilidad de su composición, toxicidad, facilidad de percolación hacia aguas superficiales e incluso subsuperficiales [4]. Su composición puede ser muy diversa y está directamente relacionada con la naturaleza de los residuos de los que provienen; contienen toda característica contaminante principal, es decir, nitrógeno, fósforo, presencia abundante de patógenos e igualmente sustancias tóxicas como metales pesados y alto contenido de materia orgánica como proteínas, carbohidratos, hidrocarburos aromáticos, alcoholes, principalmente los ácidos grasos volátiles y una alta conductividad [5]-[6]-[7].

Los lixiviados que se producen en los rellenos sanitarios, SDF o tiraderos a cielo abierto, por lo regular no reciben un adecuado manejo por lo que su generación suele representar un riesgo de contaminación para el suelo y los cuerpos de agua adyacentes, tanto superficiales como subterráneos; 7 de cada 10 SDF tiene un problema de escape de lixiviados durante al menos 3 meses por cada año [8]. Tomando en cuenta que aproximadamente el 80% de la producción anual de lixiviados se genera de manera concentrada en los meses de temporada de lluvias, esto significa que los cultivos y fuentes de agua se contaminan de manera constante [8]-[9], provocando problemas de toxicidad, eutrofización y acidificación, además de que los contaminantes producidos en un lugar frecuentemente terminan en otros lugares, por lo que evitar su flujo superficial e infiltración es de suma importancia debido a que estas fuentes de agua muchas veces son utilizadas en actividades recreativas y agrícolas, como agua potable o como fuente de alimentos para el consumo humano. La exposición durante un largo periodo a concentraciones subletales de



contaminantes puede provocar mayor susceptibilidad a ciertos padecimientos como problemas de la piel o enfermedades gastrointestinales [10].

En este contexto, el tratamiento de los lixiviados es esencial para disminuir los contaminantes presentes y así reducir su impacto en el medio ambiente. En la actualidad existen tratamientos biológicos o fisicoquímicos para poder tratar los lixiviados [11], sin embargo, es necesario evaluar la funcionalidad de estos tratamientos, una forma de hacerlo es la utilización de los bioensayos de toxicidad aguda mediante la prueba de inducción de micronúcleos (MN) en especies vegetales expuestas ya sea a una mezcla, un compuesto o sus metabolitos. Esta técnica ofrece una oportunidad accesible tecnológicamente y es un método validado que permite conocer los efectos tempranos de agentes tóxicos a nivel genético [12]. Debido a la función vital que desempeñan las plantas en los ecosistemas, estos organismos han sido utilizados para el diagnóstico o predicción de las consecuencias negativas de actividades antropogénicas mediante el estudio de sus procesos fisiológicos, respuestas bioquímicas, mecanismos de adaptación y mortalidad [13].

Para esta investigación se utilizaron muestras de lixiviado crudo y de lixiviado pretratado en un Biorreactor Empacado con Materiales Estabilizados (BEME), este biorreactor se caracteriza por estar empacado por residuos sólidos confinados en un relleno sanitario (>10 años). Estos materiales contienen un amplio espectro y gran cantidad de poblaciones microbianas ( $1.40 \times 10^6$  UFC/g), mismas que se han adaptado a lo largo de los años a las altas concentraciones de contaminantes que tienen una fuerte capacidad de descomposición de la materia orgánica refractaria presente en algunas aguas residuales como los lixiviados [12].

Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar el daño genotóxico en células meristemáticas vegetales de la especie de *Vicia faba* (haba) expuesta a lixiviado crudo, diluido y pretratado mediante el ensayo de inducción de MN proporcionando así, una herramienta de evaluación de la eficiencia de remoción de contaminantes mediante diferentes procesos de tratamiento en los lixiviados, ampliando el conocimiento de la problemática ambiental y contribuir a su contención mediante la evaluación de la genotoxicidad de muestras de lixiviado crudo, diluido y pretratado para que de una manera progresiva con fundamentos científicos, incentivar acciones hacia los tratamientos que se le da a los lixiviados crudos generados en los rellenos sanitarios, es, una preocupación global, por su toxicidad y consecuencia de sus efectos en cuanto a la calidad del agua y la repercusión en la salud de la población, animales y plantas [14].

## **II. Marco teórico**

### **2.1 Lixiviados**

La Norma Oficial Mexicana NOM-083-SEMARNAT-2003 y la Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos en su artículo 5 fracción XVI, definen como lixiviado al “líquido que se forma por la reacción, arrastre o filtrado de los materiales que constituyen los residuos y que contiene en forma disuelta o en suspensión, sustancias que pueden infiltrarse en los suelos o escurrirse fuera de los sitios en los que se depositan los residuos y que puede dar lugar a la contaminación del suelo y de cuerpos de agua, provocando su deterioro y representar un riesgo potencial a la salud humana y de los demás organismos vivos”.

Otros autores definen al lixiviado como aquellos líquidos (varios compuestos orgánicos e inorgánicos) que se generan por la liberación del exceso de agua de los residuos sólidos y por la percolación de agua pluvial a través de los estratos de residuos sólidos que se encuentran en las fases de descomposición o como un agua residual compleja producida por la degradación química y biológica de la materia contenida en los residuos, así como por la infiltración de agua lluvia a través de los RSU. La presencia de agua permite una combinación de procesos físicos, químicos y microbiológicos para transferir contaminantes del residuo sólido en descomposición al líquido, resultando así la formación del lixiviado [15]-[16].

El lixiviado generado es producto de múltiples factores, tales como: composición de la basura, edad del relleno, balance de agua, diseño y operación del relleno sanitario, solubilidad de los desechos, procesos de conversión microbiológica y química y la interacción del lixiviado con el medio ambiente. El caudal generado varía de acuerdo con el estado de avance y el tipo de operación del relleno, la composición también varía en el tiempo [17]. Además, traen consigo material que se encuentra disueltos, suspendidos, fijos o volátiles, conteniendo altos niveles de cargas orgánicas, presentando colores variados que van desde café-pardo-grisáceo en su momento inicial o de frescura, y un color negro viscoso en su etapa de vejez. [15]-[16]. Su composición puede ser muy diversa; desde la presencia de COV, algunos pesticidas, xenobióticos tales como metronidazol y diclofenaco [18], presencia de metales pesados, hidrocarburos aromáticos, entre otros; además presentan un elevado contenido en nitrógeno amoniacal y una alta conductividad [19].

Por otro lado, los lixiviados se pueden escapar durante el ciclo anual, siendo más grave durante la estación de lluvias donde los rellenos sanitarios pierden el control. Además de que en el 15 % de los casos los

lixiviados escapan a diario y el 10 % de los casos “a veces” tienen escapes. Es decir, el lixiviado escapa del sitio de manera constante, pero con periodos irregulares [8].

Existen tratamientos aerobios y anaerobios, para evitar la contaminación de acuíferos y de las aguas superficiales, así como el suelo cercano a los sitios. El sistema aerobio más extendidos son los lodos activados o lagunas aireadas y el reactor de biodisco, en cuanto a los tratamientos anaerobios se encuentra el Reactor Anaerobio de Flujo Ascendente (UASB por sus siglas en ingles) y el reciente Biorreactor Empacado con Materiales Estabilizados (BEME), los cuales han reportado buenos resultados, logrando disminuir la concentración de contaminantes [20]-[17].

## **2.2 Bioensayos de toxicidad**

Los bioensayos son herramientas ampliamente utilizadas en el campo de la ecotoxicología, la cual estudia el efecto y destino de los agentes tóxicos de origen antropogénico a los ecosistemas acuícolas y terrestres. Estas pruebas de toxicidad permiten realizar mediciones experimentales del efecto de agentes químicos o físicos en sistemas biológicos, estableciendo relaciones dosis-respuesta bajo condiciones controladas en terreno o en laboratorio [21].

Al implementar bioensayos y pruebas de toxicidad es necesario efectuar su estandarización, que consiste en establecer la sensibilidad de las especies y la reproducibilidad del experimento frente a un tóxico de referencia. Para este propósito, los compuestos solubles de 99% de pureza o más en las primeras etapas de recolección del método de prueba deben seleccionarse y someterse a una prueba de toxicidad específica de especie para determinar el rango de concentración del compuesto seleccionado que produce el efecto deseado. Una vez que se establece un patrón de dosis-respuesta, se puede utilizar como tóxico de referencia [21]. Los compuestos que pueden emplearse con este fin son: cloruro de sodio (NaCl), cloruro de potasio (KCl), cloruro de cadmio ( $\text{CdCl}_2$ ), sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ), dodecil sulfato de sodio (SDS) y dicromato de potasio ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) [22]. Lo anterior es útil para asegurarse que la respuesta de la población expuesta a cierto agente toxico se deba al efecto de este y no a variaciones de la sensibilidad de los organismos. La estandarización permite comparar los resultados entre diferentes laboratorios, siguiendo una metodología común [23].

En los últimos años, se han utilizado bioensayos rápidos empleando plantas superiores como organismos de prueba por ser organismos eucarióticos debido a que funcionan como buenas herramientas de trabajo para el monitoreo ambiental y son comparables a la mayoría de flora y fauna superiores constituyendo

una eficiente herramienta de trabajo para medir la alarma de peligro ambiental [24]. Además de tener las siguientes ventajas (Tabla 1):

**Tabla 1. Ventajas de los bioensayos de genotoxicidad con plantas superiores para evaluar y monitorear contaminantes ambientales [25-27].**

1. Las plantas superiores son eucariotas, se reproducen mediante mitosis y meiosis y sus células tienen una estructura similar a las del hombre. Es posible estudiar efectos en células germinales comparables a la de animales.
2. Se puede dar capacitaciones a técnicos para realizar ensayos con plantas debido a que son fáciles de cultivar y económicas para trabajar además de crecer relativamente rápido.
3. El tiempo de generación es corto en algunas especies.
4. Los ensayos pueden ser producidos bajo un amplio rango de condiciones ambientales, como pH y de temperatura. Las plantas superiores se pueden regenerar a partir de células haploides o diploides
5. Pueden ser usados en ensayos genéticos para la evaluación de la genotoxicidad de sustancias químicas en mezclas compuestas
6. Existe un amplio rango de biomarcadores genéticos que se pueden evaluar como aberraciones citológicas, mutaciones genéticas en plantas enteras, hojas, embriones, polen, etc.
7. Se pueden usar para el monitoreo <i>in situ</i> de contaminantes mutagénicos
8. Son muy confiables, para monitorear productos químicos ambientales mostrando su utilidad en la investigación de mutagénesis
9. Se pueden hacer comparaciones entre diferentes ensayos con los resultados de genotoxicidad disponibles para una serie de productos evaluados
10. Se han mostrado resultados positivos en correlación con los ensayos citogenéticas de mamíferos
11. Pueden ser combinadas con ensayos microbianos para detectar metabolitos mutagénicos (promutágenos)
12. Son muy sensibles (poco falsos negativos) en la predicción de carcinogenicidad de agentes evaluados

- |   |
|---|
| 13. Pueden ser monitoreados varios cientos de loci genéticos (cromosoma donde está localizado un gen u otra secuencia de ADN, como su dirección genética) |
|---|

### 2.3 Genotoxicidad

Se entiende como genotoxicidad a la acción de un agente o sustancia que interactúa de una forma directa o indirecta con el ADN, modificándolo y afectando su integridad, también denominado como genotóxicos o xenobióticos. El daño inducido no solo incluye al material genético del ADN, sino a todos aquellos componentes celulares que se encuentran relacionados con la funcionalidad y comportamiento de los cromosomas dentro de la célula. Algunos ejemplos son las proteínas que intervienen en la reparación, condensación y descondensación del ADN en los cromosomas, u otras estructuras como el huso mitótico, responsable de la distribución de los cromosomas durante la división celular [28].

Los Xenobióticos se clasifican en tres categorías de acuerdo con su origen: químicos, físicos y biológicos. La primera categoría está constituida por los compuestos químicos, la segunda incluye las radiaciones en todo su espectro y la última algunos parásitos, bacterias, hongos, vegetales o incluso virus. La acción o capacidad de inducir daño de estos xenobióticos está influida por la dosis recibida y el tiempo o vía de exposición, junto con la constitución genética del individuo que pueda definir una susceptibilidad propia o particular [29].

A su vez, los xenobióticos también pueden clasificarse de acuerdo con su modo de acción o efectos en mutagénicos, carcinógenos o teratógenos, dando lugar a tres tipos de procesos: mutagénesis, carcinogénesis y teratogénesis. La mutagénesis abarca los distintos tipos de alteraciones genéticas, dichas alteraciones (mutaciones) pueden producirse a nivel de una unidad mínima de información (como por ejemplo un gen) o a nivel de unidades mayores como grupos estructurales (cromosomas) correspondiente a lo que se denomina micro mutación o macro mutación, respectivamente. En el caso de las macro mutaciones, se define como agentes clastógenos a aquellos capaces de incidir rupturas cromosómicas, y agentes aneunógenos, a aquellos que producen la pérdida de cromosomas enteros o grupos de cromosomas. Las mutaciones pueden producirse sobre las células somáticas y/o germinales, siendo en este último caso heredable si son transmitidas a la descendencia. La carcinogénesis es un proceso que involucra cambios (transformación celular) de tipo irreversible, a través de una serie de estadios (iniciación, promoción y progresión). Se ha observado que la mayoría de los carcinomas están asociados entre un 90-95% de los casos a agentes químicos, entre un 1-5% a agentes físicos (radiaciones) y entre 1-

2% a agentes de tipo biológico o virus. Por otra parte, la teratogénesis, implica el daño inducido sobre el organismo en desarrollo, es decir, en algunos de los distintos periodos de gestación o a lo largo de la misma como proceso [14]-[28]-[30].

Una vez que se producen los efectos carcinogénicos y teratogénicos de las sustancias químicas, estos se suelen considerar consecuencias tóxicas irreversibles [31].

## **2.4 Ensayo de MN**

El ensayo de MN está considerado como un ensayo práctico, universalmente validado y accesible tecnológicamente, útil para la detección del daño genotóxico, producido por diferentes sustancias químicas y agentes físicos, indicando el daño de agentes mutagénicos sobre los cromosomas, mediante la identificación de fragmentos acéntricos y/o cromosomas rezagados. La técnica de MN es utilizada por su alta confiabilidad y bajo costo, contribuyendo al éxito y adopción de este biomarcador para estudios, *in vivo e in vitro*, de daños al genoma humano o vegetal [32]-[33].

Los MN son unas estructuras derivadas del núcleo de las células, pero como su nombre lo indica, son más pequeños que este. Durante la división celular, el material genético (ADN) contenido en el núcleo celular se replica y divide equitativamente dando lugar a dos células hijas idénticas. Este proceso puede producirse equívocamente debido a errores durante la replicación y posterior división del ADN, roturas cromosómicas, efecto de la radiación y de sustancias genotóxicas; lo que trae como consecuencia, pérdida de cromosomas y que el reparto del material genético no sea equitativo. Las roturas cromosómicas darán lugar a fragmentos cromosómicos acéntricos, que al no disponer de centrómero o cinetocoro no serán incluidos en los núcleos hijos, en la figura 1 se muestra la estructura que tiene un cromosoma. Estos fragmentos se rodean de membrana nuclear y aparecen en el citoplasma como pequeños núcleos que son visibles al microscopio óptico [32]-[34], existen dos mecanismos conocidos por los cuales se pueden formar micronúcleos:

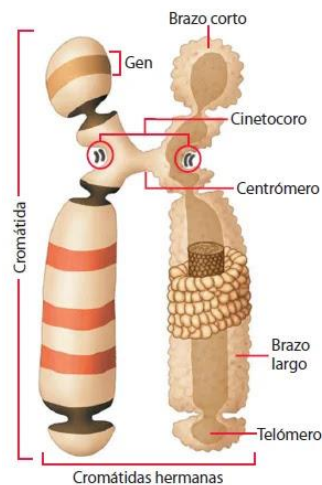
- 1.- Pérdida mitótica de fragmentos acéntricos: provocado por agentes clastogénicos, como son las radiaciones y algunos medicamentos antineoplásticos (como la ciclofosfamida, la arabinosa-c el busulfan y el metotrexate), que actúan como análogos de base. Por lo tanto, se intercalan en el ADN, e inhiben su síntesis y ocasionan posteriormente un debilitamiento de enlace entre las bases, lo que termina por producir una fractura cromosómica

2.-Pérdida mitótica de cromosomas completos: provocado por agentes aneuploidógenos (como la colchicina, vincristina y vinblastina), se caracterizan por bloquear la polimerización de microtúbulos durante la formación del huso mitótico; originando de esta manera el rezago de cromosomas completos.

En ambos casos; no se logran incorporar al núcleo de las células hijas; lo que permite diferenciarlos, es por el tamaño de los MN o la presencia del centrómero o cinetocoro. Si el daño es clastógeno se formarán MN pequeños, pero si es un efecto aneuploidógeno será la formación de MN grandes, en la figura 2 se puede observar el esquema de formación de MN dependiendo del daño ocasionado al ADN. Estos eventos pueden ocurrir espontáneamente, sin embargo, en presencia de ciertos agentes endógenos [35-37] o exógenos, la presencia de MN incrementa; convirtiéndose estos, en indicadores del efecto de agentes mutagénicos, genotóxicos o teratógenos [38].

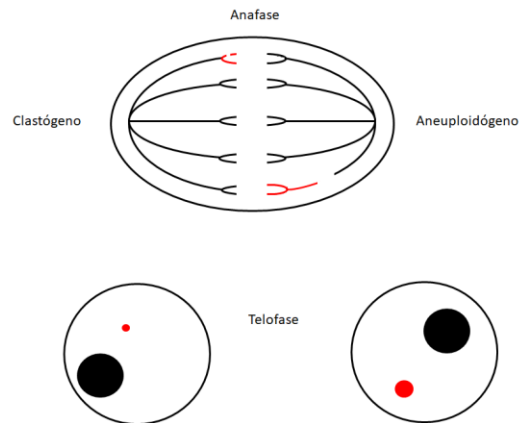
Los MN pueden persistir en la célula y en la siguiente división celular pueden replicar su ADN de forma asincrónica y defectuosa dentro del MN lo que provocaría la pulverización de cromosomas [39].

**Figura 1.** Estructura de un cromosoma



Fuente: Rojotse [40].

**Figura 2.** Esquema de la formación de MN con daño clastógeno y aneuploidógeno,



Fuente: C. I. Buduba [41].

La forma de los MN es generalmente redonda u ovalada, con un diámetro que varía desde 0,4 a 1,6 micras. Su formación ocurre en anafase de la mitosis donde el fragmento cromosómico que no posea centrómero no podrá integrarse a un núcleo hijo por carecer del elemento indispensable para orientarse en el huso acromático. Luego, en la telofase, los cromosomas normales, así como los fragmentos que posean centrómeros, dan origen a los núcleos de las células hijas. Sin embargo, los elementos rezagados, que pueden ser fragmentos o cromosomas completos, quedan incluidos en el citoplasma de las células hijas y una proporción de ellos se transforma en uno o varios núcleos secundarios. Tales núcleos son mucho más pequeños que el núcleo principal, esto también pasa si se daña el funcionamiento del aparato mitótico [34]-[42]. En la figura 3 se muestra la formación de MN en células de *Vicia faba*.

**Figura 3.** Micronúcleo en una célula de *V. faba* (400x de aumento)



Fuente: Souguir [43].

Para llevar a cabo la realización de la prueba de MN y el conteo de estos, es necesario utilizar un tejido que este en constante división como por ejemplo el epitelio de la mucosa oral o las células meristemáticas de las plantas. Una de las ventajas de la técnica de MN es la facilidad y rapidez con que se obtienen los



resultados, la posibilidad de probar un solo químico sin otros compuestos, la abundancia de células analizables en diferentes periodos del ciclo celular y el hecho de que los MN formados durante la división celular persisten al menos durante la siguiente interfaz. Entre sus limitaciones está que la prueba no detecta agentes que no producen fracturas o rezagos anafásicos (esto es, aberraciones que no implican la ocurrencia de fragmentos acéntricos como translocaciones e inversiones); tampoco es útil en poblaciones celulares que no se dividen, ni cuando se prueban carcinógenos órgano-específicos o especie-específicos [44]. Gracias a la ventaja de utilizar bioensayos para la detección de genotóxicos, se han buscado organismos que puedan ser utilizados como indicadores de daño genotóxicos. Para el caso particular de los MN, estos organismos deberán responder formando MN en número suficiente para que al exponerlos al probable agente genotóxico se observe un incremento significativo en el número de MN [45], para la determinación de la frecuencia de MN se utiliza la siguiente formula:

**Ecuación 1.** Ecuación para calcular la frecuencia de MN

$$\% MCN = \frac{\text{Numero de celulas con MN}}{\text{Numero total de celulas contadas}} \times 100$$

Fuente: Flores-Maya *et al.* [46].

Se ha demostrado que la prueba de MN permite la detección de la genotoxicidad del agua subterránea contaminada por actividades agrícolas, industriales o rellenos sanitarios que haya alrededor de la región [47].

## **2.5 Relación ante la presencia de MN con daño genotóxico**

Los biomarcadores se utilizan para medir una interacción entre un sistema biológico y un agente de tipo químico, físico o biológico, la cual es evaluada como una respuesta funcional o fisiológica, que ocurre a nivel celular o molecular y además está asociada con la probabilidad del desarrollo de una enfermedad. La interacción depende de las características heredadas y adquiridas del individuo (o del sistema biológico), y de las circunstancias de la exposición, y como resultado es posible no encontrar efecto o tener algún efecto adverso. Las consideraciones que deben tenerse en cuenta para la evaluación son: la dosis, la vía de contacto, la duración y frecuencia de exposición con el agente [48].

Es por ello, por lo que el riesgo de sufrir deterioro de la salud puede ser evaluado a través de uso de biomarcadores. Se pueden comprender y utilizar como una herramienta útil en la prevención de tumores en la detección temprana de efectos secundarios, como envejecimiento precoz y enfermedades crónico-

degenerativas (enfermedades causantes de un desgaste físico y/o mental en las personas provocando un desequilibrio que afecta tanto a órganos como a los tejidos. Su origen puede ser congénito o hereditario, por ejemplo, diabetes y padecimientos cardíacos), debido a que los MN se forman durante la transición de metafase-anafase en mitosis [49], permitiendo tener una estimación de los cambios del material genético, posibilitando un diagnóstico del efecto en el ADN [50].

La presencia de MN y otras anomalías nucleares de tipo morfológico están estrechamente ligadas a las aberraciones mitóticas generadas como consecuencia de los ciclos de rotura, fusión y puente (BFB por sus siglas en inglés). Estos ciclos empiezan cuando, ante la presencia de roturas de la cadena del ADN y/o del acortamiento de los extremos cromosómicos (telómeros), pueden ser restaurados de forma eficaz por una maquina compleja enzimática de reparación, pero si los mecanismos de reparación del ADN fallan se producen fusiones incorrectas entre cromosomas llegando a degradar el ADN, afectando la salud del organismo. Estas fusiones favorecen la aparición, durante la división celular, de unas estructuras llamadas puentes anafásicos. Estos puentes se pueden romper y generar otras roturas que, de nuevo, pueden desembocar en la formación de puentes. De esta manera la célula entra en un ciclo persistente de BFB, el cual está considerado actualmente como una de las causas principales de inestabilidad cromosómica en cáncer [42].

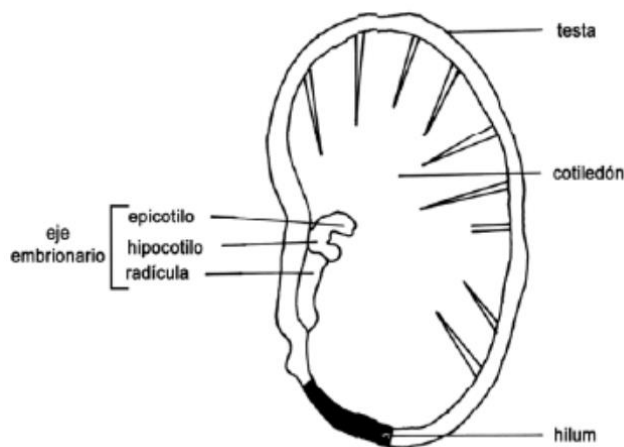
Las personas se hallan expuestas a numerosos tóxicos que están presentes en el medio ambiente, y que pueden penetrar en el organismo humano a través del tracto gastrointestinal, por ingestión de comida y/o bebidas contaminadas. La probabilidad de que el daño genético produzca una enfermedad depende en última instancia de la naturaleza del daño, la capacidad que posee la célula para reparar o amplificar el daño genético, la oportunidad de expresar cualquier alteración que se haya inducido y la capacidad del cuerpo de reconocer y suprimir la multiplicación de células aberrantes. Es razonable suponer entonces que, si un contaminante no causa daño detectable a las especies más sensibles, no afectará significativamente a otras especies [51].

La prueba de MN es de fácil aplicación tanto en grupos de población expuestos a un genotóxico, como para analizar posibles genotóxicos, por lo cual, es una alternativa para estudios a gran nivel y está tomando gran importancia implementándolo como un biomarcador útil en salud ambiental ofreciendo grandes avances en su validación como marcador predictivo de salud [39]. Los MN se han usado en diferentes bioensayos para evaluar la genotoxicidad de una amplia variedad de efluentes y desechos industriales y así proveer datos que permitan realizar análisis comparativos de riesgos [26]-[52].

## 2.6 Características generales de la semilla de *Vicia faba*

Las semillas *Vicia faba* L., son de forma ovalada, de superficie lisa, opaca y brillante, de coloración muy variada, que va desde colores oscuros hasta los claros, midiendo 3.5 cm aproximadamente de largo y alcanzando un peso promedio por semilla de 1,2 y 1,8 g. En la figura 4 se puede observar cómo es la fisiología de la semilla, la cual se compone por la testa, los cotiledones y el eje embrionario; en el punto en que la semilla se conecta con la vaina a través de funículo, existe una cicatriz que corresponde al hilum. Prácticamente junto a uno de los extremos del hilum se presenta el micropolo que corresponde a una abertura natural microscópica, a través de la cual ingresa agua a la semilla en los estados tempranos de germinación. Los cotiledones, por su parte protegen al eje embrionario y lo proveen de nutrientes durante la germinación y el establecimiento. El eje embrionario está formado por la radícula, el hipocotilo, el epicotilo, la plúmula y las dos hojas vestigiales [53]-[54].

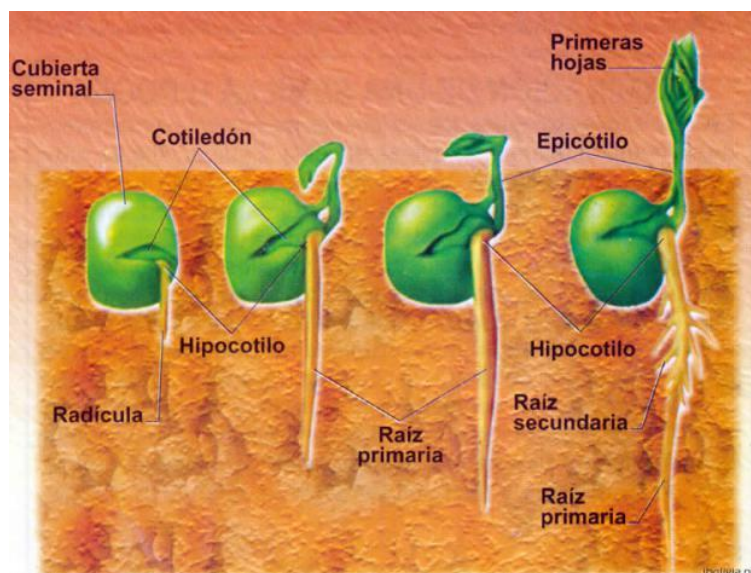
**Figura 4.** Fisiología de la semilla *Vicia faba* L. Major



Fuente: C. Goyoaga, [55]

La membrana protectora de la semilla es impermeable y es un factor importante para la conservación de la vitalidad. La energía germinativa en esta especie disminuye notablemente después de 5 o 6 años. La semilla es de germinación hipógea, es decir la testa y los cotiledones permanecen bajo tierra, además, las semillas de *V. faba* son fotoblástica negativa lo que indica que su germinación se inhibe con la luz, en la figura 5 se puede observar las diferentes etapas de germinación de la semilla [56].

**Figura 5.** Esquema que ilustra las diferentes etapas de la germinación de la semilla de *V. faba*



Fuente: R. Horque, [39].

Una amplia gama de organismos “modelo” son utilizados en los bioensayos *in vitro*, que incluyen desde células o cultivos de células denominadas líneas celulares hasta organismos más complejos como plantas de interés agrícola u otros organismos importantes por sus implicaciones en la nutrición, producción y la salud animal o la salud pública [57].

Las semillas de haba comúnmente se utilizan como modelo biológico, debido a que es un organismo que por sus características, permite obtener resultados de la citotoxicidad (daño de las células) o genotoxicidad (daño de la información genética), provocada por diversos componentes químicos en sus meristemas radicales en cortos tiempos; pueden ser mantenidos en espacios pequeños a bajo costo y son fáciles de trabajar para la observación de las células en división, posee pocos y grandes cromosomas (su genoma tiene  $2n = 12$  cromosomas, constituido por un par de cromosomas metacéntricos con satélites y cinco pares de cromosomas acrocéntricos), y por lo tanto, permite visualizar daños asociados al material genético con relativa facilidad, debido a que tiene la propiedad de alterarse ante sustancias contaminantes [58].

Dentro de las alteraciones citogenéticas en células de raíz de habas expuestas a contaminantes se encuentran: alteraciones en el índice mitótico, la formación de MN y la presencia de mitosis atípicas, que son conocidas como biomarcadores que permiten evaluar la intensidad de exposición o riesgo para la salud. El tener información sobre la respuesta de cultivos particulares a la contaminación puede ser de

gran importancia para garantizar la seguridad alimentaria de la población en general [59]. Se han utilizado en la determinación tóxica de los plaguicidas, metales pesados como cadmio, aguas contaminadas con arsénico, lixiviados, para la determinación de la clastogénesis de los desechos y efluentes industriales, aceite automotriz usado, entre otros [47].

## **2.7 Ensayo de viabilidad**

Para llevar a cabo los bioensayos utilizando semillas, es importante realizar un estudio, por lo regular las semillas comienzan a deteriorarse manifestándose por la progresiva pérdida de su capacidad de germinar o también llamada viabilidad. La viabilidad de un lote de semillas, no durmientes, hace referencia a su capacidad de germinar y de germinar plántulas normales en condiciones ambientales favorables. El tiempo que tardan las semillas en perder su viabilidad varía de acuerdo con la especie, así como de factores externos como la temperatura ambiental, y factores internos como la humedad y genotipo por mencionar algunos, en el caso de la semilla de haba pueden guardarse por dos años [60]. Dada la importancia de todos estos aspectos en el ámbito de la fisiología y tecnología de semillas, se han desarrollado diferentes protocolos para evaluar la viabilidad y vigor de las semillas, así como para lograr condiciones de almacenamiento que aseguren una mayor longevidad. Para evaluar y cuantificar la viabilidad se pueden realizar diferentes tipos de prueba, entre los que destacan: ensayos de germinación, test del tetrazolio, radiografía con rayos X y método de flotación [61].

El método de absorción o flotación es un método práctico que consiste en la separación de semillas vanas de las semillas llenas para esto se ponen las semillas en un recipiente con agua procurando que las semillas queden cubiertas por el agua dejándolas durante 24 horas, no se deben poner demasiadas semillas, de lo contrario las que flotan podrían impedir que caigan las que deberían hundirse esto debido a que en un principio flotan tanto las semillas llenas como las vacías. Transcurrido el período de tiempo las semillas llenas absorben agua, se hacen más pesadas y se hunden. Este método es útil cuando entre los pesos específicos de las semillas llenas y las vacías existe una diferencia muy pequeña [5]-[62]-[63].

Para el caso de los bioensayos que utilizan semillas como organismo de prueba, es importante llevar a cabo este tipo de ensayo debido a que ofrece una primera información respecto a la calidad de las semillas. En ella se permite definir el porcentaje de semillas viables, es decir, la tasa máxima de germinación que se puede obtener [64]. Para determinar el porcentaje de viabilidad se utiliza la siguiente ecuación:

**Ecuación 2.** Ecuación para calcular el porcentaje de viabilidad por la técnica de flotación.

$$\% \text{ de viabilidad} = \frac{(\text{No. de semillas totales} - \text{No. de semillas flotantes})}{\text{No. total de semillas}} \times 100$$

Fuente: Pronatura Veracruz [65].

El poder germinativo se refiere a las semillas que germinan en cualesquiera que sean las condiciones de germinación y los tratamientos realizados. Por lo tanto, se refiere al porcentaje de semillas vivas [64], para determinar dicho porcentaje se utiliza la siguiente ecuación:

**Ecuación 3.** Ecuación para calcular el porcentaje de germinación

$$\% \text{ de Germinacion} = \frac{\text{No. de semillas germinadas}}{\text{No. total de muestra}} \times 100$$

Fuente: M. Bonilla Vichot [66].

## 2.7 Células meristemáticas en plantas

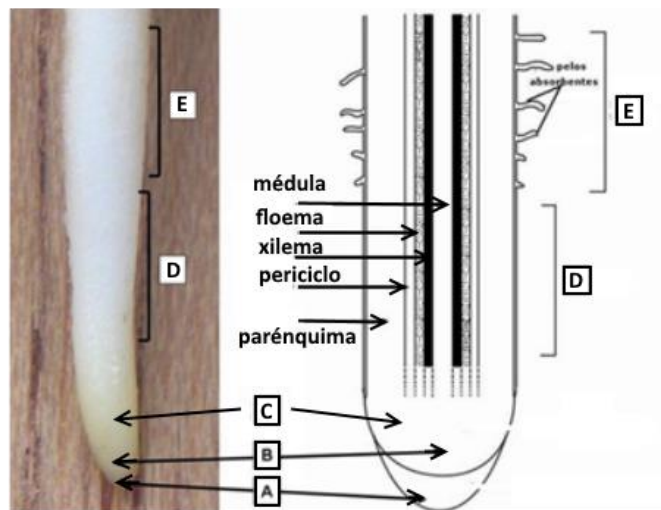
Los meristemos son los responsables del crecimiento permanente de las plantas debido a que tienen una alta capacidad de división celular y están presentes durante toda la vida de éstas, son similares a las células madre en animales, las células meristemáticas se dividen para dar origen a una célula hija que continúa siendo meristemática y otra que se diferencia [67].

Las células meristemáticas presentan las características citológicas de las células indiferenciadas. Son pequeñas, isodiamétricas y tienen una pared celular primaria delgada. Su citoplasma contiene características propias, como abundantes ribosomas, un retículo endoplasmático rugoso escaso, el complejo de Golgi muy desarrollado para fabricar los componentes de la pared celular, numerosos proplastidios, una cantidad variable de pequeñas vacuolas y un citoplasma desprovisto de inclusiones. El núcleo tiene mucha cromatina condensada, es grande y se sitúa en posición central. Las células meristemáticas son células totipotentes, también conocidas como células madre vegetales, que se dividen por mitosis y posteriormente se diferencian para originar el espectro entero de tipos de células de una planta adulta [68]-[69].

Los meristemos se clasifican de acuerdo con la localización en la planta llamados meristemos apicales, estos se encuentran en los extremos de tallos y raíces, meristemos laterales tienen forma de cilindro y este alrededor de ramas y raíces y los meristemos intercalares que se ubican en la base de los entrenudos. También se clasifican de acuerdo con el momento de su aparición, aquí se encuentran los meristemos

primarios, pueden ser apicales e intercalares, son los causantes del crecimiento en longitud en la primera etapa del desarrollo, sus células se dividen por tabicación anticlinal. Los meristemos apicales se sitúan en el ápice del tallo y en el de la raíz principal, se formarán la protodermis, que origina la epidermis, el procámbium, que produce el cámbium vascular y éste a su vez los tejidos conductores primarios (xilema y floema primarios), y el meristemo fundamental, que dará lugar al resto de los tejidos de la planta., mientras que, los meristemos caulinares producen el desarrollo del ápice caulinar, por el que se formarán el tallo y hojas, en la figura 6 se muestra los meristemos radicales en la especie vegetal de *V. faba*. En la fase reproductiva se forman los órganos reproductores. Los meristemos radicales forman el ápice radical por el que crecerá la raíz [68].

**Figura 6.** Imagen de una raíz de haba (*Vicia faba*) y un esquema a lado derecho que ilustra las diferentes zonas de la raíz. (A) Cofia o caliptra, (B) Meristema apical, (C) Zona de transición, (D) Zona de alargamiento o crecimiento, (E) Zona pilífera.



Fuente: Jreguart [70]

### **III Objetivo general**

Analizar el daño genotóxico en células meristemáticas de la especie *Vicia faba* expuestas a lixiviado crudo, diluido y pretratado mediante el ensayo de inducción de micronúcleos.

#### **3.1 Objetivos específicos**

- 1.- Determinar el porcentaje de viabilidad en las semillas de haba mediante el método de flotación para asegurar la confiabilidad del ensayo de germinación.
- 2.- Determinar el porcentaje de germinación en semillas de haba en condiciones controladas de temperatura, humedad y oscuridad.
- 3.- Estandarizar el ensayo para la inducción de MN en las células meristemáticas por exposición a muestras de lixiviado crudo y pretratado.
- 4.- Determinar si existe o no presencia de MN en las células meristemáticas de haba, expuestas a lixiviados como indicador de efecto genotóxico.



#### IV. Metodología

Las pruebas de germinación e inducción de MN para las semillas de *V. faba* se realizaron de acuerdo con la metodología de Juárez [71], con algunas modificaciones acorde a las condiciones de trabajo del Laboratorio de Toxicología y Salud Ambiental de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas.

El lixiviado crudo se obtuvo del relleno sanitario “San Francisco Tucutzano” de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, el lixiviado pretratado fue proveniente de un proceso de tratamiento de tipo biológico, en un sistema de biorreactores empacados con materiales estabilizados (BEME), el desarrollo y análisis para su caracterización se reportó por Pérez-López [72].

Las semillas con las que se realizó el bioensayo fueron habas medianas. En la tabla 2, se muestran las especificaciones de las semillas.

**Figura 7.** Semillas de Haba de la marca Horta flor, rancho Los Molinos



**Tabla 2.** Especificaciones de la semilla de *V. faba*

Especie	Procedencia	No. De lote	P <sub>1000</sub> (kg)	Pureza (%)	Germinación (%)
<i>Vicia faba</i> (mediana)	Rancho los molinos	6290	0.60	99	>85

#### 4.1 Almacenamiento

Las semillas se almacenaron a una temperatura de 4° C en un lugar seco dentro de bolsas herméticamente selladas para evitar su degradación, antes de ser utilizadas en los ensayos, los cuales se realizaron en el periodo de octubre-diciembre de 2019

#### 4.2 Ensayo de viabilidad

Para el ensayo de viabilidad se seleccionaron previamente 100 semillas considerando las características de mismo tamaño, grosor, carencia de picaduras o rupturas. Posteriormente se colocaron dentro de un recipiente de vidrio de aproximadamente 22 cm de diámetro por 17 cm de altura, al cual se le añadió agua de garrafón cubriendo todas las semillas, después se forró con papel aluminio la superficie del recipiente y se dejó reposando durante 24 horas a completa oscuridad. Transcurrido ese tiempo se verificaron y contaron las semillas que flotaron, siendo estas las semillas no viables. Para determinar el porcentaje de viabilidad se utilizó la ecuación 2 [65].

**Figura 8.** Imbibición de la semilla para la prueba de viabilidad



#### 4.3 Preparación y germinación de las semillas

Las semillas viables se acomodaron entre dos capas de algodón humedecido con agua de garrafón contenido en una charola budinera, la cual, se introdujo a una incubadora (Velp Scientifica FOC 225) con una temperatura de  $21 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  en condiciones de oscuridad para su germinación durante 4 a 5 días o hasta que la raíz principal alcanzó de 2 a 3 cm de longitud. Se estuvieron revisando diariamente para identificar la aparición de la radícula de alguna semilla y así poder remover la testa o cubierta de la semilla (ver Anexo 3-C: F). Pasado los 4 o 5 días, se calculó el porcentaje de germinación, utilizando la ecuación 3.

**Figura 9.** Semillas acomodadas entre dos capas de algodón para su germinación



Una vez que la raíz principal alcanzó la longitud ideal y previa a la exposición de los tratamientos, se eliminó la cofia utilizando un bisturí (recubrimiento protector de la punta de la raíz) que son los últimos 5 mm de la raíz aproximadamente. Se necesitaron de 60 semillas con las características antes mencionadas para trabajar el ensayo de inducción de MN.

**Figura 10.** Eliminación de la cofia de la raíz


















## 4.4 Ensayo de MN

### 4.4.1 Exposición

Se trabajó de la siguiente manera, como control negativo se utilizó agua destilada (T1); para el control positivo se preparó una solución de dicromato de potasio ( $K_2Cr_2O_7$ ) al 0.05% (T2); dentro de las muestras problema se aplicaron lixiviado crudo (T3), lixiviado crudo diluido en una proporción de 1:2 lixiviado: agua, respectivamente para igualar la forma en que ingresó al proceso de pretratamiento (T4) y por último el lixiviado pretratado (T5). Se realizó un diseño de 4 semillas por 3 repeticiones, dando un total de 12 semillas expuestas por tratamiento.

**Figura 11.** Diseño experimental del ensayo de exposición indicando el número de semillas de *Vicia faba* en cada tipo de exposición.

T1	T2	T3	T4	T5
				
				
				

Fuente: Elaboración propia

Para la exposición de las raíces a los diferentes tratamientos se utilizaron cristalizadores de vidrio con un tamaño de 8 cm de diámetro con 4 cm de altura dentro de cada uno se agregó un volumen de 100 ml de cada tratamiento de acuerdo al diseño experimental, los cristalizadores se cubrieron con papel aluminio y con la punta de un lápiz se hicieron 4 perforaciones en el papel de manera que quedaran distribuidos, después de haber hecho las perforaciones se colocaron las semillas de modo que la raíz quedará en contacto con la muestra (ver figura 12), se realizó la exposición durante 6 h a una temperatura de 22 °C en oscuridad. Transcurrido el tiempo, se lavaron las semillas con agua de garrafón y se dejaron en un baño de recuperación por 22 horas con flujo de agua y aireación constante en completa oscuridad a la misma temperatura de 22° C (ver Anexo 3-H: K). Concluido el tiempo de recuperación se cortaron cuidadosamente los últimos 5 mm de la raíz o meristemo utilizando un bisturí y se colocaron en tubos de

ensayo con tapa con volumen suficiente de solución de fijador de Farmer (Ver anexo 2 - e), almacenándolo en el congelador a una temperatura de 4° C hasta su tinción.

**Figura 12.** Exposición de semillas a los diferentes tratamientos



#### 4.4.2 Tinción

Para la tinción de los meristemas, se sacaron los tubos de ensayo del congelador, se retiró por completo la solución Farmer utilizando una pipeta Pasteur, al tubo se le añadieron 4 ml de etanol al 70 % (anexo 2 - d) para después colocar los tubos en un baño María por un tiempo de 10 min a una temperatura de 28°C, transcurrido el tiempo y utilizando otra pipeta de Pasteur se extrajo el volumen de etanol, sustituyéndolo inmediatamente por 4 ml de ácido clorhídrico (HCL) 5 N (anexo 2 - b) para iniciar el proceso de hidrólisis en baño María a temperatura de 28°C durante 20 min, enseguida se descartó el HCL y se realizaron 3 lavados continuos con agua destilada, descartando el sobrante, con ayuda de un papel absorbente se eliminó la mayor cantidad posible de humedad, a continuación se agregaron 4 ml del reactivo de Schiff (anexo 2 - f) colocando los tubos nuevamente a baño María a 28°C por 20 min más, todo el proceso de tinción se realizó en condiciones de oscuridad.

Por último, se retiró el reactivo de Schiff sustituyéndolo con un volumen de 4 ml de pectinasa al 2% dejando a baño María durante 2 h con una temperatura de 28 °C. Al término de este periodo, se sacaron los tubos y se colocaron en agua fría durante 10 min, transcurrido ese tiempo, cada meristemo se colocó sobre un portaobjetos al cual se le adicionó una gota de ácido acético al 45 % (anexo 2 - a), se cubrió con otro portaobjeto realizando la técnica de “squash” que consiste en aplastar el tejido de manera que quede en mono capa.

Para las preparaciones permanentes los portaobjetos con tejido se colocaron sobre una charola budinera y se metieron a un congelador durante 2 h a  $-40^{\circ}\text{C}$ , con la finalidad de que el tejido se adhiriera al portaobjetos y facilitara la separación de este.

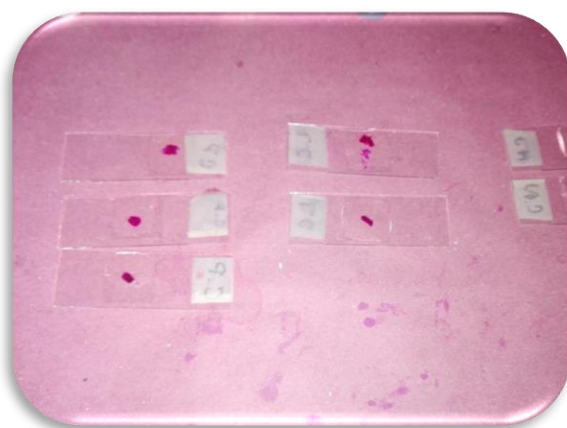
#### 4.4.3 Montaje

Una vez congelado el tejido, con ayuda de un bisturí se desprendió uno de los portaobjetos, procurando no dañar la muestra, consiguiendo que el mismo quedara en el otro portaobjeto.

En la misma charola que contenía las laminillas, se agregaron aproximadamente 100 ml de butanol absoluto de manera que todos los tejidos quedaran cubiertos en su totalidad, se dejó actuar durante 3 min, este último procedimiento se realizó 2 veces. Una vez hechos los baños de las laminillas con butanol absoluto se retiraron de la charola y se secó el exceso del alcohol cuidando de no tocar el tejido, para después colocar una gota de bálsamo de Canadá sobre el mismo y poner un cubreobjeto nuevo sobre la preparación, se dejó secar a temperatura ambiente (ver figura 13). Este mismo procedimiento se aplicó a todas las laminillas.

La cantidad de laminillas fijas para cada tratamiento fue de 12, mismas que corresponden a 12 segmentos de meristemo.

**Figura 13.** Laminillas con muestras fijas de células meristemáticas.



#### 4.5 Cuantificación de MN

Para el recuento de las células, se utilizó un microscopio binocular modelo primo, marca Star Zeiss, las observaciones y cuenta de MN se realizó utilizando el objetivo de 40x, con aumento ocular de 10x.

Se observaron 1,000 células por laminilla dando un total de 4,000 células analizadas por réplica, la cuantificación de los MN se realizó bajo los siguientes criterios [73]:

- 1) Debe tener morfología idéntica a los núcleos principales.
- 2) Debe tener una forma redonda u ovalada.
- 3) Su diámetro debe estar entre 1/16 y 1/3 de los núcleos principales.
- 4) Debe tener el mismo color, textura y retracción que el núcleo principal.
- 5) No debe presentar refringencias (núcleos o partes de núcleos brillosos).
- 6) Debe estar claramente separado del núcleo principal.
- 7) No debe estar sobrepuesto a ninguno de los núcleos.
- 8) El micronúcleo dudoso será descartado en el análisis.

#### 4.6 Análisis estadístico

Las medias de los porcentajes de la frecuencia de MN de *V. faba* L., fueron sometidas a la prueba de ANOVA para determinar si existe diferencias estadísticamente significativas entre las muestras tratamiento, se realizó la prueba de Scheffe para determinar en qué tratamiento o tratamientos estaría la diferencia significativa. Se usó el programa estadístico IBM SPSS Statistics versión 25.0 con una probabilidad de error del 5%.

#### 4.7 Antecedente; caracterización de los lixiviados.

En la caracterización de las muestras de lixiviado crudo, diluido y pretratado en la fase 1 del reactor BEME fue realizado por Pérez-López [72], cuantificando los niveles y concentración de los parámetros que se indican en la tabla 3.

**Tabla 3.** Parámetros fisicoquímicos en las muestras de lixiviados.

<b>Parámetro</b>	<b>Lixiviado</b>		
	<b>Crudo</b>	<b>Diluido 1:2</b>	<b>Pretratado fase 1 BEME</b>
<b>Color (Pt/Co)</b>	11,016.67	6,474.3	3,094.3
<b>Alcalinidad (mg CaCO<sub>3</sub>/L)</b>	8,250	5,450	1,600
<b>pH</b>	8.9	8.7	8.1
<b>DQO (mg de O<sub>2</sub>/L)</b>	5,441.6	2,708.33	1,600
<b>NH<sub>3</sub>-N (mg/L)</b>	224.0	N.A.	0.62
<b>N<sub>T</sub> (mg/L)</b>	385.0	N.A.	0.95

N.A.: Parámetro No Analizado

Fuente: Pérez -López [72].

Para la semilla de Haba, el pH óptimo de cultivo oscila entre 6.0 y 6.5 [74], por ello, es importante medirlo debido a que afecta directamente en la absorción de los nutrientes necesarios para las plantas. El pH y la alcalinidad están ligados porque tienen interacciones importantes en los procesos químicos como la fotosíntesis y respiración celular [75]. Si se utiliza un agua con pH mayor de 7.0, tiene efectos dañinos para las plantas, por lo tanto, si es más alcalinidad, los nutrientes en general no se disuelven con facilidad. Esto puede provocar deficiencia de nutrientes en las plantas, por consiguiente, problemas en su desarrollo como que no lleguen a crecer o que no le salgan hojas [76].

En el caso de la DQO, el valor máximo aceptable para riego es de 500 mg de O<sub>2</sub>/L, mientras mayor sea el valor significa que el agua está más contaminada [77].

Por otro lado, el nitrógeno forma parte de las proteínas, enzimas y clorofila de una planta, por lo que es esencial en los procesos de síntesis de proteínas y en la fotosíntesis, entre sus funciones destaca el



aceleramiento de la división celular y elongación de las raíces. Sin embargo, cuando la planta tiene exceso de nitrógeno presentan crecimiento exagerado debido a que hay una mayor multiplicación celular, haciendo que la planta se vuelva más susceptible a las variaciones ambientales, como las de la humedad y temperatura, además de tener un retraso en la producción, los rendimientos serán menores y la calidad de los productos disminuirá considerablemente [78]. El límite máximo permisible de nitrógeno total y amoniacal en aguas residuales utilizadas para riego va de los 5 a 30 mg/l [79], basándonos en esos datos el lixiviado crudo analizado y el lixiviado pretratado con el sistema BEME no cumple con dicho límite.

El tratamiento del lixiviado crudo utilizando el sistema BEME muestra como resultado una disminución del 72% de color, 81% de alcalinidad, 9% en reducción del pH, 71% en DQO y más del 99% en Nitrógeno total y amoniacal.

## V. Resultados

### 5.1 Prueba de viabilidad y germinación

Para la prueba de viabilidad se empleó el metodo de flotación donde se utilizaron 30 semillas para cada prueba misma que se realizó por triplicado con un total 60 semillas procesadas, para cada experimento se obtuvo un 90 % de viabilidad y un rango de porcentaje de germinación de 81 al 85%, aunque el porcentaje de confiabilidad y aceptación se considera debe ser mayor al 90% de germinación, es importante aclarar que para el ensayo de inducción de MN solo se utilizaron las semillas germinadas y que contaban con la elongación de la radícula, es decir, las pruebas de viabilidad y germinación se realizaron para asegurar el tamaño de muestra de semillas germinadas para el ensayo de MN. Sin embargo, se presentan los resultados obtenidos para ambas pruebas en la tabla 4, para cada réplica.

**Tabla 4.** Porcentaje de viabilidad y de germinación

Experimento	No. de semillas	No. de semillas viables	No. de semillas germinadas	Viabilidad (%)	Germinación (%)
1	30	27	22	90	83
2	30	27	23	90	85
3	30	27	21	90	81
<b>Promedio</b>	<b>30</b>	<b>27</b>	<b>22</b>	<b>90</b>	<b>83</b>

\*El número de semillas empleadas fue de 20 para cada experimento.

De acuerdo a los datos obtenidos de la prueba de germinación, se consiguió un promedio de 83%. La capacidad de germinación, se expresa como la cantidad total de semillas en la muestra que ha germinado en un ensayo. Del punto de vista práctico, esta estadística se parece al valor del porcentaje de semilla plena o completa obtenida en un ensayo de viabilidad [80]. Sin embargo el porcentaje de germinación con respecto al porcentaje de viabilidad disminuyó en un 7%. Esto puede deberse a la longevidad y pérdida de vigor de las semillas, que van sufriendo un paulatino envejecimiento a lo largo de los procesos de cosecha, secado y almacenamiento que debe cumplir con la temperatura adecuada para su conservación y poco contenido de humedad para evitar la afectación de las mismas por crecimiento de organismos o insectos que las afecten [81].

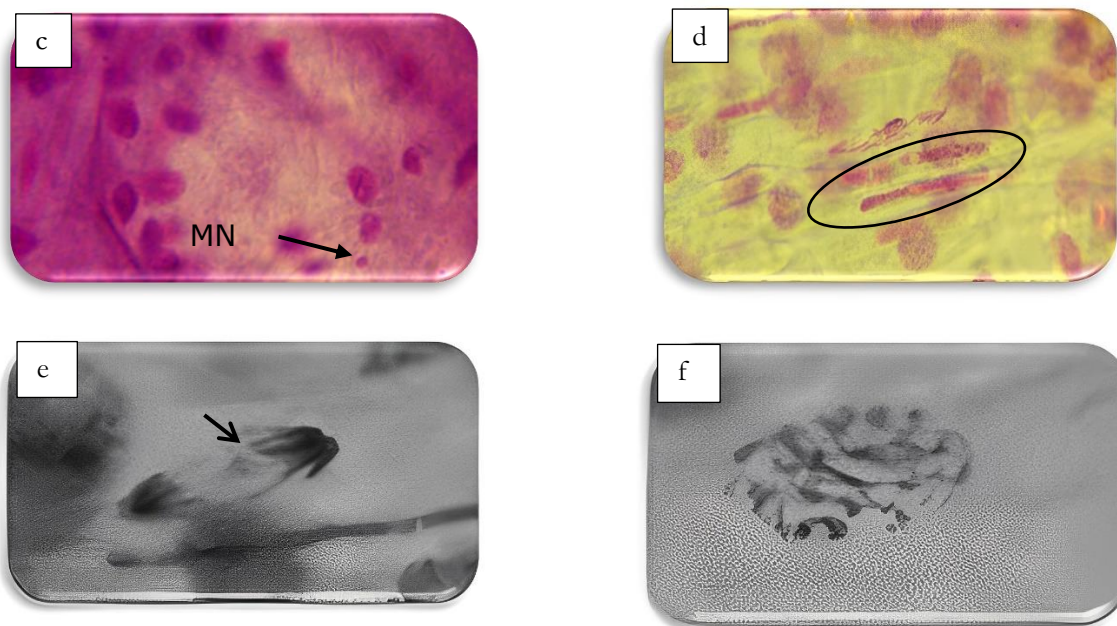
Otro de los factores que pudo intervenir en que no germinaran algunas semillas es el estadio de latencia o dormición, el cual es un estado en el que una semilla viable no germina, aunque se coloque en condiciones de humedad, temperatura y concentración de oxígeno idóneas para hacerlo [82], atribuyéndose principalmente a las gruesas cubiertas seminales de las semillas las cuales constituyen una barrera impermeable al agua y a los gases, o porque ejercen una resistencia física a la expansión de la radícula, impidiendo su germinación [83]. Es importante considerar que las semillas utilizadas son de origen comercial y aunque especifican la fecha de caducidad, se desconoce las condiciones que las semillas tuvieron antes y durante su estancia en anaquel.

## 5.2. Inducción de MN

En la figura 14 se muestran diferentes efectos observados en las células durante la identificación y cuantificación de los MN en las células meristemáticas de haba expuestas a los diferentes tipos de lixiviado.

**Figura 14.** Inducción de MN tras la exposición de raíces de *V. faba* L.



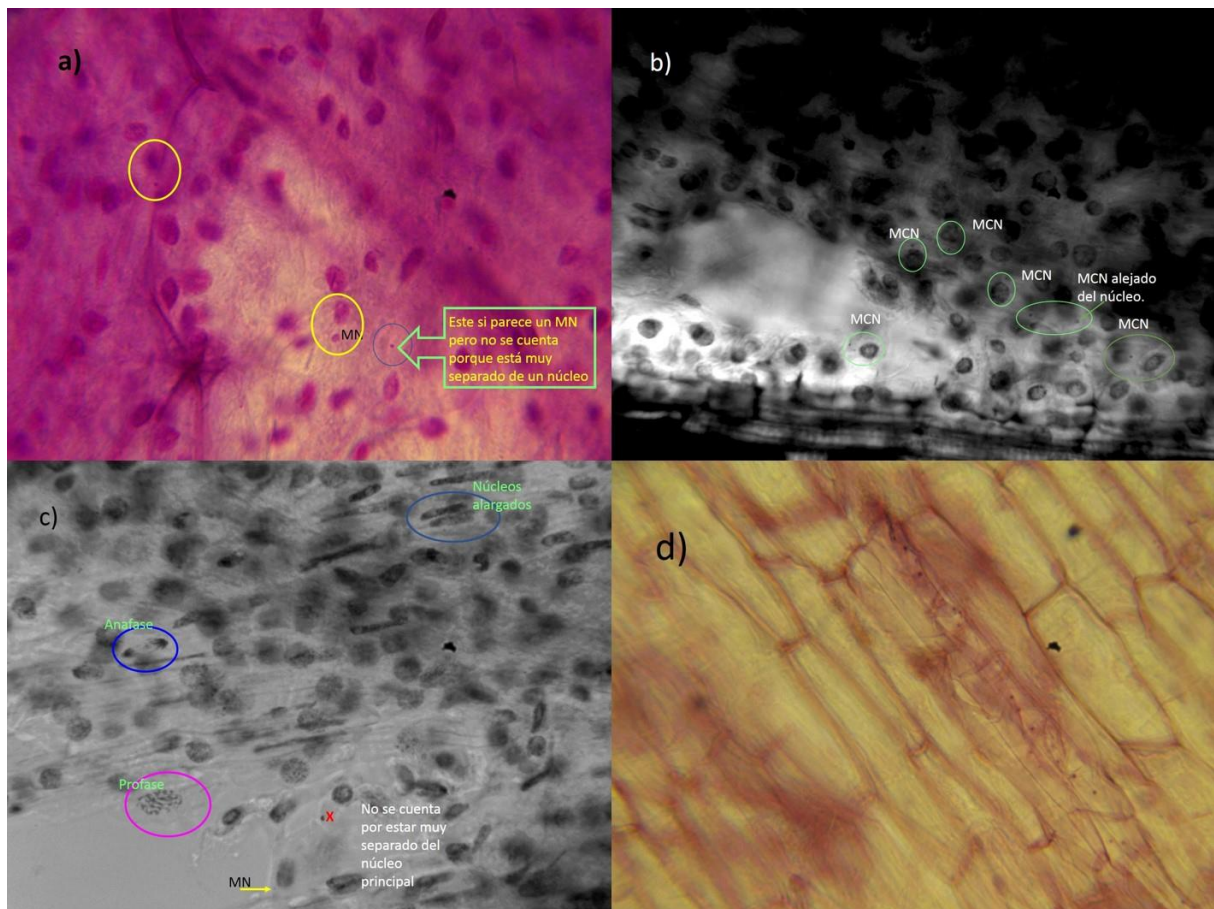


**(a, b y c)** MN observados en las muestras;**(d)** Anormalidades, células alargadas en lixiviado crudo;**(e)** Retraso en la migración de cromátidas;**(f)** Célula en profase.

Uno de los efectos observados en las células de haba fue una anomalía de una célula alargada en el tratamiento de lixiviado crudo, no obstante, no se encontró evidencia de células alargadas en *V. faba* expuesta a lixiviado proveniente del relleno sanitario, sin embargo este efecto ha sido reportado en células de cebolla *Allium cepa* expuestas a biocidas, hidroximetilurea, cafeína y alperujo (subproducto de las industrias del aceite de oliva), concluyendo que esto puede deberse a alteraciones en las señales de elongación y crecimiento celular, que ocurren en las raíces por encima de las células meristemáticas, lo que además indica un retraso en la replicación del ADN y un aumento en el crecimiento celular [84]. Revelando cambios en la morfología nuclear de las células alargadas, encontrando núcleos alargados y desplazados, con una mayor variabilidad en el modelado nuclear, que confirma su fuerte toxicidad [85]-[86].

En la figura 15, se presentan algunas diferencias observadas en las muestras control y de lixiviado crudo que muestran la presencia de MN y fases de ciclo celular. De igual manera se muestra cómo se descartaron algunos de los MN porque no cumplieron con los criterios para su cuantificación.

**Figura 15.** Diferencias observadas en las muestras control y lixiviado crudo con presencia de MN y fases del ciclo celular.



**a).** Control negativo (agua destilada), muestra con menor cantidad de MN; **b)** control positivo (dicromato de potasio) mayor cantidad de MN; **c)** Lixiviado crudo se observan MN y algunas fases del ciclo celular. Se muestran ejemplos de los MN que fueron descartados para la cuantificación; **d)** Células de tejido leñoso de la radícula de haba, dónde no se observan núcleos.

En la tabla 5, se reportan los resultados obtenidos después de analizar cada una de las laminillas por cada tratamiento. Se analizaron 1000 células por cada laminilla de cada tratamiento. Para el caso de control negativo y positivo, solo se analizaron cuatro laminillas, dando un total de 4,000 células analizadas para cada uno, para el caso de los lixiviados la cantidad de células que se analizaron fue de 12,000. En la tabla 6 se encuentra la frecuencia de MN por cada tratamiento en la cual se utilizó la ecuación 1.

**Tabla 5.** Número de MN contabilizados por laminilla.

Experi mento	Laminilla	Tratamiento				
		Control negativo (agua destilada)	Control positivo (K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> al 0.05%)	Lixiviado crudo al	Lixiviado diluido (1:3)	Lixiviado pretratado (Fase 1)
1	1	14	36	39	38	21
	2	----	----	69	39	23
	3	----	----	53	34	18
	4	----	----	80	34	26
2	1	16	52	61	22	17
	2	----	----	62	30	25
	3	----	-----	38	20	21
	4	----	----	58	33	28
3	1	13	48	36	38	21
	2	6	62	56	39	23
	3	-----	-----	66	34	18
	4	-----	----	63	34	26
<b>Promedio ±DE</b>		12.25±4.34	49.50±10.75	56.75±13.39	32.91±6.21	22.25±3.54

**Tabla 6.** Frecuencia de MN por laminilla.

Experimen to	Laminilla	Tratamiento				
		Control negativo (agua destilada)	Control positivo (K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> al 0.05%)	Lixiviado crudo	Lixiviado diluido (1:3)	Lixiviado pretratado (Fase 1)
1	1	1.40	3.60	3.90	3.80	2.10
	2	----	----	6.90	3.90	2.30

2	3	----	----	5.30	3.40	1.80
	4	----	----	8.00	3.40	2.60
	1	1.60	5.20	6.10	2.20	1.70
	2	----	----	6.20	3.00	2.50
3	3	----	-----	3.80	2.00	2.10
	4	----	----	5.80	3.30	2.80
	1	1.30	4.80	3.60	3.80	2.10
	2	0.60	6.20	5.60	3.90	2.30
	3	-----	-----	6.60	3.40	1.80
	4	-----	----	6.30	3.40	2.60
	<b>Promedio</b>	1.22±0.43	4.95±1.07	5.67±1.33	3.29±0.62	2.22±0.35
	<b>±DE</b>					

De acuerdo con MMAyA [30], los resultados se consideran positivos si hay un aumento significativo en la frecuencia de células con MN en comparación con el control negativo. En este sentido, se puede decir que la muestra problema tiene riesgos genotóxicos si el número de MN formados en esta es igual mayor al doble de los formadas en el control negativo.

$$MN_{Tratamiento} \geq 2MN_{Control\ negativo} = \textit{Tiene riesgo genotóxico}$$

Por otro lado, los resultados se consideran negativos si no hay un aumento significativo en la frecuencia de MN. Es decir, si en la muestra problema, el número de MN formados es menor al doble de MN formados en el control negativo, se dirá que el agua no tiene riesgos genotóxicos.

$$MN_{Tratamiento} < 2MN_{Control\ negativo} = \textit{No tiene riesgo genotóxico}$$

Sustituyendo los valores de la frecuencia de MN de cada tratamiento y el valor de la frecuencia de MN del control negativo (1.22) obtenemos que:

**Tabla 7.** Resultado del efecto genotóxico en los tratamientos

Tratamiento	Resultado
Control positivo	4.95 > 2.44 = Tiene efecto genotóxico
Lixiviado crudo	5.67 > 2.44 = Tiene efecto genotóxico

<b>Lixiviado diluido</b>	$3.29 > 2.44 =$ Tiene efecto genotóxico
<b>Lixiviado pretratado</b>	$2.22 < 2.44 =$ No tiene efecto genotóxico

Los resultados de la frecuencia de MN de lixiviado crudo y diluido en comparación con el control negativo, es mayor, lo que nos indica que ambas muestras tienen un efecto genotóxico en las células de haba, para el caso del lixiviado pretratado, este resultó ser menor con respecto al control negativo, indicando que el efecto genotóxico es negativo.

### 5.3 Análisis estadístico

Se analizaron los datos utilizando ANOVA para valorar diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos y confirmar lo expuesto anteriormente.

Se realizó un análisis de varianza de un factor y comparaciones múltiples de promedios ( $P < 0.05$ ). Por lo que se toma en cuenta las siguientes hipótesis:

**Ho.** Cumpliendo con el supuesto de homogeneidad, no hay diferencias estadísticamente significativas entre las varianzas de los diferentes grupos.

**H1.** No Cumpliendo con el supuesto de homogeneidad, hay diferencias estadísticamente significativas entre las varianzas de los diferentes grupos.

Para ello, se realizó el estadístico de Levene, el cual nos permite contrarrestar la hipótesis de que la varianza de los tratamientos es igual. Junto con el valor estadístico de Levene (3.694) aparecen los grados de libertad de su distribución ( $gl_1=4$ ,  $gl_2=39$ ) y el nivel crítico o probabilidad de obtener valores como el obtenido o mayores (significancia= 0.012). Puesto que el nivel crítico ( $P=0.012$ ) es menor que  $P=0.05$ , se debe rechazar la hipótesis de igualdad de varianzas y concluir que, en los 5 tratamientos utilizados, las varianzas de la variable de frecuencia de MN son diferentes estadísticamente.

**Tabla 8.** Prueba de homogeneidad de varianzas

Estadístico de Levene	gl1	gl2	P
<b>3.694</b>	4	39	0.012

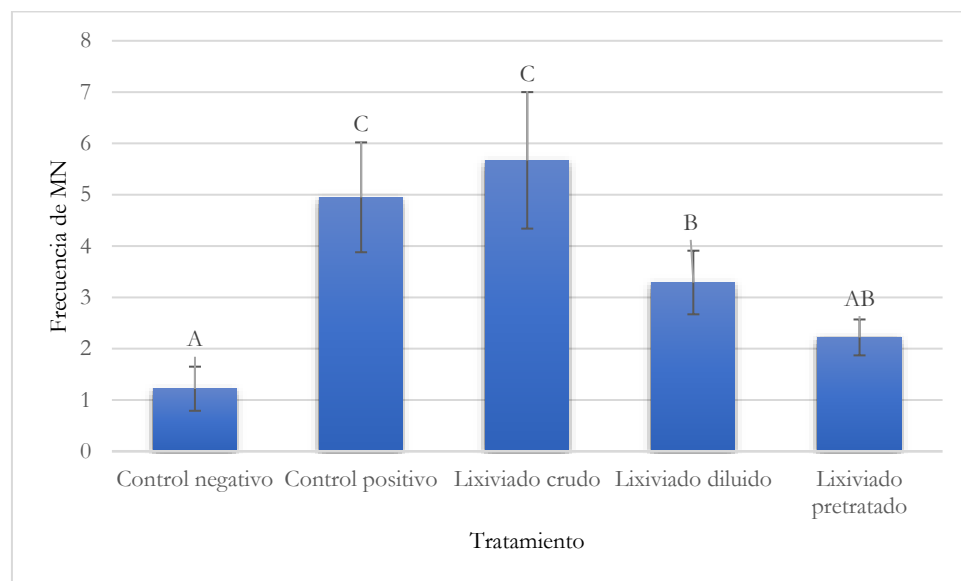
El estadístico F (34.920) del ANOVA permitió contrarrestar la hipótesis general de que los promedios comparados no son estadísticamente significativos. Al rechazar esa hipótesis, las medias de los tratamientos comparados existen diferencias estadísticamente significativas.

**Tabla 9.** Prueba de ANOVA de un factor

F	p
34.920	0.000

Para saber que medias son estadísticamente significativas, se utilizó un tipo particular de contraste denominado; comparaciones múltiples Post hoc, estas comparaciones permiten controlar la tasa de error. Utilizando el método de Scheffe debido a que no todos los tratamientos tienen el mismo número de datos. En la gráfica 1, se muestran los resultados

**Gráfica 1.** Frecuencia de MN en raíces de *Vicia faba* expuestas a los diferentes tratamientos.



Letras iguales indican que no hay diferencia significativa entre los tratamientos según ANOVA-Prueba de Scheffe,  $P=0.05$

De acuerdo con las frecuencias de MN de cada tratamiento, se encontró que en el lixiviado crudo presentaron los valores similares en comparación con el control positivo con  $5.67 \pm 1.33$  y  $4.95 \pm 1.07$ , respectivamente, sugiriendo que los tratamientos tienen sustancias genotóxicas, con respecto al control



positivo donde se utilizó dicromato de potasio al 0.05%, este ya ha demostrado su efecto citotóxico y genotóxico en células [87].

Mientras que el lixiviado pretratado presentó un comportamiento bajo con  $2.22 \pm 0.35$  aunque sigue estando por arriba de los valores del control negativo ( $1.22 \pm 0.43$ ), los resultados de la prueba Scheffe sugieren que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre estos tratamientos, por otro lado la prueba de Scheffe también reveló que el lixiviado pretratado y lixiviado diluido con valores de  $2.22 \pm 0.35$  y  $3.29 \pm 0.62$  respectivamente, no existe una diferencia estadísticamente significativa.

Con respecto al lixiviado crudo y diluido, este coincidió con lo reportado por los autores N. Sang y G. Li [88]; encontrando que los lixiviados de vertederos recolectados en diferentes estaciones causaron aumentos significativos de las frecuencias de MN, donde además mencionan que una de las causas por la cual el fuerte efecto genotóxico de los lixiviados crudos puede deberse a las características químicas y físicas de las muestras de lixiviados, como la concentración de DQO y  $\text{NH}_4^+$ .

Además Chandra *et al.*, [89], en su investigación destacaron que el lixiviado maduro que analizaron, de igual forma, indujeron la formación de MN (3.62–7.83); a pesar de estar clasificado como lixiviado estable con compuestos orgánicos menos tóxicos y biodegradables. Un posible mecanismo para MN inducidos por lixiviados puede involucrar la formación de radicales libres, ya sea a través de autooxidación o por oxidación catalizada por enzimas de compuestos orgánicos en el lixiviado, como hidrocarburos clorados y no clorados, incluidos tetracloruro de carbono, clorometano, cloroetano, cloroetileno, ácido decanoico, ácido nonanoico, etc. Estos radicales libres podrían atacar los ácidos nucleicos, provocar la sustitución de bases y la rotura del ADN y, finalmente, inducir mutaciones. [88]-[90]-[91]. Al igual que el papel de los metales pesados y la alcalinidad, los compuestos nitrogenados presentes en los lixiviados han sido ampliamente estudiados, debido a que se relacionan con la generación de efectos potencialmente inhibitorios o tóxicos [92]-[93].

Por otro lado, los resultados del lixiviado pretratado fase 1, indicaron que no existe una diferencia estadísticamente significativa con respecto al control negativo, por lo cual se puede decir que el sistema BEME contribuyó a la disminución en la presencia de MN lo cual se asocia a una disminución del efecto genotóxico, sin embargo, no se puede determinar que sea completamente inocuo. Es necesario determinar otros indicadores como el índice mitótico, aberraciones cromosómicas u otros efectos a nivel celular que confirmen los resultados en este informe.

## VI Conclusión

El porcentaje de viabilidad del 90% en las semillas de haba no aseguró un porcentaje equivalente en el ensayo de germinación que estuvo alrededor del 80%. Sin embargo, el realizar la prueba de viabilidad en condiciones controladas de temperatura y oscuridad nos permitió descartar una proporción importante de semillas no aptas para continuar con el ensayo de germinación.

El porcentaje de germinación pudo ser posiblemente afectado por diferencias en la humedad y posición de las charolas dentro de la incubadora, sin embargo, es importante considerar otros aspectos como el grado de vigor de la semilla, por lo que es importante considerar la realización de pruebas de vigor previas para determinar la calidad fisiológica y asegurar una mayor germinación. Otro factor por considerar es el uso de semillas comerciales de las que no fue posible conocer el tiempo de anaquel, sería importante probar el uso de semillas provenientes de bancos de semillas o bien que cuenten con algún certificado que indique la comprobación de origen y su calidad.

En el caso del bioensayo de inducción de MN en células meristemáticas de haba, demostró la presencia de MN tanto en el control negativo (en menor proporción), como en el control positivo y muestras problema en mayor grado (tratamientos), considerando su inducción con una exposición aguda de 6 h y un tiempo de recuperación de 22 h, indicando un riesgo genotóxico en las células de *Vicia faba* inducido por el lixiviado crudo, diluido y en menor proporción al lixiviado pretratado. Entre los más de 200 bioensayos conocidos en la literatura, las plantas superiores son consideradas como excelentes indicadores de efectos citogenéticos y mutagénicos de contaminantes ambientales. Estos bioensayos son confiables y muy sensibles para el monitoreo y la evaluación de agentes genotóxicos. *Vicia faba* ha sido considerada como un sistema de prueba ideal para evaluar genotoxicidad y ha sido incluida en el programa Gene-Tox del Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos [94].

Los MN han sido considerados por muchos autores como uno de los biomarcadores más sencillos y efectivos para analizar los efectos genotóxicos inducidos por agentes químicos. La formación de MN puede ser resultado de daños directos a los cromosomas o alteraciones al huso y al aparato mitótico, lo que puede causar diferentes problemas de salud y afectar las generaciones futuras de las especies vegetales generando potencialmente un alimento de mala calidad comercial, alimenticia o ecológico [86]. En este sentido los MN identificados y cuantificados en los diferentes tratamientos indican un daño a nivel nuclear, lo cual puede derivar de la degradación del material genético de la especie ante la exposición

principalmente al lixiviado crudo, actuando este como un agente genotóxico en las células vegetales. Este tipo de lixiviado crudo debe ser considerado de importancia para su control, al estar presente en tiraderos a cielo abierto de residuos sólidos y ante la dinámica de interacción con las condiciones del medio ambiente, pueden ser transportados a través del suelo, llegar a cuerpos de agua superficial e infiltrarse en mantos acuíferos contaminando estos medios, provocando el contacto con todo tipo de especies bióticas.

El pretratamiento en el sistema BEME es una alternativa que puede disminuir el efecto tóxico del lixiviado crudo, sin embargo, no se descarta la necesidad de fortalecer los resultados de este informe con el análisis de otros indicadores no evaluados como su influencia en el comportamiento del índice mitótico o diferente tiempo de exposición y recuperación celular, que brinden mayor soporte de su efectividad.

Los datos que se obtuvieron en este estudio son preliminares, sin embargo, es una evidencia experimental de que los lixiviados generados en el relleno sanitario inducen MN en las células de la raíz de *V. faba* de una manera dependiente de la concentración de contaminantes en el lixiviado, y que existe una relación entre esta medición química del lixiviado, el pretratamiento y su nivel de genotoxicidad.

## VII Limitaciones y recomendaciones

Después de llevar a cabo el procedimiento de la prueba de MN se encontraron algunas limitaciones que afectaron al proceso y se identificaron procedimientos que pueden ser sujeto de mejora.

A continuación, se plantean las siguientes limitaciones y recomendaciones

### Limitaciones

1. No contar con el espacio suficiente en el laboratorio para llevar a cabo las réplicas del experimento bajo las mismas condiciones.
2. Una limitación importante que se tuvo durante la prueba de MN fue la dureza del tejido de meristemo por lo que se optó por usar pectinasa para ablandar el tejido y poder realizar la técnica de “squash”, sin embargo, no se logró al 100% la formación de la monocapa, lo que afecta en algunas zonas de las laminillas la observación y conteo de los MN.
3. El retardo en la germinación de las semillas, por lo que se modificó la temperatura bajo el método de Flores-Maya *et al.* [46].
4. En el tiempo en que se realizó el conteo de los MN no se contaba con un microscopio acoplado a cámara fotográfica lo que complicó la captura de imágenes.

### Recomendaciones

1. Se recomienda comparar distintas marcas de semillas de haba comerciales, de banco de semillas o certificadas para identificar y asegurar el mayor número de semillas viables para el bioensayo.
2. Ajustar la temperatura para la germinación de la semilla y evitar su retraso, dado que cada sitio geográfico tiene sus condiciones de altitud, temperatura ambiente, entre otras que pueden incidir en los tiempos de germinación.
3. Utilizar alguna herramienta o equipo de aumento que facilite la identificación del meristemo de haba para realizar los cortes adecuados en la raíz y lograr la formación adecuada de la monocapa.
4. Hay que asegurar que el tiempo de tinción que se maneja sea el adecuado para poder observar las células y evitar los falsos positivos.
5. Trabajar el congelamiento del tejido meristemático a -80 °C debido a que se considera que influyó de manera no deseada el trabajar con una temperatura de -40°C.

6. Mejorar la técnica de “squash” o aplastamiento de las raíces en monocapa para evitar falsos positivos y se puedan observar con mayor facilidad las células.
7. Probar diferentes técnicas para la preparación permanente de las laminillas y mejorar la visualización de las células con micronúcleos.
8. Verificar la distancia de los MN que se encuentren cercanas al núcleo, esto con la finalidad de asegurar que lo que se está observando sea un MN y no un falso positivo.
9. Realizar el bioensayo con diluciones de lixiviado crudo y pretratado para determinar la concentración efectiva del tratamiento en relación con el efecto genotóxico.
10. Analizar aberraciones cromosómicas (AC) que puedan estar relacionadas a la exposición aguda de lixiviado crudo como: Índice Mitótico (IM), Aberración de Anafase (AA).

## VIII Referencias

- [1] E. Rodríguez-De Gress y J. L. M. Cedillo, «Propuesta para la gestión sustentable de los residuos sólidos urbanos en la zona central conurbada de Toluca», *Legado de Arquitectura y Diseño*, vol. 12 no. 21, 2017. [En línea] Disponible en: <https://legadodearquitecturaydiseno.uaemex.mx/article/view/9375> [Accedido: May 22, 2023].
- [2] P. Ghosh, I. S. Thakur, y A. Kaushik, «Bioassays for toxicological risk assessment of landfill leachate: A review», *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 141, pp. 259-270, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.03.023>.
- [3] A. G. Martínez-López, W. Padrón-Hernández, O. F. Rodríguez-Bernal, O. Chiquito-Coyotl, M. A. Escarola-Rosas, J.M. Hernández-Lara, y J. Martínez-Castillo, «Alternativas actuales del manejo de lixiviados», *Avances en química*, vol. 9 no. 1, pp. 37-47, 2014. [En línea] Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=93330767005> [Accedido: May 22, 2023] ISSN: 1856-5301.
- [4] Y. N. Mosquera, «Tratamiento de lixiviados mediante humedales artificiales: revisión del estado del arte», *Revista Tumbaga*, vol. 1, no. 7, feb. 2012.
- [5] S.A. Varela, y M.V. Arana, «Latencia y germinación de semillas. Tratamientos pregerminativos», *Sistemas Forestales Integrados*, vol. 3, pp. 1-10, 2011.
- [6] S. Torres Corral, B. Barrientos Becerra, M.C. Hernández Berriel, G. Gómez Beltrán, y M.G. Macedo Miranda, «Afectación ambiental del tiradero a cielo abierto de Almoloya del Río, estado de México», *Hacia la sustentabilidad: los residuos sólidos como fuente de materia prima y energía*, pp. 253-257, 2011.
- [7] E. Giraldo, «Tratamiento de Lixiviados de Rellenos Sanitarios: Avances Recientes», *Revista de Ingeniería* vol.14, pp. 44-55, nov, 2001.
- [8] G. Bernache Pérez, «Riesgo de contaminación por disposición final de los residuos. Un estudio de la región centro occidente de México», *Revista internacional de contaminación ambiental*, vol. 28, no.1, pp. 97-105, 2012.
- [9] J. Navarro (2021). Contaminación del agua debido a la descomposición de los residuos sólidos (IV/IV). [En línea] Disponible en: <https://www.lagua.es/blogs/javier-navarro/efecto-lluvias-desechos-solidos-iiiiv-0> [Accedido: May 22, 2023].

- [10] La hora (2016). Los lixiviados y sus efectos sobre la salud. [En línea] Disponible en: <https://www.lahora.com.ec/noticias/los-lixiviados-y-sus-efectos-sobre-la-salud/> [Accedido: May 22, 2023].
- [11] Instituto Nacional de Ecología y Cambio climático, INECC (2007). Tecnologías de remediación. [En línea] Disponible en: <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/372/tecnolog.html> [Accedido: agosto 22, 2019].
- [12] Z. Youcai, L. Hua, W. Jun, y G. Guowei, «Treatment of leachate by aged-refuse-based biofilter», *Journal of Environmental Engineering*, vol. 128, no. 7, pp. 662-668, 2002. DOI: [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)0733-9372\(2002\)128:7\(662\)](https://doi.org/10.1061/(ASCE)0733-9372(2002)128:7(662)).
- [13] B. Pernía, A. De Sousa, R. Reyes, y M. Castrillo, «Biomarcadores de contaminación por cadmio en las plantas», *Inter ciencia*, vol. 33, no. 2, pp. 112-119, 2008.
- [14] M. Flor Tobón y L. López, «Genotoxicidad del agua contaminada por plaguicidas en un área de Antioquia», *Revista MVZ Córdoba*, vol.16, no.2, pp.2605-2615, 2011.
- [15] M. P. Zevallos Cadillo. “Sistema de tratamiento de lixiviados procedentes del relleno sanitario de Zapallal utilizando nano filtros de grafeno con hierro, 2019”. Tesis de licenciatura., Facultad de ingeniería y arquitectura. Universidad Cesar Vallejo. Lima-Perú, 2019.
- [16] M. D. Luna. “Sistemas de tratamientos para lixiviados generados en rellenos sanitarios”. Trabajo de grado, modalidad monografía. Facultad de Ingeniería. Departamento de ingeniería civil. Universidad de Sucre. Sincelejo, Colombia, 2008.
- [17] A. Álvarez Contreras y J. H. Suárez Gelvez, «Tratamiento biológico del lixiviado generado en el relleno sanitario “El Guayabal” de la ciudad San José de Cúcuta», *Revista Científica Ingeniería y Desarrollo*, vol. 20, no.20, pp. 95-105, 2006.
- [18] J. M. Velázquez Trujillo.” Influencia de la concentración de cloruros en la remoción de color y materia orgánica (DQO y COT) en lixiviado tipo III empleando el proceso de oxidación anódica”. Tesis de licenciatura. Facultad de ingeniería. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, 2015.

- [19] S.B. Torres Corral et al. "Afectación ambiental del tiradero a cielo abierto de Almoloya del Río, estado de México". *Hacia la sustentabilidad: los residuos sólidos como fuente de materia prima y energía*. Memorias 4o. Simposio Iberoamericano de Ingeniería de Residuos, 4o. Encuentro Nacional de Expertos en Residuos Sólidos. México. 2011, pp. 253-257.
- [20] R. I. Méndez Novelo, E. R. Castillo Borges, M. R. Sauri Riancho, C. A. Quintal Franco, G. Giacomán Vallejos y B. Jiménez Cisneros, «Comparación de cuatro tratamientos fisicoquímicos de lixiviados», *Revista internacional de contaminación ambiental*, vol.25 no.3, pp. 133-145, 2009.
- [21] Z.A. Castañedo, E. Águila, O. Marrero, A. Meneses-Marcel, S. Sifontes, M. Sijo y A. Santana, «Bioensayo de toxicidad aguda en tres biomodelos utilizando compuestos de referencia», *Revista de Toxicología*, vol.36, no. 2, pp. 128-133, 2019.
- [22] G. Castillo, Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas, estandarización, Inter calibración, resultados y aplicaciones. 1ra ed. México (ed.), IMTA. pp.127-140, 2004.
- [23] J. Silva, G. Torrejón, E. Bay-Schmith y A. Larrain, «Calibration of the acute toxicity bioassay with daphnia pulex (Crustacea: Cladóceras) using a reference toxicant», *Gayana (Concepción)*, vol. 67, no. 1, pp. 87-96, 2003. DOI: <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-65382003000100011>.
- [24] M. T. Torres Rodríguez. «Empleo de los ensayos con plantas en el control de contaminantes tóxicos ambientales». *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, vol.41, no.2-3, 2003.
- [25] W.F. Grant, «The present status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens», *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, vol. 310, no. 2, pp. 175-185, 1994. DOI: [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(94\)90112-0](https://doi.org/10.1016/0027-5107(94)90112-0).
- [26] R. Valencia-Quintana, E. García-Nieto, I. Juárez-Santacruz, J. M. Montiel-González, J.I. G. Olivares, J. Sánchez-Alarcón y A. de Tlaxcala, «Diagnóstico de la problemática ambiental generada por la exposición a contaminantes ambientales presentes en aguas superficiales, con énfasis en sus impactos en la salud», V



*Congreso Internacional XI Nacional de Ciencias Ambientales*, pp. 1-6, 2006. ISBN 968-878-265-3.

- [27] M. T. T. Rodríguez y N. M. H. Pereyra, «Determinación toxicológica en aguas de río mediante el empleo de un bioensayo con planta», *Higiene y Sanidad Ambiental*, vol. 9, pp. 505-509, 2009.
- [28] X. Abrevaya, (2008, Agos. 20). *Revista electrónica IntraMed*. [En línea]. Disponible en: <https://www.intramed.net/contenidoover.asp?contenido=47111#:~:text=Los%20agentes%20capaces%20de%20ocasionar,%3A%20qu%C3%ADmicos%2C%20f%C3%ADsicos%20y%20biol%C3%B3gicos> . [Accedido: May 22, 2023].
- [29] M. Z. Quintero, A. M. V. Ruiz y I. C. O. Trujillo, «Efecto genotóxico y mutagénico de contaminantes atmosféricos», *Medicina UPB*, vol. 28, no.1, pp. 33-41, 2009.
- [30] Ministerio de Medio Ambiente y Agua (MMAyA). (2014). HELVETAS Swiss Intercooperation. [En línea] Disponible en: [https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/48860033/mmaya\\_guia\\_genotoxicidad-libre.pdf?1473954041=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DMinisterio\\_de\\_Medio\\_Ambiente\\_y\\_Agua.pdf&Expires=1684967256&Signature=SnUqMzO6gVE3HnUA0EF3UctGjNcPcfL4WnBASNd4VrWkfUr1MIAkRj5kR0fc8nP3oyfcpa~4rvwX8R8JblfbLjPVnMZpftnDDSsNfZGpuHv8VfhdC2h4x9Ji~jWzPhYQurqkyIPjm4GMCPt8mC~uklomiriYxWJHZpJEwJc2ZT2V7cortZiEIDyV90jgJrsdBPCBwTfzKDSQygCAMFbrE-retpSx1Zg43YmHytBnOSFJj~99s35LVk09gL3yHlnxyzSeex0KnE1R9G9J8P-ngnU~GmlybH1HnjI3~YozPXWzpLToCipLz23oY29SggcwkcDKTeXqyuqPepZe0zK7VA\\_&Key-Pair-Id=APKAJLOHF5GGSLRBV4ZA](https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/48860033/mmaya_guia_genotoxicidad-libre.pdf?1473954041=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DMinisterio_de_Medio_Ambiente_y_Agua.pdf&Expires=1684967256&Signature=SnUqMzO6gVE3HnUA0EF3UctGjNcPcfL4WnBASNd4VrWkfUr1MIAkRj5kR0fc8nP3oyfcpa~4rvwX8R8JblfbLjPVnMZpftnDDSsNfZGpuHv8VfhdC2h4x9Ji~jWzPhYQurqkyIPjm4GMCPt8mC~uklomiriYxWJHZpJEwJc2ZT2V7cortZiEIDyV90jgJrsdBPCBwTfzKDSQygCAMFbrE-retpSx1Zg43YmHytBnOSFJj~99s35LVk09gL3yHlnxyzSeex0KnE1R9G9J8P-ngnU~GmlybH1HnjI3~YozPXWzpLToCipLz23oY29SggcwkcDKTeXqyuqPepZe0zK7VA_&Key-Pair-Id=APKAJLOHF5GGSLRBV4ZA) [Accedido: May 22, 2023].
- [31] L. Giannuzzi, F. Ortega y E. G. Ventosi, Toxicología general y aplicada, 1ra edición. Buenos Aires, Argentina. Editorial Universidad Nacional de La Plata. Facultad de Ciencias Exactas. 2018. [En línea] Disponible en: <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/71533> [Accedido: May 22, 2023].

- [32] M. Zalacaín, L. Sierrasesumaga y A. Patiño, «El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos», *In Anales del sistema sanitario de Navarra*, vol. 28, no. 2, pp. 227-236, 2005.
- [33] A. C. Díaz, S. M. González, F. E. Valente, S. Salgado-Moreno, F. Carrillo-Díaz, H. Macías-coronel, y B. Peña-Parra, «La prueba de micronúcleos en sangre como bioindicador de genotóxicos», *Abanico veterinario*, vol.2, no.2, pp. 43-54, 2012.
- [34] T. Matheus Lobo y A. Bolaños, «Micronúcleos: biomarcador de genotoxicidad en expuestos a plaguicidas», *Salus*, vol.18, no.2, pp. 18-26, 2014.
- [35] L. Migliore, L. Cocchi y R. Scarpato. «Detection of the centromere in micronuclei by fluorescence in situ hybridization: its application to the human lymphocyte micronucleus assay after treatment with four suspected analgen's. », *Mutagenesis*, vol.11, no.3, pp. 285-290, 1996.
- [36] C. Ramos-Remus, G. Dorazco-Barragán, F. J. Aceves-Ávila, F. Alcaraz-López, F. Fuentes-Ramírez, J. Michel-Díaz, y G. Zúñiga-González, «Genotoxicity assessment using micronuclei assay in rheumatoid arthritis patients», *Clinical and experimental rheumatology*, vol. 20, no.2, pp. 208-212, 2002.
- [37] M. Rodríguez Vázquez, A. Sánchez Ortiz, C. Ramos Remus, G. Zúñiga, y O. Torres Bugarín, «Evaluación de la genotoxicidad de ciclofosfamida mediante prueba de micronúcleos en pacientes con lupus eritematoso sistémico», *Rev. Mex. reumatol*, pp.41-5, 2000.
- [38] J. A. Heddle, M. C. Cimino, M. Hayashi, F. Romagna, M. D. Shelby, J. D. Tucker y J. T. MacGregor. « Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present, and future», *Environmental and molecular mutagenesis*, vol.18, no.4, pp. 277-291, 1991.
- [39] J. M. G. Sagredo, «Prueba de micronúcleos: análisis citómicos y biomarcador de salud», *En Anales de la Real Academia Nacional de Medicina. Real Academia Nacional de Medicina*, no.2, pp. 627-641. 2012.
- [40] Rojotse. (2023, abril, 26). Tu guía de aprendizaje. [En línea]. Disponible: <https://www.rojotse.com.co/2021/05/que-son-los-cromosomas.html> [Accedido: May 22, 2023]

- [41] C. I. Buduba, "Mutagénesis y antimutagénesis en extractos acuosos, clorofórmicos y acetónicos de *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* e *Ilex dumosa* var. *Dumosa*". Tesis de maestría. Facultad de ciencias exactas. Universidad Nacional de La Plata. La Plata, Argentina, 2011.
- [42] M. Terradas, M. Martín, L. Tusell y A. Genescà, «Genetic activities in micronuclei: is the DNA entrapped in micronuclei lost for the cell? Mutation Research», *Reviews in Mutation Research*, vol. 705, no.1, pp. 60-67, 2010.
- [43] D. Souguir, G. Hörmann, y M. Hachicha, «Genotoxicity assessment of the groundwater quality in the teboulba region-tunisia using the *Vicia Faba* micronucleus test», *Applied Ecology and Environmental Research*, vol. 17, no.2, pp. 3959-3971. 2019.
- [44] G. M. Zúñiga González, B. C. Gómez Meda. «La prueba de micronúcleos», *Revista de divulgación científica y tecnológica de la universidad veracruzana, la ciencia y el hombre*, vol.19, no.1. 2006.
- [45] R. Valencia-Quintana, et al. «Genotoxicidad de plaguicidas en sistemas vegetales», *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, vol. 29, pp. 133-157, 2013
- [46] S. Flores-Maya et al., «Evaluación de la genotoxicidad de una sopa instantánea comercial utilizando la prueba de micronúcleos en *Vicia faba* y ratón CD-1», *BIOCYT Biología Ciencia y Tecnología*, vol.7, 2014
- [47] M. Iqbal, «*Vicia faba* bioassay for environmental toxicity monitoring: a review». *Chemosphere*, vol.144, pp.785-802. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.09.048>.
- [48] S. S. Arango, «Biomarcadores para la evaluación de riesgo en la salud humana», *Revista Facultad Nacional de Salud Pública*, vol.30 no.1, pp. 75-82, 2012.
- [49] O. Torres-Bugarín, y M. L. Ramos-Ibarra, «Utilidad de la Prueba de Micronúcleos y Anormalidades Nucleares en Células Exfoliadas de Mucosa Oral en la Evaluación de Daño Genotóxico y Citotóxico», *International Journal of Morphology*, vol.31, no.2, pp. 650-657. 2013. DOI: <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022013000200050>.

- [50] V. S. Ochoa Machaca, "Determinación de la relación entre la concentración de mercurio en sangre y el daño genotóxico ocasionado por la exposición en los trabajadores de la actividad de recuperación del oro en Cuzco – 2019", Tesis de pregrado. Facultad de ingeniería. Ingeniería de Seguridad Industrial y Minera. Universidad Tecnológica de Perú, Arequipa-Perú 2020.
- [51] E.T. Guimaraes M. Domingos, E.S. Alves, J.R. N. Caldini, D. J. A. Lobo, A.J.F.C. Lichtenfels y P. H. N. Saldiva. «Detection of the genotoxicity of air pollutants in and around the city of Sao Paulo (Brazil) with the Tradescantia-micronucleus (Trad-MN) assay», *Environmental and Experimental Botany*, vol.44, pp.1-8, 2000.
- [52] I. Coalova, S. Mencacci y A. Fassiano, «Genotoxicidad de mezclas de pesticidas: ¿algo más que la suma de las partes?», *Acta Toxicol Argent*, vol.21, no.1, pp. 5-14, 2013.
- [53] A. E. Confalone, «Crecimiento y desarrollo del cultivo del haba (*Vicia faba* L.). Parametrización del submodelo de fenología de cropgro-fababean», Ingeniería agrónoma. Departamento de producción vegetal, Universidad Santiago de Compostela. Lugo, 2008.
- [54] A. J. Matilla, «Desarrollo y germinación de las semillas», Fundamentos de fisiología vegetal, vol.2, pp. 1-27. 2008.
- [55] C. Goyoaga. "Estudio de factores no nutritivos en "*Vicia faba* i.": influencia de la germinación sobre su valor nutritivo" Tesis Doctoral. Facultad de farmacia. Departamento de Nutrición y Bromatología II (Bromatología) Universidad Complutense de Madrid. Madrid, 2005.
- [56] R. Horque Ferro. "Cultivo de haba". Instituto Nacional de Investigación y Extensión Agraria (INIA). Lima-Perú. 2004. [En línea] Disponible: [http://repositorio.inia.gob.pe/bitstream/inia/740/2/Horque-Cultivo\\_del\\_Haba.p](http://repositorio.inia.gob.pe/bitstream/inia/740/2/Horque-Cultivo_del_Haba.p) [Accedido: May, 22, 2023]
- [57] R. A. Ávila Cervantes Raúl, G. Mancilla Montelongo, G. P. González Pech, A.C. Sandoval Castro y F. Torres Acosta, «Bioensayos in vitro de relevancia en las ciencias biológicas y agropecuarias», *Bioagrociencias*, vol. 12, no.1 pp. 34-41, 2007.

- [58] R. A. Beltrán Orbegoso, y K.A. Gonza Carnero, «Citotoxicidad y genotoxicidad de las aguas de los ríos Jequetepeque y Moche mediante el bioindicador ambiental *Vicia faba L*», *Scientia Agropecuaria*, vol.8, no.3, pp. 203-213. 2017.
- [59] F.P. García, M.D.D.A.L. Vargas, M.A.M. marzo, E.B. Esteban y J. C. G. Oyarzun, «Daños tóxicos en tejidos vegetales, producidos por aguas contaminados con arsénico en Zimapán, Hidalgo, México», *Ciencia y Tecnología de Alimentos*, vol. 26, no.1, pp. 94-97. 2006.
- [60] Goites, E. «Manual de cultivos para la huerta orgánica familiar». Prohuerta INTA Ed, 163. 2008.
- [61] F. P. García y J.M.P. Villamil, «Viabilidad, vigor, longevidad y conservación de semillas». Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, secretaria general de Estructuras. 2001.
- [62] V. Arriaga, V. Cervantes, A. Vargas-Mena, «Manual de reforestación con especies nativas». Secretaria de Desarrollo Social, Instituto Nacional de Ecología. Universidad Nacional Autónoma de México, pp. 186, 1994.
- [63] R. L. William, "Guía para la manipulación de semillas forestales" (No. Fe 20/2). FAO. 1991. [En línea] Disponible: <https://www.fao.org/3/ad232s/ad232s00.htm> [Accedido: May, 22, 2023]
- [64] I. Rodríguez Quilón, G. Adam y J. M. Durán, «Ensayos de germinación y análisis de viabilidad y vigor en semillas» *Agricultura: Revista Agropecuaria*, vol.78, no.912, pp. 836-842, 2008.
- [65] Pronatura Veracruz. "Pruebas de viabilidad", 2018. [Archivo de video]. Disponible: <https://www.youtube.com/watch?v=XNtA4H3g0Uw&t=81s> [Accedido: May, 22, 2023]
- [66] M. Bonilla Vichot, «Variación del peso y viabilidad de las semillas de *Pinus tropicalis* para diferentes procedencias», *Revista Cubana de Ciencias Forestales*, vol. 2, no. 1, 2014.
- [67] C. G. Zepeda. "Cambium vascular, meristemo de crecimiento secundario". Universidad Autónoma del Estado de México, México, 2018.
- [68] M. Megías, P. Molist, M.A. Pombal. "Atlas de histología vegetal y animal. Tejidos vegetales". 2017. [En línea] Disponible:

<https://hopelchen.tecnm.mx/principal/sylabus/fpdb/recursos/r123331.PDF>

[Accedido: May 22, 2023]

- [69] S. Silva, "Biologías de las plantas I". Escuela Normal Superior Maestros Argentinos. 2014.
- [70] Jreguart. El Cedazo. ¡Hablemos de raíces! [En línea] Disponible <https://eltamiz.com/elcedazo/2018/11/19/hablemos-de-raices-i/> [Accedido: May 22, 2023]
- [71] L. Juárez, "Ensayo de genotoxicidad: micronúcleos". Manual de Técnicas en Genética y Ambiente. 1ra edición, México. Universidad Autónoma de Tlaxcala, México. 2012. pp. 103- 116.
- [72] B. M. Pérez-López. "Toxicidad aguda en semillas de maíz (*Zea mays*) expuestas a lixiviado crudo y pretratado en un sistema BEME". Tesis Licenciatura. Programa de ingeniería Ambienta. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, 2022
- [73] M. Fenech, «The in vitro micronucleus technique», *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, vol.455, no.1-2, pp.81–95. 2000. DOI: doi:10.1016/s0027-5107(00)00065-8.
- [74] Instituto de Investigación y Capacitación Agropecuaria, Acuícola y Forestal. (s. f.). "Cultivo de Haba humedad residual y temporal" [En línea] Disponible: <https://icamex.edomex.gob.mx/haba> [Accedido: May 22, 2023]
- [75] M. A. Garbagnati, P. S. González, R. I. Antón y M. A. Mallea, «Características fisicoquímicas, capacidad buffer y establecimiento de la línea base ambiental del Río Grande, San Luis, Argentina». *Ecología austral*, vol.15, no.1, pp.59-71. 2005.
- [76] GrowMax water. "Como estabilizar los niveles de pH del agua para regar." blog GrowMax Water. 2020. [En línea] Disponible: <http://growmaxwater.com/blog/es/como-estabilizar-el-ph-del-agua-pararegar/#:~:text=Un%20agua%20con%20un%20pH,que%20no%20llegan%20a%20salir%E2%80%A6> [Accedido: May 22, 2023].
- [77] A. Ibanez," DBO y DQO para caracterizar aguas residuales". Nihon Kasetzu Europe | *Monitoring & Water Clarification*. 2017 [En línea] Disponible:

<https://nihonkasetu.com/es/dbo-y-dgo-para-caracterizar-aguas-residuales/>

[Accedido: May 22, 2023].

- [78] Agravita. “La importancia del nitrógeno en las plantas”. Vitra. Al servicio de la agricultura. Rancagua, 2020 [En línea] Disponible: <https://www.agrovitra.com/la-importancia-del-nitrogeno-en-las-plantas/> [Accedido: May 22, 2023].
- [79] J. Silva, P. Torres y C. Madera. « Reuso de aguas residuales domesticas en la agricultura», *Una revisión. Agronomía Colombiana*, vol. 26, no. 2, pp. 347-359. 2008.
- [80] P. Ffolliott y J. Thames, “Recolección, manipuleo, almacenaje y pretratamiento de las semillas de Prosopis en américa latina” (1.a ed.). FAO. 1983. [En línea] Disponible: <https://www.fao.org/3/Q2180S/Q2180S00.htm#TOC> [Accedido: May 22, 2023]
- [81] M. Pita y F. Pérez, “Germinación de semillas”, Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación de España. Madrid, España. 1998.
- [82] C. Fernández-Bravo, N. Urdaneta, W. Silva, H. Poliszuk, y M. Marín, «Germinación de semillas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) cv. Río Grande sembradas en bandejas plásticas, utilizando distintos sustratos», *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*, vol. 23, pp. 188-195, 2006
- [83] J. Doria, «Generalidades sobre las semillas: su producción, conservación y almacenamiento». *Cultivos Tropicales*, vol. 31 no.1, pp.00. 2010. [En línea] Disponible: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0258-59362010000100011&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362010000100011&lng=es&tlng=es) [Accedido May 15, 2023].
- [84] A. M. Berrocal, R. H. Blas, J. Flores, y M. A. Siles, «Evaluación del potencial mutagénico de biocidas (vertimec y pentacloro) sobre cebolla». *Revista Colombiana de Biotecnología*, vol.15, no.1, pp.17-27, 2013.
- [85] A. Hammann, L. M. Ybañez, M. I. Isla, y M. B. Hilal, «Potential agricultural use of a sub product (olive cake) from olive oil industries composting with soil», *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*, vol.8, no. 1, pp. 43-52, 2019.
- [86] A. Zabka J. T. Polit y J. Maszewski «Inter- and intrachromosomal asynchrony of cell division cycle events in root meristem cells of *Allium cepa*: possible connection with gradient of cyclin B-like proteins». *Plant Cell Rep*, vol.29, pp.845–856. 2010.

- [87] J. S. Alarcón et al., «Inducción de micronúcleos en células meristemáticas de la raíz de *Vicia faba* tratadas con diferentes concentraciones de Marvel», *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, vol. 34, pp. 95-106, 2018.
- [88] N. Sang, y G. Li, «Genotoxicity of municipal landfill leachate on root tips of *Vicia faba*». *Mutation Research/ Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, vol.560, no.2, pp.159-165, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2004.02.015>.
- [89] S. Chandra, L. K. S. Chauhan, P. N. Pande, y S. K. Gupta, «Cytogenetic effects of leachates from tannery solid waste on the somatic cells of *Vicia faba*». *Environmental Toxicology: An International Journal*, vol.19, no.2, pp.129-133, 2004.
- [90] M. Noji, M. Saito, M. Nakamura, M. Aono, H. Saji, K. Saito, «Cysteine synthase overexpression in tobacco confers tolerance to sulfur-containing environmental pollutants», *Plant Physiol*, vol.126, pp. 973–980, 2001.
- [91] X. Pang, D.H. Wang, A. Peng, «Effects of mercury stress on the activity of antioxidant enzymes», *Environ. Chem*, vol.20, pp.351–355, 2001
- [92] J. Olivero, C. Padilla, O. D. la Rosa, «Relationships between physicochemical parameters and the toxicity of leachates from a municipal solid waste landfill». *Ecotox. Environ. Safe*, vol.70, pp.294-299. 2008. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2007.05.016
- [93] M.V. Pablos, et al., «Correlation between physicochemical and ecotoxicological approaches to estimate landfill leachates toxicity». *Waste Manag*, vol.31, pp.1841-1847. 2011.
- [94] T.H. Ma, «*Vicia* cytogenetic tests dor envioronmental mutagens: a report of the US environmental protection agency gene-tox program», *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, vol.99, no. 3, pp. 257-271, 1982. DOI: [https://doi.org/10.1016/0165-1110\(82\)90045-8](https://doi.org/10.1016/0165-1110(82)90045-8).



## IX Anexos

### Anexo 1. Reactivos

Nombre	Marca	No. De catálogo
Ácido acético ( $\text{CH}_3\text{-COOH}$ )	J.T BAKER	9508-02
Ácido clorhídrico ( $\text{HCl}$ )A	J.T BAKER	9530-33
Ácido cítrico monohidratado	J.T BAKER	0110-01
Citrato de Sodio ( $\text{NaH}_2(\text{C}_3\text{H}_5\text{O}(\text{COO})_3)$ )	J.T. BAKER	3646-01
Bálsamo de Canadá	Hycel	
Butanol ( $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$ )	J.T BAKER	9054-03
Carbón activado	J.T BAKER	E343-07
Etanol ( $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ )	J.T BAKER	B5924-03
Fucsina básica	J.T BAKER	B660-03
Metabisulfito de sodio	J.T BAKER	3552-01
Pectinasa		
Dicromato de potasio ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ )		

## Anexo 2. Preparación de reactivos

### a) Ácido acético 45 %

Para preparar 100 ml, mezclar 45 ml de ácido acético con 55 ml de agua destilada, guardar en el refrigerador a 4°C hasta usar la totalidad de la mezcla.

### b) Ácido clorhídrico 5 N

Para preparar 100 ml, en un matraz aforado se coloca 16 ml de HCl se añade agua destilada hasta el aforo, agitar suavemente. Guardar de preferencia en frasco de vidrio color ámbar en el refrigerador a 4°C hasta que se agote la mezcla.

### c) Ácido clorhídrico 0.15 N

En un matraz aforado de 100 ml se agrega aproximadamente 50 ml de agua destilada, posteriormente se añade con cuidado 600 µl de HCl, finalmente se agrega agua destilada hasta el aforo.

### d) Etanol al 70 %

Mezclar 70 ml de etanol con 30 ml de agua destilada, guardar en frascos de vidrio a temperatura ambiente.

### e) Fijador farmer (Etanol-ácido acético 3:1 (v/v))

Para preparar 100 ml, se mezclan 3 volúmenes de etanol y uno de ácido acético, se guarda en frasco de vidrio en refrigeración a 4°C hasta terminar la mezcla.

### f) Reactivo de Schiff

Mezclar 100 mililitros de HCl 0.15 N, 1.9 g de metabisulfito de sodio y 0.35 g de fucsina básica, agitar por 2 h a 400 rpm, pasado las 2 horas, añadir 0.5 g de carbón activado y agitar por 15 min, filtrar con papel filtro grueso y guardar en frasco ámbar en el refrigerador a 4°C hasta que el reactivo se agote.

### g) Dicromato de potasio para *V. faba*

Mezclar 75 ml de agua destilada con 50 mg de dicromato de potasio y aforar en un matraz de 100 ml, guardar la mezcla en un frasco de vidrio a 4°C en el refrigerador

### h) Buffer de citratos pH 4.7

Se preparan soluciones al 0.01 M de ácido cítrico, para lo cual se pesaron 0.0192 g y 0.0294 g de citrato de sodio, se disuelve cada reactivo por separado en 10 ml de agua destilada, después se mezclan partes proporcionales de cada uno hasta ajustar el pH a 4.7.

\*Esta solución se prepara al momento de utilizarla.

i) Pectinasa al 2%

En un matraz aforado de 10 ml colocar 0.2 g de pectinasa y aforar con el buffer de citratos pH 4.7; disolver suavemente evitando la formación de espuma.

\*Preparar al momento sólo el volumen necesario, no almacenar.

j) Solución de HCl al 1N

En un matraz aforado se coloca 1.13ml de HCl, se añade agua destilada hasta el aforo, agitar suavemente. Guardar preferentemente en un frasco de vidrio color ámbar a 4°C hasta que la mezcla se agote

### Anexo 3. Evidencia fotográfica



A. Imbibición de semillas de haba



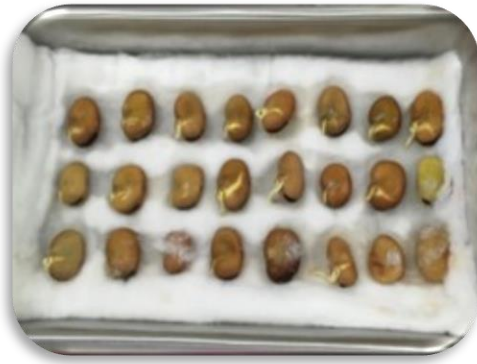
B. Semillas despues de 24 horas de imbibición



C. Acomodamiento de las semillas entre dos capas de algodón para su germinación



D. Incubadora utilizada para la germinación de semillas



E. Semillas con testa o cubierta empezando a germinar



F. Semillas sin testa



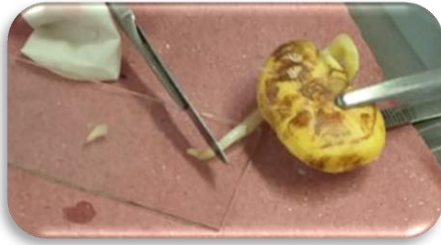
G. Preparación de reactivos



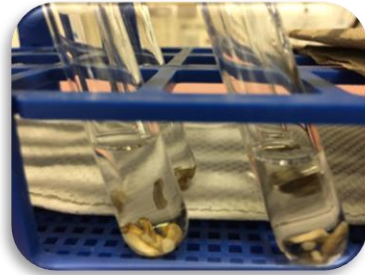
H. Exposición de las semillas por 6 h



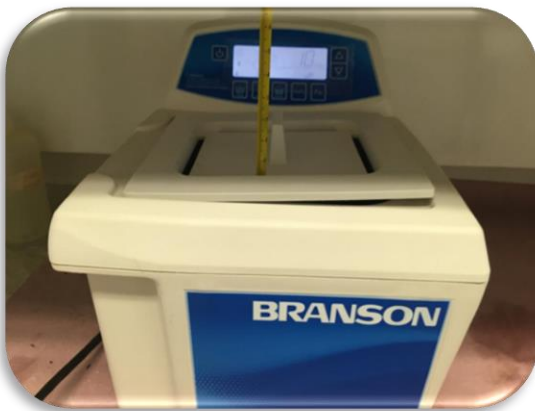
I. Baño de recuperación por 22 h



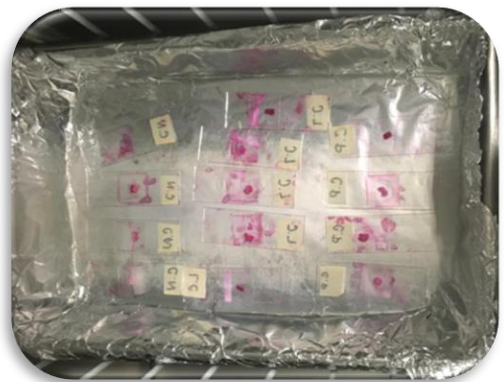
J. Corte del meristemo de la semilla



K. Raíces de semillas guardadas en tubos de ensayo



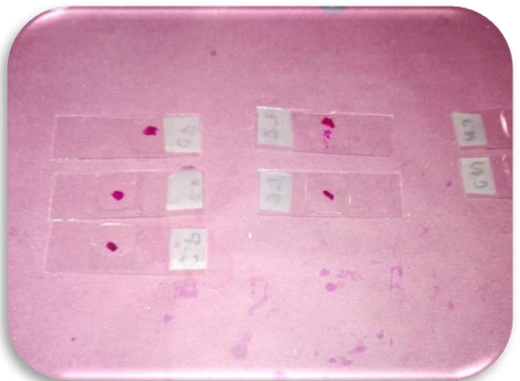
L. Hidrolisis de las raíces



M. Congelamiento de tejido meristemático a  $-40^{\circ}\text{C}$



N. Lavado de laminillas antes de su preparación permanente



Ñ. Laminillas listas para su análisis

#### Anexo 4. Tablas de resultados

**Tabla 10.** Prueba de homogeneidad de varianzas

		Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
Frecuencia de MN	Se basa en la media	3.694	4	39	.012

**Tabla 11.** ANOVA

Frecuencia de MN					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	105.340	4	26.335	34.920	.000
Dentro de grupos	29.412	39	.754		
Total	134.752	43			

**Tabla 12.** Comparaciones múltiples. Método Scheffe

Variable dependiente: Frecuencia de MN						
Schiffe						
(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Control negativo	Control positivo	-3.72500*	.61406	.000	-5.7100	-1.7400
	Lixiviado crudo	-4.45000*	.50138	.000	-6.0707	-2.8293
	Lixiviado diluido	-2.06667*	.50138	.006	-3.6874	-.4459
	Lixiviado pretratado	-1.00000	.50138	.422	-2.6207	.6207
Control positivo	Control negativo	3.72500*	.61406	.000	1.7400	5.7100
	Lixiviado crudo	-.72500	.50138	.720	-2.3457	.8957
	Lixiviado diluido	1.65833*	.50138	.042	.0376	3.2791

	<b>Lixiviado pretratado</b>	2.72500*	.50138	.000	1.1043	4.3457
<b>Lixiviado crudo</b>	<b>Control negativo</b>	4.45000*	.50138	.000	2.8293	6.0707
	<b>Lixiviado positivo</b>	.72500	.50138	.720	-.8957	2.3457
	<b>Lixiviado diluido</b>	2.38333*	.35453	.000	1.2373	3.5294
	<b>Lixiviado pretratado</b>	3.45000*	.35453	.000	2.3040	4.5960
<b>Lixiviado diluido</b>	<b>Control negativo</b>	2.06667*	.50138	.006	.4459	3.6874
	<b>Lixiviado positivo</b>	-1.65833*	.50138	.042	-3.2791	-.0376
	<b>Lixiviado crudo</b>	-2.38333*	.35453	.000	-3.5294	-1.2373
	<b>Lixiviado pretratado</b>	1.06667	.35453	.080	-.0794	2.2127
<b>Lixiviado pretratado</b>	<b>Control negativo</b>	1.00000	.50138	.422	-.6207	2.6207
	<b>Lixiviado positivo</b>	-2.72500*	.50138	.000	-4.3457	-1.1043
	<b>Lixiviado crudo</b>	-3.45000*	.35453	.000	-4.5960	-2.3040
	<b>Lixiviado diluido</b>	-1.06667	.35453	.080	-2.2127	.0794

\*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.