

INVESTIGACIONES MULTIDISCIPLINARIAS: BIOINDICADORES



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y POSGRADO



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA

Dr. Víctor Job Paredes Cuahquentzi
Rector

Mtro. René Elizalde Salazar
Secretario Académico

Mtra. María Samantha Viñas Landa
Secretaria de Investigación Científica y Posgrado

Mtro. Efraín Ortiz Linares
Secretario de Extensión Universitaria y Difusión Cultural

Dr. Sergio Eduardo Algarra Cerezo
Secretario Técnico

Mtro. Rubén Reyes Córdoba
Secretario Administrativo

Lic. Mauro Sánchez Ibarra
Secretario de Autorrealización

MAR. Adolfo Cuevas Sánchez
Coordinador de la División de Ciencias Biológicas

Dra. Madaí Angélica Gómez Camarillo
Coordinadora del Centro de Investigación en Genética y Ambiente

INVESTIGACIONES MULTIDISCIPLINARIAS: BIOINDICADORES

**Trabajo realizado por el
Cuerpo Académico de Ciencias Ambientales
UATLx-CA-39**

**Elizabeth García Gallegos
Héctor Santos Luna Zendejas
Libertad Juárez Santacruz
Edelmira García Nieto**



© 2014 Centro de Investigación en Genética y Ambiente
Universidad Autónoma de Tlaxcala
Av. Universidad No. 1
Calle del Bosque Col. Centro Tlaxcala, Tlax., C.P 90000
Tel/Fax 01(248) 48 155 00
Derechos reservados conforme a la ley
Primera edición
ISBN: 978-607-8432-01-1
Impreso en México

Cuidado de la edición: Héctor S. Luna y Elizabeth García
Diseño editorial: Centro de Investigación en Genética y Ambiente
Diseño de portada: Edelmira García Nieto
Primera edición: Diciembre de 2014

Ejemplo de la manera correcta de citar cualquier capítulo de este libro:
Juárez-Santacruz L., *Xelhuantzi-Mendoza Y.* 2014. *Vicia faba* como bioindicador genotóxico de sedimentos superficiales de ríos. En: *Investigaciones Multidisciplinarias: Bioindicadores.* (García-Gallegos *et al.*). Universidad Autónoma de Tlaxcala, México. p. 33-51.

La información publicada en los capítulos de este libro es responsabilidad del autor por lo que el contenido de los mismos no refleja necesariamente el punto de vista de la Institución.

ÍNDICE

	Página
Prefacio <i>Elizabeth Hernández Acosta</i>	9
Agradecimientos <i>Los autores</i>	11
Capítulo 1..... <i>Lithobates berlandieri</i> Baird como bioindicador genotóxico en una zona agrícola del municipio de Nativitas, Tlaxcala <i>Edelmira García Nieto y Norma Alicia Sánchez Rodríguez</i>	13
Capítulo 2..... <i>Vicia faba</i> como bioindicador genotóxico de sedimentos superficiales de ríos <i>Libertad Juárez Santacruz y Yury Xelhuantzi Mendoza</i>	33
Capítulo 3..... <i>Vicia faba</i> L. (LEGUMINOSAE): Bioindicador de la calidad de compostas elaboradas con lodos residuales <i>Héctor Santos Luna Zendejas y Myrna Solís Oba</i>	53
Capítulo 4..... Indicadores de madurez de lombricompostas obtenidas a partir de diferentes residuos orgánicos <i>Elizabeth García Gallegos</i>	73

PREFACIO

El uso de bioindicadores se ha convertido en una nueva herramienta para evaluar la toxicidad de mezclas complejas de agentes químicos presentes en matrices ambientales o sustratos, complementando los métodos analíticos utilizados para evaluar el riesgo ecotoxicológico. Su empleo simplifica en gran medida las actividades de campo y laboratorio debido a que la aplicación y cuantificación de los organismos se basa en índices de diversidad ajustados a intervalos que califican la calidad de matrices ambientales y sustratos. Un bioindicador es un organismo, cuyas reacciones ante las agresiones medioambientales proporcionan información sobre los aspectos cualitativos y cuantitativos de la integridad de un ecosistema. Un buen bioindicador debe tener una distribución amplia y cosmopolita además de tolerar a los contaminantes en concentraciones similares a las observadas en el medio ambiente contaminado, la importancia de éstos recae en su capacidad predictiva, la cual es determinada por su sensibilidad, especificidad y la prevalencia de la respuesta o asociaciones que demuestre

La inquietud de escribir este libro radica en proporcionar al estudiante una visión global del empleo de bioindicadores para evaluar las alteraciones de la calidad ambiental de suelos y sedimentos a través de organismos especialmente sensibles como *Lithobates berlandieri* Baird y *Vicia faba* L. Por otro lado, la determinación de indicadores físicos, químicos y biológicos para valorar la calidad de abonos orgánicos, específicamente compostas y lombricompostas que serán aplicadas como enmiendas orgánicas a suelos degradados.

La presente obra busca ser de gran utilidad para fortalecer unidades de aprendizaje sustentadas dentro del modelo pedagógico humanista integrador basado en competencias (MHIC), como lo es Toxicología.

logía ambiental, Agroecología, Ecotoxicología, Evaluación de riesgo y Edafología, cursos avanzados que oferta la Maestría en Ciencias en Sistemas del Ambiente, cuya finalidad es preparar a los estudiantes en la problemática ambiental para abordar un escenario potencialmente peligroso y al mismo tiempo darles a conocer que es importante evaluar la calidad de sustratos como los abonos orgánicos, los cuales son empleados para mejorar las condiciones físicas, químicas y biológicas de los suelos, para incrementar la calidad productiva y mantener su sustentabilidad.

Es importante resaltar que cada capítulo fue escrito por especialistas en el tema, por tal razón considero que será de gran utilidad en la enseñanza e investigación de estudiantes y docentes.

Dra. Elizabeth Hernández Acosta
Universidad Autónoma Chapingo
Diciembre de 2014

AGRADECIMIENTOS

Nuestro agradecimiento a la Universidad Autónoma de Tlaxcala por su permanente respaldo institucional. En esta ocasión el acertado apoyo al Cuerpo Académico de Ciencias Ambientales (UATLx-CA-39) para la publicación de este libro a través del Programa Estratégico CACyPI-2014 (Cuerpos Académicos, Calidad y Productividad para su Internacionalización-2014), contribuirá al fortalecimiento de los programas educativos de la Maestría en Ciencias en Sistemas del Ambiente y así como a las licenciaturas de Biología y Ciencias Ambientales.

El presente libro es el resultado de proyectos de investigación enfocados a evaluar la contaminación ambiental empleando bioindicadores de origen animal y vegetal e indicadores físicos y químicos en compostas y lombricompostas.

Los integrantes del Cuerpo Académico, agradecen a los estudiantes, quienes con sus inquietudes nos impulsaron a exponer los temas que consideramos servirá de guía durante su formación académica.

Los autores

***Lithobates berlandieri* Baird COMO BIOINDICADOR
GENOTÓXICO EN UNA ZONA AGRÍCOLA DEL MUNICIPIO
DE NATIVITAS, TLAXCALA**

Edelmira GARCÍA-NIETO¹, Norma Alicia SÁNCHEZ RODRÍGUEZ²

¹Laboratorio de Toxicología Ambiental, Centro de Investigación en Genética y Ambiente, Universidad Autónoma de Tlaxcala.

²Licenciatura en Biología, Facultad de Agrobiología, Universidad Autónoma de Tlaxcala.

Palabras clave: bioindicador, genotoxicidad, zona agrícola

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el daño al DNA en anfibios de la especie *Lithobates berlandieri* Baird, empleando el ensayo cometa y la prueba de micronúcleos como biomarcadores de genotoxicidad. La fragmentación al DNA osciló en el intervalo de 87 a 96 % ($p = 0.798$) con un DICA de 165 a 271 ua ($p = 0.846$), sin diferencias significativas entre hembras y machos. Ambas variables resultaron ser dependientes del peso, con mayor significancia en la fragmentación del DNA ($r^2 = 0.6174$; $p = 0.001$) que en el DICA ($r^2 = 0.2216$; $p = 0.006$). La frecuencia de micronúcleos osciló de 2 a 8 MN/1000, sin diferencias significativas entre géneros ($p = 0.166$) y grupos ($p = 0.857$). Se aprecia una ligera asociación negativa pero no significativa ($r^2 = 0.0818$; $p = 0.125$) con el peso. Ambos biomarcadores sugieren la presencia de agentes genotóxicos en la zona agrícola de Nativitas. Es importante caracterizar el riesgo potencial en la biota y en la salud humana a través de la cuantificación de plaguicidas en matrices ambientales y biológicas.

Key words: bioindicator, genotoxicity, agricultural area

ABSTRACT

The aim of present study was to evaluate the DNA damage in amphibian species *Lithobates berlandieri* Baird, using Comet assay and micronucleus test as genotoxicity biomarkers. The DNA fragmentation ranged from 87 - 96 % ($p = 0.798$) with a DICA value of 165 - 271 ua ($p = 0.846$), without significant differences between males and females. Both variables proved to be dependent on weight, a greater significance in the DNA fragmentation ($r^2 = 0.6174$; $p=0.001$) with respect to the DICA ($r^2 = 0.2216$; $p=0.006$), was showed. The Micronuclei frequency ranged from 2 - 8 MN/1000, no significant differences by gender ($p = 0.166$) and among groups ($p = 0.857$) were found. There is a slight negative association but not significant ($r^2 = 0.0818$; $p = 0.125$) with the weight. Both biomarkers suggest the presence of genotoxic agents in the Nativitas agricultural area. It is important to characterize the potential risk in biota and human health through the quantification of pesticides in biological and environmental matrices.

INTRODUCCIÓN

El surgimiento de la agricultura fue un paso clave en el desarrollo de la humanidad e implica la transformación del ambiente, a través del tratamiento del suelo y producción de vegetales para satisfacer las necesidades alimenticias del hombre. Además de las implicaciones económicas, la agricultura exhibe contribuciones en el desarrollo social

y ambiental como la retención de carbono y la conservación del suelo como hábitat para una gran diversidad de organismos (FAO 2009).

Sin embargo, las plagas continúan siendo la gran amenaza de esta actividad, y en el intento por controlarlas se han utilizado distintos productos químicos que representan un riesgo potencial en este ecosistema. Estos productos no sólo eliminan las plagas, sino que afectan organismos benéficos para el suelo y los cultivos, lo que se traduce en un desequilibrio biológico, además del riesgo que representan algunos de ellos al tener la capacidad de bioacumularse y biomagnificarse en la cadena trófica (Waliszewski *et al.* 2008). Los plaguicidas organoclorados (DDT, HCB, HCHs), fueron ampliamente utilizados en el siglo pasado y a una década de su prohibición, siguen encontrándose en el ambiente debido a su elevada persistencia y uso clandestino (Díaz-Barriga *et al.* 2012, Torres-Dosal *et al.* 2012, González *et al.* 2013, Juárez *et al.* 2013). En términos generales los plaguicidas de mayor uso son los herbicidas, seguidos de insecticidas organofosforados y fungicidas (Albert 2005).

En México se reconoce al agua como un recurso estratégico y un tema de seguridad nacional. Este recurso se ha convertido en un elemento central de la política ambiental y un factor clave en el desarrollo social y económico. Su disponibilidad condiciona la posibilidad de desarrollo de algunas regiones del país y su calidad es factor determinante para la salud y bienestar de la población (FAO 2009). El empleo de agua contaminada para el riego de cultivos representa un riesgo potencial para la biota nativa, incluyendo al hombre como último eslabón de la cadena trófica (Juárez *et al.* 2013).

El estado de Tlaxcala se ubica en la provincia del eje neovolcánico y en la subprovincia de los lagos y volcanes del Anáhuac, la altitud

en el territorio tlaxcalteca oscila desde los 2 150 hasta 4 461 msnm con mayor altitud en la cima del volcán “La Malintzi” y con menor altitud en la ex hacienda de Santa Águeda en el municipio de Nativitas. El Estado cuenta con una superficie total de 402 450 ha de las cuales más del 58.4 % (235 099 ha) se dedican a la agricultura, de éstas 212 921 ha son de temporal y 22 178 ha corresponden a la agricultura de riego (SAGARPA 2012).

En gran parte del territorio el agua empleada para riego proviene del sistema hidrológico Zahupan-Atoyac, en el cual se ha registrado contaminación por plomo y arsénico (García-Nieto *et al.* 2011) y compuestos orgánicos persistentes, como hexaclorobenceno, bifenilos policlorados, DDT, alfa, beta y gamma hexaclorociclohexano (Juárez-Santacruz *et al.* 2013).

Los principales cultivos que se siembran en el Estado son: maíz, cebada, trigo, frijol, avena, canola, papa y amaranto. La producción de maíz en punta de riego asciende alrededor de 25 000 ha, ubicadas en la zona sur de la entidad en los municipios de Ixtacuixtla, Tepetitla, Nativitas, Zacatelco, Panotla, Tlaxcala, Totolac, Tetlatlahuca, Tepeyanco, Xicohtzinco y Santa Apolonia Teacalco (SAGARPA 2012). En el municipio de Nativitas la superficie sembrada para el 2011 fue de 4 168 ha (2 310 ha de temporal y 1 858 ha de riego), de las cuales 2 554 ha correspondieron a maíz, (INEGI 2011).

De acuerdo al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), los principales fertilizantes que se emplean en el territorio tlaxcalteca son el sulfato de amonio, superfosfato de calcio triple, cloruro de potasio y urea. Asimismo, se aplican diversos agentes químicos para controlar la maleza, tal es el caso de los herbicidas fenoxicarboxílicos (Esterón); sulfonilureas (Harmony, Amber); ben-

zotiadizoles (Basagran); benzoicos (Banvel); dinitroanilinas (Treflan); fenilureas (Afalon); arilo-xifenoxipropionatos (Fusilade, Topik); ciclohexanodionas (Grasp) y difeniléteres (Flex). Además, para el control de plagas se reporta el uso de agentes químicos pertenecientes al grupo de los organosfosforados (Malatión, Diazinón, Tamarón, Lorsban, Rogor, Folimat, Perfektion y Nuvacron); carbamatos (Sevin, Pirimor); piretrinas (Arrivo); triazoles (Folicur) e imidazoles (Sportak) (SAGARPA 2012). Los anfibios son el único grupo de vertebrados que poseen una fase de vida acuática (larvaria) y otra terrestre, que los hace sensibles a las alteraciones en ambos medios, ocupan una posición clave en la cadena trófica, y se consideran bioindicadores del medio natural que habitan. La piel de los anfibios es lisa, permeable y constituye un importante órgano en el balance hídrico, osmótico e incluso respiratorio en algunas especies. Esta piel es vulnerable a los productos químicos presentes en el agua y en el suelo, como los plaguicidas. La exposición a estos contaminantes pueden producir efectos subletales como alteraciones conductuales o de desarrollo, alteraciones de la pigmentación, deformidades e incluso la muerte (Denoël *et al.* 2013, Wagner *et al.* 2014). En muchos casos, se produce la acumulación de sustancias químicas en diversos órganos o tejidos y se producen alteraciones funcionales o fisiológicas que pueden provocar daños en los individuos (Gahl *et al.* 2011, Groner y Relyea 2011, Baker *et al.* 2013, Smalling *et al.* 2015).

Un bioindicador es un organismo o comunidad de organismos, cuyas reacciones ante las agresiones medioambientales son registradas y proporcionan información sobre los aspectos cualitativos y cuantitativos de la salud o integridad de un ecosistema. Estos organismos reflejan el estado biótico y abiótico de un ambiente y representan el impacto de cambios ambientales sobre un hábitat, comunidad o ecosiste-

ma o es indicativo de la diversidad de un subgrupo de taxa o de la diversidad completa dentro de un área. Un buen bioindicador debe tener una distribución amplia y cosmopolita, para propósitos de comparación internacional.

En cuanto a características ecológicas se requiere que se encuentre en abundancia y que esté disperso en cierto tipo de ambiente, ser específico y de movilidad restringida para reflejar las condiciones locales, tener un tamaño que permita el estudio de los diferentes tejidos y sus componentes, tolerar los contaminantes en concentraciones similares a las observadas en el medio ambiente contaminado, sin efectos letales (Lazorchak *et al.* 2002, Gerhardt 2010).

La importancia de utilizar un bioindicador recae en su capacidad predictiva, la cual es determinada por su sensibilidad, especificidad y la prevalencia de la respuesta o asociaciones que demuestre. La rana leopardo (*Lithobates berlandieri* Baird), es un excelente bioindicador de la zona agrícola de este trabajo. Se distribuye por EE.UU.AA (Texas y Nuevo México) hasta el centro de México, siendo nativa en Belice, Guatemala, Honduras, México y Nicaragua. Presenta un ciclo de vida que empieza en el agua, después de la fecundación, el huevo empieza su desarrollo de embrión a larva, la cual presenta branquias externas que permanecen con la abertura del sifón lateral, posibilitando la respiración. Posteriormente, se transforma en renacuajo, el cual por el proceso de metamorfosis se convierte en rana, y así sobrevive en el ambiente terrestre, alcanzando la maduración sexual entre los 3 y 4 años y una longitud de 6 a 11 cm. En invierno hiberna en charcos o zanjas con agua de movimiento lento. La especie se caracteriza por su color pálido verde o marrón grisáceo, presenta puntos dorsales oscuros con borde ligero y reticulaciones oscuras en sus muslos. Se distingue una raya

ligera a lo largo de la quijada que desaparece totalmente delante del ojo (Hillis *et al.* 1983, Behler y King 1992, Stebbins 2003).

Además de los efectos mencionados anteriormente, los agroquímicos son potencialmente genotóxicos para los anfibios (Poletta *et al.* 2009, Lajmanovich *et al.* 2014). Son numerosos los ensayos que se emplean con diversos bioindicadores para evaluar el daño al DNA de una sustancia química o matriz ambiental. Entre los más utilizados están el intercambio de cromátidas hermanas, las aberraciones cromosómicas, la electroforesis unicelular en gel (ensayo cometa) y la prueba de micronúcleos (MN). El ensayo cometa evalúa el daño al DNA de células individuales, se utiliza ampliamente en el biomonitorio ecotoxicológico y ambiental para evaluar el potencial genotóxico de suelos, sedimentos y agua en diversos entornos, en los cuales se emplean organismos tanto animales como vegetales (Salagovic *et al.* 1996, Avishai *et al.* 2002, Jasso *et al.* 2007, Dhawan *et al.* 2009, Lacaze *et al.* 2010. Pérez-Iglesias *et al.* 2014).

El ensayo de MN, es un biomarcador que evalúa el daño a nivel cromosómico. Se ha aplicado en estudios ecotoxicológicos empleando diversas especies de vegetales (Juárez-Santacruz *et al.* 2013) y animales silvestres o cultivados en el laboratorio (García-Nieto *et al.* 2014), expuestas a agentes clastógenicos y aneugénicos. Un MN se origina a partir de fragmentos de cromosomas acéntricos y/o de cromosomas enteros retardados que no se incorporan al núcleo de la nueva célula. Un segundo origen son los fragmentos inducidos por rompimiento de puentes durante la etapa de anafase.

Finalmente, los MN se forman en la telofase donde una envoltura nuclear envuelve a los fragmentos o cromosomas no incorporados que quedaron incluidos en el citoplasma de las células hijas y se trans-

forman en núcleos secundarios, de forma redonda o almendrada, mucho más pequeños que los núcleos verdaderos (Terradas *et al.* 2010).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el daño al DNA en *Lithobates berlandieri* Baird, bioindicador de la zona agrícola del municipio de Nativitas, empleando el ensayo cometa y la prueba de micronúcleos como biomarcadores de genotoxicidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

Se localiza en la zona agrícola de San Miguel del Milagro en el municipio de Nativitas ubicado en el altiplano central mexicano a 2 200 msnm entre los 19°14' latitud norte y 98°19' longitud oeste al sur del estado de Tlaxcala (**Fig. 1**). La actividad agrícola se orienta básicamente a la producción de maíz, avena, frijol y alfalfa con una superficie cultivada de 4 168 ha de las cuales 1 858 son de riego (INEGI 2011). Los recursos hidrográficos de Nativitas comprenden a los ríos Atoyac y Zahuapan con un recorrido aproximado de 10.5 km al poniente y 5 km al oriente del municipio, respectivamente.

Captura de organismos

La captura de las ranas se llevó a cabo en la época de lluvia durante los meses de septiembre y octubre de 2009. Se recolectaron un total de 33 organismos empleando redes elaboradas con tela tipo malla (tul), se trasladaron en una cubeta cubierta con malla al laboratorio de Toxicología Ambiental del CIGyA. Se separaron hembras y machos, se obtuvo el peso y la talla, finalmente se clasificaron taxonómicamente como *Lithobates berlandieri* Baird (**Fig. 1**).

Obtención de sangre

Los eritrocitos de los anfibios tienen núcleo y por su abundancia (36 000 a 60 000 eritrocitos/ml) solo se necesita una pequeña cantidad de sangre para medir el daño al DNA. Dentro de las dos horas posteriores a la captura se extrajo entre 200 a 500 μ l de sangre por punción cardiaca empleando una jeringa de insulina y tubos Eppendorf previamente heparinizados. Se prepararon las laminillas correspondientes a cada ensayo. Los especímenes se agruparon por sexo (hembras n = 18; machos n = 15) y gramaje (G1 < 5 g, n = 10; G2 de 5 a 10 g, n = 13; G3 > 10 g, n = 10).

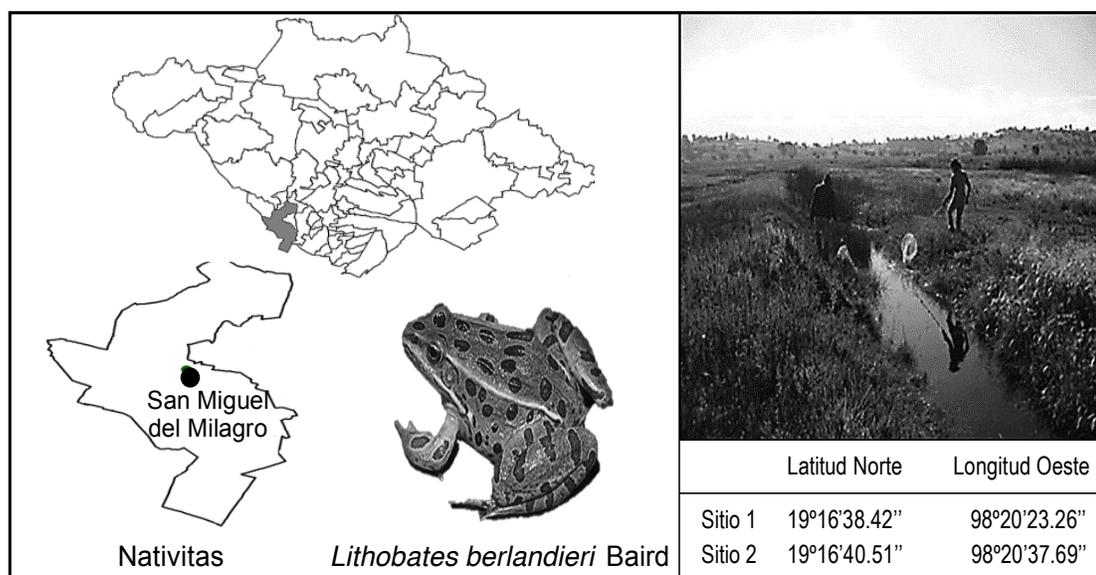


Fig. 1. Localización georeferenciada del área de captura de *Lithobates berlandieri* Baird en la localidad de San Miguel del Milagro, Nativitas, Tlaxcala

Electroforesis unicelular en gel

Para el ensayo cometa se utilizó la versión alcalina descrita por Sing *et al.* (1988). Sobre laminillas, previamente preparadas con agarosa regular, se extendió 75 μ l de una mezcla de agarosa de bajo punto de fusión al 0.5 % (225 μ l) y sangre (10 μ l de una dilución 1:30 en aga-

rosa), permitiendo la solidificación a 4 °C durante 5 min. El DNA se liberó del núcleo por inmersión de las laminillas en una solución de lisis (NaCl 2.5 mM, EDTA 100 mM, Tris 10 mM, Tritón 1 % y DMSO 10 %) durante 24 h a 4 °C. El desenrollamiento del DNA se llevó a cabo bajo condiciones de obscuridad colocando las laminillas en una solución de NaOH 300 mM y Na₂EDTA 10 mM (pH 13) durante 20 min, posteriormente se sometieron a una electroforesis a 300 mA y 25 V durante 20 min. Las laminillas se lavaron dos veces con buffer de neutralización (0.4 M Tris-base, pH 7.5) y se fijaron con alcohol metílico absoluto.

La migración de los fragmentos de DNA se analizó con un microscopio de epifluorescencia (LEICA DM 2000) equipado con lámpara de mercurio (OSRAM HBO® 100/2 watts, Germany) y filtro de excitación (450-490 nm). Las laminillas se analizaron a doble ciego y siempre por el mismo investigador, utilizando como fluorocromo el bromuro de etidio (0.02 mg/ml). Se contabilizaron un total de 100 moléculas de DNA por cada rana y se clasificaron en una escala de 0 a 3 de acuerdo al tamaño de la cauda o nivel de daño, el diámetro aproximado de la cabeza es de 20 µm: clase 0, sin cauda; clase 1, con una cauda menor al diámetro de la cabeza (< 20 µm); clase 2, longitud de la cauda entre uno y dos veces el diámetro de la cabeza (20 a 40 µm); clase 3, con una longitud caudal mayor al doble del diámetro de la cabeza (> 40 µm) (Miyaji *et al.* 2004). Los cometas sin cabeza o núcleo visible fueron clasificados como “nubes” y no fueron contabilizados debido a que están asociados a células muertas (Hartmann y Speit 1997). El índice de daño para el ensayo cometa (Damage Index Comet Assay = DICA) se obtuvo al sumar el producto del número de moléculas en cada clase (n₀, n₁, n₂ y n₃) por el valor de la clase (0, 1, 2 y 3), así el DICA osciló entre 0 a 300 unidades arbitrarias (ua), de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$DICA = (0 \times n_0) + (1 \times n_1) + (2 \times n_2) + (3 \times n_3)$$

Ensayo de micronúcleos

Para el ensayo de micronúcleos (MN), se preparó un delgado y uniforme frotis de sangre (5 μ l) sobre laminillas previamente lavadas con metanol. Las laminillas se dejaron secar a temperatura ambiente. Las células se fijaron por inmersión de las laminillas en frascos Coplin, los cuales contenían una solución de metanol: ácido acético (3:1) durante 30 min y se tiñeron con el colorante Giemsa (5 % Giemsa en PBS pH 6.7) por 5 min. El análisis al microscopio se realizó por el mismo investigador y a doble ciego utilizando un microscopio de luz óptico (marca Leica DM 2000, lente de inmersión 100/1.25). Se contabilizaron 1000 células eritrocíticas en interfase por cada espécimen, y se registraron los eritrocitos con micronúcleos, empleando los criterios establecidos por Fenech *et al.* (2003).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los especímenes se agruparon por gramaje con medias aritméticas [3.2 \pm 1.1 g (G1), 7.7 \pm 1.3 g (G2) y 18.3 \pm 5.5 g (G3)] estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre grupos. La comparación entre hembras y machos del mismo grupo no mostró diferencias significativas (**Cuadro I**). En la **Fig. 2** se aprecian las moléculas de DNA fragmentadas formando una imagen parecida a un cometa. El diámetro de la cabeza presenta un intervalo de 15 a 20 μ m. La categoría 3 equivale a una longitud caudal superior a 40 μ m (mayor al doble del diámetro de la cabeza). EL promedio de moléculas en la categoría 3 fue del 51.1 \pm 7.8 % (G1), 32.8 \pm 3.9 % (G2) y 32.8 \pm 3.9 % (G3).

CUADRO I. ESPECÍMENES DE *Lithobates berlandieri* Baird RECOLECTADOS EN UNA ZONA AGRÍCOLA: SEXADOS Y AGRUPADOS DE ACUERDO AL PESO

G1 (< 5g)		G2 (5 a 10g)		G3 (>10g)	
Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos
1.6	2.7	5.6	6.0	12.9	10.6
1.7	4.0	7.3	6.3	13.3	14.8
2.3	4.7	7.5	6.7	16.6	21.0
3.0		7.6	8.2	20.7	21.7
3.5		9.4	8.4	25.6	26.2
4.0		9.6	8.6		
4.1			9.5		
2.9 ± 1.0^a (n = 7)	3.8 ± 1.0^a (n = 3)	7.8 ± 1.5^b (n = 6)	7.7 ± 1.3^b (n = 7)	17.8 ± 5.4^c (n = 5)	18.9 ± 6.1^c (n = 5)

Letras iguales indican que no hubo diferencias significativas por género con la prueba T de Student: ^aG1 p = 0.236, ^bG2 p=0.839, ^cG3 p = 0.783

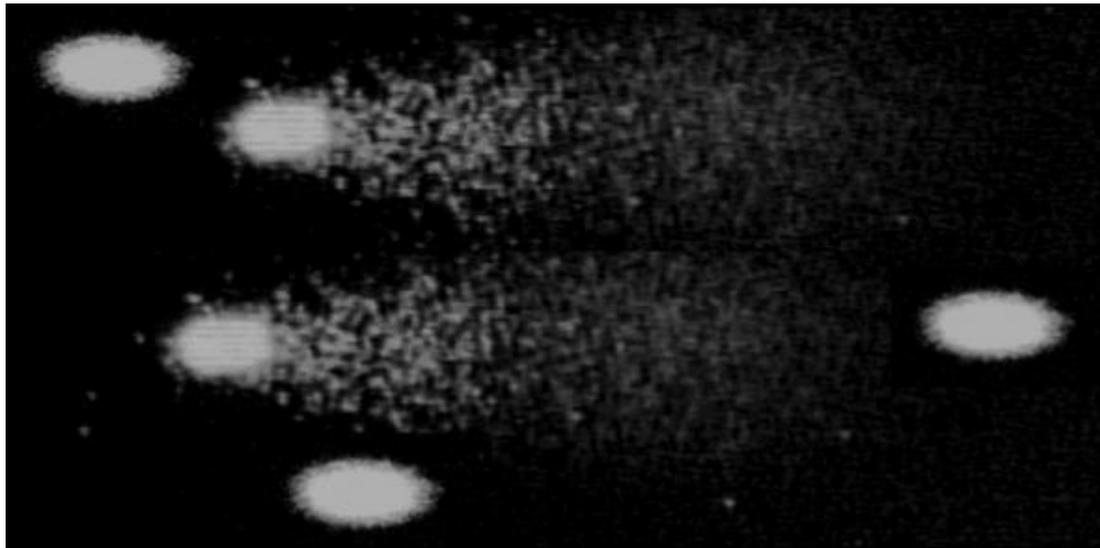


Fig 2. Fragmentación del DNA en eritrocitos de *Lithobates berlandieri* Baird

Los resultados del ensayo cometa indican que no hay diferencias significativas entre hembras ($92.8 \pm 2.5 \%$; 204.4 ± 21.8 ua) y machos ($92.6 \pm 2.9 \%$; 206.2 ± 31.2 ua), empleando el porcentaje de fragmentación al DNA (**Fig. 3**) y el DICA (**Fig. 4**).

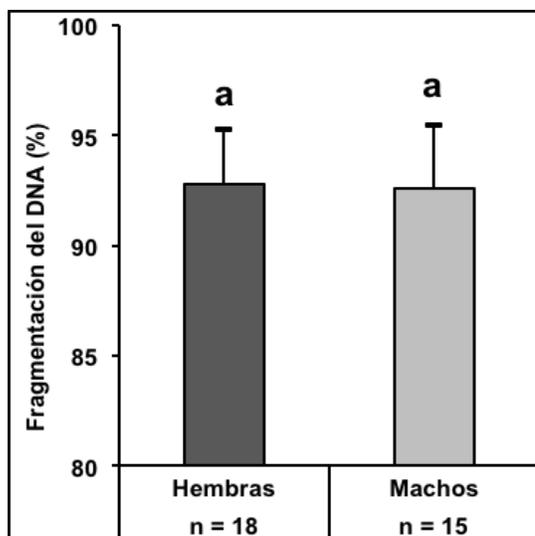


Fig 3. Fragmentación del DNA en eritrocitos de *Lithobates berlandieri* Baird. Letras iguales indican que no hubo diferencias significativas entre los grupos analizados con la prueba T de Student $p < 0.05$.

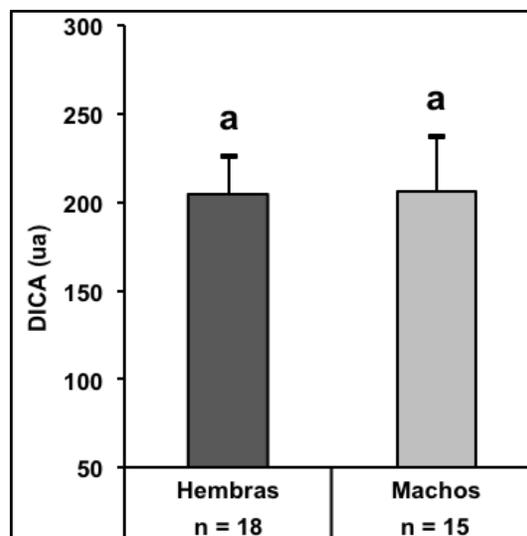


Fig 4. Índice de daño al DNA por el ensayo cometa en eritrocitos de *Lithobates berlandieri* Baird. Letras iguales indican que no hubo diferencias significativas entre los grupos analizados con la prueba T de Student $p < 0.05$.

Sin embargo, los especímenes de mayor peso (G3) presentaron un porcentaje de moléculas con fragmentación del DNA menor ($89.8 \pm 1.8 \%$) con respecto a los grupos G1 ($94.3 \pm 1.6 \%$) y G2 ($93.8 \pm 1.9 \%$) (**Fig. 5**).

El valor del DICA fue menor en el grupo G3 (186.2 ± 7.2 ua) que en el G1 (222.1 ± 14.0 ua) (**Fig. 6**). El porcentaje de fragmentación del DNA y el valor del DICA resultaron ser variables dependientes del peso de los especímenes, a mayor peso menor daño al DNA. El coeficiente de determinación en la **Fig. 7** indica que el 61.74 % de la fragmentación del DNA se asocia negativamente con el peso de los especímenes de manera significativa ($p = 0.001$).

El 22.16 % del daño al DNA medido con la variable DICA presenta una asociación negativa y significativa ($p = 0.006$) con el peso de los especímenes (**Fig. 8**).

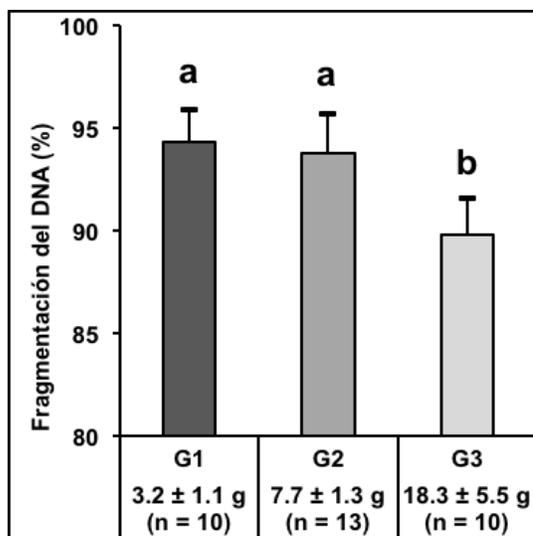


Fig 5. Fragmentación al DNA entre los tres grupos de *Lithobates berlandieri* Baird agrupados por peso. Letras diferentes representan diferencias significativas entre grupos analizados por ANOVA y Tukey $p < 0.05$.

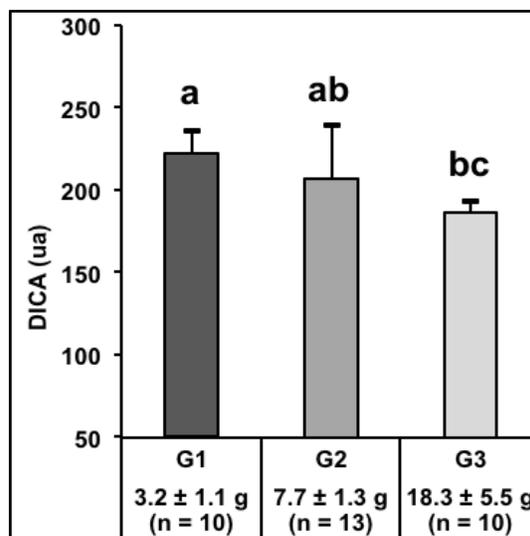


Fig 6. Índice de daño al DNA por el ensayo cometa en *Lithobates berlandieri* Baird agrupados por peso. Letras diferentes representan diferencias significativas entre grupos analizados por ANOVA y Tukey $p < 0.05$.

El porcentaje de daño al DNA en *Lithobates berlandieri* Baird del presente estudio es comparable a la genotoxicidad reportada en larvas de *Rana nigronaculata* Hallowell (92 %) expuestas a 0.5 mg/L de imidacloprid durante 7 días (Feng *et al.* 2004).

Mientras que las larvas de *Hypsiboas pulchellus* expuestas a concentraciones de 37.5 y 45 mg/L de imidacloprid durante 96 h, resultaron ser menos sensibles con una fragmentación al DNA de 61.6 % (Pérez-Iglesias *et al.* 2014) y 51.3 % (Ruiz de Arcaute *et al.* 2014), respectivamente.

Por su parte, el sapo *Bufo bufo gargarizans* expuesto a 0.32 mg/L del plaguicida clorpirifos presentó daño al DNA evaluado por el ensayo cometa, el cual es comparable al encontrado en la rana leopardo del presente estudio con una longitud caudal de $87.1 \pm 7.1 \mu\text{m}$ (Yin *et al.* 2009).

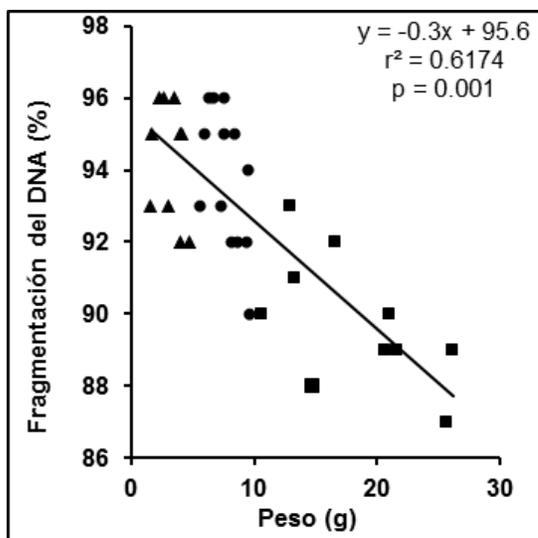


Fig 7. Regresión lineal entre el porcentaje de moléculas con fragmentación al DNA y el peso de los especímenes de *Lithobates berlandieri* Baird. Correlación de Pearson $p < 0.05$.

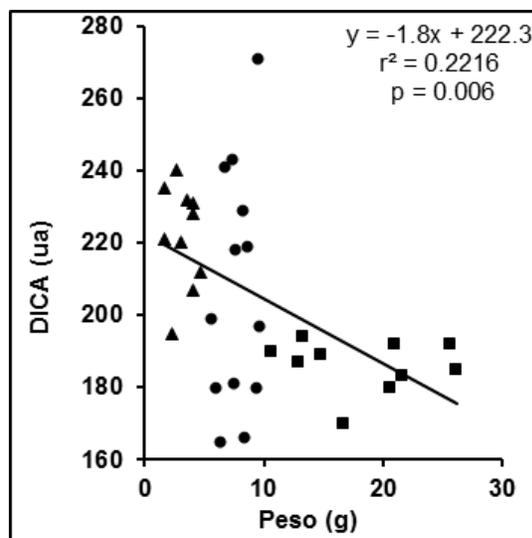


Fig 8. Regresión lineal entre el índice de daño al DNA por el ensayo cometa y el peso de los especímenes de *Lithobates berlandieri* Baird. Correlación de Pearson $p < 0.05$.

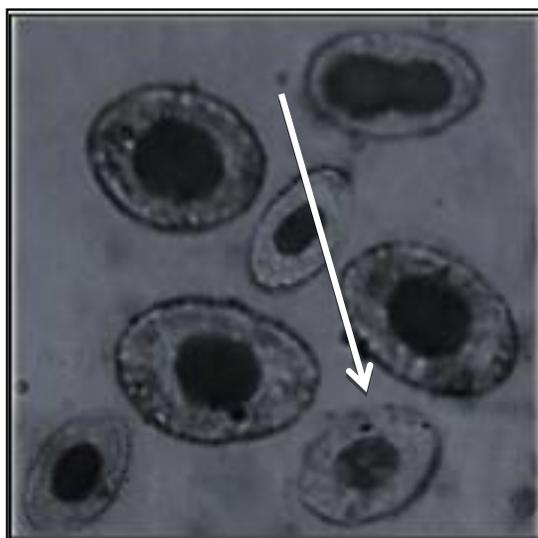


Fig 9. Células eritrocíticas nucleadas de *Lithobates berlandieri* Baird. La flecha muestra la presencia de un micronúcleo.

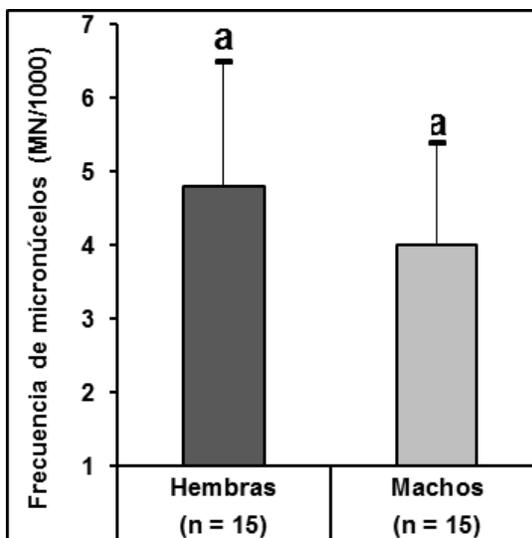


Fig 10. Frecuencia de micronúcleos en eritrocitos de *Lithobates berlandieri* Baird analizados por género. Letras iguales indican que no hubo diferencias significativas entre los grupos analizados con la prueba T de Student $p < 0.05$.

En la **Fig. 9** se aprecia la naturaleza ovalada de los eritrocitos de la rana *Lithobates berlandieri* Baird con núcleo en forma oval y centrado, claramente estructurado y teñido lo cual facilita la identificación de fragmentos en el citoplasma como los micronúcleos. El intervalo de la frecuencia de micronúcleos osciló de 2 a 8 MN/1000, sin diferencias significativas entre hembras (4.8 ± 1.7 MN/1000) y machos (4.0 ± 1.4 MN/1000) como se indica en la **Fig. 10**.

Al comparar esta variable entre grupos G1 (4.6 ± 2.0), G2 (4.4 ± 1.3) y G3 (4.2 ± 1.6) tampoco se encontraron diferencias (**Fig. 11**). En la **Fig. 12** se observa una ligera tendencia de mayor frecuencia de MN en los especímenes de menor peso, sin embargo la asociación es muy débil ($r^2 = 8.2 \%$) y la correlación de Pearson no fue significativa ($p = 0.125$).

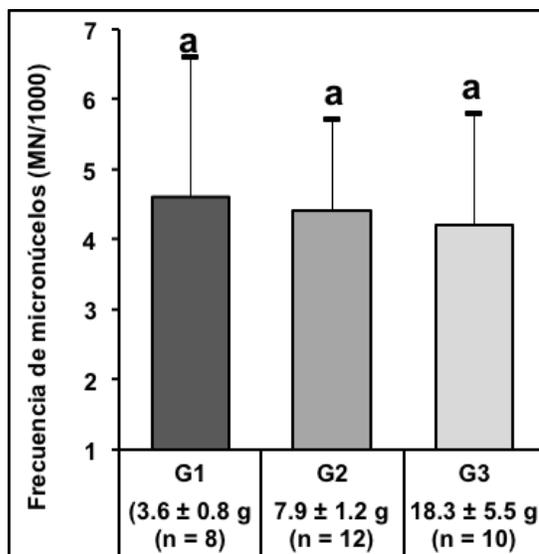


Fig 11. Frecuencia de micronúcleos entre los tres grupos de *Lithobates berlandieri* Baird agrupados por peso. Letras diferentes representan diferencias significativas entre grupos analizados por ANOVA y Tukey $p < 0.05$.

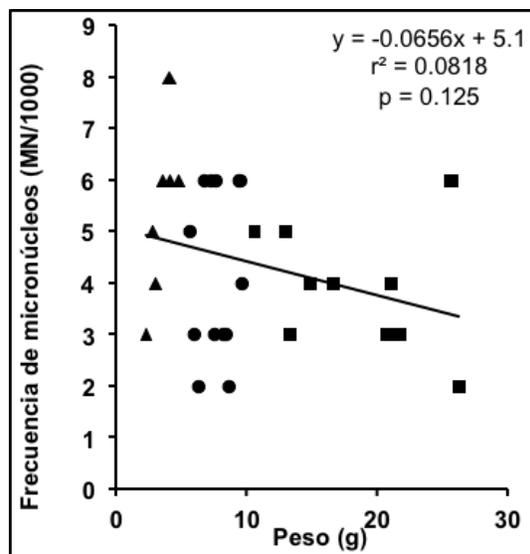


Fig 12. Regresión lineal entre la frecuencia de micronúcleos en eritrocitos y el peso de los especímenes de *Lithobates berlandieri* Baird. Correlación de Pearson $p < 0.05$.

La frecuencia de micronúcleos (4.4 ± 1.6 MN/1000) observada en *Lithobates berlandieri* Baird fue similar a la reportada por Pérez-Iglesias *et al.* (2014) en larvas de la especie *Hypsiboas pulchellus* (5.4 ± 1.3 MN/1000) expuestas a 37.5 mg/L (96 h) de imidacloprid, y por Ruiz de Arcaute *et al.* (2014) en la misma especie (4.2 ± 1.6 MN/1000), a una concentración de 45 mg/L de este plaguicida.

La magnitud del daño también es comparable a los resultados en la *Rana nigromaculata* Hallowell (3.8 ± 0.8 MN/1000) (Feng *et al.*, 2004) expuesta a 32 mg/L (168 h) de imidacloprid, y a lo reportado en *Rana limnocharis* (5.9 ± 1.3 MN/1000) expuesta a 400 μ g/L de arsénico durante 96 h (Singha *et al.* 2014).

La frecuencia de micronúcleos en las ranas, arriba mencionadas, fue inferior a la reportada en sapos *Bufo bufo gargarizans* (11.7 ± 0.7 MN/1000) expuestos a 0.32 mg/L de clorpirifos durante 96 h (Yin *et al.* 2009), y a *Bufo raddei* (8.2 ± 0.2 MN/1000) expuestos a contaminantes petroquímicos de la región del río Yellow al norte de China (Huang *et al.* 2014).

Ambos biomarcadores de genotoxicidad sugieren la presencia de agentes capaces de dañar el DNA a nivel cromosómico y molecular en la zona agrícola de Nativitas, en el estado de Tlaxcala. *Lithobates berlandieri* Baird resultó ser un excelente bioindicador con una mayor sensibilidad en las ranas de menor peso.

Estos resultados proponen continuar las investigaciones en las zonas agrícolas del municipio de Nativitas y en otras áreas del Estado, a través de la cuantificación de diversos plaguicidas en matrices ambientales y biológicas, con el fin de caracterizar el riesgo potencial en la biota y en la población humana, siendo el hombre el último receptor en la cadena trófica.

REFERENCIAS

- Albert L. A. (2005). Panorama de los plaguicidas en México. 7° Congreso de Actualización en Toxicología Clínica. Servicios de Salud de Nayarit y Comisión Federal de Protección contra Riesgos Sanitarios, 17 pág. Última revisión [15-diciembre-2014]. Disponible en: <http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/cd56/pano-rama.pdf>
- Avishai N., Rabinowitz C., Moiseeva E. y Rinkevich B. (2002). Genotoxicity of the Kishon River, Israel: the application of an in vitro cellular assay. *Mutat. Res.* 518 (1), 21-37.
- Baker N. J., Bancroft B. A. y Garcia T. S. (2013). A meta-analysis of the effects of pesticides and fertilizers on survival and growth of amphibians. *Sci. Total. Environ.* 449,150-156.
- Behler J. L. y King F. W. (1992). *The Audubon Society field guide to North American reptiles and amphibians* (Knopf AA, Ed.). Universidad de California, 743 p.
- Denoël M., Libon S., Kestemont P., Brasseur C., Focant J. F. y De Pauw E. (2013). Effects of a sublethal pesticide exposure on locomotor behavior: A video-tracking analysis in larval amphibians. *Chemosphere* 90, 945-951.
- Dhawan A., Bajpayee M. y Parmar D. (2009). Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. *Cell. Biol. Toxicol.* 25, 5-32.
- Díaz-Barriga M. F., Trejo-Acevedo A., Betanzos A. F., Espinosa-Reyes G., Alegría-Torres J. A. y Pérez Maldonado I. N. (2012). Assessment of DDT and DDE levels in soil, dust, and blood samples from Chihuahua, Mexico. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 62 (2),351-358.
- FAO. (2009). *La FAO en México. Más de 60 años de cooperación 1945 - 2009*. La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, FAO, México, 370 p. Última consulta [04-diciembre-2014]. Disponible en: http://fao.org.mx/documentos/Libro_FAO.pdf.
- Fenech M., Chang W. P., Kirsch-Volders M., Holland N., Bonassi S. y Zeiger E. (2003). HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesisblock micronucleus assay using isolated human lymphocytes cultures. *Mutat. Res.* 534 (1-2), 65-75
- Feng S., Kong Z., Wang X., Zhao L. y Peng P. (2004). Acute toxicity and genotoxicity of two novel pesticides on amphibian, *Rana N. Hallowell*. *Chemosphere* 56, 457-463.
- Gahl M. K., Pauli D. B. y Houlahan J. F. (2011). Effects of chytrid fungus and a glyphosate-based fungicides on survival and growth of wood frogs (*Lithobates sylvaticus*). *Ecol. App.* 21, 2521-2529.
- García-Nieto E., Carrizales-Yañez L., Juárez-Santacruz L., García-Gallegos E., Hernández-Acosta E., Briones-Corona E. y Vázquez-Cuecuecha O. G. (2011). Plomo y arsénico en la subcuenca del Alto Atoyac en Tlaxcala, México. *Rev. Chapinigo SCFA.* 17 (1), 7-17.
- García-Nieto E., Juárez-Santacruz L., García-Gallegos E., Tlalmis-Zempoalteca J., Romo-Gómez C. y Torres-Dosal A. (2014). Genotoxicological Response of the Common Carp (*Cyprinus carpio*) Exposed to Spring Water in Tlaxcala, México. *Bull Environ. Contam. Toxicol.* 93, 393-98.
- Gerhardt A. (2010). Bioindicator species and their use in biomonitoring. En *Environmental Monitoring* (Inyang HI, Daniels JL. Ed.). Global Institute for Energy and Environmental Studies (GIEES). The University of North Carolina at Charlotte, USA. Geoenvironmental and Energy Systems Research Laboratory (GESRL). Uni

- versity of North Carolina at Charlotte, USA. UNESCO-EOLSS ©Encyclopedia of Life. Vol. I, pp. 77-123. Última consulta [09-diciembre-2014]. En: <http://www.eolss.net/Sample-Chapters/C09/E6-38A-01-07.pdf>
- González-Millie D. J., Espinosa-Reyes G., Rivero-Pérez N. E., Trejo-Acevedo A., Nava-Montes A. D. y Ilizaliturri-Hernández C. A. (2013). Persistent Organochlorine Pollutants (POPs) and DNA damage in Giant Toads (*Rhinella marina*) from an industrial area at Coatzacoalcos, Mexico. *Water, Air, Soil, Pollut.* 224, 1781.
- Groner M. L. y Relyea R. A. (2011). A tale of two pesticides: how common insecticides affect aquatic communities. *Freshwater Biol.* 56, 2391-2404.
- Hartmann A. y Speit G. (1997). The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (comet assay). *Toxicol. Lett.* 90 (2-3), 183-188.
- Hillis D. M., Fros J. S. y Wright D. A. (1983). Phylogeny and biogeography of the *Rana pipiens* complex: A biochemical evaluation. *Systematic Zoology* 32, 132-143.
- Huang D., Zhang Y., Wang Y., Xie Z. y Ji W. (2007). Assessment of the genotoxicity in toad *Bufo raddei* exposed to petrochemical contaminants in Lanzhou Region, China. *Mutat. Res.* 629, 81-88.
- INEGI. (2011). Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Última consulta [04-diciembre-2014]. Disponible en: <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/mexico-cifras/default.aspx?e=29>
- Jasso P. Y., Espinosa-Reyes G., González-Millie D., Razo-Soto I., Carrizales L., Torres-Dosal A., Mejía-Saavedra J., Monroy M., Ize A., Yarto M. y Díaz-Barriga F. (2007). An integrated health risk assessment approach to the study of mining sites contaminated with arsenic and lead. *Integrated Environ. Assess. Manag.* 3 (3), 344-350.
- Juárez-Santacruz L., García-Nieto E., Costilla-Salazar R., García-Gallegos E., Coronel-Olivares C., Gómez-Camarillo M. A. y Gaytán-Oyarzún J. C. (2013). Assessment of the genotoxic potential of sediments contaminated with POPs and agricultural soils using *Vicia faba* micronucleus assay. *Soil Sediment. Contam. Int. J.* 22 (6), 288-300.
- Lacaze E., Geffard O., Bony S. y Devaux A. (2010). Genotoxicity assessment in the amphipod *Gammarus fossarum* by use of the alkaline Comet assay. *Mutat. Res.* 700:32-38.
- Lajmanovich R. C., Mariana C., Cabagna-Zenklusen M. C., Attademo A. M., Junges C. M., Peltzer P. M., Bassó A. y Lorenzatti E. (2014). Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in tadpoles of the common toad (*Rhinella arenarum*) treated with the herbicides Liberty® and glufosinate-ammonium. *Mutat. Res.* 769, 7-12.
- Lazorchak J. M., Hill B. H., Brown B. S., McCormick F. H., Engle V., Lattier D. J., Bagley M. J., Griffith M. B., Maciorowski A. F. y Toth G. P. (2002). USEPA biomonitoring and bioindicator concepts needed to evaluate the biological integrity of aquatic systems. En: *Bioindicators and biomonitoring* (Markert BA, Breure AM, Zechmeister HG, Ed.). © 2002 Elsevier Science B.V. Capítulo 23, pp. 831-873.
- Miyaji C. K., Jordaño B. Q., Ribeiro L. R., Eira A. F. y Cólus I. M. S. (2004). Genotoxicity and antigenotoxicity assessment of shiitake (*Lentinula edodes* (Berkeley) Pegler) using the Comet assay. *Genet. Mol. Biol.* 27 (1), 108-114.
- Pérez-Iglesias J. M., Ruiz de Arcaute C., Nikoloff N., Dury L., Soloneski S., Natale G. S. y Larramendy M. L. (2014). The genotoxic effects of the imidacloprid-based insecticide formulation Glacoxan Imida on Montevideo tree frog *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 104, 120-126.
- Poletta G.L., Larriera A., Kleinsorge E., Mudry M. D. (2009). Genotoxicity of the herbicide formulation Roundup® (glyphosate) in broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*)

- rostris*) evidenced by the Comet assay and the Micronucleus test. *Mutat. Res.* 672, 95-102.
- Ruiz de Arcaute C., Pérez-Iglesias J. M., Nikoloffa N., Nataleb G. S., Soloneskia S. y Larramendya M. L. (2014). Genotoxicity evaluation of the insecticide imidacloprid on circulating blood cells of Montevideo tree frog *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae) by comet and micronucleus bioassays. *Ecological Indicators* 45, 632-639.
- SAGARPA. (2012). Pronóstico agroclimático Tlaxcala 2012. 63 pág. Última consulta [04-diciembre-2014]. Disponible en: <http://www.sagarpa.gob.mx/Delegaciones/tlaxcala/Documents/2012/PRONOSTICO%20AGROCLIMATICO%202012.pdf>
- Salagovic J., Gilles J., Verschaeve L. y Kalina I. (1996). The comet assay for the detection of genotoxic damage in the earthworms: a promising tool for assessing the biological hazards of polluted sites. *Folia Biologica (Praha)* 42 (1-2), 17-21.
- Singh N. P., McCoy M. T., Tice R. R. y Schneider E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175 (1), 184-191.
- Singha U., Pandey N., Boro F., Giri S., Giri A. y Biswas S. (2014). Sodium arsenite induced changes in survival, growth, metamorphosis and genotoxicity in the Indian cricket frog (*Rana limnocharis*). *Chemosphere* 112, 333-339.
- Smalling K. L., Reeves R., Muths E., Vandever M., Battaglin W. A., Hladik M. L. y Pierce C. L. (2015). Pesticide concentrations in frog tissue and wetland habitats in a landscape dominated by agriculture. *Sci. Total Environ.* 502, 80-90.
- Stebbins R. C. (2003). *A Field Guide to Western Reptiles and Amphibians*. 3rd Edition. Houghton Mifflin Company, New York. 514 p.
- Terradas M., Martín M., Tusell L. y Genescà A. (2010). Genetic activities in micronuclei: is the DNA entrapped in micronuclei lost for the cell? *Mutat. Res.* 705 (1), 60-7.
- Torres Dosal A., Martínez-Salinas R. I., Hernández-Benavides D., Pérez-Vázquez F. J., Ilizaliturri-Hernández C. y Pérez-Maldonado I. N. (2012). Assessment of the levels of DDT and DDE in soil and blood samples from Tabasco, Mexico. *Environ. Monit. Assess.* 184 (12), 7551-7559.
- Wagner N., Züghart W., Mingo W. y Lötters S. (2014). Are deformation rates of anuran developmental stages suitable indicators for environmental pollution? Possibilities and limitations. *Ecological Indicators* 45, 394-401.
- Waliszewski S. M., Carvajal O., Gómez-Arroyo S., Amador-Muñoz O., Villalobos-Pietrini R., Hayward-Jones P. M. y Valencia-Quintana R. (2008). DDT and HCH isomer level in soil, carrot root and carrot leaf samples. *Bull Environ. Contam. Toxicol.* 81, 343-347.
- Yin X., Zhua G., Li X. B. y Liua S. (2009). Genotoxicity evaluation of chlorpyrifos to amphibian Chinese toad (Amphibian: Anura) by Comet assay and Micronucleus test. *Mutat. Res.* 680, 2-6.

***Vicia faba* COMO BIOINDICADOR GENOTÓXICO DE SEDIMENTOS SUPERFICIALES DE RÍOS**

Libertad JUÁREZ-SANTACRUZ¹, Yury XELHUANTZI MENDOZA²

¹Laboratorio de Toxicología Ambiental, Centro de Investigación en Genética y Ambiente, Universidad Autónoma de Tlaxcala.

²Ingeniería Química, Facultad de Ciencias Básicas, Ingeniería y Tecnología, Universidad Autónoma de Tlaxcala.

Palabras clave: *Vicia faba*, aberraciones cromosómicas, contaminación

RESUMEN

El presente estudio evalúa la genotoxicidad de extractos ácidos de sedimentos recolectados en cinco puntos del Sistema Hidrológico Zahuapan-Atoyac (Tlaxco, El Ojito, Apizaco, Tepetitla y Papalotla). Se utilizó *Vicia faba* como sistema de prueba y las aberraciones cromosómicas e índice mitótico como marcador de daño. En todos los extractos el porcentaje de índice mitótico disminuyó después de 4 h de exposición y 18 y 44 h de recuperación presentando valores estadísticamente significativos (11.2 ± 6.2 y 13.9 ± 0.2) comparados con el testigo negativo (17.9 ± 2.1). La frecuencia de células en anafase con aberraciones cromosómicas como puentes, fragmentos y cromosomas con centrómero inactivado se incrementaron en ambos tiempos de recuperación, con valores estadísticamente diferentes comparados con el testigo negativo, los resultados demuestran la presencia en los sedimentos de compuestos con capacidad cito y genotóxica.

Key words: *Vicia faba*, chromosome aberrations, contamination

ABSTRACT

This study evaluates the genotoxicity of acid extracts of sediments collected at five points of Hydrological System Zahuapan-Atoyac (Tlaxco, Ojito, Apizaco, Tepetitla and Papalotla). *Vicia faba* was used as system test and chromosome aberrations and mitotic index as marker of damage. In all extracts the percentage of mitotic index decreased after 4 h of exposure and 18 and 44 h of recovery showing statistically significant values (11.2 ± 6.2 and 13.9 ± 0.2) compared with the negative control (17.9 ± 2.1). The frequency of cells in anaphase with chromosomal aberrations such as bridges, fragments and chromosomes inactivated centromere increased in both recovery times, with statistically different values compared to the negative control, the results demonstrate the presence in the sediments of compounds with capacity cito and genotoxic.

INTRODUCCIÓN

Los ríos y arroyos de México constituyen una red hidrográfica de 633 000 km de longitud, por los cauces de los 50 ríos principales fluye el 87 % del escurrimiento superficial del país (CONAGUA 2013). Desde años remotos el agua de los ríos es utilizada para realizar diversas actividades, dejando a su paso una gran cantidad de contaminantes derivados de los productos químicos indispensables en los procesos de producción de las empresas instaladas en las orillas de los río, y del aumento de la población que usa el río para verter sus desechos (Monsivais y Rueda 2012).

El río Zahuapan principal corriente superficial del estado de Tlaxcala cruza de forma directa, por 25 de los 60 municipios y, de forma

indirecta 20 realizan descargas de aguas residuales sin tratamiento previo y sin ningún tipo de control (PADHPOT 2012). Las principales fuentes de contaminación son descargas de aguas residuales domésticas, públicas e industriales, así como de residuos sólidos (CONAGUA 2013).

Por su parte el río Atoyac recibe descargas de aguas residuales industriales provenientes de los corredores industriales Quetzalcóatl, Ixtacuixtla y Huejotzingo; así como del Complejo Petroquímico Independencia y de diversas empresas de maquila de mezclilla, además de agua residual doméstica y de escurrimientos que contienen agroquímicos provenientes de las áreas agrícolas (Monsivais y Rueda 2012).

Esto significa que tanto el río Zahuapan como el Atoyac transportan aguas residuales sin tratamiento previo con diversas sustancias entre ellas cloroformo, cloruro de metileno, detergentes, metales pesados, sólidos suspendidos y así como una gran cantidad de materia orgánica, provocando altos grados de contaminación ambiental y degradación ecológica (PADHPOT 2012), lo cual repercute de forma directa a la biodiversidad de los ríos, e indirectamente a las comunidades cercanas aledañas que utilizan el agua del río para actividades de riego y para ganadería (Monsivais y Rueda 2012).

Por su parte los sedimentos han sido ampliamente utilizados como indicadores de contaminación ambiental de los ecosistemas acuáticos, debido a que constituyen el más grande y estable depósito de contaminantes tanto orgánicos como inorgánicos. Un sedimento se define como un depósito en forma de conos de origen detrítico, químico u orgánico, fruto de la meteorización de las rocas, de precipitación de elementos disueltos en el agua o de la acumulación de materia orgánica, los sedimentos arcillo-limosos y con alto contenido de materia orgánica presentan una elevada retención de una variada gama de contami-

nantes (Doménech y Peral 2006). El continuo aporte de vertidos a los ríos incrementa el aporte de metales pesados en agua y sedimentos (García-Nieto *et al.* 2011), así como de compuestos orgánicos persistentes como DDT y bifenilos policlorados (PCBs) entre otros (Juárez-Santacruz *et al.* 2013).

Muchas sustancias que contaminan el aire, el agua o el suelo ejercen un efecto sobre los seres vivos, algunas de ellas producen alteración en los genes, lo que puede producir efectos mutagénicos lo cual implica la necesidad de evaluar genotóxicamente estos compuestos.

Los ensayos con plantas como *Vicia faba* se han integrado como un componente de genotoxicidad en evaluación de riesgos para la detección de mutágenos ambientales debido a que son simples, rápidos, baratos, eficientes y confiables (Grant 1982, Patlolla *et al.* 2012, Sta *et al.* 2012). El ensayo con células meristemáticas de la raíz de *V. faba* ha sido pionero en estudios citogenéticos de agentes físicos y químicos desde los años '30s (Patlolla *et al.* 2012, Sta *et al.* 2012), debido a que tiene pocos cromosomas ($2n = 12$), ciclo celular corto (20 h) y alto proporción de células en división, por lo que es adecuado para evaluar daño al DNA.

Entre los biomarcadores de exposición medidos en diversas plantas se encuentran las aberraciones cromosómicas (AC) según USEPA Gene-Tox Program. La frecuencia de AC en los ápices de *V. faba* utilizado como indicadores de genotoxicidad (Grant 1982; Patlolla *et al.* 2012), es un bioensayo validado por el Programa Internacional sobre Seguridad Química (IPCS, OMS) y el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA) como una prueba estándar y eficiente para la investigación química y evaluación *in situ* de la genotoxicidad de sustancias contaminantes (Grant 1982).

El ensayo de AC detecta cambios en la estructura de los cromosomas, que son visibles al microscopio óptico. Estos cambios corresponden a roturas y reordenaciones dentro de un cromosoma o entre cromosomas diferentes. Estas reorganizaciones son producidas sobre todo por aquellas sustancias que rompen directamente la cadena de DNA (radiaciones ionizantes) o que distorsionan la doble hélice de DNA (agentes intercalantes).

Las AC se han estudiado durante muchos años, varios modelos fueron desarrollados para explicar su origen, la mayoría de las teorías sobre su mecanismo de formación implican los conceptos de clastógenos los cuales actúan directamente sobre el DNA para producir roturas de la cadena, y, posteriormente, la supervivencia de estas roturas o mal reparaciones de ellos a través de la metafase o anafase cuando aparecen como fracturas cromosómicas o translocaciones (Bignold 2009).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la capacidad genotóxica de extractos ácidos de sedimentos del sistema hidrológico Zahuapan-Atoyac (SH:Z-A), empleando el ensayo de aberraciones cromosómicas en células en anafase de *V. faba* como bioindicador.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

Los sitios de estudio se determinaron con base en estudios preliminares realizados en el Sistema Hidrológico Zahuapan-Atoyac (SH:Z-A) (**Fig. 1**), los cuales se describen a continuación.

1. **Tlaxco (TLA)**. Representa el nacimiento del río Zahuapan en la sierra del Peñón, del municipio de Tlaxco, antes de ser impactado por descargas municipales e industriales de este municipio,

sitio inicial de muestreo del sistema hidrológico Zahuapan-Atoyac.

2. **Manantial el Ojito (OJI)**. Se encuentra localizado pendiente arriba del cauce del Zahuapan, su evaluación es importante debido a que el agua se utiliza para abastecer a las comunidades de San Bartolo y Apizaquito.
3. **Apizaco (API)**. Este sitio recibe descargas provenientes de la ciudad industrial Xicothéncatl.
4. **Tepetitla-Atoyac (TEP)**. El río Atoyac se origina en el estado de Puebla, recibe descargas de origen doméstico e industrial.
5. **Papalotla (PAP)**. En la comunidad de San Buenaventura, perteneciente al municipio de Papalotla, ya se han unido las corrientes de los ríos Atoyac y Zahuapan y muy probablemente se han incrementado y/o diversificado los posibles contaminantes vertidos a lo largo de ambos cauces.

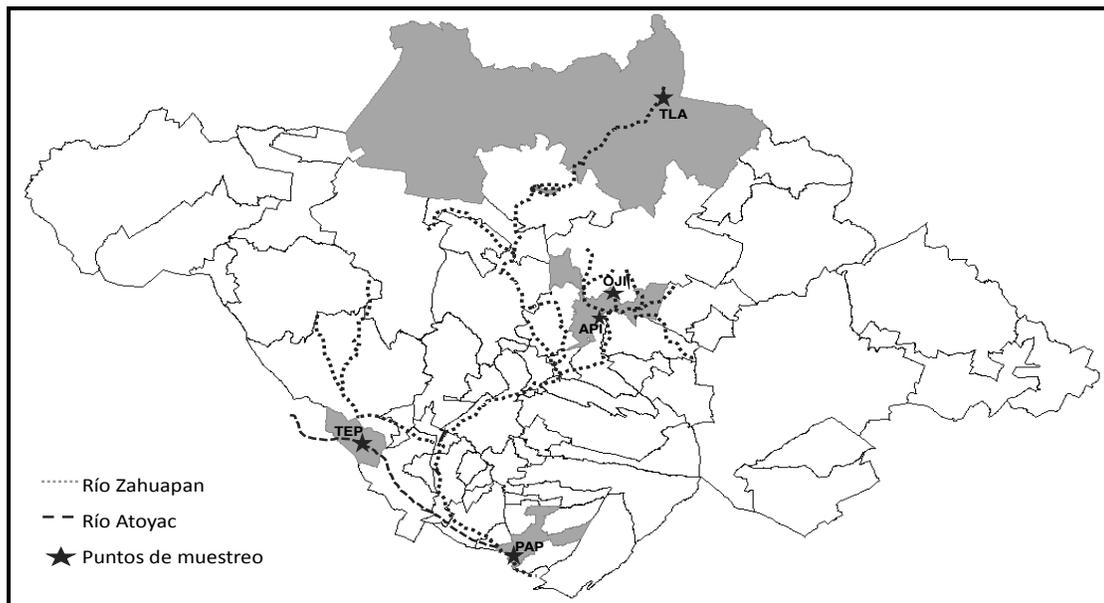


Fig. 1. Mapa de ubicación de puntos de muestreo en el sistema hidrológico Zahuapan-Atoyac

Muestreo de sedimento

En recipientes de polietileno se recolectó sedimento superficial con una espátula de plástico en la orilla del cauce en cada uno de los sitios seleccionados, se colocaron en una hielera para su traslado al laboratorio en donde se secaron en una estufa a 37° C por 48 h. Las muestras se homogenizaron utilizando un tamiz con malla de 600 µm y se guardaron en refrigeración hasta su uso.

Obtención de extractos ácidos

Se pesó 1g de sedimento de cada sitio, cada uno se colocó en un vaso de precipitados, se añadieron 10 ml de ácido nítrico (HNO₃) y 0.5 ml de ácido perclórico y se taparon con vidrios de reloj. En una campana de extracción los vasos se colocaron sobre una parrilla de calentamiento, cuidando que la temperatura no sobrepasara los 80 °C. Se mantuvieron de esta forma hasta que el ácido se redujo a aproximadamente 3 ml posteriormente se quitó el vidrio de reloj y se continuó la evaporación hasta un volumen de 0.5 ml. Cada extracto se resuspendió con 25 ml de HNO₃ al 0.2 % y se filtró con papel filtro Whatman No.1, se guardaron en refrigeración hasta su uso.

Evaluación genotóxica de extractos

Semillas de *V. faba* se lavaron en agua corriente y se dejaron en imbibición por 24 h, posteriormente se germinaron entre dos capas de algodón humedecido con agua destilada. Al aparecer la radícula, se removió la testa y al medir la raíz principal de 2 a 3 cm previamente a los tratamientos, se eliminó la cofia.

Los extractos ácidos de los sedimentos se diluyeron al 50 % con agua destilada y se colocaron en cristalizadores, 8 raíces se sumergie-

ron en cada uno durante 4 h. Al mismo tiempo se colocó un testigo negativo (TN) con agua destilada y un testigo vehículo (TV) con HNO₃ al 0.2 %. Posteriormente las raíces se enjuagaron con agua destilada y se colocaron en un baño de recuperación con agua corriente, aireación constante y en oscuridad durante 18 y 44 h. En seguida se cortaron aproximadamente 5 mm de las puntas de las raíces, se colocaron en solución etanol-ácido acético 3:1 y se guardaron en refrigeración.

Los meristemas se hidrolizaron con HCl 5 N en baño María a 28 °C por 20 min. Posteriormente se lavaron con agua destilada y se tiñeron con reactivo de Schiff durante 20 min. Finalmente los meristemas se colocaron uno a uno sobre portaobjetos agregando una gota de ácido acético al 45%, en seguida se colocó el cubreobjetos y se realizó el aplastamiento del tejido en monocapa (“squash”). Las laminillas se colocaron sobre hielo seco hasta que estuvieron completamente congeladas, se les desprendió el cubreobjetos con un bisturí, se deshidrataron con dos cambios de butanol absoluto y se montaron con una gota de resina Entellan.

El análisis de AC se realizó en células en anafase, diferenciando entre normales, aquellas que no presentaban alteración en su estructura y anormales las que presentaban AC, estas últimas clasificándose en puentes, fragmentos y cromosomas con centrómero inactivado (CCI) (**Fig. 2**). Se cuantificó el total de células de 4 laminillas por sitio. Al mismo tiempo se determinó el índice mitótico (IM) en 1 000 células, se contó el número de células en división (profase, metafase, anafase y telofase) y en interfase (**Fig. 3**). El porcentaje de IM se obtuvo al dividir las células en división entre el total de células multiplicado por cien.

El análisis estadístico se realizó mediante el análisis de dos proporciones, valor crítico para $Z p < 0.05 = 1.65$.

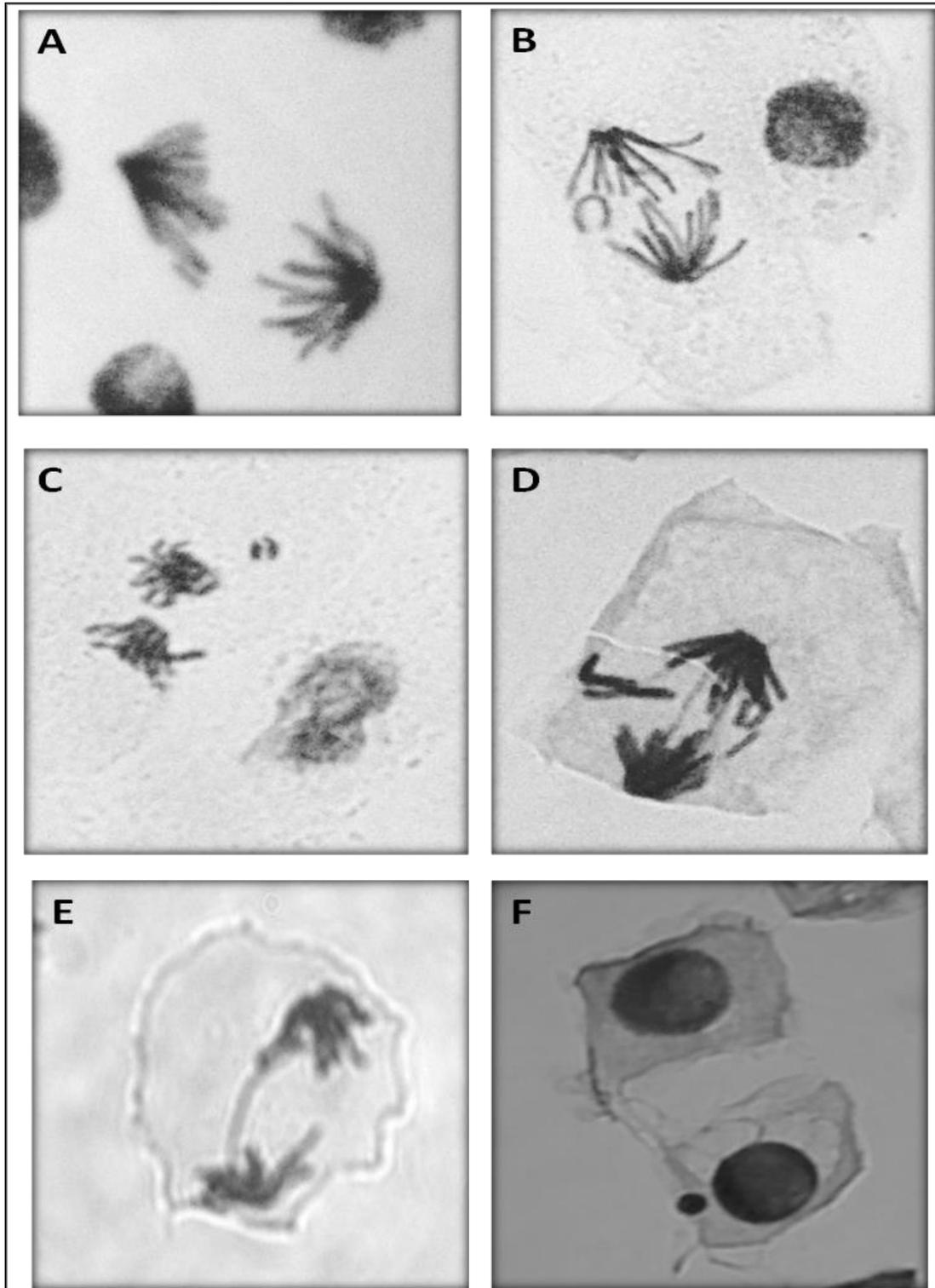


Fig. 2. Células en etapa de Anafase con aberraciones cromosómicas obtenidas en células de *V. faba* tras la exposición a extractos ácidos del SH:Z-A. A) Anafase normal, B) Cromosoma con centrómero inactivado, C) Fragmentos, D) Puente doble y CCI, E) Puente sencillo y F) Micronúcleo

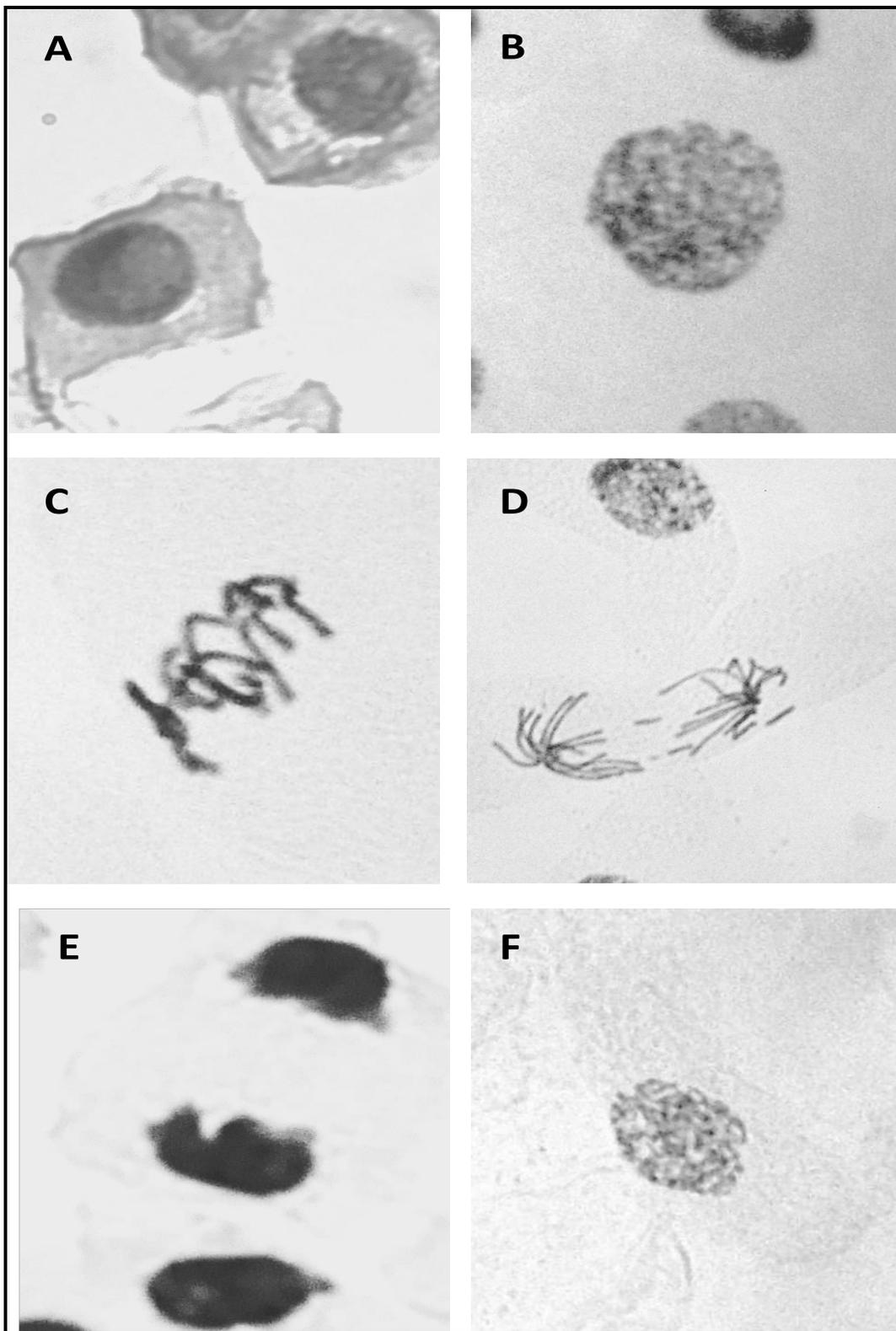


Fig. 3. Células de *V. faba* en diferentes etapas del ciclo celular de A) Interfase, b) Profase, c) Metafase, d) Anafase y e) Telofase

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El **Cuadro I** muestra los resultados del porcentaje de índice mitótico en células de *V. faba* expuestas a extractos ácidos de sedimentos del Sistema Hidrológico Zahuapan-Atoyac (SH:Z-A) durante 4 h y después de 18 y 44 h de recuperación.

El efecto de los extractos sobre la proliferación celular en *V. faba* se evalúa por el descenso en el IM. La proporción de las células en las diferentes fases de la mitosis (profase, metafase, anafase y telofase) disminuyó en las raíces de *V. faba* expuestas a los extractos con respecto a los testigos, el intervalo de reducción fue de 37.5 % (TLA) hasta 29.7 % (PAP) y de 30.5 % (API) hasta 12.9 % (OJI) a las 18 y 44 h de recuperación, respectivamente. Los extractos TLA, TEP y PAP presentaron diferencia estadística con respecto al testigo negativo (TN) en ambos tiempos de recuperación, mientras que el extracto OJI presentó diferencia sólo a las 18 h y API a las 44 h.

CUADRO I. ÍNDICE MITÓTICO EN CÉLULAS MERISTEMÁTICAS DE LA RAÍZ DE *V. faba* EXPUESTAS A EXTRACTOS ÁCIDOS DEL SH: Z-A DESPUÉS DE 4 h DE EXPOSICIÓN

Extracto Ácido	18 h de recuperación					44 h de recuperación				
	^a % IM	±	DS	^b Z _{TN}		^a % IM	±	DS	^b Z _{TN}	
TN	17.9	±	2.1			17.7	±	3.6		
TV	18.7	±	1.7	-0.45	NS	16.5	±	1.3	0.71	NS
TLA	11.2	±	6.2	4.30	*	13.6	±	2.2	2.57	*
OJI	11.6	±	1.7	3.98	*	15.4	±	4.8	1.40	NS
API	17.3	±	6.6	0.38	NS	12.3	±	0.1	3.41	*
TEP	12.1	±	9.2	3.64	*	13.9	±	0.2	2.38	*
PAP	12.6	±	7.1	3.30	*	12.5	±	3.6	3.30	*

^a Promedio de dos experimentos ± DS.

n = 2000 células en cada tratamiento

Análisis de dos proporciones, valor crítico para Z p<0.05 = 1.65

^b Valor crítico de Z. Cada muestra se compara con el testigo negativo.

* Significativo para Z (0.05) = 1.65 NS = No significativo

El IM tanto para el TN como para el TV arroja datos similares, al compararse no presentó diferencias estadísticas, por lo tanto se concluye que el testigo vehículo no es un agente que inhiba la proliferación celular, por tal motivo la comparación solo se realizó con el TN.

Cuando se compara el porcentaje de IM entre los dos tiempos de recuperación (**Fig. 4**), se observa que con los extractos TLA, TEP y PAP no hay diferencia por lo que el daño es independiente del tiempo de recuperación, sin embargo, en OJI y API se presenta una reducción en la proliferación celular hasta $11.6 \pm 1.7 \%$ y $12.3 \pm 0.1 \%$, respectivamente, por tanto, se evidencia efecto S-independiente en OJI y S-dependiente, en API, es decir que los contaminantes de este sitio necesitan pasar por la etapa de síntesis del ciclo celular para causar su efecto nocivo.

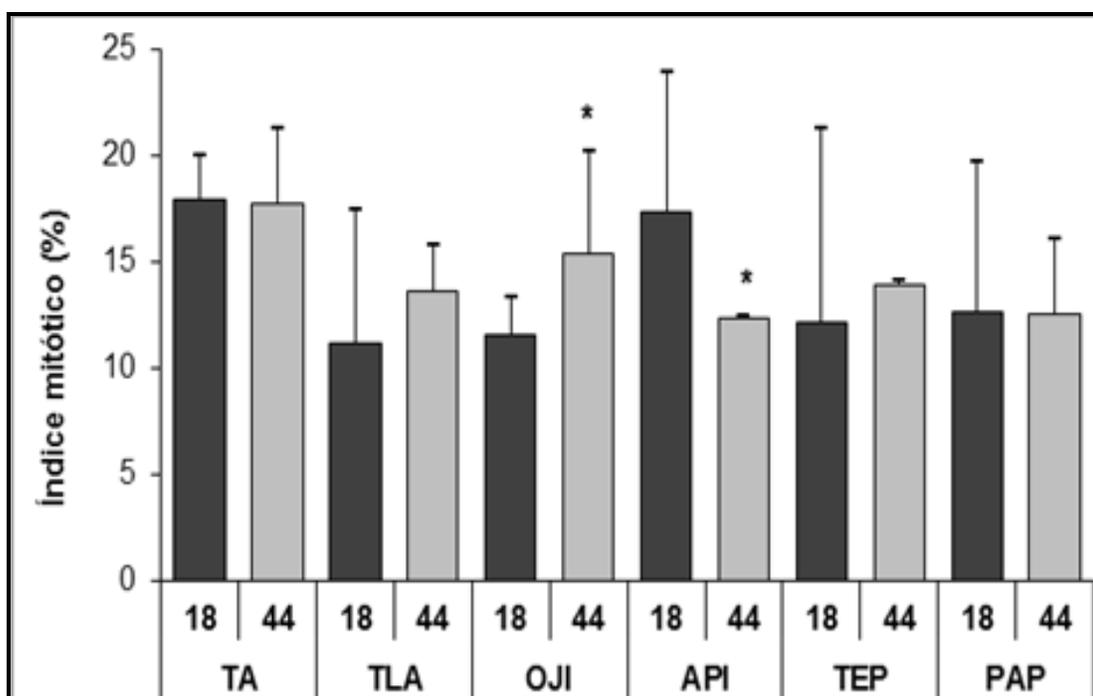


Fig. 4. Comparación del porcentaje de índice mitótico obtenido en células meristemáticas de *V. faba* expuestas durante 4 h a extractos ácidos de sedimentos del SH:Z-A y después de 18 y 44 h de recuperación.

El primer síntoma de la toxicidad de los extractos es la inhibición de la proliferación celular (Yi *et al.* 2010). La disminución del IM podría deberse a la inhibición de la síntesis de DNA, lo cual implica un lento progreso de las células de la fase S (síntesis de DNA) a la fase de mitosis del ciclo celular (Patlolla y Tchounwou 2005, Patlolla *et al.* 2012) o al bloqueo de la fase G2 en el que se requiere la tubulina para la formación de huso mitótico (Mahoney *et al.* 2006). Los efectos en el IM pueden ser considerados como el impacto mutagénico inicial que conducen a anomalías cromosómicas, tales como AC y otras anomalías nucleares (Cotelle *et al.* 1999).

Se observa que todos los extractos ácidos a excepción del OJI fueron capaces de inducir daño al DNA. La proporción de células en anafase con AC a las 18 h de recuperación varía entre $11.3 \pm 8.9 \%$ hasta $14.0 \pm 7.8 \%$ en los diferentes sitios, presentando diferencias estadísticamente significativas comparadas con el TN ($9.0 \pm 2.0 \%$). El TV no produce un daño adicional al DNA ya que el porcentaje de células anormales fue inclusive menor al TN (**Cuadro II**).

El porcentaje de células en anafase con AC a las 44 h de recuperación presentó un incremento de 1 (TEP $8.7 \pm 4.9 \%$) hasta 3 veces (OJI $17.7 \pm 2.2 \%$) estableciendo diferencias estadísticas con respecto al TN ($5.1 \pm 2.0 \%$) (**Cuadro III**). El efecto en la mayoría de los extractos fue independiente de los tiempos de recuperación por lo que el daño al DNA inducido no depende del ciclo celular, con excepción de la muestra de OJI donde el porcentaje de células en anafase con AC ($10.2 \pm 2.2 \%$) a las 18 h de recuperación no presenta diferencias significativas con el TN ($9.0 \pm 2.0 \%$) aunque si se aprecia un ligero incremento con respecto a este, sin embargo, como el porcentaje de IM en este mismo sitio (**Cuadro I**) si presenta inhibición de la porcentaje de proliferación celu-

lar, entonces en el sitio el efecto citotóxico pudiera estar enmascarando el efecto genotóxico.

CUADRO II. PORCENTAJE DE CÉLULAS EN ANAFASE NORMALES Y ANORMALES EN CÉLULAS MERISTEMÁTICAS DE LA RAÍZ DE *V. faba* EXPUESTAS A EXTRACTOS ÁCIDOS DEL SH:Z-A DESPUÉS DE 4 h DE TRATAMIENTO Y 18 DE RECUPERACIÓN

Extracto ácido	^a Total de Células	^b % de Células Normales			^b % de Células Anormales			^c Z _{TN}
		MEDIA	±	DS	MEDIA	±	DS	
TN-18	2246	91.0	±	2.0	9.0	±	2.0	
TV-18	3375	93.2	±	2.1	6.8	±	2.1	3.072 *
TLA-18	1175	88.7	±	8.9	11.3	±	8.9	-2.547 *
OJI-18	2276	89.8	±	2.2	10.2	±	2.2	-0.932 NS
API-18	1000	86.0	±	7.8	14.0	±	7.8	-3.788 *
TEP-18	1118	86.7	±	4.9	13.3	±	4.9	-4.214 *
PAP-18	1956	88.6	±	2.4	11.4	±	2.4	-2.819 *

^a Total de células en anafase de dos experimentos

^b Promedio de dos experimentos ± DS

Análisis de dos proporciones, valor crítico para Z $p < 0.05 = 1.65$

^c Se muestra el valor crítico de Z. Se compara cada tratamiento con el testigo negativo.

* Significativo para Z (0.05) = 1.65 NS = No significativo

Resultados similares se obtuvieron al crecer en hidroponía plantas de *V. faba* y *Zea mays* a diferentes concentraciones de arsénico, causando un decremento en el porcentaje de células en división, así como un incremento significativo en la frecuencia de AC en ambas plantas (Duquesnoy *et al.* 2010).

El proceso de fortalecimiento de la membrana a través de la lignificación y formación de compuestos fenólicos secundarios conduce a un marcado cambio en el espesor y a la formación de ROS, los cuales se cree son responsables de las anomalías cromosómicas que podría dañar el DNA (Ahmad *et al.* 2000, Barbar *et al.* 2006).

CUADRO III. PORCENTAJE DE CÉLULAS EN ANAFASE NORMALES Y ANORMALES EN CÉLULAS MERISTEMÁTICAS DE *V. faba* EXPUESTAS A EXTRACTOS ÁCIDOS DEL SH:Z-A DESPUÉS DE 4 h DE TRATAMIENTO Y 44 DE RECUPERACIÓN

Extracto ácido	^a Total de Células	^b % de Células Normales			^b % de Células Anormales			^c Z _{TN}
		MEDIA	±	DS	MEDIA	±	DS	
TN-44	2720	94.9	±	2.0	5.1	±	2.0	
TV-44	2047	90.8	±	2.1	9.2	±	2.1	-5.538 *
TLA-44	2654	89.2	±	8.9	10.8	±	8.9	-8.667 *
OJI-44	991	82.3	±	2.2	17.7	±	2.2	-8.766 *
API-44	2574	89.3	±	7.8	10.7	±	7.8	-7.843 *
TEP-44	1323	91.3	±	4.9	8.7	±	4.9	-5.364 *
PAP-44	1234	87.8	±	2.4	12.2	±	2.4	-8.032 *

^a Total de células en anafase de dos experimentos

^b Promedio de dos experimentos ± DS

Análisis de dos proporciones, valor crítico para Z p<0.05= 1.65

^c Se muestra el valor crítico de Z. Se compara cada tratamiento con el testigo negativo.

* Significativo para Z (0.05) = 1.65

NS=No significativo

Algunos informes señalan que las alteraciones cromosómicas causan directamente la muerte celular (Leme y Marin-Morales 2009; Kasurka *et al.* 2011), por tal motivo los cambios que se presentan en el índice mitótico pueden considerarse como indicadores de daño citotóxico.

Al comparar el efecto de los extractos ácidos de las muestras de sedimentos del SH:Z-A entre los 2 tiempos de recuperación (18 vs 44 h), se observa que los extractos del OJI, API y TEP presentan diferencias estadísticas entre la cantidad de células en anafase con AC, el mayor porcentaje de daño se presentó a las 44 h en el OJI, mientras que para TEP y API fue a las 18 h cuando el DNA presentó un daño mayor. En PAP y TLA no hay diferencia por lo que la acción de las sustancias que en el sitio se encuentren es independiente del ciclo celular. (**Fig. 5**).

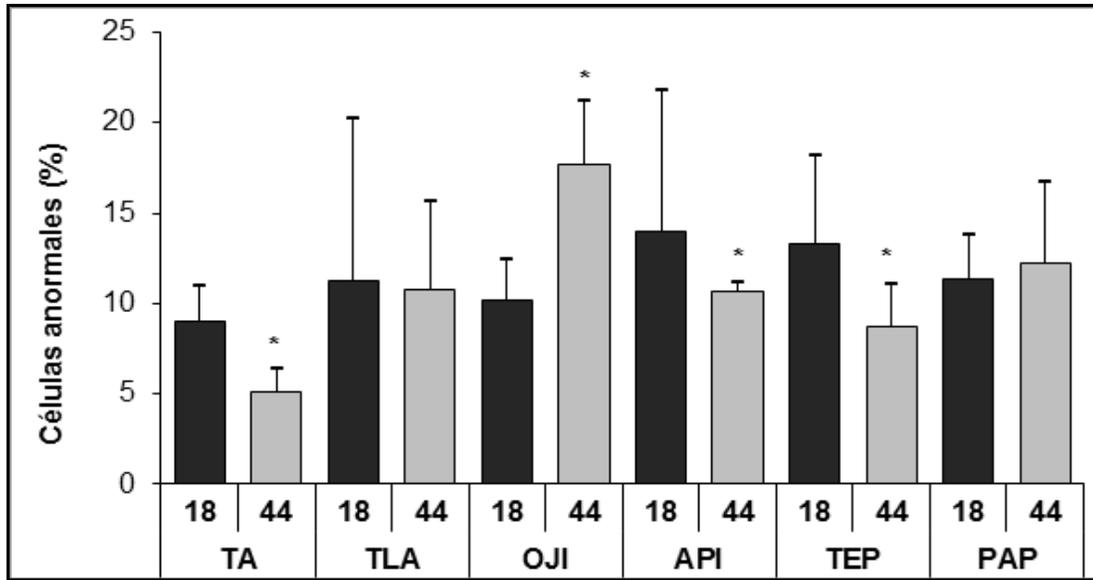


Fig. 5. Comparación del porcentaje de células en anafase anormales en células meristemáticas de *V. faba* expuestas durante 4 h a extractos ácidos de sedimentos del SH:Z-A

Diversos autores han reportado la capacidad genotóxica de ambientes acuáticos impactados por diversos compuestos (Hoshina y Marin-Morales 2009, Giorgetti *et al.* 2011) como metales pesados (Barbosa *et al.* 2010) y compuestos orgánicos persistentes (Juárez-Santacruz 2013).

La evaluación genotóxica en células en anafase permite además de detectar AC como puentes y fragmentos, observar otras como cromosomas con centrómero inactivado, que se producen al afectarse la región centromérica. El mayor porcentaje de AC observadas con los extractos fueron aberraciones de tipo cromatídicas como puentes y fragmentos, en los dos tiempos de recuperación, (**Cuadro IV**). El aumento en el porcentaje de AC en meristemas radiculares indica el efecto genotóxicos de diversos contaminantes ambientales (Yi *et al.* 2009, Pérez *et al.* 2011, Patlolla *et al.* 2012).

Los diferentes tipos de AC inducidas por los diferentes productos

químicos representan su clastogenicidad. Entre los factores que pueden contribuir al incremento en la frecuencia de AC es la interferencia de las sustancias químicas durante el proceso de reparación del DNA, la reparación de las roturas de las cromátidas, que representan las roturas de doble filamento del DNA que no hayan sido sometidos a la reparación en G2, cualquiera de estos daños irreversibles del DNA conducirán a su formación (Patlolla *et al.* 2012).

CUADRO IV. PORCENTAJE DE AC EN CÉLULAS EN ANAFASE DE LA RAÍZ DE *V. faba* EXPUESTAS A EXTRACTOS ÁCIDOS DEL SH:Z-A DESPUÉS DE 4 h DE TRATAMIENTO

Extracto Ácido	18 h de recuperación				44 h de recuperación			
	% Puentes	% Fragmentos	% CCI	% MN	% Puentes	% Fragmentos	% CCI	% MN
TN	49.2	10.7	38.1	2.0	58.1	13.3	22.2	6.5
TV	51.2	18.3	20.2	10.2	52.7	25.7	16.1	5.5
TLA	67.0	18.5	13.2	1.4	49.5	30.9	14.5	5.1
OJI	27.6	46.5	20.0	5.9	41.1	32.9	20.5	5.5
API	43.3	25.4	24.7	6.7	46.6	18.3	31.0	4.1
TEP	34.0	31.3	30.3	4.5	60.8	21.5	16.1	1.7
PAP	59.7	20.1	16.8	3.5	48.1	23.8	21.3	6.7

CCI = Cromosomas con centrómero inactivado
 MN = Micronúcleos

En general, los resultados de este estudio demuestran la capacidad clastogénica de sustancias contaminantes presentes en los sedimentos del SH:Z-A, sin embargo resulta preocupante el daño provocado por el extracto OJI debido a que el agua del manantial es utilizada para consumo humano, por lo tanto se sugiere ampliar la evaluación del sitio para confirmar los resultados y sentar las bases que permitan buscar las medidas necesarias para reducir el riesgo al que pudiera estar enfrentando la población en general. Por otra parte, las células de los meris-

temos de la raíz de *V. faba*, es un excelente material para estudios de clastogenicidad y monitoreo de agentes físicos y químicos.

REFERENCIAS

- Ahmad S., Kitchin K. T. y Cullen W. R. (2000). Arsenic species that cause release of iron from ferritin and generation of activated oxygen. *Arch Biochem Biophys* 382 (2), 195-202.
- Babar A. M., Singh N., Shohael A. M., Hahn E. J. y Paek K. Y. (2006). Phenolics metabolism and lignin synthesis in root suspension cultures of *Panax ginseng* in response to copper stress. *Plant Science*. 171, 147-154.
- Barbosa J. S., Cabral T. M., Ferreira D. N., Agnez-Lima L. F., Batistuzzo de Medeirosa SR. 2010. Genotoxicity assessment in aquatic environment impacted by the presence of heavy metals. *Ecotoxicol Environ Saf.* 73 (3), 320-325.
- Bignold L. P. (2009). Mechanisms of clastogen-induced chromosomal aberrations: A critical review and description of a model based on failures of tethering of DNA strand ends to strand-breaking enzymes. *Mutat Res* 681, 271-298
- CONAGUA. (2013). Estadísticas del agua en México, edición 2013. SEMARNAT, CONAGUA. Mex. 176 p.
- Cotelle S., Masfaraud J. F. y Férard J. F. (1999). Assessment of the genotoxicity of contaminated soil with the *Allium/Vicia*-micronucleus and the *Tradescantia*-micronucleus assays, *Mutat. Res.* 426 (2), 167-171.
- Doménech X. y Peral J. (2006). Química ambiental de sistemas terrestres, editorial reverté, España, pp. 215.
- Duquesnoy I., Champeau G. M., Evray G., Ledoigt G. y Piquet-Pissaloux A. (2010). Enzymatic adaptations to arsenic-induced oxidative stress in *Zea mays* and genotoxic effect of arsenic in root tips of *Vicia faba* and *Zea mays*. *C. R. Biol.* 333(11-12), 814-824
- García-Nieto E., Carrizales-Yáñez L., Juárez-Santacruz L., García-Gallegos E., Hernández-Acosta E., Briones-Corona E., Vázquez-Cuecuecha O. G. (2011). Plomo y arsénico en la subcuenca del alto atoyac en Tlaxcala, México. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 17(1), 7-17.
- Giorgetti L., Talouizte H., Merzouki M., Caltavuturo L., Geri C. y Frassinetti S. (2011). Genotoxicity evaluation of effluents from textile industries of the region Fez-Boulmane, Morocco: a case study. *Ecotoxicol Environ Saf.* 74(8), 2275-2283.
- Grant W. F. (1982). Chromosome aberration assays in *Allium*. A report of the US Environmental Protection Agency gene-Tox Program. *Mutat. Res.* 99, 273-291.
- Hoshina M. M. y Marin-Morales M. A. (2009). Micronucleus and chromosome aberrations induced in onion (*Allium cepa*) by a petroleum refinery effluent and by river water that receives this effluent. *Ecotoxicol Environ Saf.* 72 (8), 2090-2095.
- Juárez-Santacruz L., García-Nieto E., Costilla-Salazar R., García-Gallegos E., Coronel-Olivares C., Gómez-Camarillo M. A. y Gaytán-Oyarzún J. C. (2013). Assessment of the genotoxic potential of sediments contaminated with POPs and agricultural soils using *Vicia faba* micronucleus assay. *Soil And Sediment Contamination An International Journal* 22 (6), 288-300.
- Kasurka C. B., Sekeroğlu Z. A. y Sekeroğlu V. (2011). Evaluation of the genotoxicity and cytotoxicity of fexofenadine in cultured human peripheral blood lymphocytes. *Toxicol In Vitro.* 25 (7), 1480-1484.

- Leme D. M., Marin-Morales M. A. (2009). *Allium cepa* test in environmental monitoring: a review on its application. *Mutat. Res.* 682 (1), 71-81.
- Mahoney N. M., Goshima G., Douglass A. D. y Vale R. D. (2006). Making microtubules and mitotic spindles in cells without functional centrosomes. *Curr. Biol.* 16 (6), 564-569.
- Monsivais S. E. L. y Rueda A. E. I. (2012). Impuestos y subsidios ambientales para regular la contaminación de aguas industriales (Contaminación de la industria textil en el río de Atoyac, municipio de Tepetitla de Lardizábal, Tlaxcala). Tesis de Licenciatura. UAM-A. México, DF. 96 p.
- PADHPOT. (2012). Programa de apoyo al desarrollo hidráulico de los estados de Puebla, Oaxaca y Tlaxcala. Acceso [Diciembre 2014]. Disponible en http://www.agua.unam.mx/padhpot/assets/cdh/generales/Reportefinal_formulacion_200812.pdf
- Patlolla A. K. y Tchounwou B. P. (2005). Cytogenetic evaluation of arsenic trioxide toxicity in Sprague-Dawley rats. *Mutat. Res.* 587, 126-133.
- Patlolla A. K., Berry A., May L. B. y Tchounwou B. P. (2012). Genotoxicity of Silver Nanoparticles in *Vicia faba*: A Pilot Study on the Environmental Monitoring of Nanoparticles. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 9, 1649-1662.
- Pérez D. J., Lukaszewicz G., Menone M. L. y Camadro E. L. (2011). Sensitivity of *Bidens laevis* L. to mutagenic compounds. Use of chromosomal aberrations as biomarkers of genotoxicity. *Environ Pollut.* 159 (1), 281-286.
- Sta Ch., Ledoigt G., Ferjani E. y Goupil P. (2012). Exposure of *Vicia faba* to sulcotrione pesticide induced genotoxicity. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 103 (1), 9-14.
- Yi M., Yi H., Li H., y Wu L. (2010). Aluminum induces chromosome aberrations, micronuclei, and cell cycle dysfunction in root cells of *Vicia faba*. *Environ Toxicol.* 25 (2), 124-129.

***Vicia faba* L. (LEGUMINOSAE) BIOINDICADORA DE LA CALIDAD DE COMPOSTAS ELABORADAS CON LODOS RESIDUALES INDUSTRIALES**

Héctor Santos LUNA ZENDEJAS¹ y Myrna SOLÍS OBA²

¹Centro de Investigación en Cambio Climático, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, México.

²Instituto Politécnico Nacional, Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada, Tlaxcala, Tlaxcala, México.

Palabras clave: haba, micorriza, composta, biofertilizante

RESUMEN

Una problemática que atañe de manera importante al sector agrícola es la degradación del suelo, la cual repercute en su productividad. Ésta se ha incrementado, entre otras cosas, por el uso excesivo de fertilizantes químicos. Se han propuesto diversas alternativas amigables con el ambiente, como es el uso de compostas y la aplicación de biofertilizantes. En este trabajo se evaluó el uso de una composta y Hongos Micorrízicos Arbusculares (HMA), de manera individual y combinados, como sistemas alternos al uso de fertilizantes químicos. *Vicia faba* L. se empleó como planta bioindicadora de la calidad de la composta y sus combinaciones, se cuantificó la altura de las plantas así como la biomasa fresca aérea y radicular. Se determinó que con la aplicación de la composta, de los HMA o de la mezcla composta/HMA casi se duplicó la biomasa aérea del haba comparada con el control, la altura también registró un mayor promedio. El uso de la composta y de los HMA es una

alternativa de agricultura sustentable y *V. faba* L. además de ser una leguminosa de importancia agrícola y económica se puede considerar una excelente indicadora de la calidad de las compostas aplicadas a los suelos como enmiendas orgánicas.

Key words: broad bean, mycorrhizal, compost, biofertilizers

ABSTRACT

The problem major to regards in the agricultural sector is land degradation, which affects their productivity. This degradation has increased, among other things, by the excessive use of chemical fertilizers. Is have proposed various environmentally friendly alternatives, such as the use of compost, application of organic fertilizers and biofertilizers. In this paper was evaluated the use of compost and Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF), individually as well as a combination of both, as alternative systems to the use of chemical fertilizers. As bioindicator of the quality of the compost and combinations thereof, was used the plant *Vicia faba* L., the plant height, the biomass fresh aerial and radical was quantified, it was determined that the application of compost, AMF or compost/AMF, doubled broad bean ground biomass compared to control, the height also recorded a higher average. The use of compost and AMF is an alternative sustainable agricultural and *V. faba* L. besides being a legume and of economic importance can considered an excellent indicator of the quality of the compost to be applies to soils as amendments organic. The use of compost and AMF is an alternative sustainable agricultural and *V. faba* L. besides being a legume and of economic importance can

considered an excellent indicator of the quality of the compost to be applied to soils as organic amendments.

INTRODUCCIÓN

El crecimiento acelerado de la población, ha obligado a buscar un aumento en la producción para satisfacer las crecientes demandas alimenticias. La agricultura es una actividad fundamental para la producción de alimentos a nivel mundial, cuando esta se basa exclusivamente en el incremento de la producción del suelo, se suelen provocar cambios ambientales negativos, frecuentemente irreversibles, que traen como consecuencia la pérdida de la fertilidad del suelo. Con el uso de los fertilizantes químicos se ha logrado generar altos rendimientos de los cultivos, sin embargo, su inadecuada aplicación ha desencadenado diversos problemas, como la pérdida de fertilidad y capacidad productiva de los suelos y el efecto negativo sobre el desarrollo de las poblaciones microbianas nativas (Lal 2001). Para apoyar al sector agrícola es importante la aplicación de tecnologías amigables con el ambiente, buscar la reducción de costos de producción y estrategias para el aumento de la productividad (McMahon y Valdés 2011).

Otro problema asociado con ese crecimiento de la población es la contaminación del agua, el cual puede ser manejada en plantas de tratamiento; pero se generan lodos residuales para los cuales, posteriormente, se deben buscar formas adecuadas para su disposición final. Una forma accesible con el ambiente y que genere un beneficio económico y productivo de eliminar los lodos es mediante el proceso de compostaje. Este es un proceso de descomposición microbiológico por el cual hongos, bacterias y actinomicetos actúan sobre la materia biodegradable.

gradable produciendo composta (Graves y Hattemer 2000). Las compostas son excelentes abonos, ya que mejoran las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo; favorecen la estabilidad de la estructura de sus agregados, aumenta la porosidad, permeabilidad, así como su capacidad de retención de agua y de intercambio catiónico; incrementa el contenido de macronutrientes como el N, P, K, Ca y Mg y micronutrientes como Fe, Zn, Mn y Cu (Eghball *et al.* 2004), reflejándose en un incremento del crecimiento de las plantas. Además al ser un insumo libre de patógenos, que no atrae insectos o vectores, puede ser manejado y almacenado sin peligro por largos períodos de tiempo (Graves y Hattemer 2000).

La fertilidad del suelo agrícola está estrechamente relacionada con las poblaciones microbianas y la incorporación de materia orgánica, que conlleva al aumento en la actividad de estas poblaciones mediante la promoción de los beneficios adicionales relacionados con las características físicas y químicas del suelo (Triano *et al.* 2005). En los últimos años se ha promovido el uso de otras alternativas que ayudan a aumentar la productividad agrícola y proteger el medio ambiente a través de interacciones biológicas naturales de la biota del suelo.

En este orden de ideas, las asociaciones simbióticas de ciertos microorganismos con las plantas son benéficas ya que, además de aportarles nutrientes a las plantas, pueden cambiar las propiedades físicas y químicas del suelo, e inhibir el crecimiento de especies vegetales parasitas (Linderman 2008). El estudio de estas interacciones biota del suelo-plantas ha impulsado su uso como alternativa a los fertilizantes químicos, ya que incrementan la producción agrícola y protegen el medio ambiente. La micorriza es una asociación simbiótica mutualista entre el micelio de algunos hongos del suelo del filum Glomeromycota

(Schüßler *et al.* 2001) y las raíces de diversas plantas. Esta asociación es la más común, se presenta en alrededor del 85% de las especies vegetales.

Los Hongos Micorrízicos Arbusculares (HMA) han sido considerados como uno de los grupos fúngicos más importantes, ya que a través de sus hifas transportan a las plantas iones de baja movilidad como el fósforo, a cambio de hidratos de carbono fotosintéticos. Adquieren nitrógeno en forma de amonio (NH_4^+) y nitrato (NO_3^-), lo que también mejora el crecimiento y productividad de los cultivos, por ello el uso potencial de estos hongos como fertilizantes bióticos es viable (Govindarajulu *et al.* 2005). La incorporación de los HMA es una excelente e importante oportunidad para utilizarlos como fertilizantes, bioprotectores y bioestimulantes en la agricultura sustentable.

Por otro lado en la actualidad, el papel de las leguminosas en su conjunto está siendo revalorizado en todo el mundo, ya que constituyen la familia botánica que ha mantenido la producción y la fertilidad de los sistemas agrarios desde la antigüedad. Diversos estudios demuestran lo apropiado de utilizar el haba (*V. faba* L.) en la rotación con cereales, por ejemplo insertada en la rotación anual "haba-maíz forrajero", también se emplea como forraje de invierno (Confalone *et al.* 2013).

El cultivo de haba es importante por varias razones: es una legumbre que ocupa la séptima posición en importancia en el mundo, se usa tanto para alimentación humana como animal, en muchos países constituye la mayor fuente de proteína en alimentación humana, entre ellos México; su cultivo es empleado en rotaciones por su excelente papel en la fijación de nitrógeno atmosférico y a la buena estructura física que su sistema radical deja en el suelo. La semilla se consume en fresco o seco y el resto de la planta se utiliza como forraje, sin embargo,

para lograr incrementar su producción se requiere aplicar fertilizante nitrogenado (Guadarrama *et al.* 2007).

Asimismo, el haba ha sido empleada como planta bioindicadora de contaminantes orgánicos e inorgánicos, se ha utilizado en la evaluación de las condiciones de la calidad del agua para determinar concentraciones de arsénico que induce el intercambio de cromátidas hermanas provocando perturbaciones en el huso e interfiriendo en la reparación del DNA (Gómez-Arroyo *et al.* 1997). También ha sido empleada para determinar el efecto de insecticidas organofosforados como el 2,2-diclorovinil dimetil fosfato (diclorvos-DDVP) en las células de sus raíces, evaluando la frecuencia de micronúcleos y de aberración cromosómica mitótica, para determinar los efectos clastogénicos y mitodepresivos del DDVP en células de esta planta (Kontek *et al.* 2007). Recientemente, el haba se empleó para determinar la concentración de Pb de un suelo y su translocación a los tejidos de la raíz y biomasa aérea (García *et al.* 2011), otro estudio reveló que las concentraciones de Cd en los tejidos de la raíz de haba pueden ser tóxicas para el ser humano. Además, se ha utilizado para determinar la presencia de contaminantes orgánicos persistentes como isómeros de HCH y DDT en los sedimentos superficiales de los ríos y suelos agrícolas para determinar el potencial genotóxico por el ensayo de micronúcleos (Juárez-Santacruz *et al.* 2013).

Las respuestas biológicas observadas a través de los bioensayos en plantas de *Vicia faba* L. pueden ser excelentes bioindicadores de toxicidad y una herramienta para el monitoreo ambiental.

En el presente trabajo se utilizó suelo agrícola proveniente del municipio de Altzayanca, Tlaxcala, México; se evaluó la aplicación de tres alternativas a la adición de fertilizantes químicos, el uso de una composta preparada a partir de lodos de plantas de tratamiento de agua

residual y HMA; y la aplicación de HMA y composta. Utilizando como planta bioindicadora a *Vicia faba* L.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de la composta

Para preparar la composta se utilizó la siguiente mezcla: 45% de lodos provenientes de una planta de tratamiento de agua de una empresa papelerera, 25% de lodos de una planta de tratamiento de agua de una empresa embotelladora, 25% de residuos de una empacadora de Chile y 5% de rastrojo de maíz, esta mezcla se definió para obtener una relación C/N inicial de 30/1, según lo recomendado para la elaboración de compostas (Castellanos *et al.* 2000). Una vez realizada la mezcla se humedeció y mezcló semanalmente durante 4 meses, transcurrido el tiempo se tamizó y almacenó en un lugar seco a temperatura ambiente para su uso posterior. Previamente a su aplicación se realizó una prueba de madurez a la composta.

Prueba de fitotoxicidad con semillas de lechuga

Con base en la prueba de Zucconi *et al.* (1981), tomando una muestra de la composta se preparó un extracto acuoso en proporción de 1:5 relación composta:agua desionizada. Se adicionó 1 ml del extracto en cajas Petri, que contenían 10 semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L.) sobre papel filtro; éstas se compararon con un testigo con agua desionizada. Se mantuvieron en cámara de germinación (HACH, BOD incubator-modelo 208) durante 4 días a 27 °C. Se calculó el porcentaje de germinación relativo (PGR), crecimiento de radícula relativo (CRR) e índice de germinación (IG) (Tiquia 2000).

Análisis efectuados a la composta

Los análisis se hicieron de acuerdo a las siguientes normas: pH por el método AS-02, conductividad eléctrica por el método AS-18, nitrógeno total por el método Kjeldahl, fósforo aprovechable por el Método AS-10 (SEMARNAT 2000), relación carbono/nitrógeno (SEDUE 1985) y de madurez o fitotoxicidad, mediante el cálculo del índice de germinación usando semillas de lechuga (Zucconi *et al.* 1981).

Inóculo de HMA

El inóculo de HMA se obtuvo por medio de la técnica de separación de esporas de HMA de Brundrett (2008). Se tomaron 100 g de suelo rizosférico de cultivo de maíz y se colocaron en un vaso de precipitado, se le agregaron 900 ml de agua, se mezcló vigorosamente por 30 s, y se dejó reposar de 4 a 5 min y el sobrenadante se decantó sobre tamices (0.500 mm, 0.212 mm, 0.106 mm y 0.050 mm) con el fin de separar las esporas, el proceso se repitió de cinco a seis veces.

El material retenido en cada uno de los tamices se mezcló con agua y se centrifugó a 2 000 rpm durante cinco min, el sobrenadante fue desechado. Posteriormente el material retenido en el fondo del tubo se volvió a centrifugar con sacarosa al 50 % a 2 000 rpm durante un min, el sobrenadante se pasó a un tamiz de 0.045 mm para lavarse con agua, posteriormente se colocó en una caja Petri.

Mediante la observación con un microscopio estereoscópico (Vanguard 1274ZH) se separaron, cuantificaron y agruparon las esporas con base en su tamaño, forma, presencia de la hifa de sostén y color. La clasificación taxonómica de cada género se efectuó con la ayuda de un microscopio óptico y se apoyó en la literatura especializada (Morton 2012, Schenck y Pérez 1990).

Cultivo de haba (*Vicia faba* L.)

Se seleccionaron tres tratamientos para evaluarlos como alternativas al uso de fertilizantes químicos. El suelo agrícola proveniente del municipio Alzayanca, Tlaxcala, México, se esterilizó en autoclave a 121 °C y 1 atm de presión durante 60 min, para determinar el efecto de los hongos MA y de las composta, este procedimiento se repitió tres veces. Se aplicaron 3 tratamientos, en los cuales el suelo estéril se mezcló con: 1) la composta (COM), 2) el inóculo de HMA (HMA) y 3) el inóculo HMA y composta (HMA/COM), como se indica en el **Cuadro I**.

CUADRO I. TRATAMIENTOS APLICADOS AL SUELO AGRÍCOLA PARA EL CULTIVO DE HABA (*Vicia faba* L.)

Tratamiento	Suelo agrícola estéril	Suelo agrícola no estéril	Composta (COM)	HMA (esporas)
Control	---	4 kg	---	---
Tratamiento 1 (COM)	3 kg	---	1 kg	---
Tratamiento 2 (HMA)	3 kg	---	---	800
Tratamiento 3 (HMA/COM)	3 kg	---	1 kg	800

Evaluación del cultivo de haba

Para comparar el desarrollo de las plantas bajo los diferentes tratamientos se tomaron muestras en las siguientes etapas vegetativas: Etapa I plántula (37 días), etapa II antes de la floración (66 días), etapa III antes de fructificar (100 días) y etapa IV en cultivo maduro. Se evaluaron las siguientes variables:

1. Altura de la parte aérea: medida desde el hipocótilo hasta el extremo superior de la última hoja.
2. Biomasa fresca del follaje: considerada desde el hipocótilo hasta

el extremo superior de la última hoja, se usó una balanza de precisión (Sartorius 1801).

3. Biomasa fresca de la raíz: se eliminó el suelo y se pesó.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se hizo con el programa STATISTICA 7 versión para WINDOWS Vista 2006, los datos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA). Para determinar la significancia estadística de las diferencias entre los tratamientos se realizó una prueba de comparación múltiple de LSD ($\alpha = 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Obtención de la Composta

Después de cuatro meses de compostaje de los lodos de las plantas de tratamiento, de los residuos de la empacadora de Chile y del rastrojo de maíz, se obtuvo una composta madura que no presentó fitotoxicidad en semillas de lechuga (82 % de IG) de acuerdo con Zucconi (1981). Los análisis efectuados a la composta y al suelo agrícola utilizado, así como los límites permisibles se muestran en el **Cuadro II**. Se observa que la composta tiene mayor cantidad de N, P, carbono orgánico y sales (mayor conductividad eléctrica) que el suelo agrícola utilizado, los cuales pueden ser asimilados por las plantas.

Cada parámetro medido al suelo y a la composta se compararon con dos normas, la Norma Oficial Mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000, que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudios, muestreo y análisis; y con la NTEA-006-SMA-RS-2006, que establece los requisitos para la producción de los

mejoradores de suelos elaborados a partir de residuos orgánicos. Se observa que los parámetros del suelo agrícola utilizado caen en los intervalos marcados en la norma para suelos (SEMARNAT 2000), mientras que la composta tuvo mayor contenido de nitrógeno y de fósforo que los establecidos en dicha norma (SMA 2006).

CUADRO II. PARÁMETROS FÍSICOS Y QUÍMICOS DE LA COMPOSTA OBTENIDA Y DEL SUELO AGRÍCOLA Y LÍMITES PERMISIBLES EN LA NORMATIVIDAD MEXICANA

Parámetro	Composta	NTEA-006-SMA-RS-2006 (Mejorador de suelos)	Suelo agrícola	NOM-021-SEMARNAT-2000 (suelo)
N	0.22 %	---	0.103 %	0.1 – 0.15 %
P	0.003 %	0.1 %	9.38 mg/kg	5.5 - 11 mg/kg
CO	1.71 %	---	0.94 %	---
C/N	7.8	< 12	9.12	---
pH	7.23	6.5 – 8.0	7.3	6.6 – 7.3
CE (dS/m)	1.12	---	0.04	<2 dS/m

En la elaboración de las compostas se sugiere preparar mezclas de sustratos con una relación C/N inicial 20/1 a 30/1, al final del mismo se propone que la composta tenga valores de la relación C/N menores a 12/1 (SMA 2006). Una relación C/N mayor a 20/1 indica mayor inmovilización del N en el suelo, provocando una competencia entre los microorganismos de la rizósfera por el nitrógeno. Según los límites indicados en el **Cuadro II**, la composta cumplió con este valor.

El pH es otro de los parámetros importantes de la composta, ya que afecta de modo significativo la disponibilidad y la asimilación de los nutrimentos esenciales por las plantas, como son el N, P, Fe, Mn, Cu y Zn; por ejemplo, el intervalo de pH que favorece la disponibilidad de N es de 6 a 8.5, mientras que para la fijación de P está entre 6 y 7. Asi-

mismo, el pH ejerce una fuerte influencia al determinar la proliferación y actividad de muchos microorganismos del suelo. El pH de la composta elaborada fue de 7.23, adecuado para mantener la disponibilidad de los nutrimentos y está en el intervalo de límites permisibles mostrados en el **Cuadro II**.

La conductividad eléctrica (CE) indica la presencia de sales solubles, altas concentraciones de Na^+ , Ca^{+2} , K^+ , Mg^{+2} , Cl^- y SO_4^{-2} pueden afectar directamente el desarrollo de los cultivos, sin embargo, esto dependerá de la tolerancia del propio cultivo a la salinidad, al tipo de suelo y a las prácticas de riego empleadas (McMahon y Valdés 2011). La salinidad de un suelo constituye uno de los principales factores limitantes de su fertilidad, se recomienda mantener valores de conductividad eléctrica ≤ 2 dS/m, ya que por encima de este valor las propiedades morfológicas, físicas y químicas del suelo son fuertemente influenciadas por la salinidad, siendo tóxicas para las plantas. La conductividad eléctrica de la composta preparada fue menor a los límites especificados (**Cuadro II**), por lo que su aplicación a los cultivos no representa riesgo.

Del análisis en el **Cuadro II** se observa que al finalizar el proceso de compostaje se obtuvo un material que cumple con las especificaciones reportadas para ser aplicado como mejorador de suelos y cuyo contenido nutrimental es mayor al indicado para un suelo según la normatividad indicada en el **Cuadro II** (SEMARNAT 2000). El aprovechamiento de residuos, como los lodos de las plantas de tratamiento de agua, de una empacadora de chile y el rastrojo de maíz para elaborar composta tiene varias ventajas: evitar su envío al relleno sanitario, reduce los costos de disposición que erogan las empresas, incrementa la vida útil del relleno sanitario y, lo más importante, se aprovecha la materia orgánica para la obtención de un material que se puede usar para mejorar los

suelos agrícolas, disminuyendo el uso de fertilizantes químicos. Todo ello conlleva a obtener beneficios ambientales importantes.

Hongos Micorrízicos Arbusculares (HMA)

Por cada 100 g de suelo rizosférico de cultivo de maíz se obtuvo aproximadamente 14 g de tamizado, con un promedio de 800 esporas, de las cuales sólo se tomaron en cuenta aquellas con aspecto físico saludable, es decir las que presentaran pared sin perforaciones y contenido brillante con gránulos lipídicos. Se identificaron cinco géneros de la Clase Glomeromycetes de los 17 que hasta ahora han reconocido Schüßler y Walker (2010): *Acaulospora* (Acaulosporaceae); *Glomus* y *Sclerocystis* (Glomeraceae); *Scutellospora* y *Gigaspora* (Gigasporaceae).

El género más abundante fue *Glomus*, esto concuerda con los resultados de Serralde y Ramírez (2004) quienes evaluaron el número de esporas en suelos cultivados con dos variedades de maíz y adicionados con materia orgánica (material verde y abono), encontraron que este género fue el más abundante. Algunos autores, en diferentes partes del mundo, han encontrado que el género *Glomus* es el HAM más común en una variedad de suelos agrícolas con diversos tipos de cultivos (Burni *et al.* 2011, Gaur y Kaushik 2012, Schalamuk *et al.* 2007, Wang *et al.* 2008)

Cultivo de haba (*Vicia faba* L.)

Con el fin de determinar la etapa óptima del crecimiento de la planta, se realizaron 4 muestreos: a los 37, 66, 100 y 134 días.

El máximo crecimiento, tanto de la altura de la planta como de la biomasa se observó en la etapa III, es decir a los 100 días, por lo que

los análisis y comparación entre los tratamientos se llevaron a cabo considerando hasta este muestreo III, posterior a este tiempo el cultivo empezó su senescencia.

a) Altura de follaje del cultivo de haba (*Vicia faba* L.)

En la **figura 1** se muestran las alturas promedio registradas de las plantas de haba. El crecimiento de las plantas registrado en los muestreos I y II fue similar en todos los tratamientos, incluyendo al control. Sin embargo, después de los 66 días hubo diferenciación en las alturas de las plantas, en el muestreo III se observó que la altura del follaje fue significativamente mayor en las plantas donde se aplicaron la composta y/o los HMA comparados con el control.

El análisis estadístico (**Cuadro III**) indica que la mayor altura promedio se registró en las plantas obtenidas al fertilizar el suelo con los tratamientos HMA y HMA/COM, la segunda mayor altura se obtuvo en las plantas a las que se les aplicó la composta y la menor fue la registrada en las plantas control.

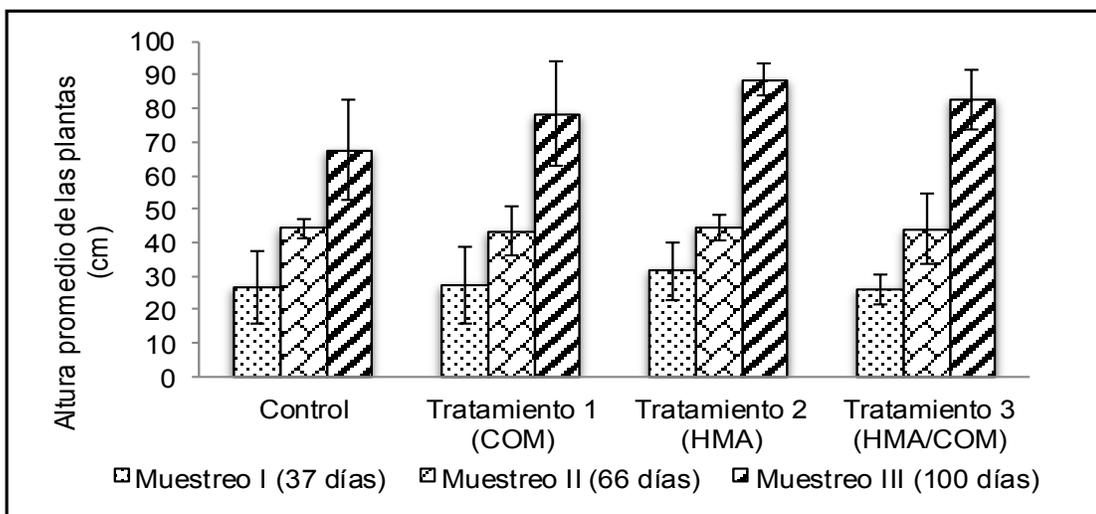


Fig. 1. Altura promedio de las plantas de haba en los tres tratamientos y el control

CUADRO III. PRUEBA ESTADÍSTICA LSD PARA LAS VARIABLES QUE SE EVALUARON A LAS PLANTAS DE HABA EN EL MUESTREO III

Parámetro (\bar{x})	Control	Tratamiento 1 (COM)	Tratamiento 2 (HMA)	Tratamiento 3 (HMA/COM)
Altura (cm)	67.6 (b)	78.4 (ab)	88.6 (a)	82.7 (a)
Masa aérea fresca (g)	36.1 (b)	56.3 (a)	60.3 (a)	69.6 (a)
Peso de raíz fresca (g)	20.3 (b)	24.4 (b)	41.5 (a)	29.2 (ab)

Letras iguales en renglones indican que no hay diferencia significativa

b) Biomasa fresca de follaje

La biomasa de las plantas a los 37 días fue similar en todos los casos. A partir del muestreo II se observa diferenciación, la biomasa fue mayor en los tratamientos que en el control. Según el análisis estadístico (**Cuadro III**), en el tercer muestreo la biomasa de las plantas obtenidas donde se fertilizó con composta, HMA o HMA/COM tuvieron significativamente igual biomasa promedio entre ellos, es de resaltar que con la mezcla HMA/COM casi se duplicó la masa promedio con respecto a las que tuvieron las plantas del control. Lo cual indica que para incrementar la biomasa del haba y obtener mayor material vegetal para uso como forraje, son eficientes tanto la aplicación de composta, inocular con HMA o la combinación de ambos (**Fig. 2**).

Desde el muestreo I a los 37 días, las raíces de las plantas donde se adicionaron los HMA tuvieron significativamente mayor biomasa radical, comparada con la registrada en las plantas donde se adicionó la composta y con las correspondientes al control. Conforme las plantas se desarrollaron ésta diferencia fue mayor, en el muestreo III a las plantas que se les aplicaron únicamente los HMA presentaron estadísticamente el mayor peso promedio de las raíces, seguida del tratamiento donde se aplicó HMA/COM; el peso radicular promedio en las plantas control y

donde se aplicó la composta no tuvieron diferencia significativa. El desarrollo radicular de las plantas donde se aplicó únicamente HMA fue mayor a las obtenidas donde se aplicó HMA/COM, esto se pudo deber a que al incrementar los niveles nutrimentales por la adición de la composta se inhibió la colonización de las plantas por los HMA (**Fig. 3**).

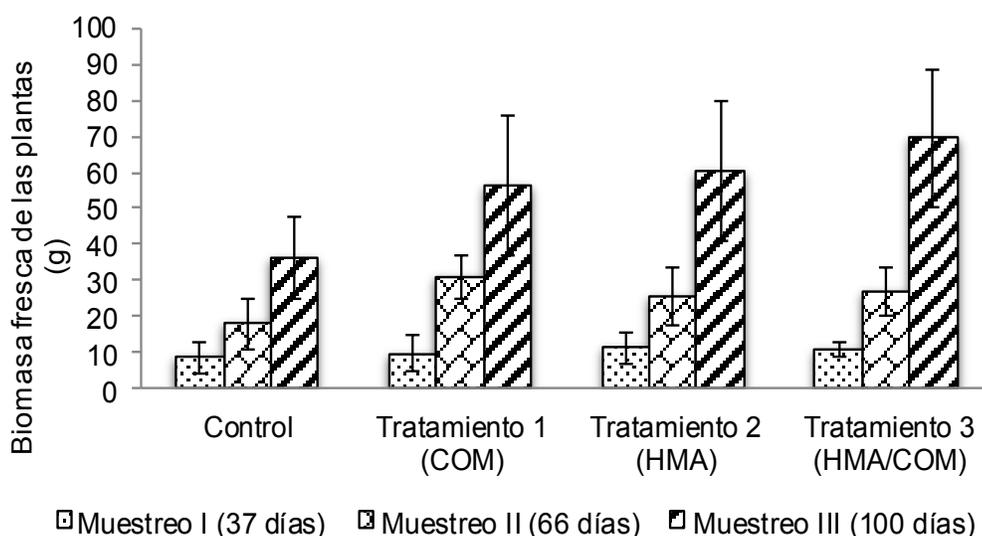


Fig. 2. Biomasa promedio del follaje fresco de las plantas de los tres tratamientos y el control.

c) Biomasa fresca de las raíces

El incremento de la biomasa fresca y radicular es indicador de que la planta se desarrolló mejor en presencia de la composta y de los HMA. La composta aporta nutrientes y mejora las propiedades del suelo lo cual se traduce en un mayor desarrollo vegetal, como ya se indicó. La asociación micorrízica juega un importante papel en la adquisición de los nutrientes del suelo, ya que una de las funciones importantes de estos hongos es la de aumentar el área de absorción radicular de las plantas, a través de sus redes miceliales y con ello captar mayor cantidad de nutrientes.

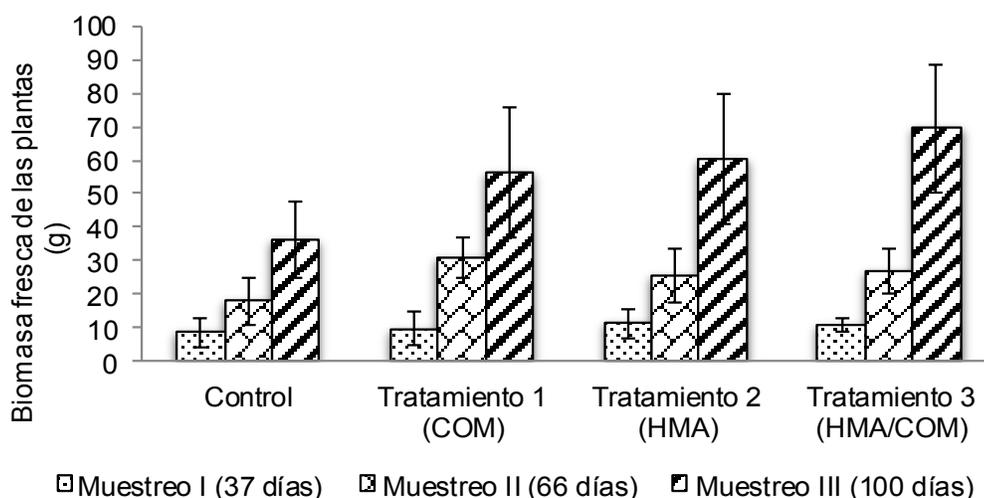


Fig. 3. Biomasa promedio de las raíces frescas de las plantas de haba obtenidas bajo los tres tratamientos y el control.

Los resultados obtenidos coinciden con lo observado por De Grazia *et al.* (2011) ellos reportan que los materiales compostados mejoraron la calidad del pimiento (*Capsicum annuum* L.); además Eghball *et al.* (2004) indican que aplicando composta hay un efecto residual de N y P que perdura al menos un periodo de cultivo más, mejorando las propiedades del suelo. Por su parte plantas de *Euphorbia prostrata* aumentaron significativamente su peso fresco y biomasa radical con la inoculación con HMA y vermicomposta (Channashettar *et al.* 2008). El peso de las plantas de maíz cultivadas en turba e inoculadas con *G. fasciculatum*, vermicomposta y con una bacteria nativa aumentó considerablemente (Gutiérrez *et al.* 2008).

CONCLUSIONES

Se encontró que el uso de la composta y de Hongos Micorrízicos Arbusculares de manera individual o en combinación de ambos es una alternativa ambientalmente amigable para incrementar el desarrollo de

la planta de haba, comparada con el control. El empleo de estos insumos es una alternativa viable para reducir el consumo de fertilizantes químicos, aminorando además los efectos negativos que éstos ocasionan al medio ambiente.

Los HMA se pueden aislar del suelo rizosférico para aplicarse como sistema de desarrollo vegetal con buenos resultados. Mientras que la composta se puede obtener de una gama de residuos orgánicos. El compostaje representa además un medio para aprovechar residuos como los aquí empleados, lodos de plantas de tratamiento de agua y residuos agroindustriales, con los cuales se obtuvo una composta con propiedades adecuadas para su aplicación según la normatividad. Esto es interesante ya que es una manera ambientalmente viable para disponer de éste tipo de residuos, que a la fecha no son aprovechados y su disposición final representa una problemática ambiental y económica.

Vicia faba L. es una planta que puede ser empleada en ensayos bajo condiciones de invernadero como bioindicadora de la calidad de compostas que serán aplicadas a suelos que se pretende mejorar sus condiciones de degradación.

REFERENCIAS

- Brundrett M.C. (2008). Arbuscular Mycorrhizas. En: Mycorrhizal Associations: The Web Resource. Version 2.0. Date accessed. <mycorrhizas.info>. (fecha de consulta 29/10/2013).
- Burni T., Hussain F. y Sharief M. (2011). Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) associated with the rhizosphere of *Mentha arvensis* L., and *M. longifolia* Huds. Pak. J. Bot. 43, 3013-3019.
- Castellanos J. Z., Uvalle J.X. y Aguilar S. A. (2000). Manual de interpretación de análisis de suelos y aguas. Instituto de Capacitación para la Productividad Agrícola, México.
- Channashettar V. A., Uppal H., S. Adholeya A. (2008). Influence of arbuscular mycorrhizal fungi on plant biomass of *Euphorbia prostrata*. Mycorrhiza News 20, 14-17.
- Confalone A., Barufaldi M., Navarro M., Aguas L., Vilatte C. y Ponce G. (2013). Crecimiento, captura de luz y componentes del rendimiento del haba cv. Alameda

- creciendo en Azul, provincia de Buenos Aires, Rev. FCA UNCUYO. 45, 105-116.
- De Grazia J., Tiftonell P. A. y Chiesa A. (2011). Fertilización nitrogenada en plantines de pimiento (*Capsicum annuum* L.) cultivados en sustratos con diferentes proporciones de materiales compostados: efecto sobre los parámetros de calidad del plantín. Rev. FCA UNCUYO. 43, 175-186.
- Eghball B., Ginting D. y Gilly, J. E. (2004). Residual effects of manures and compost application on corn production and soil properties. Agron. J. 96, 442-447.
- García Gallegos E., Hernández A. E., García Nieto E. y Acevedo S. O. A. (2011). Contenido y traslocación de plomo en avena (*Avena sativa* L.) y haba (*Vicia faba* L.) de un suelo contaminado. Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente 17, 19-29.
- Gaur S. y Kaushik P. (2012). Effect of Seasonal Variation on Mycorrhizal Fungi Associated with Medicinal Plants in Central Himalayan Region of India. Amer. J. Plant Sci. 3, 618-626.
- Gómez Arroyo S., Armienta Ma. A., Cortés Eslava J. y Villalobos Pietrini R. (1997). Sister chromatid exchanges in *Vicia faba* induced by arsenic-contaminated drinking water from Zimapan, Hidalgo, Mexico. Mutat Res 394, 1-7.
- Govindarajulu M., Pfeffer P. M., Jin H., Abubaker J., Douds D. D., Allen J. W., Bücking H., Lammers P. J. y Shachar-Hill Y. (2005). Nitrogen transfer in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. Nature 435, 819-823.
- Graves E. R. y Hattemer M. G. (2000). National Engineering Handbook, Part 637, Ed. Department of Agriculture and Natural Resources Conservation Service.
- Guadarrama Q. A., Escalante E. J. A., Rodríguez G. M. T., Sánchez G. P. y Sandoval C. E. (2007). Biomasa, proteína, taninos y rendimiento en haba en función del nitrógeno. TERRA Latinoamer. 25, 169-175.
- Gutiérrez M. F. A., Moguel Z. B., Abud A. M., Gutiérrez O. V. F. y Dendooven L. (2008). Sheep manure vermicompost supplemented with a native diazotrophic bacteria and mycorrhizas for maize cultivation. Bioresour. Technol. 99, 7020-7026.
- Juárez Santacruz L., García Nieto E., Costilla Salazar R., García Gallegosa E., Coronel Olivares C., Gómez Camarillo M., y Gaytán Oyarzún J. (2013). Assessment of the Genotoxic Potential of Sediments Contaminated with POPs and Agricultural Soils Using *Vicia faba* Micronucleus Assay. Soil and Sediment Contamination: An International Journal 22, 288-300.
- Kontek R., Osiecka R. y Kontek B. (2007). Clastogenic and mitodepressive effects of the insecticide dichlorvos on root meristems of *Vicia faba*. J Appl Genet. 48, 359-361.
- Lal R. (2001). Soil degradation by erosion. Land Degrad. Develop. 12, 519-539.
- Linderman R. G. (2008). The mycorrhizosphere phenomenon. En: Mycorrhiza Works (Feldman F., Kapulnik Y. y Barr J. Ed.). Deutsche Phytomedizinische Gesellschaft, Braunschweig, pp. 341-355.
- McMahon M. A. y Valdés A. (2011). OCDE, Mejores Políticas para una vida mejor. Análisis de la extensión agrícola en México. Disponible en: <http://www.sagarpa.gob.mx/desarrolloRural/DesCap/Documents/AnalisisExtensionismoAgricolaMexico.pdf> (fecha de consulta: 8/05/2012)
- Morton J. (2012). International Culture Collection of (vesicular) Arbuscular Micorrizal Fungi, West Virginia University. Disponible en: <http://www.invam.caf.wvu.edu> (fecha de consulta 10/03/2012).
- SDUE (1985). Norma Mexicana NMX-AA-67-1985. Protección al Ambiente - Contaminación del Suelo - Residuos Sólidos Municipales -Determinación de la Relación Carbono/Nitrógeno, Secretaría de Desarrollo Urbano y Ecología, Departamento del Distrito Federal. Diario Oficial de la Federación. 8/08/1985

- SEMARNAT (2000). Norma Oficial Mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000. Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudio, muestreo y análisis, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales y Pesca. Diario Oficial de la Federación 31/2/2002
- SMA (2006). Norma Técnica Estatal Ambiental NTEA-006-SMA-RS-2006. Que establece los requisitos para la producción de los mejoradores de suelos elaborados a partir de residuos orgánicos, Secretaría del Medio Ambiente. Gaceta del Gobierno. Periódico Oficial del Gobierno del Estado de México. 9/10/2006
- Schalamuk S., Chidichimo H. y Cabello M. (2007). Variaciones en la composición de especies de Glomeromycota (Fungi) en un cultivo de trigo bajo distintos sistemas de labranza. Bol. Soc. Argent. Bot. 42, 45-53.
- Schenck N. C. y Pérez Y. (1990). Manual for the identification of VA mycorrhizal fungi. INVAM. University of Florida. 245 p.
- Schüßler A., Schwarzott D. y Walter C. (2001). A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. Mycol. Res. 105, 1413-1421.
- Schüßler A. y Walker C. (2010). The Glomeromycota. A species list with new families and new genera. Disponible en: <http://www.amf-phylogeny.com> (fecha de consulta: 8/05/2012).
- Serralde O. A. M. y Ramírez G. M. M. (2004). Análisis de poblaciones de micorrizas en maíz (*Zea mays*) cultivado en suelos ácidos bajo diferentes tratamientos agronómicos. Rev. Corpoica. 5, 31-40.
- Triano S. A., Palma D. y Hernández E. (2005). Uso de sustratos orgánicos y reciclaje de nutrimentos en la producción de cacao (*Theobroma cacao* L.) en el municipio de Cunduacán, Tabasco. Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas, Campus Tabasco. Fundación PRODUCE, Tabasco, A.C.
- Wang Y. Y., Vestberg M., Walker Ch., Hurme T., Zhang X. y Lindström K. (2008). Diversity and infectivity of arbuscular mycorrhizal fungi in agricultural soils of the Sichuan Province of mainland China. Mycorrhiza 18, 59-68.
- Zucconi F., Pera A., Forte M. y De Bertoli M. (1981). Evaluating toxicity in immature compost. Biocycle 22, 54-57

**INDICADORES DE MADUREZ DE LOMBRICOMPOSTAS
OBTENIDAS A PARTIR DE DIFERENTES RESIDUOS ORGÁNICOS**

Elizabeth GARCÍA-GALLEGOS¹

¹Laboratorio de Fertilidad de Suelos, Cuerpo Académico Ciencias Ambientales. Centro de Investigación en Genética y Ambiente. Universidad Autónoma de Tlaxcala.

Palabras clave: abonos orgánicos, agroecología, fitotoxicidad

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo consistió en evaluar la calidad de lombricompostas obtenidas de diferentes residuos orgánicos a través de indicadores de madurez y la prueba de fitotoxicidad con semillas de cebada (*Hordeum vulgare* L.), rábano (*Raphanus sativus* L.) y frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Los indicadores como el pH, conductividad eléctrica, materia orgánica, relación C/N, N_{total} y densidad aparente se encontraron dentro del intervalo que establece la NMX-FF-109. En cuanto a la capacidad de intercambio catiónico, sólo la lombricomposta L2 exhibió un valor menor a lo que marca la normatividad mexicana. La concentración de P se presentó un intervalo de 0.02 a 0.04 % y la relación C/P indicó que no existió una adecuada mineralización de los residuos orgánicos empleados para llevar a cabo las lombricompostas. Respecto a la concentración de Pb, Cr, Cd y Ni, ésta fue menor a lo que establece la normatividad mexicana. La prueba de fitotoxicidad mostró que con semillas de cebada las lombricompostas L1, L2 y L3 presentaron un IG > 100%, con frijol todas las lombricompostas tuvieron una moderada

fitotoxicidad y en rábano el IG fue mayor a 100 sólo en la L2. La prueba con semillas es más sensible para determinar la calidad de abonos orgánicos, por lo tanto se considera una herramienta complementaria a los resultados que arrojan los indicadores físicos, químicos y biológicos para establecer la madurez de una lombricomposta y su inocuidad al aplicarla como enmienda orgánica.

Key words: organic fertilizers, agroecology, phytotoxicity

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the quality of vermicompost obtained from different organic waste through indicators of maturity and phytotoxicity test with barley seeds (*Hordeum vulgare* L.), radish (*Raphanus sativus* L.) and bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Indicators such as pH, electrical conductivity, organic matter, C/N ratio, total N and bulk density within were the found established by the NMX-FF-109. As for the cation exchange capacity, only the L2 vermicompost exhibited a minor value marking Mexican regulations. The concentration P was presented of the 0.02 to 0.04 %, and the ratio C/P indicated that there was no a mineralization adequate of organic waste used to perform the vermicompost. Regarding the concentration of Pb, Cr, Cd and Ni, it was lower than that established by norms Mexican. Phytotoxicity test showed that the barley seeds with L1, L2 and L3 vermicompost had a GI > 100%, with all bean seeds the vermicompost had a phytotoxicity moderate and radish the IG was higher a 100 only in L2. The test with seeds is more sensitive to determine the quality of organic fertilizers; therefore, it

is considered a complementary tool to the results that shed the indicators physical, chemical and biological to establish the maturity of a vermicompost and its safety when applied as organic amendment.

INTRODUCCIÓN

Los residuos orgánicos como los lodos residuales que generan las plantas de tratamiento, la hojarasca de parques y jardines, los residuos domésticos y residuos sólidos urbanos, así como residuos de cosechas, estiércoles, bagazo de caña, cascarilla de arroz, entre otros, son fuente importante de materia orgánica, su empleo como mejoradores de la calidad del suelo ha sido ampliamente documentado. Sin embargo, presentan diferentes propiedades fisicoquímicas, lo que depende del proceso que los generó, por lo que su impacto en el suelo debe evaluarse para evitar efectos adversos (Cayuela *et al.* 2009, Peltre *et al.* 2012). Al buscar una oportunidad de aprovechamiento de los residuos, se hace necesaria su caracterización para conocer su composición y definir las tecnologías apropiadas para su aprovechamiento y posterior tratamiento (Saval 2012). Una alternativa es emplear el proceso de lombricompostaje, el cual emplea la acción conjunta de microorganismos y lombrices para procesar residuos orgánicos y obtener un producto estable denominado “lombricomposta” o “humus de lombriz” (Ruíz 2011). Almaguer *et al.* (2012) mencionan que es la cría controlada de lombrices; técnica que involucra varios procesos biológicos que aceleran la transformación y mineralización de un residuo orgánico en descomposición hasta convertirlo en humus. El proceso de lombricompostaje se conoce también como una eco-tecnología, sencilla, viable y beneficiosa para la producción intensiva de lombricomposta (Sinha *et al.* 2010).

Las lombrices en su mayoría son hermafroditas aunque existen algunas que se reproducen partenogénicamente (autofecundación). La especie epigea *Eisenia foetida* se reproduce sexualmente y por partenogénesis, es quizás la más prolífica, por esta razón es una de las especies más utilizadas para la biotransformación de los residuos orgánicos, junto con ella, la especie *E. andrei* también presenta alta tasa reproductiva, además de hábitos muy semejantes a la anterior. El ciclo biológico de estas especies es poco menos de 90 días, desde la salida de las lombrices juveniles del capullo hasta la aparición de nuevos. En México se utiliza ampliamente *E. foetida* para obtener lombricomposta (Santamaría 2007). Cada lombriz consume aproximadamente de 100 a 300 mg de alimento por día para incrementar su peso vivo de 30 a 45 mg en 90 días, del material consumido entre el 5 y 10 % es empleado para llevar a cabo las actividades metabólicas y el otro 85 % es excretado como lombricomposta que contiene orina (amonio) y mucoproteínas (Blair *et al.* 1997). Es rica en macro y micronutrientes, vitaminas, hormonas de crecimiento, enzimas; tales como, proteasas, amilasas, lipasas, celulasas, quitinasas, endonucleasa, fosfata alcalina, nitro reductasa, enzimas que realizan la degradación de la materia orgánica para obtener proteínas y carbohidratos, así como otros compuestos orgánicos de una complejidad estructural importante, todo lo anterior depende del tipo de sustrato utilizado como fuente de alimento para las lombrices (Nagavallema *et al.* 2005, Prabna *et al.* 2007).

Su alimento se compone de cuatro elementos básicos: residuos orgánicos con alto contenido de N, residuos orgánicos con alto contenido de C, agua (humedad) y aire (oxígeno) (Sharma *et al.* 2005). Los contenidos de C y N tienen que ser en dosis adecuadas para llevar a cabo un buen proceso, ya que demasiado C se convierte en un proceso

lento, y si hay más N, se generan malos olores y se produce una mezcla viscosa (Rodríguez y Córdova 2006). Por otro lado, Gunadi *et al.* (2002) mencionan que una buena selección de residuos y equilibrio entre ellos tendrá como resultado un buen desarrollo de microorganismos, sin embargo, si los residuos orgánicos como el estiércol contienen sales y sustancias potencialmente tóxicas o los residuos vegetales, sustancias ácidas, se tiene que realizar una estabilización de los residuos antes de incorporar las lombrices. En México, se emplean en mayor medida los estiércoles para llevar a cabo el proceso de lombricompostaje, debido a que su acumulación genera malos olores, nitratos y sales, se reporta el empleo de estiércol de ganado vacuno, gallinaza, porqueraza y estiércol de conejo; sin embargo, el estiércol de bovino contiene altas concentraciones de N que permite obtener una lombricomposta de buena calidad (Luévano y Velásquez 2001).

De esta manera, el proceso de lombricompostaje se convierte en una alternativa sustentable para reducir residuos orgánicos, el producto la lombricomposta, además de incrementar el contenido de materia orgánica al suelo, aumenta la capacidad de retención de agua, especialmente si son arenosos, mejora la agregación de las partículas del suelo, se previene la erosión, evita que se compacte el suelo, en suelos contaminados por metales pesados forma complejos organometálicos y ayuda a la eliminación de patógenos (Mehta y Karnwal 2013). Al tener una elevada carga enzimática y bacteriana incrementa la solubilidad de los elementos nutritivos, liberándolos en forma paulatina, facilitando su asimilación por las raíces de las plantas e impidiendo que éstos sean lixiviados con el agua, manteniéndolos disponibles por más tiempo en el suelo, lo que favorece la germinación de las semillas y el desarrollo de las plantas (Julca *et al.* 2006).

El empleo de la lombricomposta en la agricultura reduce la aplicación de fertilizantes minerales; sin embargo, algunos elementos como los metales pesados pueden acumularse en los suelos al repetir su aplicación, lo que impactaría a otros integrantes del agroecosistema (Cambier *et al.* 2014). Debido a que la calidad de las lombricompostas no depende de un solo parámetro químico, microbiológico, bioquímico o toxicológico es indispensable evaluar su madurez y fitotoxicidad (Campitelli y Ceppi 2008).

La relación C/N es el indicador probablemente más utilizado para señalar la madurez de la lombricomposta, debido a que el carbono es una fuente de energía y forma parte de la masa de las células microbianas como su elemento estructural básico; en cuanto al nitrógeno es un componente decisivo de las proteínas, las bacterias emplean el nitrógeno como nutrimento, cuando existe poco nitrógeno, la población de microorganismos disminuye y el proceso de lombricompostaje presenta un retraso; por otro lado, si existe demasiado nitrógeno aumenta el crecimiento microbiano y se acelera la descomposición de los residuos, pero pueden existir serios problemas de olores desagradables al disminuir el oxígeno y producirse condiciones anaeróbicas, debido principalmente a la formación de amoníaco (Álvarez de la Puente 2006). En el caso del carbono dentro del proceso de lombricompostaje, la pérdida de éste se realiza en forma de CO₂, debido a las actividades respiratorias de las lombrices y de la microflora asociada (Suthar 2010).

En México, la NMX-FF-109-SCFI-2007 (DOF 2008) establece diversos indicadores que deberá presentar una lombricomposta previo a ser aplicada como enmienda orgánica al suelo, los parámetros que menciona son: pH, materia orgánica, capacidad de intercambio catiónico, nitrógeno total, conductividad eléctrica, densidad aparente; hume-

dad, relación C/N, así como el contenido de metales (Pb, As, Ni, Hg, Cr, Cd, Zn), la presencia de huevos de helmintos, hongos fitopatógenos, *Salmonella* spp. y *E.Coli*. Para complementar el análisis de calidad de las lombricompostas, actualmente se emplea el ensayo con semillas de diferentes plantas, debido a que mide el efecto combinado de varios factores fitotóxicos. Sin embargo, este tipo de ensayo varía en su metodología, por el material a evaluar y el tipo de especie vegetal a emplear (Baumgarten y Spiegel 2004).

Existen métodos para evaluar la toxicidad de químicos u otros contaminantes, basándose en los efectos en la emergencia y crecimiento de plántulas como lo propone la Organización de Desarrollo y Cooperación Económica (OECD, por sus siglas en inglés) y la Organización Internacional de Estandarización (ISO, por sus siglas en inglés). Pruebas específicas para compostas se tienen en Australia (Committee CS/37 1999), Estados Unidos (TMECC 2001) y Alemania por la Organización Federal del Seguro de Calidad de Compostas (FCQAO, por sus siglas en inglés) (FCQAO 1994) y métodos estándar para evaluar la fitotoxicidad de compostas en México, se reporta sólo en el Distrito Federal, la Gaceta Oficial del Distrito Federal publicó en su norma ambiental NADF-020-AMBT-2011 (POGEM 2006) que una composta obtenida a partir de residuos orgánicos debe evaluar su calidad a través de la prueba de fitotoxicidad. Sin embargo, el principal problema para la aplicación e interpretación de esta prueba es la diferencia en el material objeto de la investigación, de las condiciones experimentales, las especies de plantas utilizadas, la duración del experimento, los procedimientos individuales para la obtención de los extractos acuosos, o los parámetros medidos (ya sea la longitud de la raíz, el peso seco o fresco de las plantas, germinación de las semillas, índice de germinación, entre

otras) (Baderna *et al.* 2013). Debido a lo cual, los bioensayos con plantas permiten conocer los efectos tóxicos que provoca un sustrato o contaminante, aunque no es una prueba contundente se le puede considerar como una herramienta complementaria a los análisis físicos y químicos realizados a un suelo, agua, sedimento u abono orgánico (Baumgarten y Spiegel 2004, Visioli *et al.* 2013).

Por lo anterior el objetivo del presente trabajo consistió en evaluar la calidad de diferentes lombricompostas a través de indicadores de madurez y la prueba de fitotoxicidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sustratos

Para las diferentes lombricompostas se emplearon los siguientes sustratos: Lodo residual lácteo (LRL) obtenido de una empresa dedicada a la fabricación de diversos productos derivados de la leche. Estiércol de ganado vacuno (EGV) recolectado en un establo doméstico. Estiércol de conejo (EC) proporcionado por el Centro de Investigación en Reproducción Animal de la UATx. Rastrojo de maíz (RM) adquirido en un establecimiento comercial. Desechos de corteza de un aserradero (CA) y residuos domésticos (RD) recolectados de una casa-habitación. El LRL tuvo un 70 % de humedad y se aplicó directamente. El EGV y el EC fueron secados a temperatura ambiente y a la sombra. El RM fue triturado antes de aplicarlo.

Establecimiento del proceso de lombricompostaje

Para obtener las diferentes lombricompostas se empleó a la lombriz *Eisenia foetida*, proporcionada por los Laboratorios de Ecología

Forestal y Fertilidad de Suelos del CIGyA-UATx.

El proceso se realizó de acuerdo a las siguientes proporciones:

1. L1. EC (50%) + CA (50%)
2. L2. EC (50%) + RD (50%)
3. L3. LRL (60%) + EGV (10%) + RM (30%)
4. L4. LRL (40%) + EGV (20%) + RM (40%)

Los tratamientos se estabilizaros por 30 días, al término de este tiempo se agregó la lombriz, la humedad fue controlada durante todo el tiempo que duró el proceso (5 meses). Las lombricompostas 1 y 2 se llevaron a cabo en un espacio de 1 m x 2 m x 50 cm y las lombricompostas 3 y 4 en bandejas de plástico de 20 L de capacidad.

Análisis químico

De cada lombricomposta se tomaron 500 g para ser tamizada a través de una malla de abertura de 2 mm, con el objeto de tener un tamaño de partícula homogéneo y poder realizar las determinaciones físicas y químicas. Los análisis consistieron en determinar el pH (relación 1:2 p/v), materia orgánica (MO) y $C_{\text{orgánico}}$ por el método de Walkley-Black (Jackson 1976), el contenido de CE (dS m^{-1}) en el extracto de saturación (Richards 1990), capacidad de intercambio catiónico (CIC) [$\text{Cmol}(+) \text{kg}^{-1}$] por la técnica con acetato de amonio (Chapman 1965), N_{total} (%) por el método de Kjeldahl,, relación C/N por la NMX-AA-67-1985 (DOF 1992), densidad aparente (g cm^{-3}) por el método de la probeta que establece la NMX-FF-109-SCFI-2008 (DOF 2008) y $P_{\text{disponible}}$ (%) por el método Bray (Bray y Kurtz 1945).

La concentración total de Pb, Cr, Cd y Ni que menciona la NMX-FF-109-SCFI-2008 (DOF 2008) para lombricompostas fue determinada de acuerdo al método EPA 3051 (EPA 1998). Obtenidas las digestiones

se aforaron a 50 ml con una solución de HNO₃ al 3 %. La cuantificación de los metales se llevó a cabo por un espectrofotómetro de absorción atómica marca Varian modelo 880, Australia.

Prueba biológica

Se empleó la prueba de fitotoxicidad con semillas de rábano (*Raphanus sativus* L), frijol (*Phaseolus vulgaris* L) y cebada (*Hordeum vulgare* L). La elección de las semillas fue de acuerdo a la OECD/OCDE (2006) la cual menciona que para establecer esta prueba se deben seleccionar mínimo tres especies. Se obtuvo un extracto acuoso de cada lombricomposta en una proporción 1:10 (p/v) y como control se empleó agua destilada. Se colocó papel absorbente en cajas Petri (100 x 15 mm), se distribuyeron 4 semillas y se humedecieron con 5 mL del extracto acuoso y/o de agua destilada (testigo). Las cajas fueron tapadas y colocadas en una estufa de incubación a temperatura de 20 ± 2 °C. Las semillas fueron humedecidas cada 24 h por 3 días. Se midió la longitud radicular y el número de semillas germinadas para determinar el índice de germinación con respecto al control (Paradelo *et al.* 2008).

El índice de germinación (IG) expresado en porcentaje fue calculado de la siguiente manera:

$$\%IG = 100 \times \frac{G}{G_c} \times \frac{L}{L_c}$$

Donde:

G = Germinación de las semillas

L = Longitud de la radícula de las plántulas

G_c = Germinación de las semillas control

L_c = Longitud de la radícula de las plántulas control

Finalmente, el % IG se comparó con el criterio que propone Martignon (2009) quien señala que sí se obtiene un % IG > 90 no hay toxicidad; si % IG 75-90 baja toxicidad; si % IG 51-75% moderada toxicidad; si % IG 26-50 alta toxicidad y si % IG < 25 severa toxicidad.

Análisis estadístico

Los datos de los indicadores e índice de germinación se analizaron a través de un análisis descriptivo, análisis de varianza y una prueba de comparación de medias de Tukey ($p < 0.05$) para determinar si existen diferencias significativas entre las lombricompostas. Además se determinó el coeficiente de correlación Pearson entre los indicadores del suelo que influyen en la fitotoxicidad (pH, CE, $C_{\text{orgánico}}$, N_{total} , P) y el índice de germinación medido a través de porcentaje de las diferentes plántulas (cebada, rábano y frijol), empleando el paquete estadístico Statgraphics Centurion XVI (Stat Point Technologies 2011).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación de las lombricompostas

En el **cuadro I** se muestran los resultados de los indicadores seleccionados para evaluar la calidad de las diferentes lombricompostas. El valor de pH se encontró dentro del intervalo que establece la NMX-FF-109, así como los valores de la CE, MO, relación C/N, N_{total} y la Dap. Respecto a la CIC, la lombricomposta L2 presentó un valor menor a lo que establece la normatividad (< 40), lo que indica que parte del material orgánico no fue debidamente humificado y por lo tanto puede ocasionar fitotoxicidad a las plantas (Ch'ng *et al.* 2013).

La relación C/N es un indicador de la madurez de las lombricom-

postas y debe ser menor a 20 como lo señala la normatividad mexicana, a menos que permanecieran materiales lignocelulósicos en los residuos orgánicos (Emino y Warman 2004; Negi y Suthar 2013). En el caso de las lombricompostas evaluadas en este trabajo, la relación C/N fue menor a 20, por lo que se consideran maduras.

CUADRO I. INDICADORES FÍSICOS Y QUÍMICOS DE LAS DIFERENTES LOMBRICOMPOSTAS

Parámetro	L1	L2	L3	L4	NMX-FF-109-SCFI-2007
pH 1:2 (p/v)	6.6±0.08	6.8±0.03	6.1±0.03	7.0±0.05	5.5 – 8.4
CE (dS m ⁻¹)	0.080±0.02	0.076±0.02	0.087±0.02	0.073±0.12	≤ 4
CIC [Cmol(+)/kg ⁻¹]	63.2±0.22	33.1±0.27	50.6±2.9	51.5±0.86	> 40
MO (%)	43.8±0.28	31.3±1.15	35.5±0.41	31.3±0.41	20 – 50
C _{orgánico} (%)	25.4±0.16	18.1±0.67	20.5±0.18	18.1±0.24	-
C/N	18.6±0.34	14.7±0.36	15.8±0.69	15.1±0.83	≤ 20
N _{total} (%)	1.3±0.03	1.2±0.03	1.3±0.05	1.2±0.05	1 – 4
P (%)	0.02±1.15	0.02±2.15	0.04±2.5	0.04±1.35	0.15 – 1.5*
C/P	1270±1.24	905±0.05	512.5±1.5	452.5±0.05	≥ 300-≤ 200 [§]
Dap (g cm ⁻³)	0.5±0.01	0.4±0.01	0.6±0.08	0.7±0.02	0.4 - 0.9
Pb (mg kg ⁻¹)	0.081	0.025	Nd	0.003	100
Cr (mg kg ⁻¹)	0.003	0.008	Nd	Nd	120
Cd (mg kg ⁻¹)	nd	0.012	Nd	Nd	2
Ni (mg kg ⁻¹)	0.121	0.004	0.009	0.004	20

CE = Conductividad eléctrica, Dap = Densidad aparente, CIC = Capacidad de intercambio catiónico, MO = Materia orgánica.

*Intervalo de P (Soto y Meléndez 2004). [§]Intervalo relación C/P (Núñez 2007)

Una relación C/N alta (> 50) puede provocar la inmovilización del N y una relación baja (< 10) ocasionaría toxicidad por amonio si se aplica como enmienda orgánica, lo que dependerá de los residuos orgánicos empleados (Majlessi *et al.* 2012). Por lo tanto, es imprescindible valorar la relación amonio/nitratos, la cual varía dependiendo de las materias primas, pero en general un abono inmaduro tendrá mayores nive-

les de amonio que nitratos (Soto y Meléndez 2003). Ch'ng *et al.* (2013) reportaron una relación C/N de 19.8 con una concentración de $\text{NH}_4\text{-N}$ de 63 mg L^{-1} y $\text{NO}_3\text{-N}$ de 42 mg L^{-1} al final del proceso de compostaje de la mezcla de residuos de hojas de piña trituradas, gallinaza y melaza.

Por otro lado, Pérez *et al.* (2011) reportan una relación C/N de 8 en lombricompostas obtenidas a partir de residuos de hortalizas y estiércol vacuno. Por su parte Olivares *et al.* (2012) mencionan que la lombricomposta a partir de estiércol de ganado vacuno y aserrín tuvo una relación C/N de 7, estos valores indican una humificación completa de los residuos orgánicos.

En cuanto a la concentración de P, fue mayor en las lombricompostas obtenidas a partir de los lodos residuales de la industria láctea (**Cuadro I**); sin embargo, su valor es menor a lo que reportan Soto y Meléndez (2003) de 0.15 a 1.5 % en abonos de lodos residuales municipales. Barik *et al.* (2011) reportaron que con una lombricomposta a partir de residuos de cosecha y estiércol de ganado vacuno en una proporción 1:1 (p/p) tuvieron concentraciones de P de 0.19 a 1.02 %. La mineralización ocurre por la acidez provocada por los microorganismos en la descomposición de la materia orgánica y esto provoca un aumento en la solubilización de P, dado por las enzimas llamadas fosfatasa que se localizan en el intestino de la lombriz (Suthar *et al.* 2012) y la descomposición influenciada por la temperatura, el pH, la aireación, la naturaleza de los residuos orgánicos y la relación C/P. En este punto, si la relación C/P es igual o menor a 200, es de esperarse la mineralización del P orgánico durante la descomposición de la materia orgánica; si por el contrario, dicha relación es igual o mayor a 300, ocurrirá una inmovilización del P inorgánico durante el mismo proceso (Núñez 2007). Las lombricompostas evaluadas presentaron una relación C/P mayor a lo

que menciona el autor (**Cuadro I**), por lo que con este parámetro se puede indicar que no hubo una adecuada mineralización de los residuos orgánicos.

Respecto a la concentración de los metales evaluados (Pb, Cr, Cd y Ni) en las diferentes lombricompostas, su valor fue mucho menor a lo que establece la normatividad mexicana, con esto las lombricompostas pueden ser empleadas como enmiendas orgánicas para mejorar la calidad de suelos que se encuentran deficientes de materia orgánica. Los abonos orgánicos de residuos vegetales por lo general presentan bajos niveles de metales pesados, mientras que aquellos obtenidos a partir de residuos orgánicos urbanos e industriales tienen una alta concentración, lo que retrasa la madurez de los abonos (Paradelo *et al.* 2008). Condición que no se presentó en las lombricompostas de lodos residuales de la industria láctea, obtenidas en este trabajo.

La concentración total de metales pesados es un indicador útil de contaminación presente en los abonos orgánicos que serán aplicados como enmiendas, pero no provee información de metales disponibles para las plantas, lo que depende de su forma química (especiación) (Basanta *et al.* 2007). Por otra parte, la lombriz participa como organismo que bioacumula metales pesados y por lo tanto reduce los niveles de toxicidad en el sustrato, es por eso que este organismo además de elaborar lombricomposta es considerado un bioacumulador de metales del ambiente (Del Águila *et al.* 2011).

Prueba de fitotoxicidad

En las **figuras 1, 2 y 3** muestran los resultados de la prueba de fitotoxicidad de las lombricompostas evaluado mediante el índice de germinación (IG), se observan diferencias estadísticamente significati-

vas ($p < 0.05$) entre las lombricompostas y el control.

En la prueba con cebada, las lombricompostas L1, L2 y L3 presentaron un % IG > 100 . Cuando el valor de IG sobrepasa el 100 %, indica la presencia de nutrientes o sustancias promotoras de la germinación. La lombricomposta L4, tuvo un IG de 57.2 % este valor la clasifica como moderadamente tóxica de acuerdo a Martignon (2009).

Moldes *et al.* (2007) mencionaron que las gramíneas son menos sensibles que otras especies a la presencia de sustancias tóxicas. Paradelo *et al.* (2008) reportaron que la cebada no es una especie adecuada para discriminar entre lombricompostas fitotóxicas y no fitotóxicas. Sin embargo, Ch'ng *et al.* (2013) reportaron un IG de 80 % con semillas de maíz, lo cual sugiere que la mezcla de residuos de hojas de piña triturada, gallinaza y melaza fue libre de sustancias tóxicas y por lo tanto el producto se considera maduro.

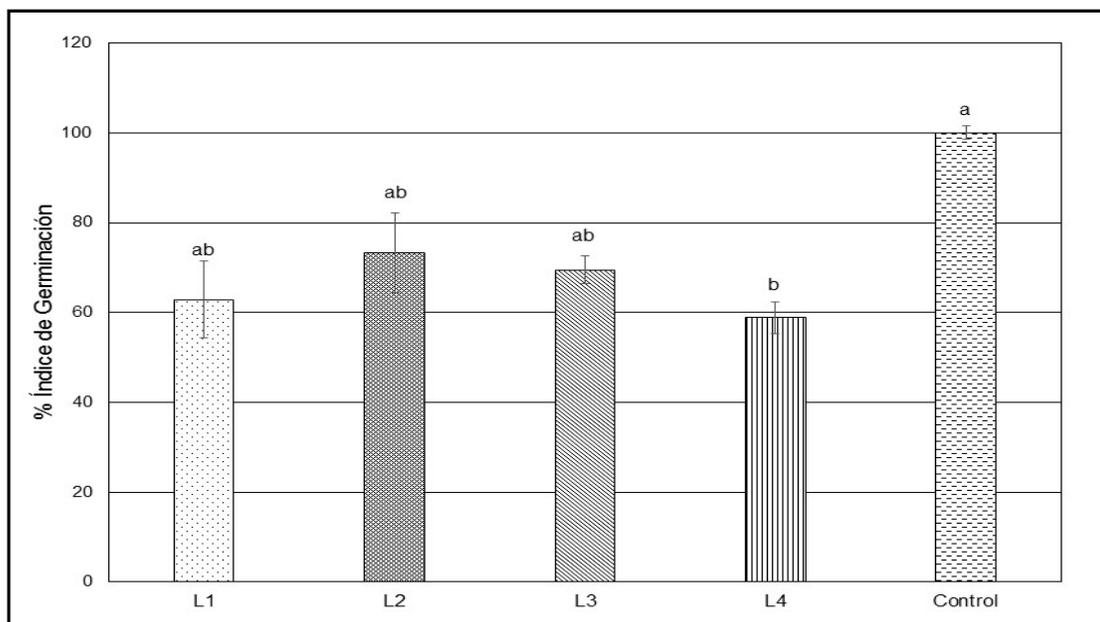


Fig. 1. Porcentaje del índice de germinación en semillas de cebada (*Hordeum vulgare* L.) al exponerlas a los extractos de las lombricompostas. ANOVA + Tukey ($p < 0.05$).

En la prueba con frijol las cuatro lombricompostas presentaron una moderada fitotoxicidad (51-75 %) de acuerdo a Martignon (2009) (**Fig. 2**). En este caso, las semillas de esta leguminosa fueron más sensibles a los extractos acuosos de los productos. Rivera *et al.* (2005) señalaron que las leguminosas son más susceptibles que las gramíneas a la exposición de sustancias tóxicas y por lo tanto estas especies pueden ser empleadas como bioindicadoras de la madurez de abonos orgánicos.

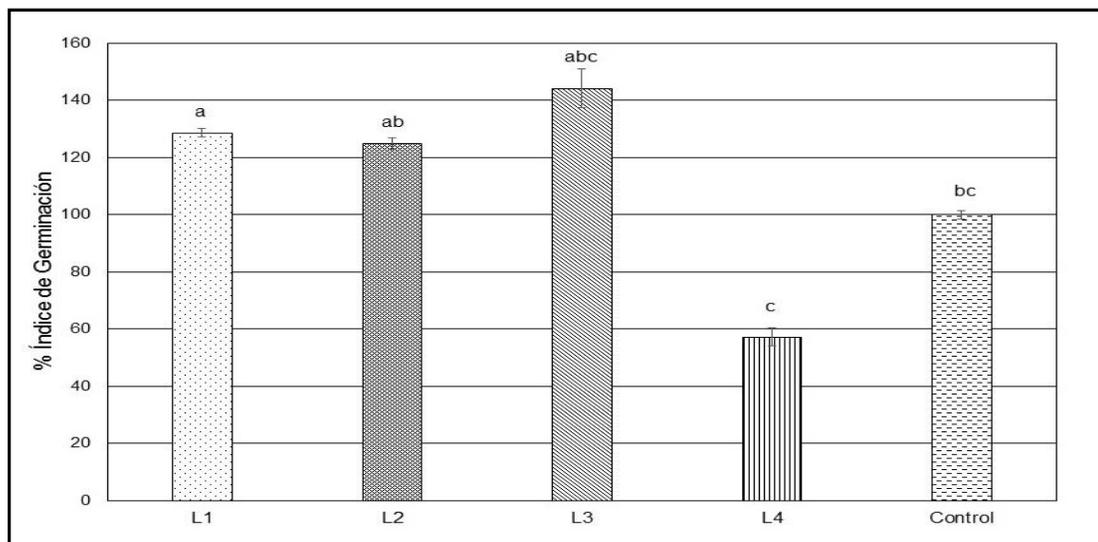


Fig. 2. Porcentaje del índice de germinación en semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) al exponerlas a los extractos de las lombricompostas. ANOVA + Tukey ($p < 0.05$).

En el caso de las semillas de rábano, el extracto acuoso de la lombricomposta L2 fue la única que presentó un % IG > 100 (**Fig. 3**), lo que indica un efecto de bioestimulación. La respuesta de este estímulo se considera como una alerta potencial, debido a que la bioestimulación es a menudo asociada a una respuesta adaptativa de homeostasis para incrementar su defensa natural contra el estrés (Calabrese y Baldwin 2003). Caso contrario, las lombricompostas L1, L3 y L4 ocasionaron una

moderada fitotoxicidad (51-75 %) como para frijol. Estévez *et al.* (2012) reportaron que en lechuga, otra especie de hortaliza, el índice de germinación al evaluar abonos orgánicos fue de 83 a 94 %, porcentaje que señala la ausencia de sustancias tóxicas y por lo tanto se podrían aplicar al suelo como mejoradores, estos mismos autores mencionan que las semillas de hortalizas ofrecen excelentes resultados en la prueba de fitotoxicidad.

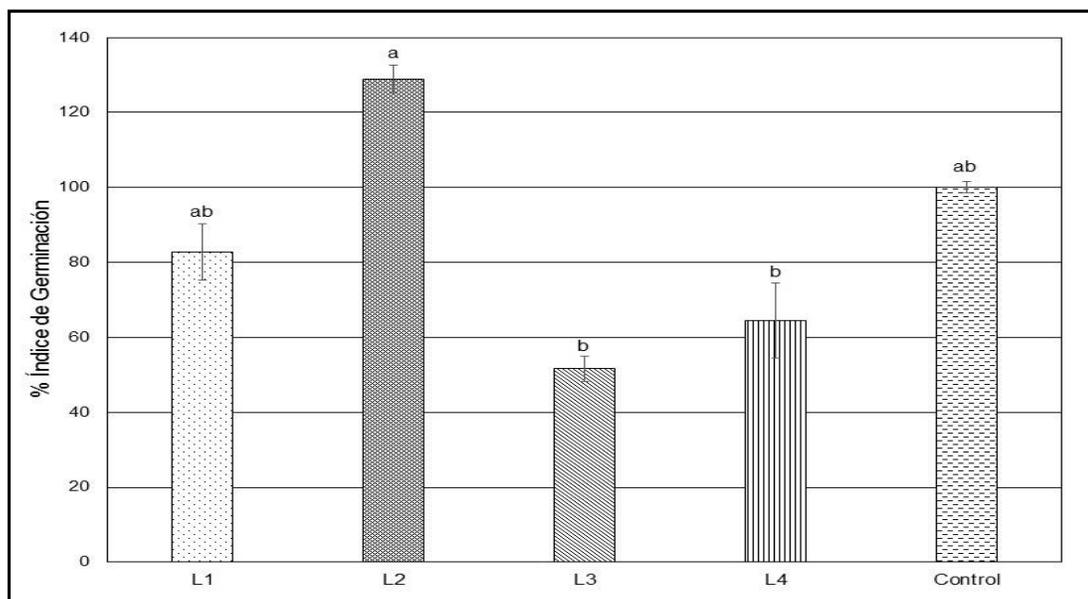


Fig. 3. Porcentaje del índice de germinación en semillas de rábano (*Raphanus sativus* L.) al exponerlas a los extractos de las lombricompostas. ANOVA + Tukey ($p < 0.05$).

El **cuadro II** muestra los resultados de la correlación entre los parámetros físicos y químicos y el índice de germinación de las semillas.

En cebada se presentaron correlaciones significativas y positivas ($p < 0.05$) entre la prueba de fitotoxicidad y la concentración de MO, C_{orgánico} y P, mientras rábano sólo se presentó correlación significativa y negativa con la concentración de P, lo que sugiere que a mayor concen-

tración de P disponible en las lombricompostas se obtendrá un decremento en el IG de las semillas, por lo que es importante verificar éste parámetro en el proceso de lombricompostaje.

El modelo ajustado explica el 37.7 % de la variabilidad en IG de rábano, el coeficiente de correlación es -0.6098, lo que indica una relación moderadamente fuerte entre las variables, mientras que para cebada el modelo explica el 47.5 % (**Cuadro III**).

CUADRO. II. COEFICIENTE DE CORRELACIÓN DE PEARSON ENTRE LOS RESULTADOS DE LA PRUEBA DE FITOTOXICIDAD E INDICADORES QUÍMICOS DE LAS DIFERENTES LOMBRICOMPOSTAS

IG	IG			pH	CE	MO	C _{org.}	C/N	N _{total}	P
	C	R	F							
C	1.0	0.3832	-0.0260	-0.1255	0.1333	0.4888*	0.4127*	0.2141	0.3570	-0.6894*
R		1.0	0.1862	0.3512	-0.1779	-0.1058	-0.1022	-0.1012	-0.1845	-0.6098*
F			1.0	-0.1590	0.2164	-0.1985	-0.2014	-0.3584	0.0210	0.0169

C= Cebada, R= Rábano, F= Frijol, CE: Conductividad Eléctrica, MO: Materia Orgánica. *correlación significativa (p < 0.05).

CUADRO III. REGRESIÓN LINEAL ENTRE EL IG Y LA CONCENTRACIÓN DE FÓSFORO.

Plántula	P	IG = m (x) + b			p
		M	b	R ²	
Cebada		-0.6659	397.75	47.5%	0.0000
Rábano		2556.26	160.01	37.7%	0.0003

x = fósforo, m = pendiente, b = intercepto, R² = coeficiente de determinación. * = nivel de significancia al 95 %

Betencourt *et al.* (2012) mencionaron que la concentración de P debe estar entre 0.1 y 1.6 %, atribuyéndose en cierta medida a que la concentración depende de la cantidad de materia orgánica y el pH del sustrato en el compostaje, debido a que la materia orgánica al descom-

ponerse libera gran cantidad de ácidos orgánicos que solubilizan los fosfatos y el pH provoca que elementos como el Al y Fe se neutralicen y permitan la movilización del P. Pero si existe una concentración elevada de P en los abonos orgánicos, una vez que se incorporen al suelo, saturan los sitios de intercambio, lo que ocasionaría que el P sea estable y por lo tanto menos aprovechable para las raíces de las plantas y microorganismos.

CONCLUSIONES

La problemática que se presenta en la generación de los residuos orgánicos es una constante de esta época, las acciones de reciclaje y reducción son procesos físicos y químicos que resultan costosos, por lo que el emplear técnicas de lombricompostaje reduce el precio de producción y es una alternativa para descontaminar el ambiente.

Por los indicadores que establece la normatividad mexicana las lombricompostas evaluadas en este trabajo son adecuadas para aplicarlas como enmiendas orgánicas con el fin de mejorar la cantidad de materia orgánica de suelos degradados. Sin embargo, la relación C/P indicó que no existió una buena mineralización de los residuos orgánicos empleados, lo que no limita su empleo.

Los bioensayos con semillas probaron que dichas lombricompostas pueden ocasionar una fitotoxicidad moderada a las plantas. Por lo que esta prueba es una herramienta complementaria a la evaluación de indicadores físicos, químicos y biológicos. La prueba de fitotoxicidad con semillas indicó que la lombricomposta L4 que se obtuvo a partir de 40 % de lodos lácteos, 20 % estiércol y 40 % rastrojo de maíz presentó una moderada toxicidad para las tres semillas empleadas en este trabajo

(cebada, frijol y rábano) de acuerdo al índice de germinación. Con estos resultados esta lombricomposta se debe aplicar con reservas para mejorar las condiciones de suelos dedicados a la agricultura.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece el apoyo otorgado a los Cuerpos Académicos a través del proyecto, CACyPI-UATx-2014 que permitió realizar los diferentes análisis a las lombricompostas. Un reconocimiento especial al Laboratorio de Ecología Forestal del CIGyA por proporcionar las lombricompostas L1 y L2.

REFERENCIAS

- Almaguer L. J., Reyes L. V., Reyes H. A. y Villa P. O. (2012). Evaluación del efecto del humus líquido obtenido por tres métodos, en condiciones de maceta y de campo, utilizando maíz (*Zea mays* L) y remolacha azucarera (*Beta vulgaris* L), respectivamente. DELOS. Revista Desarrollo Local Sostenible 5, 1-6.
- Álvarez de la Puente J. M. (2006). Estudio sobre mezclas óptimas de material vegetal para compostaje de alperujos en almazaras ecológicas y caracterización físico química de los compost producidos. DGPE. Consejería de Agricultura y Pesca. Junta de Andalucía.
- Baderna D., Colombo A., Amodei G., Cantú S., Teoldi F., Cambria F., Rotella G., Natolino F., Lodi M. y Benfenati E. (2013). Chemical-based risk assessment and in vitro models of human health effects induced by organic pollutants in soils from the Olona valley. *Sci. Total Environ.* 463-464, 790-801.
- Barik T., Gulati J. M. L., Garnayak L. M y Bastia D. K. (2011). Production of vermicompost from agricultural wastes – a review. *Agric. Reviews* 31, 172-183.
- Basanta R., García M. A., Cervantes M. J. E., Mata V. H. y Bustos V. G. (2007). Sostenibilidad del reciclaje de residuos de la industria azucarera: una revisión. *Cienc. Technol. Aliment.* 5, 293-300.
- Baumgarten A. y Spiegel H. (2004). Phytotoxicity (plant tolerance). Agency for Health and Food Safety, Viena Austria. 36 p.
- Betencourt E., Duputel M., Coloma B., Desclaux D. y Hinsinger P. (2012). Intercropping promotes the ability of durum wheat and chickpea to increase rhizosphere phosphorus availability in a low P soil. *Soil Biol. Biochem.* 46, 181-190.
- Blair J. M., Parmelee R. W., Allen M. F., McCartney D. A. y Stinner B. R. (1997). Changes in soil N pools in response to earthworm population manipulations in agroecosystem with different N sources. *Soil Biol. Biochem.* 29, 361-367.

- Bray R. H. y Kurtz L. T. (1945). Determination of total, organic, and available phosphorus in soil. *Soil Sci.* 59, 39-45.
- Calabrese E. J. y Baldwin L. A. (2003). The hermetic dose-response model is more common than the threshold model in toxicology. *Toxicol. Sci.* 71, 246-250.
- Cambier P., Pot V., Mercier V., Michaud A., Benoit P., Revallier A. y Houot S. (2014). Impact of long-term organic residue recycling in agriculture on soil solution composition and trace metal leaching in soils. *Sc. Total Environ.* 499, 560-574.
- Campitelli P. y Ceppi S. (2008). Chemical, physical and biological compost and vermicompost characterization: A chemometric study. *Chemometr. Intell. Lab.* 90, 64-71.
- Cayuela M. L., Sinicco T. y Mondini C. (2009). Mineralization dynamics and biochemical properties during initial decomposition of plant and animal residues in soil. *Appl. Soil Ecol.* 41, 118-127.
- Chapman H. D. (1965). Cation exchange capacity. *In: C. A. Black (ed.). Methods of analysis. Part 2. Agronomy 9. American Society of Agronomy. Madison, Wisconsin.*
- Ch'ng H. V., Ahmed O. H., Kassim S. y Majid N. M. A. (2013). Co-composting of pineapple leaves and chicken manure slurry. *Int. J. Recycling Org. Waste Agric.* 2, 1-8.
- Committee CS/37. (1999). Composts, soil conditioners and mulches AS 4454-1999. Standards, Australia, Homebush, Australia.
- Del Águila J. P., Lugo de la Fuente J. y Vaca P. R. (2011). Vermicomposting as a process to stabilize organic waste and sewage sludge as an application for soil. *Trop. Subtrop. Agroecosyst.* 14, 949-963.
- Diario Oficial de la Federación (DOF). (1992). NMX-AA-67-1985. Protección al ambiente-contaminación del suelo-residuos sólidos municipales-determinación de la relación carbono/nitrógeno. 6 de Noviembre de 1992. 2 p.
- Diario Oficial de la Federación (DOF). (2008). NMX-FF-109-SCFI-2008. Humus de lombriz (lombricomposta) especificaciones y métodos de prueba. 10 de junio. 24 pp.
- Emino E. R. y Warman P. R. (2004). Biological assay for compost quality. *Compost Sci. Util.* 12, 342-348.
- Environmental Protection Agency (EPA). (1998). Method 3051. Microwave assisted acid digestion of sediments, sludges, soils, and oils. 30 pp.
- Estévez S. I., Seoane L. S., Núñez D. A., López M. M. E. (2012). Production and characterization of compost made from garden and other waste. *Pol. J. Environ. Stud.* 21, 855-864.
- FCQAO (Federal Compost Quality Assurance Organization). (1994). Methods book for the analysis of compost. Abfall Now e. V. Publishing House, Stuttgart, Germany.
- Gunadi B., Blount C. y Clive A. E. (2002). The growth and fecundity of *Eisenia fetida* (Savingny) in cattle solids pre-composted for different periods. *Pediobiologia* 46, 15-23.
- Jackson M. L. (1976). Análisis químico de suelos. Trad. al español por M. J. Beltrán. 3ª. Ed. Omega. Barcelona, España. 622 pp.
- Julca O. A., Meneses F. I., Blas S. R. y Bello A. S. (2006). Organic matter, importance, experiences and its role agriculture. *IDESIA.* 24, 49-61.
- Luévano G. A. y Velásquez G. N. E. (2001). Ejemplo singular en los agronegocios estiércol vacuno: de problema ambiental a excelente recurso. *Revista Mexicana de Agronomía* 9, 306-320.
- Majlessi M., Eslami A., Saleh N. H., Mirshafieean S. y Babaii S. (2012). Vermicomposting of food waste: assessing the stability and maturity. *Iranian J. Environ. Health Sci. Engineering* 9, 1-6.

- Martignon G. (2009). Linee guida per la misura della tossicità dei suoli. Test di fitotossicità per il suolo. CESI RICERCA-ASV Ambiente e Sviluppo Sostenibile. Disponibile en: <http://doc.rse-web.it/doc/doc-sforgia/09000808-1996/09000808-1996.html>.
- Mehta N. y Karnwal A. (2013). Solid waste management with the help of vermicomposting and its applications in crop improvement. *J. Biol. Earth Sci.* 3, 8-16.
- Moldes A. B., Vázquez M., Domínguez J. M., Díaz F. F. y Barral M. T. (2007). Evaluation of mesophilic biodegraded grape marc as soil fertilizer. *Appl. Biochem. Biotech.* 141, 27-36.
- Nagavallema, K. P., Wani S. P. y Lacroix S. (2005). Vermicomposting: Recycling wastes into valuable organic fertilizer. *J. Agricult. Environ. Internat. Develop.* 99, 188-204.
- Negi R. y Suthar S. 2013. Vermistabilization of paper mill wastewater sludge using *Eisenia foetida*. *Biores. Technol.* 128, 193-198.
- Núñez E. R. (2007). El suelo como medio natural en la nutrición de los cultivos. En: Alcántar G. G. y Trejo T. L. I. (Coordinadores). 2007. Nutrición de cultivos. Mundi-Prensa México S.A. de C.V. y Colegio de Postgraduados. México, D.F. 438 p.
- Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). (2006). Terrestrial plants test: seedling emergence and seedling growth test. Guideline for testing of chemicals. No.208. Paris, Francia. 21 p.
- Olivares C. M. A., Hernández R. A., Vences C. C., Jáquez B. J. L. y Ojeda B. D. (2012). Lombricomposta y composta de estiércol de ganado vacuno lechero como fertilizantes y mejoradores de suelo. *Universidad y Ciencia* 28, 27-37.
- Paradelo R., Moldes A. B., Rodríguez M. y Barral M. T. (2008). Relationship between heavy metals and phytotoxicity in composts. *Cienc. Tecnol. Aliment.* 6, 143-151.
- Peltre C., Christensen B. T., Dragon S., Icard C., Kätterer T. y Houot S. (2012). RothC simulation of carbon accumulation in soil after repeated application of widely different organic amendments. *Soil Biol. Biochem.* 52, 49-60.
- Pérez G. L. C., García G. E., Vázquez C. O., Zamora C. E., Hernández A. E., Juárez S. L. y García N. E. (2011). Grano de café y lombricomposta como una alternativa de rehabilitación para tepetate. *En: Gómez C. M. A., Vázquez C. O. y Zamora C. E. (Comps.). 2011. Centro de Investigación en Genética y Ambiente, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, México. p. 45-57.*
- POGEM. (2006). Norma Técnica Estatal Ambiental NTE-006-SMA-RS-2006. Que establece los requisitos para la producción de los mejoradores de suelos elaborados a partir de residuos orgánicos. Toluca de Lerdo, México. 9 de Octubre de 2006. No. 71. 64 p.
- Prabna M. L., Jayaraai I. A., Jeyaraai R. y Rao S. (2005). Comparative studies on the digestive enzymes in the gut of earthworms, *Eudrilus eugeniae* and *Eisenia foetida*. *Indian J. Biotechnol.* 6, 567-569.
- Richards L. A. (1990). Diagnóstico y rehabilitación de suelos salinos y sódicos. 6ª. ed. Departamento de Agricultura de Estados Unidos de América. Editorial Limusa, México. D.F.
- Rivera C. M. C., Trujillo N. A., Miranda C. M. A y Maldonado C. E. (2005). Evaluación toxicológica de suelos contaminados con petróleo nuevo e intemperizado mediante ensayos con leguminosas. *Interciencia* 30: 326-331.
- Rodríguez S. M. A. y Córdova V. A. (2006). Manual de compostaje municipal: tratamiento de residuos sólidos urbanos. SEMARNAT, INE y GTZ. México, D.F. 101 p.
- Ruíz M. M. (2011). Taller de elaboración de lombricomposta [Recurso electrónico]: porque tener lombrices nos beneficia a todos. Universidad Iberoamericana. México, D.F. http://www.via.mx/web/files/TALLER_DE_LOMBRICOMPOSTA.pdf.

- Saval S. (2012). Aprovechamiento de residuos agroindustriales: pasado, presente y futuro. *BioTecnología* 16, 14-46.
- Santamaría R. S. (2007). Las lombrices de tierra en los sistemas agrícolas. *En: Ferrera C.R. y Alarcón A. (eds.) Microbiología agrícola. Hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biológico y planta-microorganismo* Ed. Trillas, México, D.F. 310-324.
- Sharma S., Pradham K., Satya S. y Vasudevan P. (2005). Potentiality of earthworms for waste management and in other Use-A Review. *J. American Sci.* 1, 4-16.
- Sinha, R. K., Agarwal S., Chauhan K., Chandran V. y Soni B. K. (2010). Vermiculture technology: reviving the dreams of sir Charles Darwin for scientific use of earthworms in sustainable development programs. *Technol. Investments* 3, 155-172.
- Soto G. y Meléndez G. (2003). Indicadores químicos de calidad de abonos orgánicos. *In: Soto G., Meléndez G. y Uribe L. (eds.) Abonos orgánicos: Principios, aplicaciones e impacto en la Agricultura.* Centro de Investigaciones Agronómicas, Costa Rica. 59 p.
- StatPoint Technologies. Statgraphics Centurion XVI. Software estadístico versión en español. United States of America. 2011.
- Suthar S. (2010). Recycling of agro-industrial sludge through vermiculture technology. *Ecol. Eng.* 36, 1028-1036.
- Suthar S. y Singh D. (2012). Phytotoxicity of composted herbal pharmaceutical industry wastes. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 19, 3054-3059.
- Suthar S. y Sharma P. (2013). Vermicomposting of toxic weed-*Lantana camara* biomass: Chemical and microbial properties changes and assessment of toxicity of end product using seed bioassay. *Ecotox. Environ. Safe.* 95, 179-187.
- TMECC. (2001). Test methods for the examination of composting and compost. US Composting Council, Holbrook, NY.
- Visioli G., Menta C., Gard C. y Conti D. F. (2013). Metal toxicity and biodiversity in serpentine soils: Application of bioassay tests and microarthropod index. *Chemosphere* 90, 1267-1273.

INVESTIGACIONES MULTIDISCIPLINARIAS: BIOINDICADORES

Se terminó de imprimir el 16 de Diciembre de 2014 en los talleres de
Conciencia Gráfica S.A de C.V. con domicilio en Fracc. Cabañas Lt. 2

Oasis, Valsequillo, Puebla y con número de teléfono y fax

01 222 281 7084

El tiraje consta de 500 ejemplares

