

# Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

## Instituto de Ciencias

### Maestría en Ciencias Ambientales

Carlos Felipe Luna Bautista

Directora de tesis: Anabella Handal Silva. Comité tutorial: Alia Méndez Albores. Wendy A. García Suástegui. Fabiola Avelino Flores.

## EVALUACIÓN DEL POTENCIAL GENOTÓXICO DEL AGUA RESIDUAL TEXTIL, MEDIANTE BIOINDICADORES



### INTRODUCCIÓN

La degradación de la cuenca Alta del Balsas (río Zahuapán y Atoyac) es histórica y compleja. Esta contaminación es producto de la instalación de fábricas relacionadas con la petroquímica, la metálica y la automotriz, sumándose a la textil. En Tlaxcala, los ríos reciben sustancias nocivas provenientes de las industrias de 3 corredores industriales, Quetzalcoatl, Ixtacuixtla y Huejotzingo, del Complejo Petroquímico independencia y de más de 30 empresas de la maquila de mezcilla familiares irregulares. También recibe grandes cantidades de contaminantes orgánicos por los vertidos municipales deficientemente tratados y contaminantes químicos de plaguicidas y fertilizantes (Barranachea, 2004). La industria textil es uno de los giros que principalmente requiere una gran cantidad de agua para sus procesos, así como energía y productos químicos auxiliares, el agua residual generada se encuentra altamente contaminada debido a la presencia de colorantes, surfactantes, sales orgánicas y distintos compuestos químicos utilizados durante el proceso productivo. (GilPavas, et al. 2018).

### OBJETIVO GENERAL:

Evaluar la genotoxicidad del agua residual textil, vertida al río Atoyac en Villa Alta, Tlaxcala, mediante la utilización de bioindicadores: ajo (*Allium sativum*) y pez cebra (*Danio rerio*).

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Realizar el análisis fisicoquímico del agua residual textil (ART) vertida al río Atoyac.
- Determinar el Índice Mitótico (I.M) del ART en el tejido vegetal de Ajo (*Allium sativum*)
- Evaluar el daño genotóxico en células sanguíneas del pez cebra (*Danio rerio*) mediante las técnicas de micronucleos (MN) y ensayo cometa.

### METODOLOGÍA

#### TRABAJO DE CAMPO:

Las muestras, de agua residual textil, se tomarán de la zona de estudio directamente del efluente que proviene de la fábrica textil con base a la NMX-AA-003. Todas las pruebas se realizaron por triplicado. *In situ* se midió el pH, oxígeno, temperatura ambiental, temperatura del ART, con diferentes equipos y técnicas. El ART se colectó en la zona de estudio, 3 veces a distinta hora 80L: a las 9:00 a.m., 12:00 p.m. y 15:00 p.m. (Fig. 1) Posteriormente se mezclaron en el laboratorio y se determinó los siguientes parámetros fisicoquímicos: TDS, nitrógeno total, fósforo total, ORP, O.D(%), conductividad, salinidad, color, DBO<sub>5</sub> (Incubador Oxitop), DQO y turbidez (fotómetro Nova 60 Spectroquant). Se determinará la concentración del colorante indigo, y grasas.

#### TRABAJO DE LABORATORIO:

##### Cultivo y aclimatación en el laboratorio del pez cebra (*Danio rerio*)

Se utilizarán ejemplares de pez cebra (*Danio rerio*) (Pisces: Cyprinidae) de 1.5 ± 0.4g de peso corporal, procedentes de la estación piscícola de Cuautla, Morelos. Previo a los experimentos, los peces serán aclimatados a las condiciones de laboratorio. Los peces serán alojados aleatoriamente en acuarios de vidrio (10 individuos por acuario) con capacidad de 30 L y acondicionados con aireación constante. Se empleará un sistema semiestático, con recambio diario del 30% del volumen de agua, temperatura constante (26°C) y fotoperiodo 12h luz/12h oscuridad. Los peces serán alimentados 2 veces al día, se proporcionará oxígeno constante y se controlará la temperatura del agua, se medirá el pH con un pH-meter HANNA y la alcalinidad (mg/dL), dureza (mg/dL) y amonio (mg/L), usando un kit colorimétrico (HACH Fish Farming Model FF-1A.).

Los organismos que se utilizan en las pruebas de toxicidad aguda son peces juveniles del pez cebra (*Danio rerio*) y son descendientes directos de organismos silvestres reproducidos en criaderos en Cuernavaca Morelos. Los experimentos iniciarán con la aclimatación de ejemplares juveniles machos y hembras del pez cebra (*Danio rerio*), durante 7 días previo a la realización de los Bioensayos, bajo condiciones de laboratorio: en acuarios de 40 L con agua potable, filtro biológico, oxigenación constante de 3.5 a 4 mg/L, temperatura 27 ± 1°C, pH de 7.3 a 7.5, dureza del agua de 5° a 15° DGH y condiciones de iluminación son 14:10 h (luz: oscuridad), serán alimentados con hojuelas comerciales Wardley dos veces al día.

##### BIOENSAYOS EN TEJIDO VEGETAL: (*Allium sativum*)

**Índice mitótico:** Se realizó la siembra de ajo (*Allium sativum*), en un tratamiento agudo (96h), y se colocaron en la mezcla del ART en las concentraciones 25, 50 y 100%; las diluciones se realizaron con agua potable. Cada bioensayo se formó de un grupo control y 3 grupos experimentales.

Al cabo de 4 días (96h) a cada ajo de cada grupo, se cortó el meristemo apical y se fijaron en ácido acético (3:1) durante un día. Posteriormente, se deshidrataron con HCL 5M y se procedió a la tinción con Aceto Orceína.

Se determinó el IM en cada grupo experimental.  $IM = \frac{No. \text{ de células en mitosis}}{Total \text{ de células}} \times 100$

##### BIOENSAYOS EN TEJIDO ANIMAL: (*Danio rerio*)

**Prueba de micronucleos.** Con la mezcla de ART se formaron 4 bioensayos cada bioensayo constará de un grupo control y tres repeticiones al 25, 50 y 100% de ART, cada bioensayo constará de cinco ejemplares. Los diferentes grupos experimentales se mantendrán durante 96 hrs. (tratamiento agudo). Posteriormente de cada grupo experimental se colocaron cinco ejemplares en una vaso de precipitado con agua helada y se colocaron gotas de xilocaina para adormecer al pez y se tomarán muestras de sangre de la región caudal de cinco ejemplares de pez cebra se realizarán los frotis sanguíneos por animal para determinar la frecuencia de MN y observar las alteraciones nucleares. Los extendidos sanguíneos serán teñidos durante 10 min con colorante de Wright-Metanol (Merck®). La lectura de las láminas se efectuará, contando 1,000 células por frotis. Sólo se tomarán en cuenta células sanguíneas con membranas nucleares y citoplasmáticas intactas, descartando aquellas sobrepuestas o dañadas. Para identificar los MN se tomarán los siguientes criterios: diámetro del MN menor a un 1/3 del núcleo principal, estar claramente separado del núcleo, no ser refractario, presentar su mismo color e intensidad y estar incluidos en el citoplasma celular (Grisolia, 2002). El conteo de MN será expresado en porcentaje (MNC %), calculado a partir del número de eritrocitos micronucleados observados por cada 1000 células. Así mismo, se calculará el índice de proliferación (IP) que se obtiene considerando el % de MNC del control negativo respecto al % de MNC calculado en las muestras experimentales.

**Prueba ensayo cometa.** Con la mezcla de ART se formaron 4 bioensayos cada bioensayo constará de un grupo control y tres repeticiones al 25, 50 y 100% de ART, cada bioensayo constará de cinco ejemplares. De cada grupo experimental y el control cada 24 horas se tomarán dos ejemplares de pez cebra por punción cardíaca se tomarán muestras de sangre, con jeringas eparinizadas. De cada ejemplar muestreado se realizaron dos placas la cantidad de ADN dañado. Los efectos genotóxicos se evaluarán mediante la técnica de electroforesis en gel o ensayo cometa, considerando la metodología de Singh et al. (1988). La medición de los cometas se realizará con ayuda de un microscopio de fluorescencia. Las placas serán coloreadas con bromuro de etidio (0,02 mg/ml) antes de las mediciones. En cada placa se medirán 50 cometas, para un total de 1000 cometas por período y por nivel de exposición. En las mediciones se incluirán la longitud del núcleo y la cola de los cometas, en micrómetro.

### RESULTADOS

#### ÁREA DE ESTUDIO



Toma de muestra de ART



Análisis de ART in situ

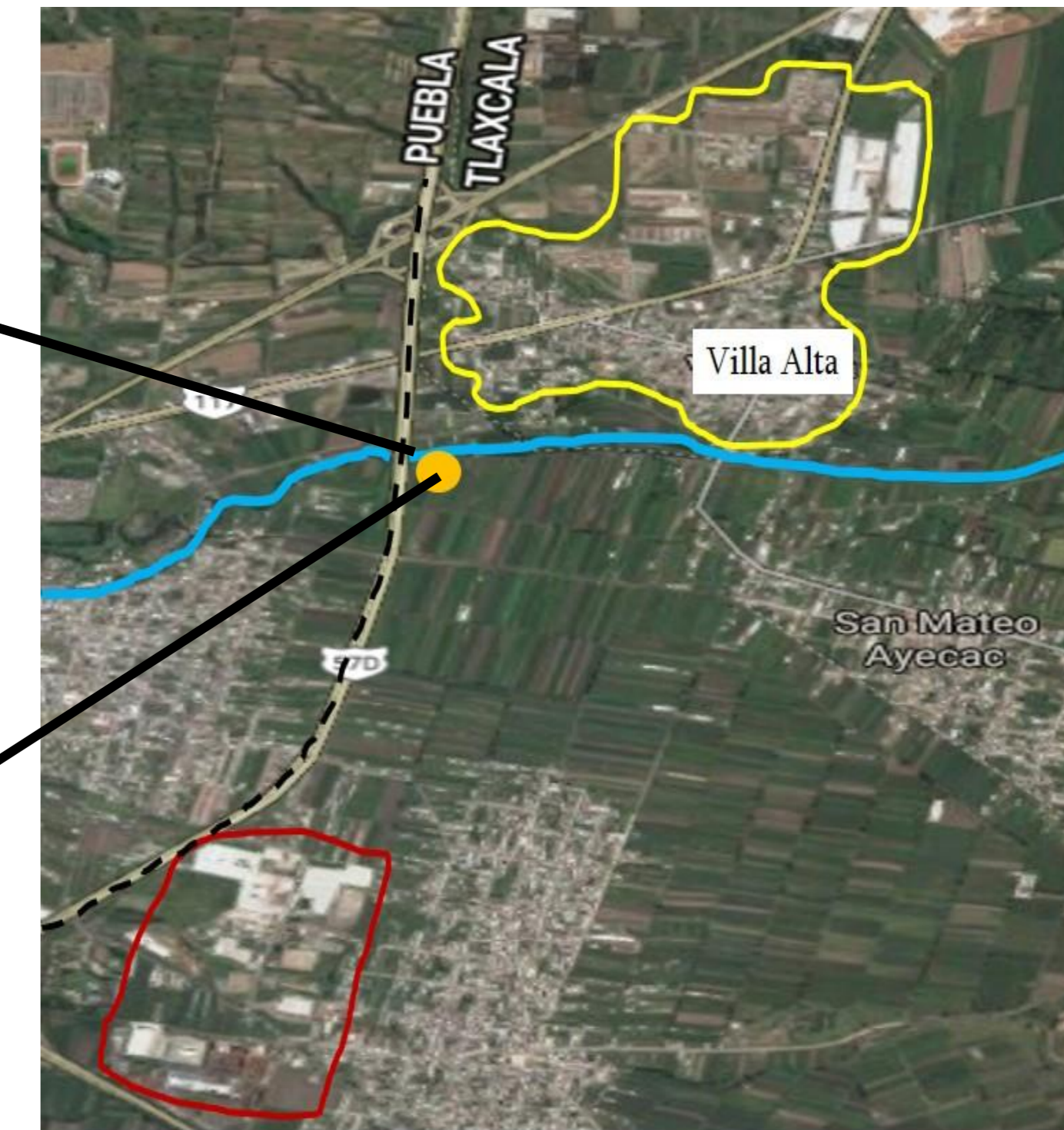
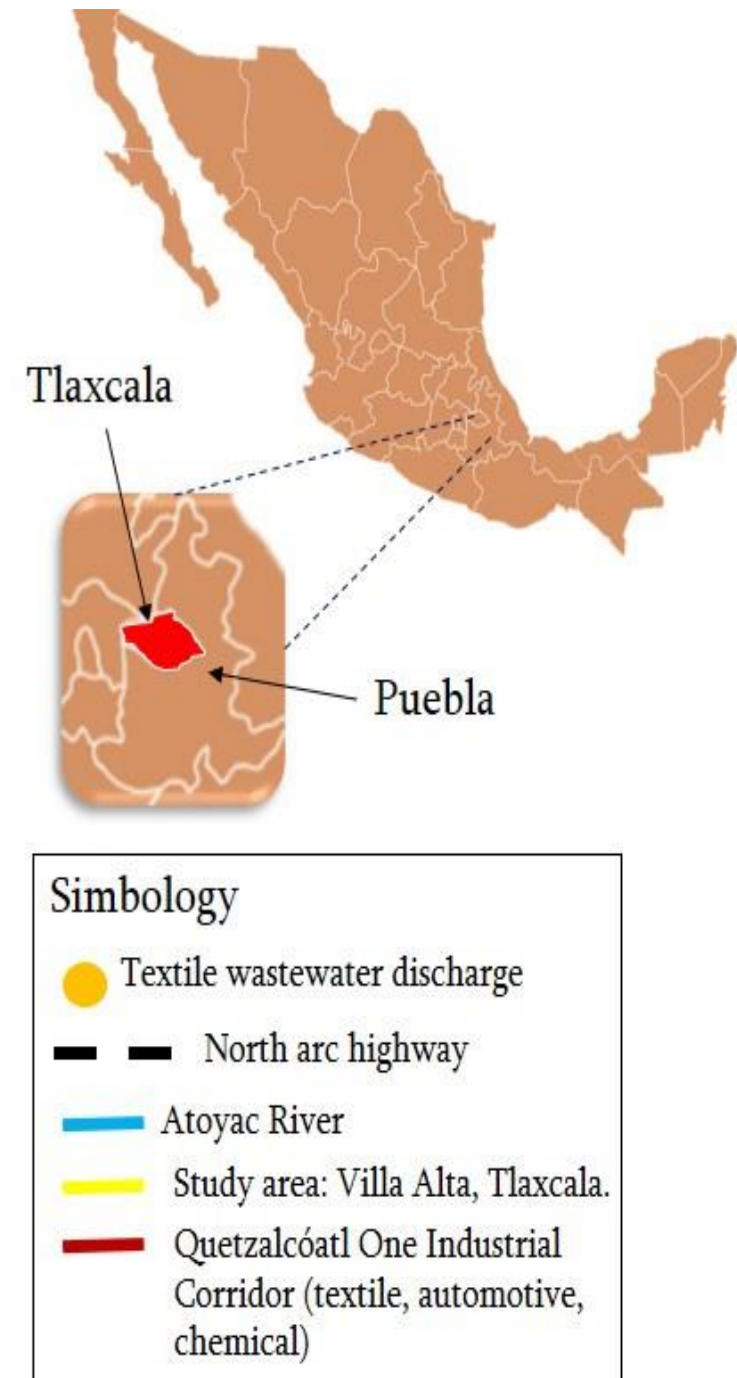


Fig. 1 Study area Villa, Alta, Tlaxcala. Source: modified google maps, 2019.



Simbology  
 ● Textile wastewater discharge  
 — North arc highway  
 — Atoyac River  
 — Study area: Villa Alta, Tlaxcala.  
 — Quetzalcoatl One Industrial Corridor (textile, automotive, chemical)

Tabla 1. Análisis fisicoquímicos del ART

Parámetro fisicoquímico	Resultado
Conductividad (S/m)	13.90 ± 0.23
TDS (mg/L)	10.20 ± 0.94
Salinidad	3.36 ± 0.13
D.O (mg/L)	8.45 ± 0.08
pH	8.71 ± 0.12
ORP (mV)	32.76 ± 0.41
Nitrógeno total (mg/L)	4.75 ± 0.17
Fósforo total (mg/L)	6.20 ± 0.47
Turbidez (NTU)	25.39 ± 0.61
Color	142.66 ± 1.69
Temperatura (°C)	30.66 ± 0.47
DBO <sub>5</sub> (mg/L)	165.66 ± 5.55
Temperatura ambiental (°C)	22.36 ± 0.24
DQO (md/L)	221.66 ± 4.92

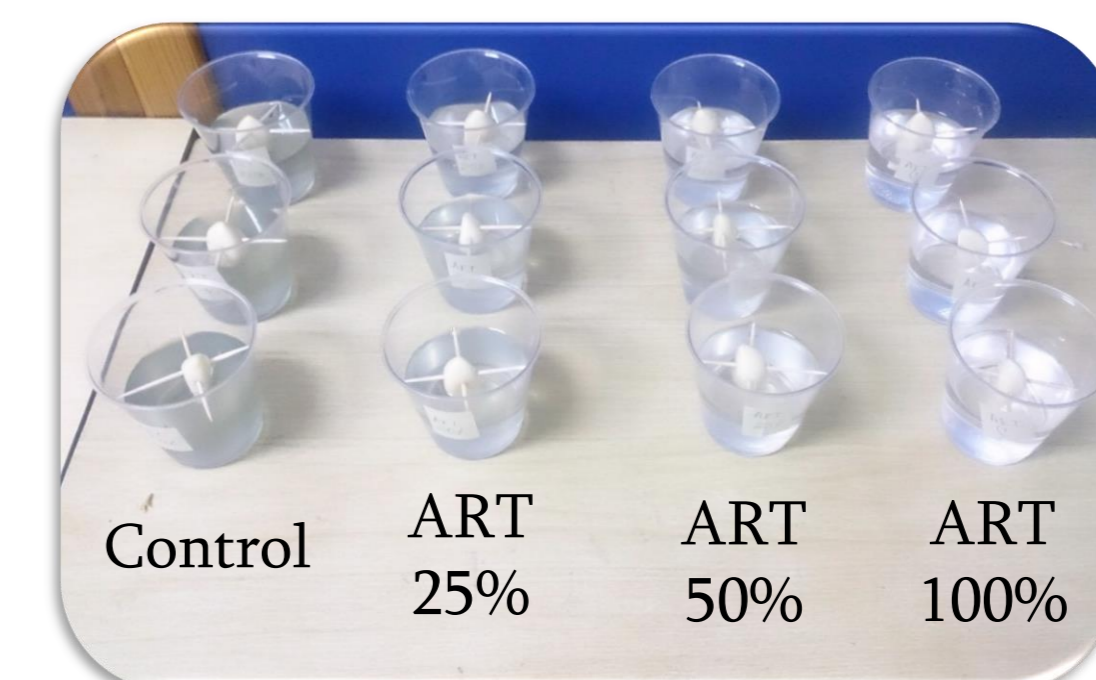


Fig 2. Siembra de ajo a diferentes concentración de ART



Brote al 100% Raíz en control, 25 y 50%

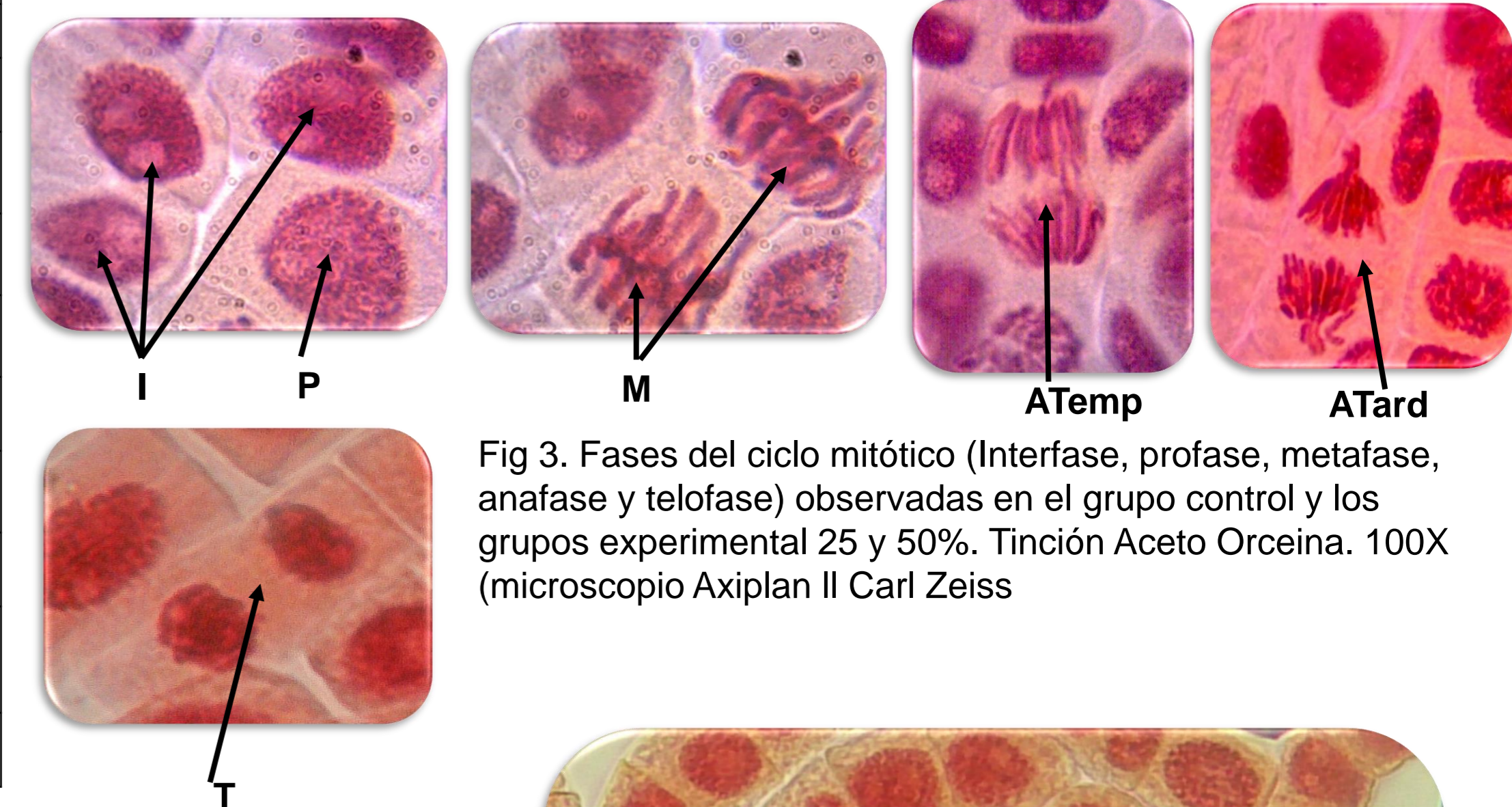


Fig 3. Fases del ciclo mitótico (Interfase, profase, metafase, anafase y telofase) observadas en el grupo control y los grupos experimentales 25 y 50%. Tinción Aceto Orceína. 100X (microscopio Axioplan II Carl Zeiss)

Fig 4. Fases del ciclo mitótico (Interfase y profase) observadas en los brotes del grupo experimental en el ART al 100%. Tinción Aceto Orceína. 100X (microscopio Axioplan II Carl Zeiss)

Tabla 2. Porcentaje de células en división del grupo control y los grupos experimentales.

Bioensayos	Células en división por etapa del ciclo celular					Índice	
	Interfase	Profase	Metafase	Anafase	Telofase	Interfásico	Mitótico
Control (Agua)	274.33 ± 9.8	367.66 ± 6.94	138 ± 7.25	150.66 ± 6.59	69.33 ± 2.86	274.33 ± 9.84	72.4 ± 0.98
Experimental 1 (ART 25%)	329.6 ± 42.85	356.66 ± 13.69	25.33 ± 17.24	152.66 ± 30.46	60 ± 5.88	329.66 ± 42.85	67.03 ± 4.28
Experimental 2 (ART 50%)	450.33 ± 38.43	447 ± 66.28	25.33 ± 17.24	52.33 ± 31.41	25 ± 17.66	450.33 ± 38.43	54.96 ± 4.84
Exp. 3 ART 100%	591.66 ± 37.20	347.33 ± 21.82	13.33 ± 5.43	32.33 ± 11.72	15.33 ± 11.81	591.66 ± 37.20	40.83 ± 3.72

### CONCLUSIONES

- Con base a la norma NOM-001-ECOL-1996 (06/ENE/97), la DBO<sub>5</sub> sobrepasa el límite máximo permisible con 165.66 mg/L (Tabla 1).
- Los resultados de la valoración del IM del ajo en el tratamiento a 96 hrs. a diferentes concentraciones de agua residual textil demostró que, en la concentración al 100% se observó que hubo crecimiento de brotes sin embargo, en los grupos: controles, 25 y 50% hubo crecimiento de raíces (Fig. 2 y Fig. 3).
- El análisis del IM en los diferentes grupos controles y experimentales demostraron que el IM fue mayor en el grupo control en comparación con los grupos experimentales (Tabla 2 y Fig. 3). Esto demuestra que en los grupos experimentales el agua residual textil inhibe la división celular, en relación a la concentración del ART.

### REFERENCIAS

GilPavas, E., Arbeláez-Castaño, P. E., Medina-Arroyave, J. D., & Gómez-Atehortua, C. M. (2018). Tratamiento De Aguas Residuales De La Industria Textil Mediante Coagulación Química Acoplada a Procesos Fenton Intensificados Con Ultrasonido De Baja Frecuencia. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 34(1), 157-167. <https://doi.org/10.20937/RICA.2018.34.01.14>  
 Barranachea, A. (2004). Tratamiento de agua para consumo humano. 50-56