

**Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, Managua.**

**UNAN-MANAGUA**

**Recinto Universitario “Rubén Darío”**

**Facultad de Ciencias e Ingeniería**

**Departamento de Biología**



**Monografía para Optar al Título de Licenciada en Biología con Mención en  
Educación Ambiental.**

**Tema: Aplicación del Allium Test en las muestras de agua en la presa de la  
Finca la Tormenta, comarca Trinitara, municipio de Siuna-RACCN, junio-  
diciembre 2016.**

**Autor: Bra. Jennifer del Rosario Peralta Peralta**

**Tutor:**

**MSc. Liana Mirna Gómez Rodríguez**

**Asesores técnicos:**

**Lic. Francisca Salazar Cabrera.**

**Lic. Harvey Blandón Amador.**

**Managua, Nicaragua Febrero, 2017**

## DEDICATORIA

**A mi Dios:** Quien jamás me ha abandonado, y siempre me ha brindado fuerza y conocimiento dándome el valor, la fe y la esperanza para avanzar frente a cada obstáculo, y realizar cada una de las metas que me he propuesto.

**A mis padres:** Adán Alcides Peralta Talavera y Simodocia del Socorro Peralta Montalban; quienes me han inculcado los valores éticos, morales y espirituales a lo largo de mi vida, sobre todo nunca me han dejado sola, siempre estuvieron brindándome apoyo en mis éxitos y mis fracasos.

## **AGRADECIMIENTO**

**A mis familiares:** mi Hermano Amílcar Peralta, mi tía Adalis Peralta por ser parte de mi vida, ayudarme espiritualmente, y apoyarme e incentivar me a seguir mis estudios

**A mis compañeros y amigos:** los Br. Jairo Gunera Z., Adriana Picado, Maira Serrano, por brindarme su apoyo y por estar cerca de mí, a lo largo de mi carrera.

**A los Profesores:** del departamento de Biología por inculcarme el conocimiento en el transcurso de la carrera.

**A Mi tutora:** MSc; Liana Gómez, y Asesores; Francisca Salazar y Harvey Blandón por su ayuda, y dedicación a lo largo de todo este periodo de preparación y por su apoyo.

### **Reflexión Bíblica**

Dame ahora sabiduría y ciencia, para presentarme delante de este pueblo; porque

¿Quién podrá gobernar a este pueblo tan grande?

**2 Crónicas 1:10**

**Fuente: la Biblia del peregrino América Latina**

# ÍNDICE

**DEDICATORIA**

**AGRADECIMIENTO**

**INDICE GENERAL**

**INDICE DE TABLA**

**INDICE DE ILUSTRACIONES**

**INDICE DE GRAFICAS**

**RESUMEN**

<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>II. ANTECEDENTES .....</b>	<b>2</b>
<b>III. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>4</b>
<b>IV. OBJETIVOS .....</b>	<b>5</b>
4.1. General: .....	5
4.2. Específicos:.....	5
<b>V. MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>6</b>
5.1. Selección de los organismos de prueba .....	6
5.2. Principio de la prueba .....	7
5.3. Allium test .....	8
5.4. Allium test y evaluación genotoxicológica .....	8
5.5. Control del ciclo celular .....	9
<b>VI. HIPÓTESIS.....</b>	<b>11</b>
<b>VII. DISEÑO METODOLÓGICO .....</b>	<b>12</b>
7.1. Área de estudio .....	12
7.2. Tipo de estudio.....	13
7.3. Universo.....	13
7.4. Muestra de estudio.....	13
7.5. Unidad de análisis.....	13
7.6. Operación de las variables de Estudio.....	14
7.7. Material a utilizar .....	15
7.8. Método de Fiskesjö para Allium test .....	16
<b>VIII. ANALISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS .....</b>	<b>23</b>

8.1. Elongación de la Raíz de Allium cepa L.....	23
8.1.1. Crecimiento Promedio de las raíces de Allium cepa L. ....	29
8.2. Observaciones de Placas Microscópicas.....	33
8.2.1. Fases Mitóticas alteradas.....	35
8.3. Índice Mitótico .....	36
<b>IX. CONCLUSIONES .....</b>	<b>37</b>
<b>X. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>38</b>
<b>XI. FUENTES BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>39</b>
<b>XII. ANEXOS.....</b>	<b>42</b>
Anexo 1. Hoja de registro del Allium cepa L., expuesta a las muestras problema .....	43
Anexo 2. Registro de parámetros macroscópicos en las muestras recolectadas (Agua de la finca) y el control.....	44
Anexo 3. Conteo del Índice Mitótico de las placas Microscópicas .....	48
Anexo 4. Ilustraciones del área de Recolección de muestras de agua. ....	64
Anexo 5. Protocolo de Allium Test. ....	68
Anexo 6. Ubicación de la zona de estudio .....	71
Anexo 7. Ciclo Celular.....	72
Anexo 8. Glosario.....	73
Anexo 9. Abreviaturas.....	74

## INDICE DE TABLA

<b>Tabla 1.</b> Operacionalización de las variables.....	14
<b>Tabla 2.</b> Material del trabajo.....	15
<b>Tabla 3</b> Período de exposición de los Bulbos de <i>Allium cepa</i> L., en el punto alto	24
<b>Tabla 4</b> Caracterización de Parámetros Macroscópicos.....	24
<b>Tabla 5</b> Período de Exposición de los Bulbos de <i>Allium cepa</i> L., en el Punto Medio .....	25
<b>Tabla 6</b> Caracterización de Parámetros Macroscópicos.....	25
<b>Tabla 7</b> Período de Exposición de los Bulbos de <i>Allium cepa</i> L en el Punto Bajo	26
<b>Tabla 8</b> Caracterización de Parámetros Macroscópicos.....	26
<b>Tabla 9</b> Período de Exposición de los Bulbos de <i>Allium cepa</i> L., en el Punto del Pozo. ....	27
<b>Tabla 10</b> Caracterización de Parámetros Macroscópicos.....	27
<b>Tabla 11</b> Período de Exposición de los Bulbos de <i>Allium cepa</i> L., en el Control.	28
<b>Tabla 12</b> Caracterización de Parámetros Macroscópicos.....	28
<b>Tabla 13</b> Valores promedio del crecimiento de <i>Allium cepa</i> L .....	29
<b>Tabla 14</b> Observaciones de las placas Microscópicas.....	33
<b>Tabla 15</b> Identificación de fases Mitóticas alteradas.....	35
<b>Tabla 16</b> Registro del Índice Mitótico en las Muestras de agua de los 5 puntos...	36
<b>Tabla 17</b> Análisis de los Parámetro Macroscópico en <i>Allium cepa</i> L.....	45
<b>Tabla 18</b> Análisis de los Parámetro Macroscópico en <i>Allium cepa</i> L.....	46
<b>Tabla 19</b> Análisis de los Parámetro Macroscópico en <i>Allium cepa</i> L.....	47
<b>Tabla 20</b> Muestras Control a las 24 horas. ....	49
<b>Tabla 21</b> Suma de Porcentajes del control a las 24 Horas .....	49
<b>Tabla 22</b> Muestras Control a las 48 horas. ....	50
<b>Tabla 23</b> Suma de Porcentajes del control a las 48 Horas .....	50
<b>Tabla 24</b> Muestras Control a las 72 horas. ....	51
<b>Tabla 25</b> Suma de Porcentajes del control a las 72 Horas. ....	51
<b>Tabla 26</b> Muestras Punto Alto a las 24 horas. ....	52

<b>Tabla 27</b> Suma de Porcentajes del Punto Alto a las 24 Horas .....	52
<b>Tabla 28</b> Muestras Punto Alto 48 horas.....	53
<b>Tabla 29</b> Suma de porcentajes del Punto alto a las 48 horas .....	53
<b>Tabla 30</b> Muestras Punto Alto a las 72 horas .....	54
<b>Tabla 31</b> Suma de Porcentajes del Punto alto a las 72 Horas.....	54
<b>Tabla 32</b> Muestras Punto Medio a las 24 horas.....	55
<b>Tabla 33</b> Suma de Porcentajes del Punto Medio a las 24 Horas.....	55
<b>Tabla 34</b> Muestras Punto Medio a las 48 horas.....	56
<b>Tabla 35</b> Suma de Porcentajes del Punto medio a las 48 Horas.....	56
<b>Tabla 36</b> Muestras Punto Medio a las 72 horas.....	57
<b>Tabla 37</b> Suma de Porcentajes del punto medio a las 72 Horas. ....	57
<b>Tabla 38</b> Muestras Punto Bajo a las 24 horas. ....	58
<b>Tabla 39</b> Suma de Porcentajes del Punto Bajo a las 24 Horas.....	58
<b>Tabla 40</b> Muestras Punto Bajo a las 48 horas. ....	59
<b>Tabla 41</b> Suma de Porcentajes del Punto Bajo a las 48 Horas.....	59
<b>Tabla 42</b> Muestras Punto Bajo a las 72 horas. ....	60
<b>Tabla 43</b> Suma de Porcentajes del Punto Bajo a las 72 Horas.....	60
<b>Tabla 44</b> Muestras Pozo a las 24 horas.....	61
<b>Tabla 45</b> Suma de Porcentajes del Pozo a las 24 Horas.....	61
<b>Tabla 46</b> Muestras Pozo a las 48 horas.....	62
<b>Tabla 47</b> Suma de Porcentajes del Pozo a las 48 Horas.....	62
<b>Tabla 48</b> Muestras del Pozo a las 72 horas.....	63
<b>Tabla 49</b> Suma de Porcentajes del Pozo a las 72 Horas.....	63

## INDICE DE ILUSTRACIONES

<b>Ilustración 1</b> Clasificación del <i>Allium Cepa</i> L. ....	7
<b>Ilustración 2</b> Ciclo celular.....	10
<b>Ilustración 3</b> Limite de la Finca la Tormenta .....	12
<b>Ilustración 4</b> Visualización de la vista Panorámica de la Presa .....	64
<b>Ilustración 5</b> Punto de Muestreo 1, Punto Alto.....	64
<b>Ilustración 6</b> Punto medio de Recolección de las muestras de agua.....	65
<b>Ilustración 7</b> Vista panorámica del punto medio de muestreo .....	65
<b>Ilustración 8</b> Punto Bajo de Recolección de muestras de agua.....	66
<b>Ilustración 9</b> Punto del Pozo de recolección de las muestras de agua.....	67

## INDICE DE GRAFICAS

<b>Gráfica 1</b> Valores promedio de elongación de las raíces de <i>Allium cepa</i> L., Horas vs Muestras .....	30
---	----

## RESUMEN

El presente trabajo tiene como objetivo general aplicar el Allium test en las muestras de agua recolectadas en la presa de la finca la tormenta en la comarca Trinitaria, Siuna-RACCN 2016, Bajo condiciones controladas en los laboratorios de Biología (UNAN-Managua), para obtener resultados repetitivos y además de la discusión de las variables más relevantes en la interpretación de los datos, entre ellos estarían los parámetros macroscópicos utilizando la elongación de las raíces como punto crítico, donde el promedio de crecimiento del control fue de 2.86 cm, punto alto con 2.433 cm, el pozo con 2.642 cm, y el bajo con 2.758 cm y solo el punto medio sobrepasa el promedio del control con 3.0667 cm, lo que refleja que no existe un tóxico que inhiba el crecimiento de la raíz.

La identificación de los parámetros microscópicos en las fases de la mitosis en el punto medio, Bajo y Pozo es donde se revela presencia predominante de los daños genéticos **C-Mitosis, Cromosomas Vagabundos, y Anafase Bridge** esto puede inferir a la posible influencia de ciertos metales en las muestras de agua recolectadas de la presa. El Índice mitótico a las 72 horas fue para el Control de 92.21%, punto del Pozo con 99.04%, el punto medio con 84.83%, el punto Bajo con 82.93% y el punto Alto con 80.41%.

Al comparar los valores obtenidos después de las 72 de horas de exposición de los bulbos de *Allium cepa L.*, en las muestras de agua, entre los parámetros macroscópicos y los parámetros microscópicos, se valoró que el punto más afectado es el Punto del Pozo por presentar una elongación de raíz de 2.642 cm y en las láminas microscópicas presentar mayor presencia de aberraciones cromosómicas

## I. INTRODUCCIÓN

Las zonas rurales de Nicaragua presentan la dificultad del abastecimiento de agua potable a la población, lo que conduce al hecho de utilizar efluentes naturales como el agua de ríos y pozos artesanales, sin embargo, son aguas que debido a su recorrido podrían presentar contaminantes afectando así la salud de la población. Los análisis de laboratorios son muy costosos, por lo tanto, se han desarrollado diferentes técnicas para la evaluación de la calidad del agua, denominados Bioensayos, los que utilizan como bioindicadores organismos vegetales y animales cuidadosamente seleccionados, los cuales dan una respuesta dependiendo del estímulo al que son sometidos, como clara evidencia de las afectaciones por el tipo de agente contaminante presente en las muestras aguas. La metodología del Allium test fue determinada por el protocolo de (Fiskesjö, 1985), empleando plantas como indicadores que han demostrado su utilidad en la evaluación de agentes mutagénicos, determinada mediante protocolos estandarizados y validados.

La Finca “la Tormenta” ubicada en la costa caribe de nuestro país, fue seleccionada para la aplicación del Allium test, en muestras de agua de la presa artesanal debido a que este recurso acuático se utiliza para consumo humano y diferentes actividades agropecuarias, utilizando el *Allium cepa L.*, como organismo vegetal por ser sistemas no fotosintéticos y libres de cloroplastos, presentan reacciones similares a las de los tejidos y células de los vertebrados, por lo que son tan válidas como los grupos celulares de los mamíferos para detectar citotoxicidad basal (Rank, J. & Nielsen, M.H. , 1994), además de tener reacción en parámetros macroscópicos y microscópicos frente a agentes contaminantes

## II. ANTECEDENTES

El creciente desarrollo industrial y urbano ha traído consigo la aparición de una cantidad apreciable de sustancias químicas tóxicas, lo cual afecta tanto la salud humana como la de los ecosistemas en países desarrollados y en vías de desarrollo. Recientemente se han instrumentado bioensayos rápidos con el empleo de plantas como organismos de prueba, los que funcionan como buenas herramientas de pesquisa inicial (Rodríguez, 2003)

Los bioensayos de genotoxicidad empleando plantas como indicadores han demostrado su utilidad en la evaluación de agentes mutagénicos a través de la detección de aberraciones cromosómicas y mutagénicas (Fiskesjö, 1985), en 1938 utilizando *Allium cepa* se determinó los efectos de la colchicina y posteriormente en 1943 y 1945, las reacciones citológicas inducidas por sales inorgánicas y series orgánicas dando inicio, en la era de la mutagénesis química, al uso del biomonitoreo con plantas.

Un instrumento alternativo y que complementa los tradicionales análisis químicos para la determinación de toxicidad de muestras ambientales es la utilización de estos bioensayos, ya que los organismos vivos presentan alguna respuesta a niveles peligrosos de cualquier sustancia química o mezcla compleja de tóxicos presentes (CETESB, 1991). Los bioensayos in vitro han ganado aceptación en las estrategias de biomonitoreo, fundamentalmente porque suministran resultados confiables, son costo-efectivos, simples y rápidos. (Gustavson KE, Sonsthagen SA, Crunkilton RA, Harkin JM., 2000) Estos bioensayos pueden auxiliar en la evaluación de los efectos a la salud (toxicidad humana y animal) y de los efectos ecológicos de millares de sustancias químicas tóxicas que son introducidas por varias vías en el ambiente y permiten su aplicación en programas de monitoreo en la evaluación de la toxicidad (CETESB, 1991)

El *Allium cepa* ha sido objeto de numerosas pruebas para determinación de toxicidad utilizándolo como biomonitor de toxicidad y genotoxicidad del metronidazol aplicando el Allium test para indicación de los compuestos químicos y mezclas complejas,

(2006). La medición de algunos marcadores moleculares como indicador de la respuesta bioquímica ante los contaminantes ambientales, puede servir para mejorar la valoración de las exposiciones biológicamente importantes frente a químicos tóxicos y a su vez aumentar la habilidad de tasar el riesgo de sus efectos sobre la salud de las poblaciones expuestas (Fatima, R. and Ahmad M., 2005),

Según (Andrioli, 2011) sobre la evaluación de agentes químicos con potencial genotóxico en células meristemáticas de *Allium cepa* L. se demostró en referencia a determinar la toxicidad y genotoxicidad del Metronidazol y Tiabendazol esto con el fin de observar el crecimiento de las raíces y el rango de concentración usada para el estudio.

En el estudio presentado por (Restrepo, 2012) de Aberraciones cromosomales en bulbos de cebolla *Allium cepa* L. inducidas por moléculas híbridas 4-aminoquinolínicas se quería determinar las propiedades toxicológicas de los tres compuestos híbridos quinolin-tiazolidinona (FR-72 y FR-121), y acridinepoxiisindolindiona (FR-154) aplicándolos en el test de las raíces de bulbos de cebolla *Allium cepa* L.

En Nicaragua los datos en base al uso de Allium test es poco mencionado tenemos la investigación de Evaluación de calidad del agua del cerro Musún en rio blanco, Matagalpa-Nicaragua 2015, para determinar el grado de contaminación del efluente natural para utilización de consumo humano de la población aledaña al sector. (Harvey, 2015)

### **III. JUSTIFICACIÓN**

Nicaragua enfrenta un reto con respecto a la calidad del agua sobre todo en las zonas Rurales debido a que no poseen acceso al abastecimiento de agua potable, con una calidad apropiada para el consumo humano y para usos domésticos, es por esta razón que el dueño de la finca “la Tormenta” llevo a cabo la construcción de una presa natural para el abastecimiento de la finca, para las actividades ganaderas y para el riego de cultivos.

Las actividades antropogénicas cercanas a la zona donde la presa se encuentra ubicada, recurre a acciones que pueden ser la principal fuente de contaminación, entre ellos están contaminantes, como fertilizantes que se utilizan para el crecimiento del pasto del lugar, incrementando de esta manera la producción de alimento para los animales bovinos y equinos, esta contaminación se logra observar mediante el color que genera, incluyendo los sedimentos arrastrados durante la época de lluvias.

De igual forma la presa se utiliza como centro de recreación, donde los habitantes aledaños a la zona utilizan el agua de la presa para consumo, generando otra posible forma de contaminación de las aguas, por la mala higiene y mantenimiento de la presa.

Al realizar esta investigación tiene un papel importante para determinar si este efluente ha sido contaminado por las actividades agrícolas de la zona debido a cambios en la consistencia del agua y si presenta contaminación el poder brindarle una solución para que sea aprovechado de manera eficaz sin perjudicar la salud de las personas y de los animales dentro de la finca. Además, el realizar este tipo de estudio beneficioso para usar los efluentes acuáticos como suministros de agua potable para pobladores de determinado lugar, o en regiones donde no se cuenta con un sistema de alcantarillado sanitario.

Con la aplicación de bioensayos estandarizados y validados como el Allium test se logra detectar la presencia de agentes contaminantes aplicando los parámetros específicos del bioensayo en las muestras de aguas de la presa.

## IV. OBJETIVOS

### 4.1. General:

Aplicar el Allium test en las muestras de agua en la presa de la Finca la Tormenta, comarca Trinitara, municipio de Siuna, junio-diciembre 2016.

### 4.2. Específicos:

1. Determinar toxicidad mediante la elongación de la raíz de *Allium cepa* L. en las muestras expuestas al agua recolectadas de la presa.
2. Identificar genotoxicidad en placas microscópicas elaboradas del ápice de la raíz de *Allium cepa* L., mediante la técnica de división celular en las fases de la mitosis.
3. Calcular el índice mitótico de las placas microscópicas elaboradas del ápice de la raíz del *Allium cepa*.
4. Valorar la zona de muestreo con mayor afectación en los parámetros macroscópicos y microscópicos reflejados en los bulbos de *Allium cepa* L.

## V. MARCO TEÓRICO

(Nancy, 2004) expresa que la Ecotoxicología, un bioensayo o prueba de toxicidad es una técnica empleada para determinar si un residuo químico presente en el ambiente está en cantidades suficientemente altas para afectar adversamente algunos aspectos del espectro normal de actividades de animales y plantas. se realizan con el supuesto de que los organismos probados son “sucedáneos” o “claves” de organismos “superiores” presentes en su ambiente natural.

Las plantas vasculares, como por ejemplo hortalizas, cereales y leguminosas, han sido recomendadas por la Agencia de Protección al Medioambiente (EPA) y por la Administración de Drogas y Alimentos (FDA), debido a su buena sensibilidad, en comparación con semillas de otras especies de plantas terrestres (Nancy, 2004).

El uso de cebolla (*Allium cepa* L., *Liliaceae*), beterraga (*Beta vulgaris* L., *Chenopodiaceae*), arroz (*Oriza sativa* L., *Poaceae*) y rabanito (*Raphanus sativus* L., *Brassicaceae*), lechuga (*Lactuca sativa*) tienen gran potencialidad para evaluar la toxicidad y el riesgo de sustancias químicas peligrosas en el ambiente (Iannacone y Alvariño, 2004). (Nancy, 2004)

### 5.1. Selección de los organismos de prueba

- El organismo debe ser representativo de un grupo ecológico importante
- Amplio conocimiento de la fisiología, genética, taxonomía, y ecología del organismo.
- -Amplio rango de sensibilidad
- Disponibilidad o amplio rango de distribución y Abundancia.
- Factibilidad de mantenimiento en el laboratorio

#### 5.1.1. Los Organismos de prueba pueden ser:

- Organismos criados en Laboratorio
- Organismos colectados en campo.

### 5.1.2. Usos de las pruebas de toxicidad

- Factores favorables y desfavorables del ambiente.
- Efectos de los factores ambientales sobre la toxicidad de los contaminantes.
- Toxicidad de los contaminantes sobre una determinada especie.
- Sensibilidad de los organismos acuáticos.

### 5.1.3. Taxonomía de la cebolla (*Allium cepa* L)

Según, **Tropicos.org** la cebolla pertenece a la siguiente Clasificación:

**Reino:** Plantae

**División:** Angiospermas

**Orden:** *Asparagales*

**Clase:** *Equisetopsida*

**Subclase:** *Magnoliidae*

**Familia:** *Amaryllidaceae*

**Género:** *Allium*

**Especie:** *cepa* L.

**Nombre científico:** *Allium cepa* L.

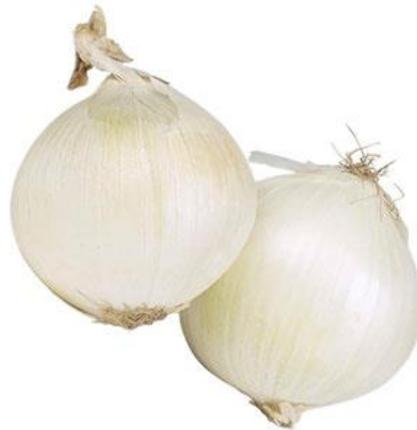


Ilustración 1 Clasificación del *Allium Cepa* L.

### 5.2. Principio de la prueba

Cuando un bulbo de cebolla (*Allium* sp) se rehidrata, se produce una estimulación del crecimiento de las células, lo cual permite la elongación de las raíces de la planta. Sin embargo, cuando la hidratación se lleva a cabo en presencia de sustancias tóxicas, la división celular de los meristemas radiculares puede inhibirse, ya sea retardando el proceso de mitosis o destruyendo las células. Este tipo de alteraciones generalmente impide el crecimiento normal de la raíz y, por tanto, su elongación (Fiskesjö G. , 1985) (Fiskesjö G. , *Allium* test on copper in drinking water, 1981)

El efecto puede determinarse en forma indirecta, mediante la comparación de la elongación de las raíces de cebollas expuestas al tóxico con las de cebollas no expuestas, luego de un periodo de 72 h de prueba. La cuantificación del efecto se realiza estableciendo el porcentaje de inhibición del crecimiento de las raíces respecto a la longitud promedio de las raíces del control

### **5.3. Allium test**

El ensayo de *Allium cepa* es una prueba para el establecimiento de genotoxicidad en ecosistemas – tierra, agua y aire –. La frecuencia de aberraciones cromosómicas se establece en las células de las puntas de la raíz de la planta de prueba – cebolla común – (*Allium cepa* L.) cuando se proporciona evidencia de potencial genotóxico en la sustancia. La prueba tiene en cuenta la influencia global y la acción mutua entre las sustancias genotóxicas y material genético (cromatina, cromosomas). (Firbas P. , 2011).

Pruebas de cebolla (Allium test) dan evidencia inflexible de la calidad del agua y a diferencia de las pruebas químicas muestran los efectos completos de contaminación, no sólo la presencia de sustancias que buscan los métodos empleados por la química analítica. (Firbas P. , 2011)

### **5.4. Allium test y evaluación genotoxicológica**

Según (Fiskesjö G. , 1985), los organismos biológicos tienen la capacidad de expresar alteraciones más sutiles que operan durante cierto tiempo en un ecosistema mediante respuestas individuales (reacciones fisiológicas, etológicas, morfológicas y bioquímicas) o de conjunto (cambio en la estructura y dinámica de las comunidades, perturbaciones en las cadenas tróficas etc.) por su capacidad de detectar cambios en la calidad de los efluentes y controlar que la toxicidad este por debajo de los límites permitidos, es por esta razón los ensayos o test biológicos se

están transformando en herramientas valiosas para la evaluación del impacto ambiental (Fiskesjö G. , 1985).

El *Allium test* es un bioensayo que permite determinar la toxicidad total y genotoxicidad de diferentes agentes tóxicos o contaminantes (Fiskesjö G. , 1985) a partir del crecimiento de la cebolla (*Allium cepa L*) (Rank, J. & Nielsen, M. H., 1993), (Rank, J. & Nielsen, M.H. , 1994), Señalan que las raíces de plantas superiores, por ser sistemas no fotosintéticos y libres de cloroplastos, presentan reacciones similares a las de los tejidos y células de los vertebrados, por lo que son tan válidas como los grupos celulares de los mamíferos para detectar citotoxicidad basal. En esta misma línea argumental (Fiskesjö G. , 1997) subraya que los meristemas radicales pueden ser empleados, además, para investigar la genotoxicidad mediante análisis microscópicos de las aberraciones celulares durante la división mitótica.

Se ha utilizado el *Allium test* para detectar un gran número de contaminantes ambientales, que incluyen, iones de metales ((Mercurio:Hg), (Cobre:Cu),(Níquel: Ni), (Cadmio: Cd), (Berilio: Be), (Aluminio: Al), (Manganeso: Mn), (Litio: Li)), metales pesados ( $Zn^{2+}$  (Zinc) y (Cadmio)  $Cd^{2+}$ ), pesticidas, colorantes textiles, productos para desinfectar agua NaClO (Hipoclorito de sodio),  $ClO_2$  (Dióxido de cloro) y otros agentes, mostrando todos ellos propiedades clastogénicas.

## **5.5. Control del ciclo celular**

**5.5.1. Fases de la Mitosis** (Zárate Ramírez, V. R., Nepomuceno Serrano, T., Roché Canseco, P. A., De la Peña Álvarez, V. & Rosas Garay, M.Á., 2012)

**5.5.1.1. Interfase:** la célula crece y el ADN se duplica. Es un período de crecimiento activo del citoplasma, incluyendo la producción de los orgánulos.

**5.5.1.2. Profase:** los cromosomas se visualizan como largos filamentos dobles, que se van acortando y engrosando. Cada uno está formado por un par de

cromátidas que permanecen unidas sólo a nivel del centrómero. En esta etapa los cromosomas pasan de una forma laxa a una compacta. La envoltura nuclear se rompe en una serie de cisternas que ya no se distinguen del retículo endoplásmico, de manera que se vuelve invisible con el microscopio óptico. Los nucléolos desaparecen.

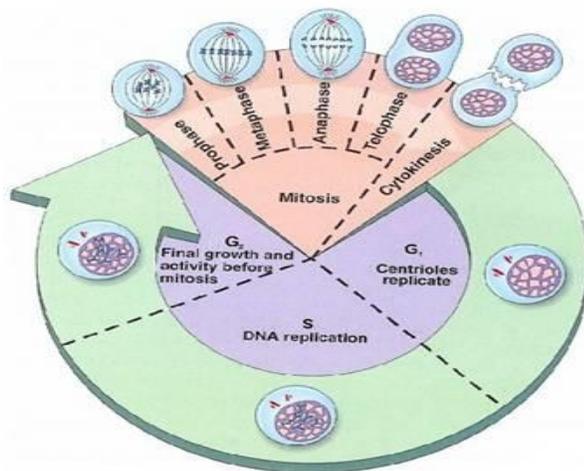
**5.5.1.3. Metafase:** aparece el huso mitótico o acromático, formado por haces de microtúbulos; los cromosomas se unen a algunos microtúbulos a través de una estructura proteica laminar situada a cada lado del centrómero, denominada cinetocoro. También hay microtúbulos polares, más largos, que se solapan en la región ecuatorial de la célula. Los cromosomas muestran el máximo acortamiento y condensación, y son desplazados por los microtúbulos hasta que todos los centrómeros quedan en el plano ecuatorial.

**5.5.1.4. Anafase:** se separan los centrómeros hijos, y las cromátidas convirtiéndose en cromosomas hijos. Cada juego de cromosomas hijos migra hacia un polo de la célula. El huso mitótico es la estructura que lleva a cabo la distribución de los cromosomas hijos en los dos núcleos hijos.

**5.5.1.5. Telofase:** comienza cuando los cromosomas hijos llegan a los polos de la célula. Los cromosomas hijos se alargan, pierden condensación, la envoltura nuclear se forma nuevamente a partir del retículo endoplásmico rugoso y se forma el nucléolo de nuevo.

**Ilustración 2 Ciclo celular**

fuelle: Internet ver en anexo:7



## VI. HIPÓTESIS

### **Hipótesis alternativa, $H_1$**

Los porcentajes promedio de inhibición de la elongación y la presencia de anomalías mitóticas en las células meristemáticas de la raíz de *Allium cepa L.*, tendrán relación con la presencia de agentes contaminantes en las muestras de agua

### **Hipótesis nula, $H_0$**

Los porcentajes promedio de inhibición de la elongación y la presencia de anomalías mitóticas en las células meristemáticas de la raíz de *Allium cepa L.*, no tendrán relación con la presencia de agentes contaminantes en las muestras de agua



## **7.2. Tipo de estudio**

Experimental, descriptivo de corte Transversal

El presente estudio es de carácter descriptivo, ya que se analizó y describió las características del organismo de prueba (*Allium cepa L.*) expuesta a las muestras agua.

Es experimental porque se cumplen 2 requisitos para lograr el control y la validez interna realizando varias pruebas para llegar a un resultado concreto.

Según el alcance temporal que se llevó a cabo el estudio es de corte transversal, debido a que se refiere a un momento específico, donde se realizó el estudio

## **7.3. Universo**

Corresponde a 6 km del recorrido del agua de la presa de la finca la tormenta.

## **7.4. Muestra de estudio.**

Corresponde a un total de 8000 ml de agua recolectada en 4 puntos específicos del curso del efluente de la presa

## **7.5. Unidad de análisis**

60 Bulbos de *Allium cepa L.*

## 7.6. Operación de las variables de Estudio

**Tabla 1. Operacionalización de las variables**

OBJETIVOS ESPECIFICOS	VARIABLES	SUB-VARIABLE	INDICADORES	TECNICA E INSTRUMENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS
<p><b>Determinar toxicidad mediante la elongación de la raíz de <i>Allium cepa</i> L.</b></p>	<p><b>Toxicidad</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Parámetros macroscópicos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Turgencia</li> <li>• Cambio de color</li> <li>• Forma de la raíz</li> <li>• Longitud y medición de la raíz.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Observación directa</li> <li>• Hoja de registro de crecimiento de las raíces de <i>Allium cepa</i> L.</li> </ul>
<p><b>Identificar genotoxicidad en placas microscópicas elaboradas del ápice de la raíz de <i>Allium cepa</i> L., y calcular el índice Mitótico</b></p>	<p><b>Genotoxicidad</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Parámetros microscópicos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Índice mitótico</li> <li>• Ciclo celular</li> <li>• Aberraciones cromosómicas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Guía de laboratorio.</li> <li>• Observación directa (uso del Microscopio)</li> </ul>

Fuente: Peralta J. (2016)

## 7.7. Material a utilizar

Tabla 2. Material del trabajo.

	Equipos	Material y Cristalería	
<b>PARAMETROS MACROSCOPICOS</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Regla</li> <li>- Lápiz</li> <li>- Cuadernos</li> <li>- Guantes</li> </ul>	48 tubo de ensayo de 1.5 cm de diámetro PYREX.  12 gradillas de poroplast  Caja incubadora artificial  Cinta ph	
	<b>Equipos</b>	<b>Material y Cristalería</b>	<b>Reactivos</b>
<b>PARAMETROS MICROSCOPICOS</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Microscopio binocular compuesto.</li> <li>- Bisturí</li> <li>- Computadora (Microsoft office)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 4 vidrio reloj</li> <li>- 1 caja de portaobjeto</li> <li>- 1 caja de cubreobjeto</li> <li>- Pipetas pasteur</li> <li>- 3 balones de 100 ml</li> <li>- Tubos de ensayo</li> <li>- Gradilla</li> <li>- Aceite de inmersión</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Solución de Colchicina al 1%</li> <li>- Fijador Carnoy 3:1 (etanol: Ácido acético glacial)</li> <li>- Solución de ácido clorhídrico (HCl) al 50%</li> <li>- Orceina Acética 45%</li> </ul>

Fuente: Peralta J. (2016)

## 7.8. Método de Fiskesjö para Allium test

La metodología está determinada por el protocolo Fiskesjö, G. (1985) ISSN 0018-0661 (Received May 4,1984) en su literatura, The Allium Test as Standard in Environmental Monitoring. Hereditas método que esta estandarizado a nivel internacional.

### 7.8.1. Protocolo de Allium test determinado por Fiskesjö, G. (1985) ISSN 0018-0661.

La prueba de *Allium cepa* L., es una prueba a corto plazo con muchas ventajas: bajo costo, la facilidad de manejar, buenas condiciones de cromosomas para el estudio de lesiones cromosómicas o perturbación de la división celular que incluye la evaluación de los riesgos de aneuploidía. La capacidad de las células de la raíz para activar promutágenos (el sistema MFO). El uso de la serie de cebollas para cada concentración de la sustancia de ensayo permite consideraciones estadísticas, ya partir de las curvas de crecimiento valores Efecto-concentración es obtenido. La prueba de Allium es, por último, una prueba sensible que muestra buena correlación con otros sistemas de prueba. Por lo tanto, los resultados positivos en la prueba de Allium deben ser considerados como una advertencia y también una indicación de que la sustancia de ensayo puede ser un riesgo para la salud humana y en nuestro medio ambiente. (Fiskesjö G. , 1985).

#### 7.8.1.1 El organismo de prueba:

Bulbos de igual tamaño se eligen a partir de una población de la *Allium cepa* común ( $2n = 16$ ), se cultivan en cada líquido de prueba. Las cebollas no deberían haber empezado a disparar de hojas verdes, ya que también la restricción de la hoja de crecimiento se puede utilizar como un parámetro para los efectos de diversos tratamientos.

El material de ensayo se puede almacenar fácilmente en condiciones secas por 10 - 20°C hasta después de la próxima temporada de cosecha. Después de la cosecha,

las cebollas se deben almacenar unos pocos meses antes de su uso (reposo invernal).

Para el experimento, se secan los bulbos y los que estén con moho deben ser desechados. Se seleccionan bulbos pequeños de alrededor de 1,5 a 2,0 cm de diámetro encajan bien en los tubos de ensayo ordinarias de 1,5 cm de diámetro con una longitud de 10 cm.

#### **7.8.1.2. Preparación de las muestras**

- **Muestra de referencia**

Se recolectó 8000 ml de agua de la presa de la finca la Tormenta, haciéndose la recolecta en 4 puntos específicos.

- **Muestra control**

2000 ml de agua de grifo recolectada en bodega del departamento de Biología, pabellón 50, que sirvió de indicador del crecimiento normal de la raíz del *Allium cepa* L.

#### **7.8.1.3. Procedimiento de la prueba:**

Antes de la prueba de inicio, se descaman los bulbos dejando intacto el anillo radicular. Si se va a iniciar con muchas cebollas al mismo tiempo, los bulbos descamados (pelados), deben ponerse en agua dulce durante el procedimiento de limpieza continua para proteger anillo radical. Los bulbos se colocan en papel toalla para eliminar el exceso de agua a partir de entonces se ponen en tubo de ensayo, llenos del líquido de ensayo.

Los experimentos deben realizarse en la temperatura ambiente y constante relativa aproximadamente a + 20°C y protegidos de la luz directa del sol.

Los líquidos de prueba deben ser almacenados en un refrigerador (+ 4°C y son llevados a temperatura ambiente sobre una hora antes de su uso).

El procedimiento de prueba puede seguir ya sea la forma original o la forma modificada del método. Las dos formas difieren en los siguientes aspectos:

En la **forma original** de la prueba de *Allium cepa L.*, se inicia el crecimiento de las raíces en agua pura (por ejemplo, agua del grifo de buena calidad). Cuando las raíces han alcanzado la longitud de 1-2 cm, los tratamientos se llevan a cabo a intervalos de tiempo ciertos (por ejemplo, 4h o 24h).

Para un estudio detallado de las configuraciones de cromosomas (por ejemplo, cromosoma, aberraciones, cromátidas) pueden ser realizadas, un tratamiento adicional para 1-2h con 0,1% colchicina antes de la preparación de láminas (una punta de la raíz en cada diapositiva) para estudios microscópicos.

En la **forma modificada** de la prueba *Allium cepa L.*, las cebollas se colocan directamente en los líquidos de ensayo sin la germinación previa de las puntas de las raíces. Los líquidos de ensayo deben ser cambiados regularmente todos los días. Por falta de líquidos, se podrán sustituir sólo las cantidades evaporadas.

Se incuban en las siguientes condiciones:

- Temperatura ambiente de 25°C
- Oscuridad
- Duración de muestreo de 72 horas

### **7.8.2. Parámetros macroscópicos**

El parámetro macroscópico más importante es la longitud de la raíz, sino también la restricción del crecimiento de las hojas verdes y otros parámetros se puede utilizar: Como observaciones estándar se pueden usar los siguientes parámetros macroscópicamente:

- **7.8.2.1. Turgencia:** la dureza de las puntas de las raíces; es un parámetro que señala el grado de toxicidad. En tratamientos que causa alta toxicidad de las raíces los cual se aflojaran y mueren, y por lo tanto este parámetro es

especialmente, útil en las pruebas preliminares de las concentraciones para ser elegidos para el experimento.

- **7.8.2.2. Cambio de Color:** Durante el experimento, las puntas de las raíces; así como a todas las plantas que pueden cambiar de color, ya sea por el tratamiento con salinidad (por ejemplo: azul-verde de sulfato de cobre), o las puntas de las raíces pueden volverse de color tóxicos que causan la muerte celular.
- **7.8.2.3. Forma de la raíz:** Formación de C- tumor (hinchazón de las puntas de las raíces concomitante de c- mitosis. Este fenómeno es observable después de 3 a 5 días, pero es más pronunciada después de unos cuantos días de cultivo);Doblado de raíces o puntas de las raíces (puede ocurrir, por ejemplo, después del tratamiento con sales de metales).
- **7.8.2.4. La longitud de raíz:** Cuantifica la sensibilidad mediante la inhibición del crecimiento radicular de los bulbos. Los valores promedio de longitud de raíces pueden trazarse en un diagrama (abscisa: concentración de tratamiento; ordenada: longitud de la raíz en el porcentaje de control). A partir de una curva de este tipo, los valores CE (**Concentración Efectiva**) se pueden obtener: EC10, EC50, EC90 representadas respectivamente, las concentraciones de efecto del daño de 10, 50 y 90% (en este caso la restricción del crecimiento) en relación al control.
- **7.8.2.5. Medición de la longitud de raíces:** un comentario especial sobre el procedimiento para la medición de las longitudes de raíz puede ser necesaria: Normalmente, la longitud de todo el manojo de raíz se mide fuera del tubo de ensayo por una regla. Un método que da un valor para cada bulbo. Este método permite que los experimentos sean continuos.Una forma más precisa de medir sería medir cada raíz de cada bulbo, exigir la eliminación de las raíces y la terminación del experimento. Mediante este método, esas raíces se pierden que son mecánicamente dobladas o dañada, por ejemplo, pueden las puntas de las raíces que falten.
-

### **7.8.3. Láminas para estudios microscópicos**

Son preparados después del cambio de líquidos en el día 2, independientemente de la longitud de la raíz. De cada uno de 5 bulbos en una serie de 10, un ápice de la raíz se toma para cada uno de 5 láminas. De cada lámina, se calcula el índice mitótico para 400 células. Los siguientes días, se realizan fotografía de las observaciones macroscópicas de la serie de prueba. Las raíces se fijan mediante el fijador de Carnoy (3:1 etanol: ácido acético glacial) guardándose en la nevera a 4°C hasta el momento de su uso.

#### **7.8.3.1. MÉTODO DE DIVISIÓN CELULAR.**

La preparación de las láminas se realiza de acuerdo al siguiente protocolo (Jimenez-Martin, G.; Gonzalez, A. y J.A. Lopez, 1965), (Sharma, A. K. y A. Sharma, 1972):

**1.-** Lavar las raíces para eliminar el fijador Carnoy. Para ello colocar las raíces en un vidrio de reloj o en una cápsula de Petri con agua destilada por 5 minutos. Realizar tres cambios de agua destilada, para un total de 15 min de proceso de lavado.

**2.-** Maceración: para ello elimine el agua destilada y añada HCl (Acido clorhídrico) al 50%, y dejar actuar por 15 minutos, o por el tiempo mínimo suficiente para que el tejido radical se ablande. La maceración provoca la disgregación celular del tejido meristemático, por degradación de la lamela media de la pared celular, permitiendo una buena separación de las células.

Este paso es muy sensible al tiempo transcurrido: si se deja actuar demasiado al ácido, éste digiere completamente la lamela media y penetra en el interior celular comenzando la degradación del protoplasto y su contenido; por el contrario, si el tiempo de acción del ácido no es suficiente, no se logrará la degradación de la lamela media y la consecuente disgregación del tejido

meristemático y las células no podrán por tanto disponerse en una monocapa luego de su separación, por lo que los resultados serán láminas con células superpuestas, donde es imposible distinguir las diferentes fases mitóticas.

**3.-** Lavar las raíces para eliminar el HCl, utilizando 3 cambios de agua destilada de 5 minutos cada uno, para un total de 15 min de proceso de lavado. Es importante el lavado del HCl pues éste interfiere con la coloración de los cromosomas.

**4.-** Disgregación: añadir una gota de ácido acético al 45% en una lámina portaobjetos, luego colocar la raíz, cortar con una hojilla y conservar los 2 mm terminales del lado del meristema (del lado de la caliptra o cofia) y eliminar el resto de la raíz. El meristema se distingue por ser más blanco. Con un par de agujas finas se disgrega el meristema en tiras finas como mechas y se elimina en lo posible la caliptra terminal, dejando lo más limpio y disgregado posible el tejido meristemático. ***Es muy importante no dejar nunca que el material se seque en la lámina portaobjetos.***

**5.-** Se coloca una gota de colorante (orceína acética 45%) sobre el material disgregado. Esperar 1 a 3 minutos, cuidando en todo momento que el material no se seque y monitoreando bajo la lupa el avance del proceso de coloración.

**6.-** Cuando las tiras de tejido hayan adquirido coloración uniforme se tapa el preparado con un cubreobjetos teniendo cuidado que no entre aire. Esperar un minuto.

**7.-** Colocar la lámina entre hojas de papel de filtro o una servilleta absorbente y presionar con la yema del dedo pulgar firmemente contra la superficie plana y uniforme de una mesa, pero con cuidado de no romper la lámina, y, sobre todo, de no mover lateralmente el cubreobjetos mientras se ejerce la presión; el movimiento lateral del cubreobjetos genera el enrollamiento de las células

meristemáticas disgregadas sobre el portaobjeto, generando la pérdida de la preparación.

**8.-** Realice las observaciones bajo el microscopio, comenzando por ubicar las agrupaciones de células meristemáticas sobre el portaobjetos para luego cambiar a un aumento de observación mayor e identificar las distintas fases que caracterizan la división celular (interfase y mitosis) y de la mitosis (profase, metafase, anafase y telofase).

**9.-** Para el análisis microscópico se escogieron los campos en los que mayoritariamente hubiera células meristemáticas y se procedió a su recuento, para posteriormente calcular el porcentaje de células por cada fase de la mitosis según recomendaciones de Urteaga y Lallana (2005). (Muñoz-Solarte, 2013)

Haciendo uso de las siguientes Formulas

Índice Mitótico Total:  $IP+IM+IA+IT * 100$

Índice de Fases:  $\text{No. De células en fase} / \text{No. Total de células}$

Índice de Profase:  $\text{Células en Profase} / \text{No. Total, de células.}$

Índice de Metafase:  $\text{Células en Metafase} / \text{No. Total, de células.}$

Índice de Anafase:  $\text{Células en Anafase} / \text{No. Total, de células.}$

Índice de Telofase:  $\text{Células en Telofase} / \text{No. Total, de células.}$

Se indica el Índice mitótico general a las 24 h, 48 h y 72 h, en las diferentes placas microscópicas realizadas mediante la técnica de Squash, estas pasaron por un proceso de selección, dividiendo la imagen en cuadrantes al ser observadas en el Microscopio Olympus (100X) y eligiéndose las más representativas para su conteo; por lo tanto, se seleccionaron cuatro imágenes por muestras para realizar la sumatoria del número de células en división.

IP+IM+IA+IT: Ver significado en Anexos #7 (Abreviaturas) página 87

IP: Índice de Profase

IA: índice de Anafase

IM: índice de metafase

IT: índice de telofase

## VIII. ANALISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

El análisis de esta investigación consta en la aplicación del bioensayo que fue de la forma modificada según Fiskesjö, G. (1985), tomando 60 bulbos de *Allium cepa* L. como organismo de prueba, que fueron expuestos a una muestra control (agua de grifo) y una muestra problema (agua recolectada) por un periodo de 72 horas

### 8.1. Elongación de la Raíz de *Allium cepa* L.

Parámetros Macroscópicos en los bulbos de *Allium cepa L.*, donde E(Elongación), T(Turgencia), C.C (Cambio de color) y F.R. (Forma de la raíz) en Intervalos de tiempo de 24, 48 y 72 Horas en el Punto Alto.

**Tabla 3 Período de exposición de los Bulbos de *Allium cepa L.*, en el punto alto**

	24 HORAS				48 HORAS				72 HORAS			
	E.	T.	C.	F.R.	E.	T.	C.	F.R.	E.	T.	C.	F.R.
PUNTO ALTO	0,3 cm				1,9 cm				3,5 cm			
	0,1 cm				0,2 cm				0,7 cm			
	0,8 cm				2,1 cm				3,5 cm			
	0,3 cm				1,7 cm				3 cm			
	1 cm				2,5 cm				3,9 cm			
	0,9 cm				2,4 cm				4,2 cm			
	0,1 cm				0,5 cm				0,5 cm			
	0,4 cm				0,9 cm				1,9 cm			
	0				0,6 cm				0,6 cm			
	0,4 cm				1,2 cm				2,7 cm			
	0,3 cm				1 cm				1 cm			
	0,6 cm				2,5 cm				3,7 cm			

Fuente: Peralta J. (2016)

**Tabla 4 Caracterización de Parámetros Macroscópicos.**

Turgencia	
Color	
Desviadas	

El color blanco significa que no hay Parámetros Macroscópicos dentro de los bulbos de *Allium cepa L.* durante la exposición desde las 24 horas a las 72 horas.

El color morado indica que hay presencia de turgencia lo cual significa que hay ablandamiento de las raíces y de los bulbos de *Allium cepa L.*, El color verde indica que hay cambio de color en el anillo del primordio radical, y en el bulbo de *Allium cepa L.*, El color celeste indica que la raíz presenta un cambio de forma que no era Lineal como las demás raíces.

Parámetros Macroscópicos en los bulbos de *Allium cepa L.*, donde E(Elongación), T(Turgencia), C.C (Cambio de color) y F.R. (Forma de la raíz) en Intervalos de tiempo de 24, 48 y 72 Horas en el Punto Medio.

Tabla 5 Período de Exposición de los Bulbos de *Allium cepa L.*, en el Punto Medio

	24 HORAS				48 HORAS				72 HORAS			
	E.	T.	C.	F.R.	E.	T.	C.	F.R.	E.	T.	C.	F.R.
PUNTO MEDIO	0,2 cm				1,2 cm				2,8 cm			
	0,2 cm				1,7 cm				2,6 cm			
	0,5 cm				2,2 cm				3 cm			
	0,7 cm				2,5 cm				3,2 cm			
	1,2 cm				3 cm				4,3 cm			
	0,2 cm				1,2 cm				1,4 cm			
	0,4 cm				1,2 cm				1,7 cm			
	0,7 cm				2,2 cm				3,8 cm			
	0,5 cm				1,9 cm				3,8 cm			
	0,4 cm				1,8 cm				3,4 cm			
	0,2 cm				1,3 cm				1,8 cm			
	1,2 cm				3 cm				5 cm			

Fuente: Peralta J. (2016)

Tabla 6 Caracterización de Parámetros Macroscópicos.

T.	
C.	
F. R	

El color blanco significa que no hay Parámetros Macroscópicos dentro de los bulbos de *Allium cepa L.* durante la exposición desde las 24 horas a las 72 horas.

El color morado indica que hay presencia de turgencia lo cual significa que hay ablandamiento de las raíces y de los bulbos de *Allium cepa L.* El color verde indica que hay cambio de color en el anillo del primordio radical, y en el bulbo de *Allium cepa L.* El color celeste indica que la raíz presenta un cambio de forma que no era Lineal como las demás raíces.

Caracterización de los Parámetros Macroscópicos en los bulbos de *Allium cepa L.*, donde E(Elongación), T(Turgencia), C.C (Cambio de color) y F.R. (Forma de la raíz) en Intervalos de tiempo de 24, 48 y 72 Horas en el Punto Bajo.

Tabla 7 Período de Exposición de los Bulbos de *Allium cepa L* en el Punto Bajo

	24 HORAS				48 HORAS				72 HORAS			
	E.	T.	C.	F.R.	E.	T.	C.	F.R.	E.	T.	C.	F.R.
PUNTO BAJO	1 cm				2,5 cm				3,8 cm			
	0,5 cm				1,9 cm				3,3 cm			
	0,2 cm				0,4 cm				1,5 cm			
	0,1 cm				0,5 cm				1,3 cm			
	0,1 cm				0,5 cm				1,7 cm			
	0,5 cm				1,2 cm				3,2 cm			
	0,2 cm				0,5 cm				2 cm			
	0,7 cm				1,5 cm				3 cm			
	0,1 cm				1 cm				2,6 cm			
	0,2 cm				0,5 cm				2,2 cm			
	0,4 cm				1,5 cm				3,3 cm			
	1 cm				3 cm				5,2 cm			

Fuente: Peralta J. (2016)

T.	
C.	
F. R	

Tabla 8 Caracterización de Parámetros Macroscópicos.

El color blanco significa que no hay Parámetros Macroscópicos dentro de los bulbos de *Allium cepa L.* durante la exposición desde las 24 horas a las 72 horas.

El color morado indica que hay presencia de turgencia lo cual significa que hay ablandamiento de las raíces y de los bulbos de *Allium cepa L.* El color verde indica que hay cambio de color en el anillo del primordio radical, y en el bulbo de *Allium cepa L.* El color celeste indica que la raíz presenta un cambio de forma que no era Lineal como las demás raíces

**Caracterización de los Parámetros Macroscópicos en los bulbos de *Allium cepa* L., donde E(Elongación), T(Turgencia), C.C (Cambio de color) y F.R. (Forma de la raíz) en Intervalos de tiempo de 24, 48 y 72 Horas en el Punto del Pozo**

**Tabla 9 Período de Exposición de los Bulbos de *Allium cepa* L., en el Punto del Pozo.**

	24 HORAS				48 HORAS				72 HORAS			
	E.	T.	C.	F.R.	E.	T.	C.	F.R.	E.	T.	C.	F.R.
PUNTO DEL POZO	0,1 cm				0,5 cm				1,2 cm			
	0,5 cm				0,8 cm				2,9 cm			
	1 cm				2,8 cm				5,2 cm			
	0,5 cm				1,4 cm				3 cm			
	0,8 cm				2,3 cm				3,3 cm			
	0,3 cm				1 cm				2 cm			
	0,2 cm				0,5 cm				1,2 cm			
	0,2 cm				1,2 cm				3 cm			
	0,3 cm				1,1 cm				2,2 cm			
	0,3 cm				1,5 cm				2,5 cm			
	0,6 cm				2,4 cm				4,2 cm			
	0,1 cm				0,3 cm				1 cm			

Fuente: Peralta J. (2016)

**Tabla 10 Caracterización de Parámetros Macroscópicos.**

T.	
C.	
F. R	

El color blanco significa que no hay Parámetros Macroscópicos dentro de los bulbos de *Allium cepa* L. durante la exposición desde las 24 horas a las 72 horas.

El color morado indica que hay presencia de turgencia lo cual significa que hay ablandamiento de las raíces y de los bulbos de *Allium cepa* L., El color verde indica que hay cambio de color en el anillo del primordio radical, y en el bulbo de *Allium cepa* L., El color celeste indica que la raíz presenta un cambio de forma que no era Lineal como las demás raíces.

Caracterización de los Parámetros Macroscópicos en los bulbos de *Allium cepa L.*, donde E(Elongación), T(Turgencia), C.C (Cambio de color) y F.R. (Forma de la raíz) en Intervalos de tiempo de 24, 48 y 72 Horas en el Control.

Tabla 11 Período de Exposición de los Bulbos de *Allium cepa L.*, en el Control.

	24 HORAS				48 HORAS				72 HORAS			
	E.	T.	C.	F.R.	E.	T.	C.	F.R.	E.	T.	C.	F.R.
CONTROL	0				0,1 cm				0,8 cm			
	0,8 cm				2 cm				3 cm			
	0,3 cm				1,3 cm				1,6 cm			
	0,3 cm				1,4 cm				3,2 cm			
	0,7 cm				1,5 cm				2,7 cm			
	0				0				0,2 cm			
	0,7 cm				1,4 cm				2,7 cm			
	0,5 cm				0,5 cm				1 cm			
	0,7 cm				2,9 cm				5 cm			
	0,1 cm				3 cm				4,5 cm			
	1,5 cm				3,1 cm				4,4 cm			
	1,4 cm				3 cm				5 cm			

Fuente: Peralta J. (2016)

T.	
C.	
F. R	

Tabla 12 Caracterización de Parámetros Macroscópicos.

El color blanco significa que no hay Parámetros Macroscópicos dentro de los bulbos de *Allium cepa L.* durante la exposición desde las 24 horas a las 72 horas.

El color morado indica que hay presencia de turgencia lo cual significa que hay ablandamiento de las raíces y de los bulbos de *Allium cepa L.*, El color verde indica que hay cambio de color en el anillo del primordio radical, y en el bulbo de *Allium cepa L.*, El color celeste indica que la raíz presenta un cambio de forma que no era Lineal como las demás raíces

### 8.1.1. Crecimiento Promedio de las raíces de *Allium cepa L.*

Tabla 13 Valores promedio de elongación de las raíces de *Allium cepa L.*, a las 24, 48 y 72 horas de exposición.

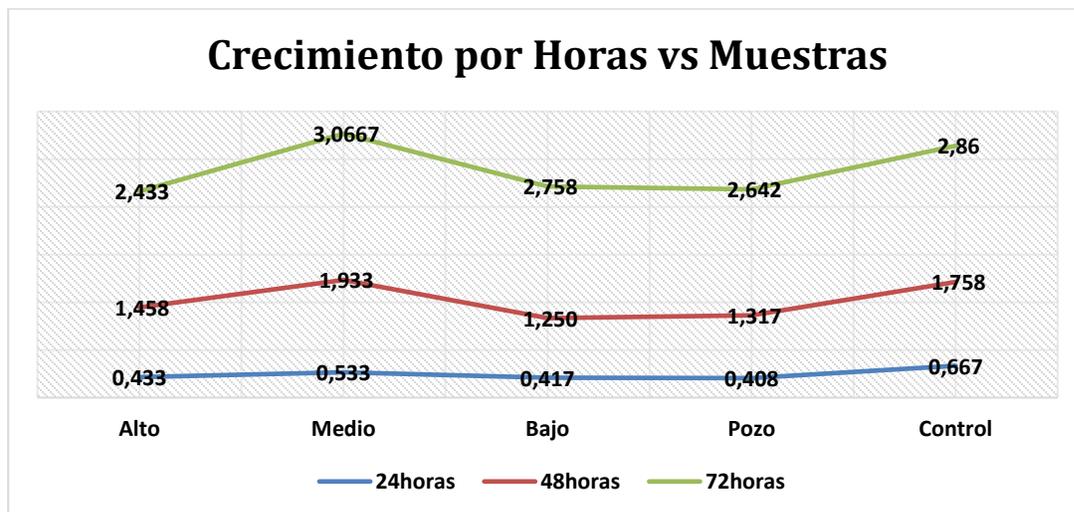
Tomando en cuenta los datos de la elongación de la raíz de *Allium cepa L.*, de las tablas # 3, 5, 7,9.11 anteriormente visualizadas Se prosiguió a realizar los promedios para cada muestra por las horas de exposición

Horas	Valores promedio de las raíces				
	Alto (cm)	Medio (cm)	Bajo (cm)	Pozo (cm)	Control (cm)
24	0.433	0.533	0.417	0.408	0.667
48	1.458	1.933	1.250	1.317	1.758
72	2.433	3.0667	2.758	2.642	2.86

**Fuente: Peralta J. (2016)**

En la tabla 13 se reflejan los promedios generales de la elongación de las raíces a las 24, 48 y 72 horas expuestas a las muestras de agua recolectadas, donde se observa que a las 72 horas el Control es de 2.86 cm de promedio, con respecto a las demás muestras indican similitud a excepción del Punto Medio que presento una elongación de raíz con 3.066 cm. Siendo mayor con respecto al promedio del control a las 72 horas de exposición de los bulbos de *Allium cepa L.*, a las muestras de agua.

**Gráfica 1 Valores promedio de elongación de las raíces de *Allium cepa* L., Horas vs Muestras**



En la gráfica 1 se reflejan los datos promedios de la elongación de las raíces de la tabla # 13 para las 24, 48, 72 horas de exposición donde se observa que el punto Medio es del mayor crecimiento con 3.0667 cm a las 72 horas, seguido del punto bajo con 2.758 cm, el control con 2.86 cm, el pozo con 2.642 cm, por último, el punto alto con 2.433 cm obteniendo el promedio más bajo.

**Seguidamente A nivel general se realizan las observaciones de los datos de las tablas # 3, 5, 7,9,11 a las 24 horas de exposición de los 60 bulbos de *Allium cepa* L., para visualizar los parámetros macroscópicos de Turgencia, Cambio de color y forma de la raíz, Dieron los siguientes resultados.**

Se logra observar los datos de los parámetros macroscópico, donde el organismo de prueba fueron 60 bulbos de *Allium cepa* L. (Cebolla) expuestas a un control y a las muestras recolectadas de la presa, cada análisis se hizo con un total de 12 bulbos por cada punto y control, observándose en primer lugar el parámetro de turgencia, donde 56 de los 60 bulbos presentaron una dureza característica en las raíces y 4 de los 60 bulbos presentaron alteraciones ( 1 bulbo del punto alto, 1 bulbo del punto medio, 1 bulbo del punto del pozo y 1 bulbo del control) como suavidad en la textura de la raíz y el bulbo completo, en el siguiente parámetro que es forma de la raíz se

encontraron que de los 60 bulbos 48 estaban con la forma lineal de las raíces y los otros 12 presentaron alteraciones en la raíz (1 bulbo para el punto medio, 5 bulbos para el punto del pozo, y 6 bulbos fueron sometidos al agua control), las cuales se encontraban desviadas hacia arriba. con respecto al cambio del color 14 de los 60 bulbos presentaron alteraciones alrededor del anillo del primordio radical (12 bulbos para el agua del pozo y 2 bulbo sometido al agua del grifo), teniendo un oscurecimiento y en 46 no se encontró ninguna alteración

***Seguidamente A nivel general se realizan las observaciones de los datos de las tablas # 3, 5, 7,9.11 a las 48 horas de exposición de los 60 bulbos de Allium cepa L., para visualizar los parámetros macroscópicos de Turgencia, Cambio de color y forma de la raíz, Dieron los siguientes resultados.***

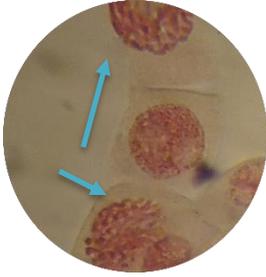
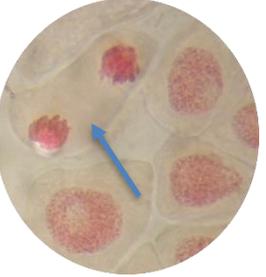
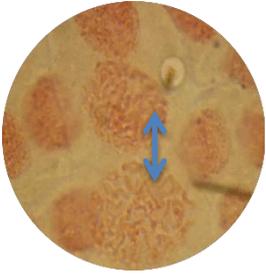
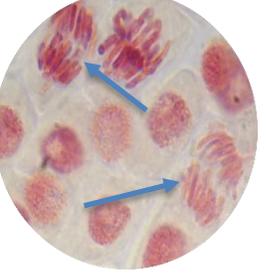
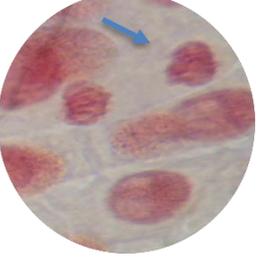
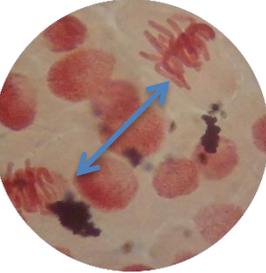
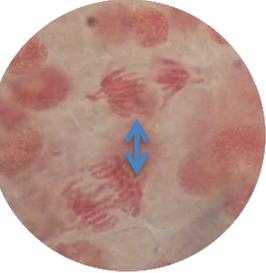
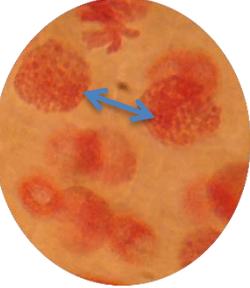
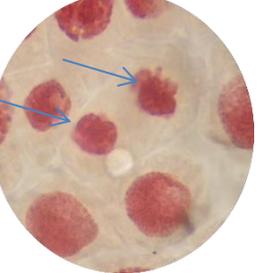
Se logra observar los análisis de los parámetros macroscópico, donde el organismo de prueba fueron 60 bulbos de *Allium cepa L.* (Cebolla) expuestas a un control y a las muestras recolectadas de la presa, cada análisis se hizo con un total de 12 bulbos por cada punto y control, en primer lugar el parámetro de turgencia, donde 50 de los 60 bulbos presentaron una dureza característica en las raíces y 10 de los 60 bulbos presentaron alteraciones ( 4 bulbo del punto alto, 2 bulbo del punto medio, 2 bulbo del punto del pozo y 2 bulbo del control) como suavidad en la textura de la raíz y el bulbo completo, en el siguiente parámetro que es forma de la raíz se encontraron que de los 60 bulbos 19 estaban con la forma lineal de las raíces y los otros 41 presentaron alteraciones en la raíz (6 bulbos para el punto alto, 7 bulbos para el punto medio, 9 bulbos para el punto bajo, 10 bulbos para el punto del pozo, y 8 bulbos fueron sometidos al agua control), las cuales se encontraban desviadas hacia arriba. con respecto al cambio del color 16 de los 60 bulbos presentaron alteraciones alrededor del anillo del primordio radical (1 bulbo para el punto alto, 1 bulbo para el punto medio, 12 bulbos para el agua del pozo y 2 bulbo sometido al agua del grifo), teniendo un oscurecimiento y en 44 no se encontró ninguna alteración

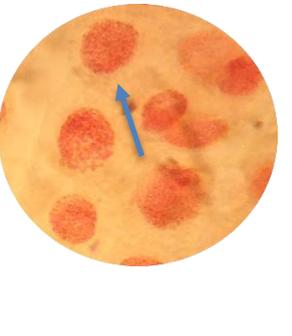
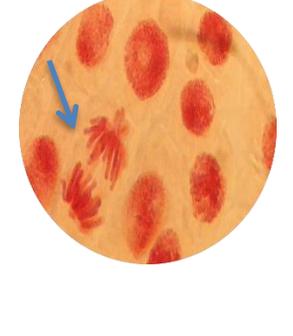
**Seguidamente A nivel general se realizan las observaciones de los datos de las tablas # 3, 5, 7,9,11 a las 72 horas de exposición de los 60 bulbos de *Allium cepa L.*, para visualizar los parámetros macroscópicos de Turgencia, Cambio de color y forma de la raíz, Dieron los siguientes resultados.**

Se logra observar los análisis de los parámetros macroscópico, donde el organismo de prueba fueron 60 bulbos de *Allium cepa L.*(Cebolla) expuestas a un control y a las muestras recolectadas de la presa, cada análisis se hizo con un total de 12 bulbos por cada punto y control, en primer lugar el parámetro de turgencia, donde 34 de los 60 bulbos presentaron una dureza característica en las raíces y 26 de los 60 bulbos presentaron alteraciones ( 10 bulbo del punto alto, 4 bulbo del punto medio, 4 bulbos para el punto bajo, 6 bulbo del punto del pozo y 2 bulbo del control) como suavidad en la textura de la raíz y el bulbo completo, en el siguiente parámetro que es forma de la raíz se encontraron que de los 60 bulbos 11 estaban con la forma lineal de las raíces y los otros 49 presentaron alteraciones en la raíz (9 bulbos para el punto alto, 10 bulbos para el punto medio, 12 bulbos para el punto bajo, 10 bulbos para el punto del pozo, y 8 bulbos fueron sometidos al agua control),las cuales se encontraban desviadas hacia arriba. con respecto al cambio del color 19 de los 60 bulbos presentaron alteraciones alrededor del anillo del primordio radical (2 bulbo para el punto alto, 2 bulbo para el punto medio, 2 bulbo para el punto bajo, 12 bulbos para el agua del pozo y 2 bulbo sometido al agua del grifo), teniendo un oscurecimiento y en 44 no se encontró ninguna alteración

## 8.2. Observaciones de Placas Microscópicas

*Tabla 14 Observaciones de las placas Microscópicas realizadas mediante la técnica de división celular.*

PUNTOS DE MUESTREO	PROFASE	METAFASE	ANAFASE	TELOFASE
CONTROL				
PUNTO ALTO				
PUNTO MEDIO				
PUNTO BAJO				

<b>PUNTO DEL POZO</b>				
---------------------------	---	---	---	---

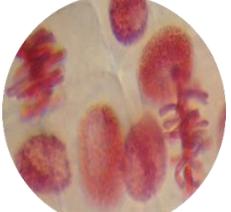
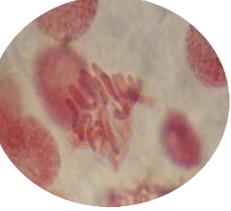
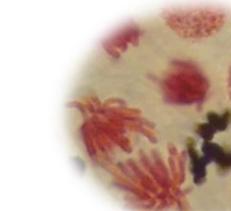
**Fuente: Peralta J. (2016) fotografías tomadas por: Peralta J. (2016) editadas con el software Gimp 2**

En la tabla #17 se destacan las 4 fases de la mitosis normal de un total de 55 láminas preparadas por la técnica de división celular, durante un periodo de 72 horas, haciendo una visualización de las láminas cada 24 horas hasta completar el ciclo del test. En las 4 muestras de agua recolectadas de los diferentes puntos de muestreo y el control. Se analizaron 1821 células encontrando 320 células en Profase, 41 células en Metafase, 24 células en Anafase y 51 en Telofase. En la tabla #17 se muestran algunas de las fotografías donde se logra observar las fases mitóticas encontradas.

La presencia de las diferentes fases mitóticas evidencia la elongación activa de la raíz de *Allium cepa L.*

### 8.2.1. Fases Mitóticas alteradas

Tabla 15 Identificación de fases Mitóticas alteradas

 <p>A</p>	 <p>B</p>	 <p>C</p>	 <p>D</p>
 <p>E</p>	 <p>F</p>	 <p>G</p>	
<p>a-Profase Normal (B)- Metafase Normal, (c)- Anafase Normal, (D)- Telofase Normal, (E) C-Mitosis, (F) Cromosomas Vagabundos en anafase, (G) Anafase Bridge</p>			

Fuente: Peralta J. (2016) fotografías tomadas por: Peralta J. (2016) editadas con el software Gimp 2

El análisis microscópico desarrollado del ápice de la raíz de *Allium cepa L*, revela presencia predominante de los daños en los cromosomas de la fase de la mitosis, (E) C-Mitosis (F)-Cromosomas Vagabundos en anafase, (G) Anafase Bridge esto se puede inferir a la posible influencia de ciertos metales en las muestras de agua recolectadas de la presa, dado que las células vegetales poseen mecanismos de protección contra los metales pesados.

### 8.3. Índice Mitótico

Tabla 16 Registro del Índice Mitótico en las Muestras de agua de los 5 puntos

Índice Mitótico						
Muestras	24 Horas	48 Horas	72 Horas	IM Parcial		IM Total
Control	107.99	84.97	83.68	276.64	276,64/3: 92,21	92.21
Punto Alto	69.3	79.1	92.84	241.24	241,24/3: 80,41	80.41
Punto Medio	80.56	77.34	96.59	254.49	254,49/3: 84,83	84.83
Punto Bajo	45.06	86.58	117.16	248.8	248,8/3: 82,93	82.93
Punto del Pozo	104.97	95.94	96.21	297.12	297,12/3: 99,04	99.04

**Fuente: Peralta J. (2016)**

Los datos del porcentaje por día del Índice Mitótico se muestran en las tablas de la Número 21 al número 50 en anexo # 3

Se refleja en la tabla 16 los datos del primer, segundo y tercer día del índice mitótico donde se demuestra el porcentaje de división mitótica, estos valores se suman de manera horizontal para obtener el porcentaje del número total de células en división finalmente se dividen entre los 3 días de conteo dando como resultado para el control un Índice Mitótico de 92.21% el punto del Pozo con 99.04%, el punto medio con 84.83%, el punto Bajo con 82.93% y por último el punto Alto con 80.41%. Notablemente se observa que la mayor división mitótica se encuentra en el punto del Pozo

## IX. CONCLUSIONES

Según los resultados obtenidos existe una relación en los porcentajes de inhibición de la elongación de la raíz y la presencia de anomalías mitóticas en las células meristemáticas del ápice de la raíz de *Allium cepa* L. *llegando a las siguientes conclusiones:*

- Se determinó que las muestras de agua no presentaban agentes tóxicos, que inhiban el crecimiento de las raíces obteniendo una elongación a las 72 horas para el control de 2.86 cm, para el Punto Medio de 3.066 cm, para el Punto Alto de 2.433 cm, el Punto del Pozo fue de 2.642 cm y el del Punto Bajo con 2.758 cm.
- Se identificó las siguientes anomalías mitóticas por la presencia de agentes genotóxicos como **C-Mitosis, Cromosomas Vagabundos, Anafase Bridge** en el Punto Alto, Medio, Bajo y Pozo.
- Al calcular el Índice Mitótico a las 72 h se demuestra que para el control es de 92.21% seguido del punto del Pozo con 99.04%, el punto medio con 84.83%, el punto Bajo con 82.93% y el punto Alto con 80.41%.
- Se encontró mayor afectación en el punto del Pozo por presentar una elongación de raíz de 2.642 cm y un índice mitótico de 99.04%.

## **X. RECOMENDACIONES**

De los resultados obtenidos se formuló las siguientes recomendaciones:

- Continuar con la línea de investigación de bioensayos utilizando otros organismos de prueba vegetales y animales.
- Realizar un análisis físico-químico y microbiológico en este cuerpo de agua.
- Aplicar una encuesta a la comunidad aledaña a la finca para evaluar las diferentes patologías presentadas.
- En cuanto a los resultados encontrados en el punto del pozo, lo más recomendable es clausurarlo.
- Extender estas investigaciones utilizando bioensayos en las asignaturas de Biología Celular y Molecular, Fisiología Vegetal, Microbiología y Biotecnología.

## XI. FUENTES BIBLIOGRÁFICAS

- Andrioli, N. (2011). *Evaluación de agentes químicos con potencial genotóxico en células meristemáticas de Allium cepa*
- Blandón, H. (2015). *Evaluación de la calidad del agua del Cerro Musún, en Rio Blanco, Matagalpa- Nicaragua .*
- CETESB. (1991). Bioensais Microbianos Aplicados no Controle de Contaminantes Tóxicos Ambientais. *Serie Didáctica, PROCOP* , 1-75.
- CLARKSON, D. (1965). The affect of aliminium and some otrer trivalen metam cations on cell division in the root apices of Allium Cepa. *Ann.Bot.N.S, Vol.29, No.114: 309-315.*
- Fatima, R. and Ahmad M. (2005). *Certain antioxidant enzymes of Allium cepa as biomarkers for the detection of toxic heavy metals in wastewater.* Science of the Total Environment, 346: 256-273.
- Firbas, P. (2011). Evaluation of quality improvement of waterworks tap water treated in accordance with original techonology Glass. *FLASKA* .
- Fiskejö, G. (1981). Benzo(a)pyrene and N-Methyl-N-nitrosoguanidine in the Allium test. *Hereditas* 95, 155- 162.
- Fiskejö, G. (1985). *Hereditas*, 102.
- FISKESJÖ, G. (1969). Some results with Allium tests with organic mercury halogenides. *Hereditas* 62: 314-322.
- FISKESJÖ, G. (1975). Rapport om ett biologiskt test (Allium test) ut fört med vatten fran Braan och Höje a i Skane. *Vatten* 31, 304-316.
- Fiskesjö, G. (1981). Allium test on copper in drinking water. *Vaten* 37, 232-240.
- Fiskesjö, G. (1981). Allium teste pa fenol, anisol, Na-laurylsulfat och kopparsulfat. En *Ekotoxikologiska metoder för akvastik miljö* (pág. 11). Nordforsk: Rapport nr.28.
- Fiskesjö, G. (1985). *The Allium test as a standard in environmental monitoring.* Suecia: Hereditas 102: (99-112).

- FISKEJÖ, G. (1994). Allium test 11. Assessment of a chemicals genotoxic potential by recording aberrations in chromosomes and cells divisions in root tips of *Allium cepa*. *Toxicol and water Qual* 9, 235-241.
- Fiskesjö, G. (1997). Allium test for screening chemicals: Evaluation of cytologic parameters. En W. G. Wang, *Plants for environmental studies* (págs. 308-333). CRC Lewis Publishers
- García, N. (2004). Fitotoxicidad del material particulado sedimentable (MPS), generado en la zona urbana del cantón Cuenca. Universidad de Cuenca, Ecuador.
- Grant, W. (1982). *Mutation Research*. 99
- Grona, S. (1990). Apuntes de Botánica Sistemática parte II. Universidad Nacional Agraria, Escuela de Ciencias Forestales páginas 345-347.
- Gustavson KE, Sonsthagen SA, Crunkilton RA, Harkin JM. (2000). Groundwater toxicity assessment using bioassay, chemical and toxicity identification evaluation analysis. *Environm Toxicol*, (15): 421-430.
- Huberman E. and Sachs L. (1976). *Mutability of different genetic loci in mammalian cells metabolically activated carcinogenic polycyclic hydrocarbons*. USA: Proc. Nat. Acad. Sci 188-192.
- Jimenez- Martin . (s.f.).
- Jimenez-Martin, G.; Gonzalez, A. y J.A. Lopez. (1965). New method of labeling cells. En *J. Cell Biol.* 26 (págs. 305-309).
- Kassab, A. L. (1994). *Cebola: do túmulo dos faraós as exigentes mesas modernas* . Sao Paulo: Brasil Agricola 2da edicion. Icone. 199p.
- KIHILMAN.B.A. (1966). *Accitons of chemicals on Dividing Cells*. New Jersey: Prentice-Hall, Englewood Cliffs.
- Levan. (1938). The effect of colchicine on roots mitoses in *Allium*. *Hereditas* 24, 471- 486.
- Levan A. and Ostergren G. (1943). The mechanism of c-mitotic action observations of the naphtalene series. *Hereditas* 29, 381-443.
- LEVAN, A. (1945). Cytological reactions infuced by inorganic salt solution. *Nature* 156:751.

- LINNAINMAA,K.,MERETIJA,T.,SORSA,M, and VAINIO,H. (1978). Cytogenetic effects of styrene and styrene oxide on human lymphocytes and allium cepa. *Environ Health* , 156-162.
- Morais Leme, D. & Marin Morales, M.A. . (2009). Allium cepa test in environmental monitoring a riview on its application. *Mutation research*, 682, 71-81.
- Muñoz-Solarte, D. M.-P. (2013). *Allium test para evaluar el efecto Citotoxico y genotoxico de extractos naturales en celulas meristematicas de Allium cepa*.
- Rank, J. & Nielsen, M. H. (1993). A modified Allium test as a tool in the screening of the genotoxicity of complex mixture. *Hereditas* 118, 49 - 53.
- Rank, J. & Nielsen, M.H. . (1994). Evaluation of the Allium anaphase - telophase test in relation to genotoxicity screening of industrial wasterwater. *Mutation research*, 312, 17- 24.
- Restrepo, R. R. (2012). *Aberraciones cromosomales en bulbos de cebolla Allium cepa L. inducidas por moléculas híbridas 4-aminoquinolónicas* .
- Rodriguez, M. T. (2003). Empleo de los ensayos con plantas en el control de contaminantes toxicos ambientales. *Revista cubana de Higiene y Epidemiologia* v.41, n.2-3.
- Sharma, A. K. y A. Sharma. (1972). *Chromosome techniques, theory and practice*. London - Baltimore: 2da Ed. Butterworths-University Park Press
- Trópicos de Nicaragua, Tropico.org tomado de <http://tropicos.org/Name/18401646> .
- Zárate Ramírez, V. R., Nepomuceno Serrano, T., Roché Canseco, P. A., De la Peña Álvarez, V. & Rosas Garay, M.Á. (2012). Mitosis: Allium test approach. *MicrobeHUnte*, 26-30.
- Zumaeta, M. A. (1995). Toxicidad aguda del cromo usando Allium cepa L.

# **XII. ANEXOS**

Anexo 1. Hoja de registro del *Allium cepa L.*, expuesta a las muestras problema

UNAN-MANAGUA

Departamento de Biología



Tabla de documentación de datos en cm para llevar un registro de crecimiento de la raíz del *Allium cepa L.*, sometidas a las muestras

Muestras	Día 1 (24 horas)	Día 2 (48 horas)	Día 3 (72 horas)
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			

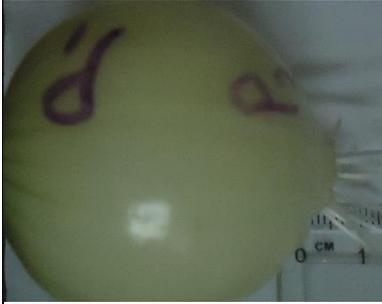
Fuente: Peralta J. (2016)

**Anexo 2. Registro de parámetros macroscópicos en las muestras recolectadas (Agua de la finca) y el control.**

**Donde para medir cada parámetro se analizaron cada una de las siguientes características midiéndolas por horas a las 24 horas, a las 48 horas y a las 72 horas de exposición**

**Tabla 17 Análisis de los Parámetros Macroscópicos en *Allium cepa* L.**

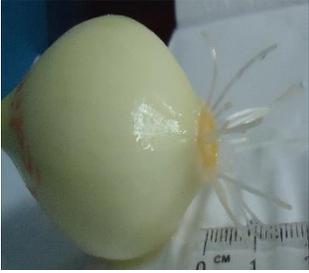
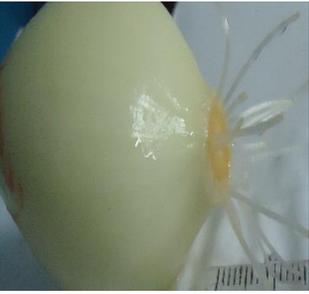
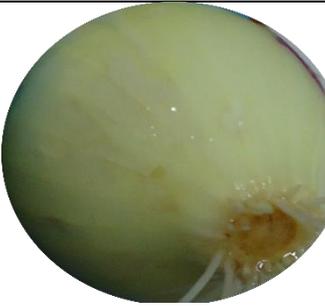
Parámetros de turgencia, forma de la raíz y cambio de color en los 60 bulbos de *Allium cepa* L., a las 24 horas de exposición

PARÁMETRO	NORMAL	VALOR #	ALTERADA	VALOR #
<b>Observación de las muestras a las 24 horas</b>				
<b>TURGENCIA</b>		56		4
<b>FORMA DE LA RAÍZ</b>		48		12
<b>CAMBIO DE COLOR</b>		46		14

Fotografías tomadas por: Peralta J. (2016) editadas con el software Gimp 2

**Tabla 18 Análisis de los Parámetros Macroscópicos EN *Allium cepa* L.**

Parámetros de turgencia, forma de la raíz y cambio de color en los 60 bulbos de *Allium cepa* L., a las 48 horas de exposición

PARÁMETRO	NORMAL	VALOR	ALTERADA	VALOR
<b>Observación de las muestras a las 48 horas</b>				
<b>TURGENCIA</b>		50		10
<b>FORMA DE LA RAÍZ</b>		19		41
<b>CAMBIO DE COLOR</b>		44		16

Fotografías tomadas por: Peralta J. (2016) editadas con el software Gimp 2

**Tabla 19 Análisis de los Parámetros Macroscópicos en *Allium cepa* L.**

Parámetros de turgencia, forma de la raíz y cambio de color en los 60 bulbos de *Allium cepa* L., a las 72 horas de exposición

PARÁMETRO	NORMAL	VALOR #	ALTERADA	VALOR #
<b>Observación de las muestras a las 72 horas</b>				
<b>TURGENCIA</b>		34		26
<b>FORMA DE LA RAÍZ</b>		11		49
<b>CAMBIO DE COLOR</b>		41		19

Fotografías tomadas por: Peralta J. (2016) editadas con el software Gimp 2

### **Anexo 3. Conteo del Índice Mitótico de las placas Microscópicas**

Índice Mitótico Total:  $IP+IM+IA+IT * 100$

Índice de Fases: No. De células en fase/ No. Total de células

Índice de Profase: Células en Profase/ No. Total, de células.

Índice de Metafase: Células en Metafase/ No. Total, de células.

Índice de Anafase: Células en Anafase/ No. Total, de células.

Índice de Telofase: Células en Telofase/ No. Total, de células.

Ver en anexo 9 abreviaturas en la página #75

**Conteo de las láminas microscópicas de los 4 cuadrantes seleccionados por tenerla mayoría de células meristemáticas en el control durante las primeras 24 horas.**

**Tabla 20 Muestras Control a las 24 horas.**

CONTROL 24 HORAS	MUESTRA 1				MUESTRA 2				MUESTRA 3			
		No. De Células	No. Total de células	NCFM/NTC		No. De células	No. Total de células	NCFM/NTC		No. De células	No. Total de células	NCFM/NTC
	P	11	41	0,2682	P	10	50	0,2	P	5	45	0,1111
	M	1		0,0243	M	0		0	M	3		0,0666
	A	1		0,0243	A	2		0,04	A	1		0,0222
	T	0		0	T	1		0,02	T	0		0
SUMA Σ		0,3168		SUMA Σ		0,26		SUMA Σ		0,1999		
		Σ *100= 31,68 %			Σ * 100= 26 %			Σ *100= 19,99 %				

NCFM: número de células en fases mitóticas- NTC: número total de células.

**Tabla 21 Suma de Porcentajes del control a las 24 Horas**

Suma de Porcentajes del Primer día		
1-	31,68	
2-	26	
3-	19,19	
4-	31,12	
	107,99	107,99%

Para calcular el porcentaje de índice mitótico se divide el Número de células en fase entre el número total de células encontradas

CONTROL 24 HORAS	MUESTRA 4			
		No. De Células	No. Total de células	NCFM/NTC
	P	13	61	0,2131
	M	4		0,0655
	A	1		0,0163
	T	1		0,0163
SUMA Σ		0,3112		
		Σ *100= 31,12 %		

Conteo de las láminas microscópicas de los 4 cuadrantes seleccionados por tenerla mayoría de células meristemáticas en el control a las 48 horas.

Tabla 22 Muestras Control a las 48 horas.

	No. De Células	No. Total de células	NCFM/NTC		No. De células	No. Total de células	NCFM/NTC		No. De células	No. Total de células	NCFM/NTC
P	6	52	0,1153	P	6	51	0,1176	P	13	83	0,1566
M	2		0,0384	M	1		0,0196	M	3		0,0361
A	0		0	A	1		0,0196	A	4		0,0481
T	0		0	T	2		0,0392	T	2		0,024
SUMA Σ			0.1537	SUMA Σ			0,196	SUMA Σ			0,2648
		Σ *100= 15,37 %			Σ * 100= 19,6 %			Σ *100= 26,48 %			

NCFM: número de células en fases mitóticas NTC: número total de células.

Tabla 23 Suma de Porcentajes del control a las 48 Horas

Suma de Porcentajes del segundo día		
1-	15,37	
2-	19,6	
3-	26,48	
4-	23,52	
	84,97	84,97%

Para calcular el porcentaje de índice mitótico se divide el Número de células en fase entre el número total de células encontradas

		MUESTRA 4		
		No. De Células	No. Total de células	NCFM/NTC
CONTROL 48 HORAS	P	7	51	0,1372
	M	1		0,0196
	A	2		0,0392
	T	2		0,0392
	SUMA Σ			0,2352
			Σ *100= 23,52 %	

Conteo de las láminas microscópicas de los 4 cuadrantes seleccionados por tenerla mayoría de células meristemáticas en el control durante las 72 horas.

Tabla 24 Muestras Control a las 72 horas.

CONTROL 72 HORAS	MUESTRA 1				MUESTRA 2				MUESTRA 3			
		No. De Células	No. Total de células	NCFM/NTC		No. De células	No. Total de células	NCFM/NTC		No. De células	No. Total de células	NCFM/NTC
	P	14	83	0,1686	P	10	92	0,1086	P	18	96	0,1875
	M	2		0,024	M	2		0,0217	M	1		0,0104
	A	0		0	A	0		0	A	1		0,0104
	T	2		0,024	T	3		0,0326	T	3		0,0312
SUMA Σ		0,2166		SUMA Σ		0,1629		SUMA Σ		0,2395		
		Σ *100= 21,66 %			Σ * 100= 16,29 %			Σ *100= 23,95 %				

NCFM: número de células en fases mitóticas NTC: número total de células.

Tabla 25 Suma de Porcentajes del control a las 72 Horas.

Suma de Porcentajes del Tercer día		
1-	21,66	
2-	16,29	
3-	23,95	
4-	21,78	
	83,68	83,68%

Para calcular el porcentaje de índice mitótico se divide el Número de células en fase entre el número total de células encontradas

CONTROL 72 HORAS	MUESTRA 4			
		No. De Células	No. Total de células	NCFM/NTC
	P	17	101	0,1683
	M	1		0,0099
	A	2		0,0198
	T	2		0,0198
SUMA Σ		0,2178		
		Σ *100= 21,78 %		

**Conteo de las láminas microscópicas de los 4 cuadrantes seleccionados por tenerla mayoría de células meristemáticas en el Punto Alto durante las primeras 24 horas.**

**Tabla 26 Muestras Punto Alto a las 24 horas.**

PUNTO ALTO 24 HORAS	MUESTRA 1				MUESTRA 2				MUESTRA 3			
		No. De Células	No. Total de células	NCFM/NTC		No. De células	No. Total de células	NCFM/NTC		No. De células	No. Total de células	NCFM/NTC
	P	7	67	0,1044	P	10	103	0,097	P	8	50	0,16
	M	0		0	M	1		0,0097	M	0		0
	A	0		0	A	1		0,0097	A	0		0
	T	2		0,0298	T	2		0,0194	T	0		0
SUMA Σ		0,1342		SUMA Σ		0,1358		SUMA Σ		0,16		
		Σ *100= 13,42 %			Σ * 100= 13,58 %			Σ *100= 16 %				

NCFM: número de células en fases mitóticas NTC: número total de células.

**Tabla 27 Suma de Porcentajes del Punto Alto a las 24 Horas**

Suma de Porcentajes del Primer día		
1-	13,42	
2-	13,58	
3-	16	
4-	26,3	
	69,3	69,30%

Para calcular el porcentaje de índice mitótico se divide el Número de células en fase entre el número total de células encontradas

PUNTO ALTO 24 HORAS	MUESTRA 4			
		No. De Células	No. Total de células	NCFM/NTC
	P	10	57	0,1754
	M	0		0
	A	1		0,0175
	T	4		0,0701
SUMA Σ		0,263		
		Σ *100= 26,3 %		

**Conteo de las láminas microscópicas de los 4 cuadrantes seleccionados por tenerla mayoría de células meristemáticas en el Punto Alto a las 48 horas.**

**Tabla 28 Muestras Punto Alto 48 horas.**

PUNTO ALTO 48 HORAS	MUESTRA 1				MUESTRA 2				MUESTRA 3			
		No. De Células	No. Total de células	NCFM/NTC		No. De células	No. Total de células	NCFM/NTC		No. De células	No. Total de células	NCFM/NTC
	P	7	89	0,0786	P	7	79	0,0886	P	5	60	0,0833
	M	2		0,0224	M	1		0,0126	M	3		0,05
	A	0		0	A	1		0,0126	A	0		0
	T	1		0,0112	T	1		0,0126	T	1		0,0166
SUMA Σ		0,1122		SUMA Σ		0,1264		SUMA Σ		0,1499		
			Σ *100= 11,22 %				Σ * 100= 12,64 %					Σ *100= 19,99 %

NCFM: número de células en fases mitóticas NTC: número total de células.

**Tabla 29 Suma de porcentajes del Punto alto a las 48 horas**

Suma de Porcentajes del Segundo día		
1-	11,22	
2-	12,64	
3-	14,99	
4-	40,25	
	79,1	79,10%

Para calcular el porcentaje de índice mitótico se divide el Número de células en fase entre el número total de células encontradas

PUNTO ALTO 48 HORAS	MUESTRA 4			
		No. De Células	No. Total de células	NCFM/NTC
	P	7	72	0,0972
	M	1		0,1388
	A	2		0,0277
	T	1		0,1388
SUMA Σ		0,4025		
			Σ *100= 40,25 %	

**Conteo de las láminas microscópicas de los 4 cuadrantes seleccionados por tenerla mayoría de células meristemáticas en el Punto Alto a las 72 horas.**

**Tabla 30 Muestras Punto Alto a las 72 horas**

PUNTO ALTO 72 HORAS	MUESTRA 1				MUESTRA 2				MUESTRA 3			
		No. De Células	No. Total de células	NCFM/NTC		No. De células	No. Total de células	NCFM/NTC		No. De células	No. Total de células	NCFM/NTC
	P	11	98	0,1124	P	14	80	0,175	P	25	119	0,2101
	M	4		0,0408	M	1		0,0125	M	4		0,0336
	A	3		0,0306	A	1		0,0125	A	2		0,0168
	T	2		0,0204	T	2		0,025	T	2		0,0168
SUMA Σ		0,204		SUMA Σ		0,225		SUMA Σ		0,2773		
			Σ *100= 20,4 %				Σ * 100= 22,5 %				Σ *100= 27,73 %	

NCFM: número de células en fases mitóticas NTC: número total de células.

**Tabla 31 Suma de Porcentajes del Punto alto a las 72 Horas.**

Suma de Porcentajes del Tercer día		
1-	20,4	
2-	22,5	
3-	27,73	
4-	22,21	
	92,84	92,84%

Para calcular el porcentaje de índice mitótico se divide el Número de células en fase entre el número total de células encontradas

PUNTO ALTO 72 HORAS	MUESTRA 4			
		No. De Células	No. Total de células	NCFM/NTC
	P	12	90	0,1333
	M	2		0,0222
	A	2		0,0222
	T	4		0,0444
SUMA Σ		0,2221		
			Σ *100= 22,22 %	

**Conteo de las láminas microscópicas de los 4 cuadrantes seleccionados por tenerla mayoría de células meristemáticas en el Punto Medio durante las primeras 24 horas.**

**Tabla 32 Muestras Punto Medio a las 24 horas.**

PUNTO MEDIO 24 HORAS	MUESTRA 1				MUESTRA 2				MUESTRA 3			
		No. De Células	No. Total de células	NCFM/NTC		No. De células	No. Total de células	NCFM/NTC		No. De células	No. Total de células	NCFM/NTC
	P	20	86	0,2325	P	12	105	0,1142	P	9	61	0,1475
	M	2		0,0232	M	2		0,019	M	1		0,0164
	A	0		0	A	0		0	A	0		0
	T	1		0,0116	T	3		0,285	T	0		0
SUMA Σ		0,2673		SUMA Σ		0,1617		SUMA Σ		0,1639		
		Σ *100= 26,73 %			Σ * 100= 16,17 %			Σ *100= 16,39 %				

NCFM: número de células en fases mitóticas NTC: número total de células.

**Tabla 33 Suma de Porcentajes del Punto Medio a las 24 Horas**

Suma de Porcentajes del Primer día		
1-	26,73	
2-	16,17	
3-	16,39	
4-	21,27	
	80,56	80,56%

Para calcular el porcentaje de índice mitótico se divide el Número de células en fase entre el número total de células encontradas

PUNTO MEDIO 24 HORAS	MUESTRA 4			
		No. De Células	No. Total de células	NCFM/NTC
	P	8	47	0,1702
	M	0		0
	A	0		0
	T	2		0,0425
SUMA Σ		0,2127		
		Σ *100= 21,27 %		

**Conteo de las láminas microscópicas de los 4 cuadrantes seleccionados por tenerla mayoría de células meristemáticas en el Punto Medio a las 48 horas.**

**Tabla 34 Muestras Punto Medio a las 48 horas.**

PUNTO MEDIO 48 HORAS	MUESTRA 1				MUESTRA 2				MUESTRA 3			
		No. De Células	No. Total de células	NCFM/NTC		No. De células	No. Total de células	NCFM/NTC		No. De células	No. Total de células	NCFM/NTC
	P	10	66	0,1515	P	8	90	0,0888	P	10	52	0,1923
	M	2		0,0303	M	0		0	M	1		0,0192
	A	1		0,0151	A	1		0,0111	A	0		0
	T	2		0,0303	T	2		0,0222	T	1		0,0192
SUMA Σ		0,2272		SUMA Σ		0,1221		SUMA Σ		0,2307		
		Σ *100= 22,72 %			Σ * 100= 12,21 %			Σ *100= 23,07 %				

NCFM: número de células en fases mitóticas NTC: número total de células.

**Tabla 35 Suma de Porcentajes del Punto medio a las 48 Horas.**

Suma de Porcentajes del Segundo día		
1-	22,72	
2-	12,21	
3-	23,07	
4-	19,34	
	77,34	77,34%

Para calcular el porcentaje de índice mitótico se divide el Número de células en fase entre el número total de células encontradas

PUNTO MEDIO 48 HORAS	MUESTRA 4			
		No. De Células	No. Total de células	NCFM/NTC
	P	4	31	0,1290
	M	1		0,0322
	A	0		0
	T	1		0,0322
SUMA Σ		0,1934		
		Σ *100= 19,34 %		

Conteo de las láminas microscópicas de los 4 cuadrantes seleccionados por tenerla mayoría de células meristemáticas en el Punto Medio a las 72 horas.

Tabla 36 Muestras Punto Medio a las 72 horas.

PUNTO MEDIO 72 HORAS	MUESTRA 1				MUESTRA 2				MUESTRA 3			
		No. De Células	No. Total de células	NCFM/NTC		No. De células	No. Total de células	NCFM/NTC		No. De células	No. Total de células	NCFM/NTC
	P	15	98	0,153	P	19	85	0,2235	P	14	80	0,175
	M	1		0,0102	M	2		0,0243	M	2		0,025
	A	1		0,0102	A	1		0,0117	A	2		0,025
	T	3		0,0306	T	2		0,0243	T	3		0,0375
SUMA Σ		0,204		SUMA Σ		0,2838		SUMA Σ		0,2625		
		Σ *100= 20,4 %			Σ * 100= 28,38 %			Σ *100= 26,25 %				

NCFM: número de células en fases mitóticas NTC: número total de células.

Tabla 37 Suma de Porcentajes del punto medio a las 72 Horas.

Suma de Porcentajes del Tercer día		
1-	20,4	
2-	28,38	
3-	26,25	
4-	21,56	
	96,59	96,59%

Para calcular el porcentaje de índice mitótico se divide el Número de células en fase entre el número total de células encontradas

PUNTO MEDIO 72 HORAS	MUESTRA 4			
		No. De Células	No. Total de células	NCFM/NTC
	P	15	102	0,147
	M	3		0,0294
	A	0		0
	T	4		0,0392
SUMA Σ		0,2156		
		Σ *100= 21,56 %		

Conteo de las láminas microscópicas de los 4 cuadrantes seleccionados por tenerla mayoría de células meristemáticas en el Punto Bajo durante las primeras 24 horas.

Tabla 38 Muestras Punto Bajo a las 24 horas.

PUNTO BAJO 24 HORAS	MUESTRA 1				MUESTRA 2				MUESTRA 3			
		No. De Células	No. Total de células	NCFM/NTC		No. De células	No. Total de células	NCFM/NTC		No. De células	No. Total de células	NCFM/NTC
	P	3	62	0,0483	P	5	46	0,1087	P	1	57	0,0175
	M	2		0,0322	M	1		0,0217	M	2		0,035
	A	0		0	A	0		0	A	0		0
	T	0		0	T	0		0	T	1		0,0175
SUMA Σ		0,0805		SUMA Σ		0,1304		SUMA Σ		0,07		
		Σ *100= 8,05 %			Σ * 100= 13,04 %			Σ *100= 7 %				

NCFM: número de células en fases mitóticas NTC: número total de células.

Tabla 39 Suma de Porcentajes del Punto Bajo a las 24 Horas

Suma de Porcentajes del Primer día	
1-	8,05
2-	13,04
3-	7
4-	16,97
	45,06

Para calcular el porcentaje de índice mitótico se divide el Número de células en fase entre el número total de células encontradas

PUNTO BAJO 24 HORAS	MUESTRA 4			
		No. De Células	No. Total de células	NCFM/NTC
	P	8	53	0,1509
	M	0		0
	A	0		0
	T	1		0,0188
SUMA Σ		0,1697		
		Σ *100= 16,97 %		

**Conteo de las láminas microscópicas de los 4 cuadrantes seleccionados por tenerla mayoría de células meristemáticas en el Punto Bajo a las 48 horas.**

**Tabla 40 Muestras Punto Bajo a las 48 horas.**

PUNTO BAJO 48 HORAS	MUESTRA 1				MUESTRA 2				MUESTRA 3			
		No. De Células	No. Total de células	NCFM/NTC		No. De células	No. Total de células	NCFM/NTC		No. De células	No. Total de células	NCFM/NTC
	P	7	71	0,0985	P	10	91	0,1098	P	14	72	0,1944
	M	3		0,0422	M	1		0,0109	M	1		0,0138
	A	0		0	A	1		0,0109	A	2		0,0277
	T	1		0,014	T	2		0,0219	T	2		0,0277
	SUMA Σ			0,1547	SUMA Σ			0,1535	SUMA Σ			0,2636
			Σ *100= 15,47 %			Σ * 100= 15,35 %			Σ *100= 26,36 %			

NCFM: número de células en fases mitóticas NTC: número total de células.

**Tabla 41 Suma de Porcentajes del Punto Bajo a las 48 Horas**

Suma de Porcentajes del Segundo día		
1-	15,47	
2-	15,35	
3-	26,36	
4-	29,4	
	86,58	86,58%

Para calcular el porcentaje de índice mitótico se divide el Número de células en fase entre el número total de células encontradas

PUNTO BAJO 48 HORAS	MUESTRA 4			
		No. De Células	No. Total de células	NCFM/NTC
	P	12	51	0,2352
	M	0		0
	A	1		0,0196
	T	2		0,0392
	SUMA Σ			0,294
			Σ *100= 29,4 %	

**Conteo de las láminas microscópicas de los 4 cuadrantes seleccionados por tenerla mayoría de células meristemáticas en el Punto Bajo a las 72 horas.**

**Tabla 42 Muestras Punto Bajo a las 72 horas.**

PUNTO BAJO 72 HORAS	MUESTRA 1				MUESTRA 2				MUESTRA 3			
		No. De Células	No. Total de células	NCFM/NTC		No. De células	No. Total de células	NCFM/NTC		No. De células	No. Total de células	NCFM/NTC
	P	22	96	0,2291	P	17	68	0,25	P	20	75	0,2666
	M	1		0,0104	M	2		0,0294	M	2		0,0266
	A	1		0,0104	A	1		0,0147	A	1		0,0133
	T	5		0,052	T	2		0,0294	T	1		0,0133
	SUMA Σ			0,3019	SUMA Σ			0,3235	SUMA Σ			0,3198
			Σ *100= 30,19 %			Σ * 100= 35,35 %			Σ *100= 31,98 %			

NCFM: número de células en fases mitóticas NTC: número total de células.

**Tabla 43 Suma de Porcentajes del Punto Bajo a las 72 Horas.**

Suma de Porcentajes del Tercer día		
1-	30,16	
2-	32,35	
3-	31,98	
4-	22,67	
	117,16	117,16%

Para calcular el porcentaje de índice mitótico se divide el Número de células en fase entre el número total de células encontradas

PUNTO BAJO 72 HORAS	MUESTRA 4			
		No. De Células	No. Total de células	NCFM/NTC
	P	16	97	0,1649
	M	3		0,0309
	A	0		0
	T	3		0,0309
	SUMA Σ			0,2267
			Σ *100= 22,67 %	

**Conteo de las láminas microscópicas de los 4 cuadrantes seleccionados por tenerla mayoría de células meristemáticas en el Punto del Pozo durante las primeras 24 horas.**

POZO 24 HORAS	MUESTRA 1				MUESTRA 2				MUESTRA 3			
		No. De Células	No. Total de células	NCFM/NTC		No. De células	No. Total de células	NCFM/NTC		No. De células	No. Total de células	NCFM/NTC
	P	9	52	0,173	P	10	45	0,2222	P	6	26	0,2307
	M	2		0,0384	M	1		0,0222	M	1		0,0384
	A	0		0	A	1		0,0222	A	0		0
	T	1		0,0192	T	2		0,0444	T	0		0
SUMA Σ		0,2306		SUMA Σ		0,311		SUMA Σ		0,2691		
		Σ *100= 23,06 %			Σ * 100= 31,1 %			Σ *100= 26,91 %				

**Tabla 44 Muestras Pozo a las 24 horas.**

NCFM: número de células en fases mitóticas NTC: número total de células.

**Tabla 45 Suma de Porcentajes del Pozo a las 24 Horas.**

Suma de Porcentajes del Primer día		
1-	23,06	
2-	31,1	
3-	26,91	
4-	23,9	
	104,97	104,97%

Para calcular el porcentaje de índice mitótico se divide el Número de células en fase entre el número total de células encontradas

POZO 24 HORAS	MUESTRA 4			
		No. De Células	No. Total de células	NCFM/NTC
	P	8	46	0,1739
	M	1		0,0217
	A	1		0,0217
	T	1		0,0217
SUMA Σ		0,239		
		Σ *100= 23,9 %		

**Conteo de las láminas microscópicas de los 4 cuadrantes seleccionados por tenerla mayoría de células meristemáticas en el Punto del Pozo a las 48 horas.**

**Tabla 46 Muestras Pozo a las 48 horas.**

POZO 48 HORAS	MUESTRA 1				MUESTRA 2				MUESTRA 3			
		No. De Células	No. Total de células	NCFM/NTC		No. De células	No. Total de células	NCFM/NTC		No. De células	No. Total de células	NCFM/NTC
	P	11	41	0,2682	P	16	86	0,186	P	3	24	0,125
	M	1		0,0243	M	2		0,0232	M	0		0
	A	1		0,0243	A	0		0	A	1		0,0416
	T	1		0,0243	T	2		0,0232	T	1		0,0416
	SUMA Σ			0,3411	SUMA Σ			0,2324	SUMA Σ			0,2082
			Σ *100= 34,11 %			Σ * 100= 23,24 %			Σ *100= 20,82 %			

NCFM: número de células en fases mitóticas NTC: número total de células.

**Tabla 47 Suma de Porcentajes del Pozo a las 48 Horas.**

Suma de Porcentajes del Segundo día		
1-	34,11	
2-	23,24	
3-	20,82	
4-	17,77	
	95,94	95,94%

Para calcular el porcentaje de índice mitótico se divide el Número de células en fase entre el número total de células encontradas

POZO 48 HORAS	MUESTRA 4			
		No. De Células	No. Total de células	NCFM/NTC
	P	11	90	0,1222
	M	1		0,0111
	A	2		0,0222
	T	2		0,0222
	SUMA Σ			0,1777
			Σ *100= 17,77 %	

**Conteo de las láminas microscópicas de los 4 cuadrantes seleccionados por tenerla mayoría de células meristemáticas en el Punto del Pozo a las 72 horas.**

**Tabla 48 Muestras del Pozo a las 72 horas.**

POZO 72 HORAS	MUESTRA 1				MUESTRA 2				MUESTRA 3			
		No. De Células	No. Total de células	NCFM/NTC		No. De células	No. Total de células	NCFM/NTC		No. De células	No. Total de células	NCFM/NTC
	P	17	95	0,1789	P	15	86	0,1785	P	12	61	0,19967
	M	1		0,0105	M	3		0,0357	M	1		0,0163
	A	2		0,021	A	2		0,0238	A	1		0,0163
	T	1		0,0105	T	4		0,0476	T	1		0,0163
SUMA Σ		0,2209		SUMA Σ		0,2856		SUMA Σ		0,2456		
			Σ *100= 22,09 %				Σ * 100= 28,56 %				Σ *100= 24,56 %	

NCFM: número de células en fases mitóticas NTC: número total de células.

**Tabla 49 Suma de Porcentajes del Pozo a las 72 Horas.**

Suma de Porcentajes del Tercer día		
1-	22,09	
2-	28,56	
3-	24,56	
4-	21	
	96,21	96,21%

Para calcular el porcentaje de índice mitótico se divide el Número de células en fase entre el número total de células encontradas

POZO 72 HORAS	MUESTRA 4			
		No. De Células	No. Total de células	NCFM/NTC
	P	18	119	0,1512
	M	3		0,0252
	A	2		0,0168
	T	2		0,0168
SUMA Σ		0,21		
			Σ *100= 21 %	

**Anexo 4. Ilustraciones del área de Recolección de muestras de agua.**  
**Ilustración 4 Visualización de la vista Panorámica de la Presa**



**Ilustración 5 Punto de Muestreo 1, Punto Alto.**

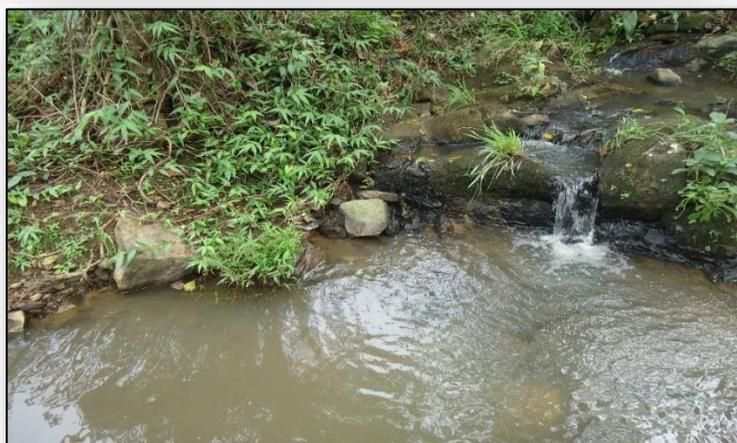


Fotografías Tomadas por: Peralta J. (2016).

*Ilustración 6 Punto medio de Recolección de las muestras de agua*



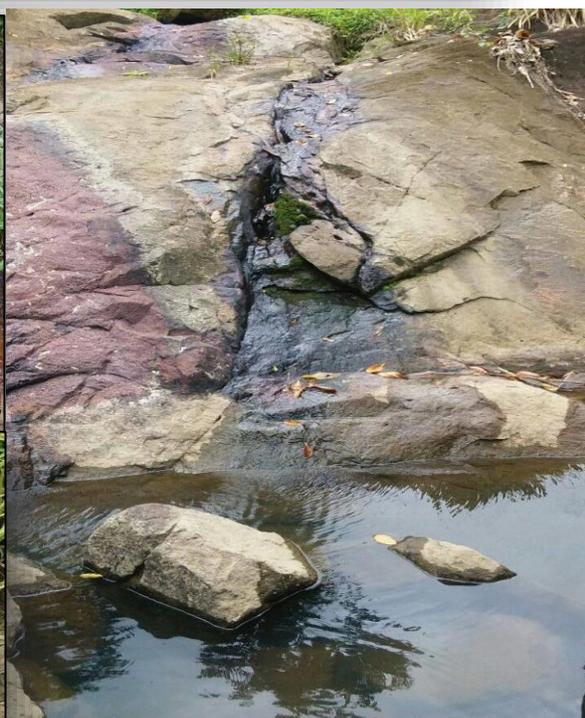
Fotografías tomadas por:  
Peralta J. (2016)



*Ilustración 7 Vista panorámica  
del punto medio de muestreo*



*Ilustración 8 Punto Bajo de Recolección de muestras de agua.*



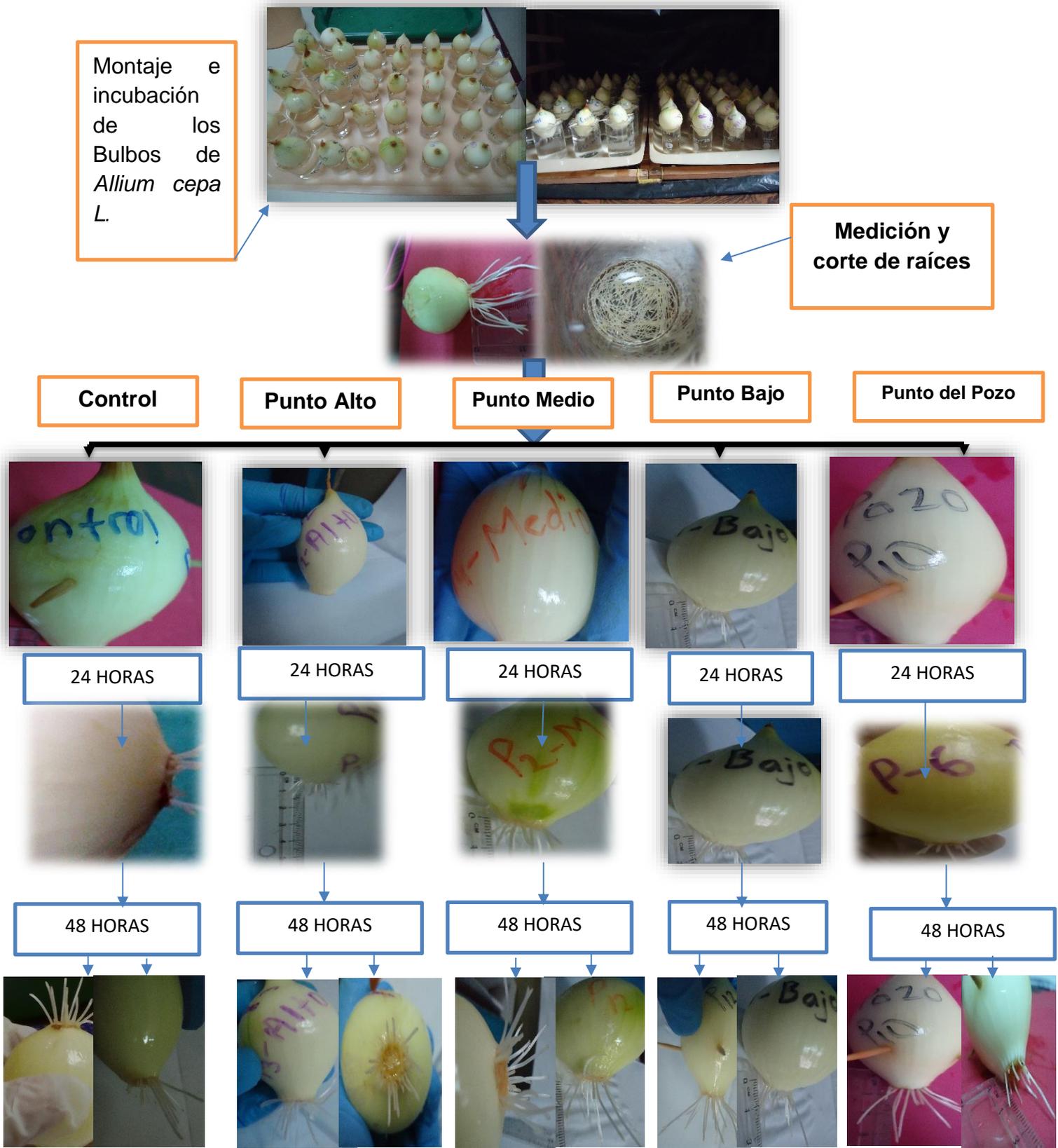
*Fotografías tomadas por: Peralta J. (2016)*

*Ilustración 9 Punto del Pozo de recolección de las muestras de agua.*



Fotografías tomadas por: Peralta J. (2016).

### Anexo 5. Protocolo de Allium Test.

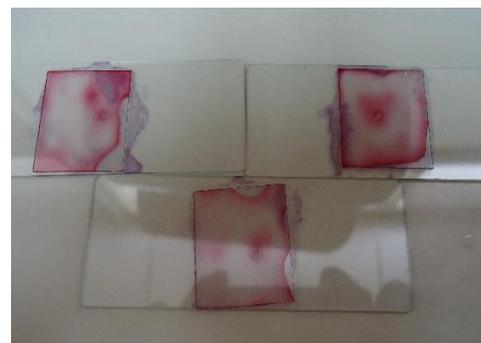




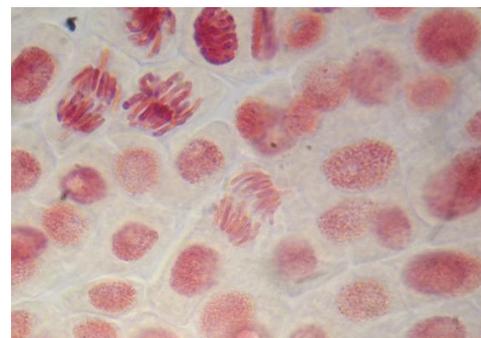
Lavado de Raíces



SQUASH



Observaciones  
Microscópicas



Fuente: Peralta J. (2016), Fotografías propias y editadas con el software Gimp

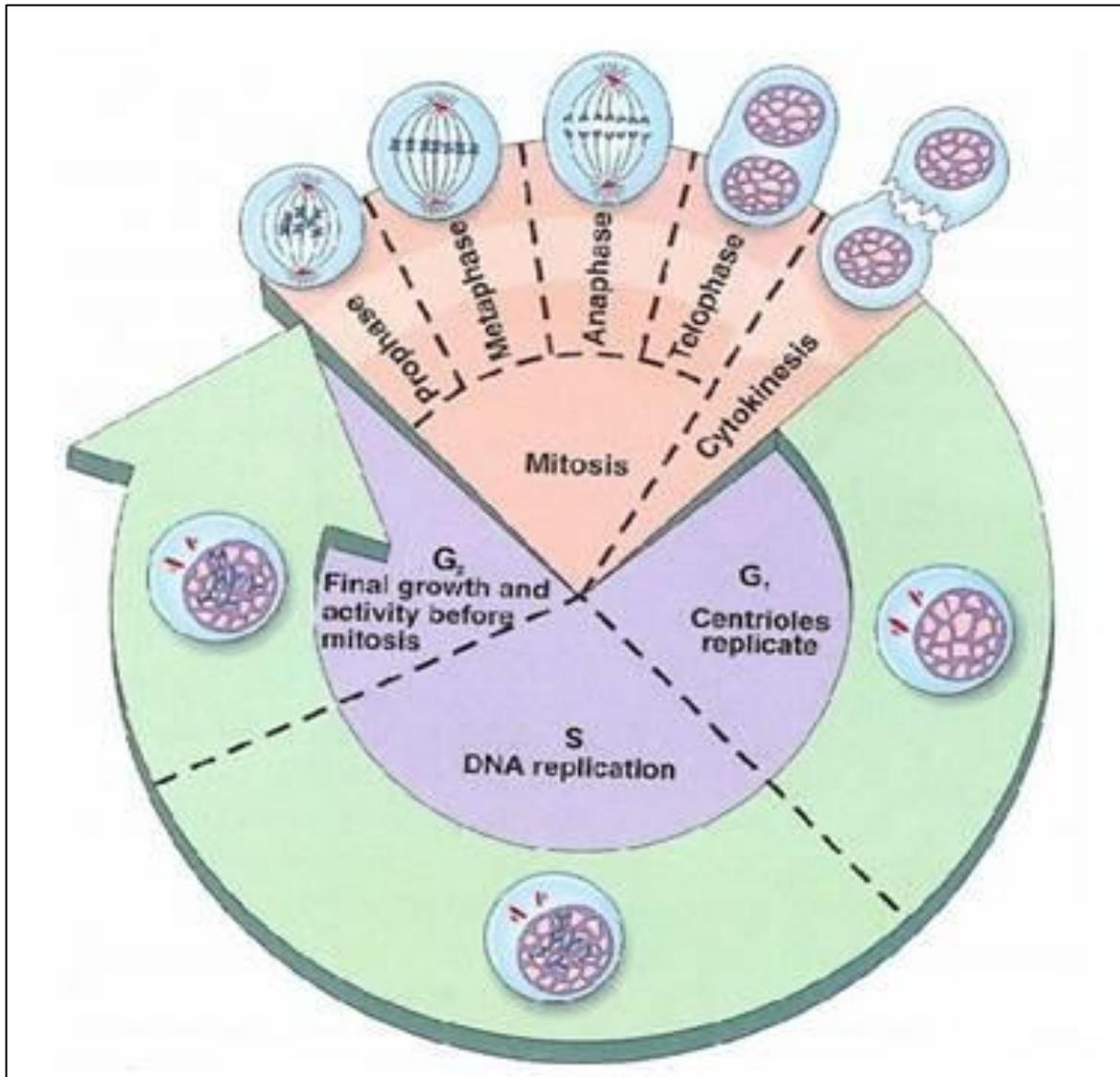
2

## Anexo 6. Ubicación de la zona de estudio



Fuente: Peralta J. (2016). Fuente Google earth pro.

## Anexo 7. Ciclo Celular



Fuente: Internet página web:

<https://sites.google.com/site/elcanerygenes/ciclo-celular-y-cancer>

## **Anexo 8. Glosario**

**Adhesiones:** cromosomas pegajosos indican altamente tóxico, por lo general no reversible, efecto - probablemente que conduce a la muerte celular

***Allium cepa:*** es un organismo que ofrece un buen modelo experimental in vivo para evaluar toxicidad y la genotoxicidad de sustancias y mezclas complejas.

**Aneuploidógeno:** Agente capaz de producir en la célula que uno o más cromosomas completos de un conjunto normal falten o se presenten más de una vez.

**C-mitosis:** débil efecto tóxico, puede ser reversibles

**Clastógeno:** Agente que causa rotura de los cromosomas y/o consecuentemente, ganancia, pérdida o reordenamiento de los fragmentos cromosómicos

**Cromosomas vagabundos:** débil efecto mitótico; indica el riesgo de aneuploidía

**Índice mitótico:** (MI) - número de células que se dividen por 1000 células observadas.

**Mutágeno:** Es un agente físico, químico o biológico que altera o cambia la información genética de un organismo y ello incrementa la frecuencia de mutaciones por encima del nivel natural. Cuando numerosas mutaciones causan cáncer adquieren la denominación de carcinógenos. No todas las mutaciones son causadas por mutágenos. Hay "mutaciones espontáneas", llamadas así debido a errores en la reparación y la recombinación de ADN.

**Puentes y/o fragmentos de cromosomas:** resultados de las pausas de cromosomas y cromátidas.

## Anexo 9. Abreviaturas

**RACCN:** Región Atlántico Costa Caribe Norte

**NTC:** Número total de células

**IM:** Índice Mitótico

**IMP:** Índice Mitótico parcial

**NCFM:** Numero de Células en Fase mitóticas

**IP:** Índice de Profase

**IM:** Índice de Metafase

**IA:** Índice de Anafase

**IT:** Índice de Telofase

**IC:** Incremento

**MFO:** sistema de la monoxigenasa dependiente del citocromo p450

**EPA:** Environmental protection Agency (Agencia de protección ambiental)

**Hg:** Mercurio

**Cu:** Cobre

**Ni:** Níquel

**Cd:** Cadmio

**Be:** Belio

**Al:** Aluminio

**Mn:** Manganeso

**Li:** Litio

**HCl:** Ácido clorhídrico