



Biotempo (Lima)



ORIGINAL ARTICLE / ARTÍCULO ORIGINAL

MICROBIOLOGICAL, CHEMICAL AND ECOTOXICOLOGICAL QUALITY OF WATERS USED FOR IRRIGATION IN THE YABÚ VALLEY, SANTA CLARA, VILLA CLARA, CUBA

CALIDAD MICROBIOLÓGICA, QUÍMICA Y ECOTOXICOLÓGICA DE LAS AGUAS UTILIZADAS PARA REGADÍO EN EL VALLE DEL YABÚ, SANTA CLARA, VILLA CLARA, CUBA

Maibia Tamayo-Irzula¹; Eduardo Gime-de-Oliveira²; Nilda Rosa Martínez-Flores³; Omar Hernández-Trimino⁴; Rigoberto Fimia-Duarte⁵ & José Iannacone^{6,7}

¹ Unidad de Toxicología Experimental (UTEX). Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara, Cuba.
E-mail: maibiati@infomed.sld.cu

² Departamento de Biología. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Central «Marta Abreu» de Las Villas, Cuba.

³ Centro Provincial de Higiene Epidemiología y Microbiología de Villa Clara, Cuba.
E-mail: microbiología@infomed.sld.cu

⁴ Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara, Cuba.

⁵ Facultad de Tecnología de la Salud. Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara, Cuba.
E-mail: rigobertofd@infomed.sld.cu

⁶ Laboratorio de Ecología y Biodiversidad Animal (LEBA). Facultad de Ciencias Naturales y Matemática. Universidad Nacional Federico Villarreal (UNFV).

⁷ Laboratorio de Parasitología. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Ricardo Palma (URP). Lima, Perú.
E-mail: joseiannacone@gmail.com

Author for correspondence: maibiati@infomed.sld.cu

ABSTRACT

Water pollution has increased over the years and has been caused primarily by industrial development and population growth. Currently there is a growing concern about the effects of using wastewater for irrigation, so the objective of the research was to evaluate the quality of the water used for irrigation in “Valley of Yabu”. Microbiological and chemical indicators were determined. In addition, the ecotoxicity of irrigation water was evaluated using a rapid, simple and economical in vitro bioassay of acute toxicity by using *Allium cepa* L. bulbs. During the period in which the analysis was carried out, it was noted that the values of total and thermotolerant coliforms were $> 0.16 \times 10^3$ NMP / 100 mL, which far exceeds those allowed in the reference standards. The contents of nitrite and ammonia show values higher than the concentrations established in the current CS. Therefore, water is evaluated as not suitable for agricultural irrigation of crops and vegetables that are consumed directly without cooking. In the acute toxicity test in *A. cepa*, the water samples

analyzed turned out to be phytotoxic at concentrations higher than 25% in the case of Point 1, while the samples corresponding to Points 2 and 3 showed their phytotoxicity after 75%. The results show the need to use a wider battery that includes other biomodels in addition to subchronic and chronic tests.

Key words: *Allium cepa* – bioassays – coliforms – Cuba – quality – Villa Clara – Waste water

RESUMEN

La contaminación de las aguas se ha incrementado a lo largo de los años, causada fundamentalmente por el desarrollo industrial y crecimiento poblacional. Actualmente existe una creciente preocupación por los efectos que causa el uso de aguas residuales en el riego. El objetivo de la presente investigación fue evaluar la calidad microbiológica, química y ecotoxicológica de las aguas utilizadas para regadío en el Valle del Yabú, Villa Clara, Cuba. Se determinaron, indicadores microbiológicos y químicos. Además, se evaluó la ecotoxicidad de las aguas utilizadas para regadío, empleando un bioensayo *in vitro* de toxicidad, rápido, sencillo y económico, utilizando bulbos de *Allium cepa* L. En el período de estudio es de señalar que los valores obtenidos en cuanto a Coliformes totales y Termotolerantes fueron $>0,16 \times 10^3$ NMP·100 mL⁻¹, los que superan en gran medida los admitidos en las normas de referencia (NR). Los contenidos de nitrito y amoníaco muestran valores superiores a las concentraciones establecidas en las NR vigentes. Por tanto, las aguas se catalogaron de No Aptas para el riego agrícola de cultivos y vegetales que se consumen de forma directa sin cocción. En el ensayo de toxicidad con *A. cepa*, las muestras de agua analizadas fueron fitotóxicas a concentraciones superiores al 25% en el caso del Punto 1, mientras que las muestras correspondientes a los Puntos 2 y 3 manifiestan su fitotoxicidad a partir del 75%. Con los resultados obtenidos se evidencia la necesidad de utilizar una batería más amplia que incluya otros biomodelos.

Palabras clave: Aguas residuales – *Allium cepa* – bioensayos – calidad – coliformes – Cuba – Villa Clara

INTRODUCCIÓN

El creciente desarrollo industrial y urbano ha traído consigo la aparición de una cantidad apreciable de sustancias químicas tóxicas que afectan los ecosistemas en el mundo y con ellos la salud humana (Rodríguez *et al.*, 2006; Agostinho *et al.*, 2010; Cepero 2012; Acosta, 2016; Castro *et al.*, 2018; Seid *et al.*, 2019), tales sustancias provocan daños a veces irreversibles como la pérdida de biodiversidad (UNESCO-WWAP & OMS, 2015). El deterioro ambiental se hace más preocupante en el agua, pues es un insumo básico para la subsistencia de todo organismo vivo y para las actividades productivas del hombre (Adriana *et al.*, 2012; Alonso, 2017).

Dentro de los contaminantes ambientales más nocivos encontramos a los efluentes industriales, que constituyen las fuentes más comunes de efectos adversos, los cuales pueden ser clasificados ampliamente de acuerdo con sus propiedades químicas y físicas, por su comportamiento en las aguas receptoras y la forma en que estos afectan al medio acuático (Macan, 2007; Smital, 2008); estos se consideran como mezclas complejas que contienen sustancias orgánicas e inorgánicas disueltas incluyendo

tóxicos, materiales biodegradables y persistentes, todos ellos con un efecto perjudicial para el ecosistema (Barceló & Alda, 2008). El principal efecto adverso de los contaminantes resulta en el desequilibrio de los ecosistemas, lo cual se manifiesta con la pérdida de estabilidad, productividad y el reciclaje de la materia en estos sistemas, lo que significa que los mismos ya no son sostenibles (Calvo, 2016). Esto es la consecuencia de la acción selectiva de las sustancias tóxicas, que tienen repercusiones distintas en las especies, en diferente medida o a concentraciones diversas. Los efectos pueden ser letales para las especies (Alegre *et al.*, 2018; Tomaiña & Iannacone, 2018). Sin embargo, es más común que los efectos sean subletales y que las especies sigan vivas, pero se modifique su desarrollo (Arkhipchuk *et al.*, 2000; Murray *et al.*, 2010; Pathiratne *et al.*, 2015).

Las sustancias potencialmente tóxicas pueden encontrarse en concentraciones tan bajas, que no son detectables con los métodos químicos convencionales (Angulo, 2015; Pathiratne *et al.*, 2015). Esto ha generado la necesidad del desarrollo de investigaciones de corte experimental para lograr una protección adecuada de los ecosistemas y garantizar la continuidad de su existencia y evitar la

pérdida de biodiversidad (Rodríguez *et al.*, 2006; Cepero, 2012; Diéguez *et al.*, 2012). Un instrumento alternativo y que complementa los tradicionales análisis químicos y microbiológicos para la determinación de toxicidad de muestras ambientales es la utilización de bioensayos, usados desde mediados del siglo XX para el control de la calidad de las aguas (Pathiratne *et al.*, 2015). Estos tipos de estudios son de gran importancia, pues constituyen un objetivo fundamental de las guías de la Organización Mundial de la Salud (OMS) por la protección a la salud pública con la prevención de la transmisión de enfermedades por el agua. Por medio de los bioensayos se establecen los criterios de calidad para la protección de la vida acuática, los que posteriormente, se usan para determinar los estándares de calidad ambiental para cada agente químico (Barceló & Alda, 2008).

En las últimas décadas, los ensayos con plantas superiores se encuentran dentro de los más utilizados, como organismos de prueba, por ser organismos eucarióticos, y por lo tanto comparables a la mayoría de las especies de la flora y la fauna superiores (Andrioli *et al.*, 2006; Restrepo-Manrique *et al.*, 2011; Pathiratne *et al.*, 2015; Ciappina *et al.*, 2017). Dentro de los mismos el de mayor repercusión es el ensayo en *Allium cepa* L. “cebolla”, bioensayo *in vitro* que constituye un procedimiento de investigación rápido, económico, simple y que muestra resultados confiables, para la evaluación de productos químicos, aguas residuales, que pueden representar un peligro potencial para el medio ambiente (Radić *et al.*, 2010; Çavuşoğlu *et al.*, 2011; Restrepo-Manrique *et al.*, 2011; Roa *et al.*, 2012; Sánchez *et al.*, 2015; Ciappina *et al.*, 2017).

Teniendo en cuenta los efectos adversos que producen al medio las aguas residuales, internacionalmente se tomó la decisión de regular sus vertimientos mediante normas que establecen las concentraciones que pueden presentar los residuales para poder ser vertidos a cualquier ecosistema (Lorenzo *et al.*, 2009). Cuba no ha quedado atrás en este aspecto y ha creado sus propias normas, las cuales han sido adaptadas a partir de las internacionales, ajustándose a nuestras condiciones (NC 27, 2012; NC 1048, 2014). Además, estableció que todas las entidades que vierten desechos a un cuerpo receptor, deben realizarles una caracterización completa de los mismos, que permita buscar alternativas para su uso o tratamiento antes de ser vertidos (Forget *et al.*, 2000; Maria & ABad, 2015; Cordon *et al.*, 2016).

El desarrollo poblacional e industrial que tuvo lugar a partir de los años 60 en la ciudad de Santa Clara, no fue compatible con el sistema de alcantarillado y la planta

de tratamiento que existía, y dejaron de funcionar los mismos. Actualmente gran parte de la población, incluyendo centros industriales y hospitalarios vierten directamente sus aguas residuales, sin tratamiento o con tratamiento deficiente, hacia el curso de los Ríos Bélico y Cubanicy que confluyen en el sistema Arroyo Grande al norte de la ciudad de Santa Clara. La negativa situación se agrava a causa de que una gran parte de la población y muchas veces hasta entidades del sector estatal, emplean las riberas y el propio cauce de los ríos (Bélico y Cubanicy) y cañadas que atraviesan la ciudad para depositar basura, escombros y otros desechos (Peñate, 2006).

En este sentido se debe tener en cuenta que este recurso natural juega un papel importante en el ecosistema por tener incluidas una gran diversidad de especies (microorganismos, animales y plantas), y por ser una fuente vital para el consumo humano (Gómez & Ramírez, 2004). En Cuba se han comenzado a evaluar en los últimos años y existen varias investigaciones sobre el tema, dada su importancia e impacto ambiental (Peñate, 2005; Peñate, 2006; Veliz *et al.*, 2012).

Por tanto, teniendo en consideración que el uso de aguas residuales, con tratamiento o no, en el riego agrícola constituye un peligro potencial para la salud humana, en esta investigación el área de impacto escogida está localizada en el “Valle del Yabú”, donde se reutiliza el agua embalsada en el sistema Arroyo Grande I y II. A partir de la política nacional dirigida a la protección del medio ambiente, resulta estratégico y de prioridad adecuar estudios experimentales, que brinden la evidencia científica de la calidad del agua de la presa y de las que abastecen las máquinas de riego, de las que hasta ahora no se tiene ninguna referencia, mediante la realización de ensayos de toxicidad de corta duración, empleando como biomodelo bulbos de *A. cepa* (Roa *et al.*, 2012; Robles & García, 2012). Para el establecimiento de medidas de protección contra el efecto nocivo de sustancias y otros contaminantes que pudieran estar incidiendo sobre estas áreas.

El objetivo de la investigación consistió en evaluar la calidad microbiológica, química y ecotoxicológica de las aguas utilizadas para regadío en el “Valle del Yabú”, enclavado en el municipio Santa Clara, provincia Villa Clara, Cuba.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

El área de estudio está localizada en el “Valle del Yabú”, próxima a la ciudad de Santa Clara, Cuba, donde está

asentada la Empresa de Cultivos Varios Yabú, entidad que satisface la demanda de agua para el riego agrícola, reutilizando el agua embalsada en el sistema Arroyo Grande I y II, desde 1983 hasta la fecha. Dicha empresa tiene una superficie de 7 255,36 ha de tierra, de ellas cultivables 6 044,64 ha, teniendo bajo riego 886,13 ha.

La diversidad de la vegetación en el área de estudio, presa Arroyo Grande II, está compuesta mayormente por las especies: *Typha domingensis* Bory & Chaub., *Phyla nodiflora* (L) Greene, y *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms., pertenecientes a las familias Typhaceae, Verbenaceae y Pontederiaceae, respectivamente. Permanentemente se encuentra una fauna menor asociada al agua como peces, anfibios e insectos acuáticos.

Se realizó el muestreo en tres sectores del Valle del Yabú: Muestra 1. Presa Arroyo Grande II, UEB Albarrán; Muestra 2. Máquina de riego 1, Conyedo y Muestra 3. Máquina de riego 2, Conyedo.

Toma de muestra

Para la presente investigación la toma de muestra se realizó en el mes de abril 2016, correspondiente al periodo seco. Se escogió esta época del año por ser la de mayor déficit hídrico y por tanto en la que el efecto del aporte de contaminantes provenientes de la ciudad de Santa Clara es mayor.

Las muestras de agua, en cada punto, se tomaron por triplicado, en el caso de las destinadas al ensayo de toxicidad en *A. cepa*, y químico en frascos de vidrio de capacidad de 1000 mL debidamente esterilizados y tapados y, en el caso de las muestras destinadas a los análisis microbiológicos se utilizaron bolsas de nailon estéril.

Procedimientos

Los frascos y bolsas de muestreo se enjuagaron bien con el agua a muestrear, luego se taparon y seguidamente se procedió al rotulado de los mismos con los siguientes datos: código de muestra, lugar de muestreo y fecha de muestreo. Las muestras tomadas, de aguas superficiales, en los puntos establecidos se conservaron en un lugar fresco y posteriormente se trasladaron a los laboratorios correspondientes: Centro Provincial de Higiene, Epidemiología y Microbiología (CPHEM) donde se realizó el análisis químico y microbiológico y en la Unidad de Toxicología Experimental (UTEX), situada en la Universidad de Ciencias Médicas, el ensayo de toxicidad en *A. cepa*, ambas instituciones ubicadas en el municipio de Santa Clara, Cuba.

Calidad microbiológica

Para el desarrollo de la técnica y procedimientos establecidos se utilizó la NC 1095:2015 Microbiología del Agua — Detección y Enumeración de Coliformes — Técnica del Número Más Probable (NMP). El número total de coliformes se expresó por los resultados de la prueba presuntiva y el número de coliformes termotolerantes por el resultado de la prueba confirmativa, en ambos casos los resultados fueron expresados en Número Más Probable de organismos presentes por cada 100 mL de muestra ($\text{NMP} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$). La determinación del $\text{NMP} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ se realizó por la serie de 5 tubos con diluciones múltiples (series de cinco porciones de 10,0 mL, cinco porciones de 1,0 mL y cinco porciones de 0,1 mL).

Los valores obtenidos se compararon con los descritos en las normas cubanas vigentes NC 827:2010 Agua Potable — Requisitos Sanitarios; NC 27:2012 Vertimiento de Aguas Residuales a las Aguas Terrestres y al Alcantarillado — Especificaciones; NC 1021:2014 Higiene Comunal — Fuentes de Abastecimiento de Agua — Calidad y Protección Sanitaria y NC 1048:2014 Calidad del Agua Para Preservar el Suelo — Especificaciones.

El NMP constó de dos etapas:

Prueba presuntiva: Los tubos inoculados con la muestra que contenían caldo lactosado o caldo lauril triptosa fueron examinados después de 24 y 48 h de incubación a $35 - 37^\circ\text{C} \pm 0,5^\circ \text{C}$. Se consideraron como positivas las que presentaron cualquier cantidad de gas en el tubo de Durham. Los cultivos que no mostraron gas en la lectura de 24 h fueron incubados 24 h más, procediendo entonces a repetir la lectura. Se efectuaron subcultivos de cada tubo que mostró turbidez con producción de gas en un medio más selectivo y confirmatorio. Se registró en la libreta de trabajo el número de tubos positivos en cada lectura. Los tubos positivos en el caldo lactosado fueron solamente presuntivos a coliformes. Por tanto, fue importante que se sometieran a la prueba confirmativa todos los tubos positivos en la prueba presuntiva.

Prueba confirmativa: El medio confirmativo para la enumeración de organismos coliformes fue el caldo lactosado con bilis y el verde brillante, y se incubaron hasta 48 h a $35-37^\circ\text{C} \pm 0,5^\circ\text{C}$, mientras que para los coliformes termotolerantes (caldo EC), la incubación fue a $44,5^\circ\text{C} \pm 0,5^\circ\text{C}$ (baño de agua termostataado) por 24 h.

Prueba confirmativa para organismos coliformes: Se agitó levemente los tubos positivos y rotados suavemente. Se evitó la película superficial, de estar presente, inclinando el tubo ligeramente. Con un asa de platino-iridio, o de níquel-cromo de 3,0 – 3,5 mm de diámetro, previamente

esterilizada al calor bajo la llama de un mechero, se inoculó un tubo de caldo lactosado con bilis y verde brillante (CBVB) de cada tubo positivo resultante de la prueba presuntiva. Se incubó a $35-37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ y examinó la producción de gas dentro de un período de 48 h. Se consideró positiva la presencia de turbidez y cualquier cantidad de gas en el tubo de Durham. Se registró, en la libreta de trabajo, el número de tubos positivos en la prueba confirmativa para la determinación del NMP de organismos coliformes.

Prueba confirmativa para coliformes termotolerantes:

Fue encendido el baño de agua termostataado y se aseguró que alcanzara la temperatura apropiada ($44-44,5^\circ\text{C} \pm 0,5^\circ\text{C}$ según el método), posteriormente se agitaron levemente los tubos positivos y rotados suavemente de maneras que se evitara la película superficial, de estar presente, inclinando el tubo ligeramente. Se transfirió una porción del cultivo, con auxilio de un asa de platino-iridio, o de níquel-cromo de 3,0 – 3,5 mm de diámetro, previamente esterilizada al calor bajo la llama de un mechero, a un tubo de caldo EC de cada tubo positivo en la prueba presuntiva.

Una vez efectuada la inoculación, el tubo de cultivo fue colocado en el baño de agua termostataado ($44-44,5^\circ\text{C} \pm 0,5^\circ\text{C}$) dentro de los primeros 30 min posteriores a esta acción, para evitar la aparición de falsos positivos.

Se incubó a $44-44,5^\circ\text{C} \pm 0,5^\circ\text{C}$ y se examinó la producción de gas dentro de un período de 24 h. Se consideró positiva la presencia de cualquier cantidad de gas en el tubo de Durham.

Se registró, en la libreta de trabajo, el número de tubos positivos en la Prueba Confirmativa para la determinación del NMP de organismos coliformes termotolerantes.

Calidad química

Para determinar las concentraciones de nitritos y amoníaco, se empleó el método estándar para la determinación de agua y agua residual (APHA, 1985).

Método colorimétrico para la determinación de amoníaco:

A una porción de 25 mL de la muestra se le añadió 1 mL de reactivo de Nessler posteriormente se agito y se esperó 15 min, seguidamente se realizó la lectura en el espectrofotómetro a 420nm. Se realizó una curva de calibración con concentraciones conocidas. Cálculo en $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de amoníaco en la muestra:

$$C = F \cdot \text{DO}$$

$$F = \frac{\sum \text{concentraciones}}{\sum \text{densidad óptica (en la curva)}}$$

$$C = \text{Concentración de amoníaco en } \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$$

Curva de calibración

Solución madre: 0,3819 g de NH_4Cl en 100 mL de agua y queda $1,22 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Solución patrón: Se tomó 1 mL de la solución madre y se llevó a un matraz de 100 mL se enrasó con agua destilada y quedó $0,0122 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de NH_3 . Se Transfirieron a cinco matraces de 100 mL, cada uno, las cantidades de solución patrón de 0,5, 1,0, 2,0, 3,0 y 5,0 mL. Se adicionó 1 mL del reactivo de Nessler. Posteriormente se enrasó con agua bidestilada y se agitó vigorosamente. Se dejó en reposo durante 15 min a temperatura ambiente. Paralelamente se preparó un blanco de reactivos y se tomaron las lecturas de absorbancia a 420 nm.

Método espectrofotométrico para la determinación de nitrito:

Se hizo un tratamiento previo a la muestra para eliminar los sólidos en suspensión y el cloruro residual: Para eliminar los sólidos suspendidos se filtró a través de un filtro de membrana de $0,45 \mu\text{m}$ de diámetro de poro. La eliminación del cloro residual se hizo por adición de una gota de tiosulfato de sodio 0,1 N a la muestra. Posteriormente se ajustó el pH de la muestra a 5–9 con ácido clorhídrico 1N, enseguida se tomó 50 mL de la muestra y se le añadió 2 mL del reactivo de color y se le mezcló. Se dejó que se desarrollara la reacción en el transcurso de 2-8 min, posteriormente se dejó reposar 10 min. Se midió la absorbancia a 543 nm en celdas con 1 cm de paso de luz. Se midió con un blanco reactivo procesado de igual forma que las muestras.

Curva de calibración: En matraces volumétricos de 50 mL se prepararon las disoluciones para la calibración a partir del patrón de $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de N-nitrito. Se diluyeron a 50 mL con agua destilada. A continuación, se presentaron los valores de concentraciones y volúmenes a tomar del patrón para realizar la curva de calibración. Se adicionaron 2 mL del reactivo de color, enseguida se mezcló y se dejó que se desarrollara la reacción entre 2-8 min por último se midió la absorbancia a 543 nm.

$$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ de N-nitrito} = \frac{\text{D.O} \times f \times \text{Volúmen final}}{\text{ml de muestra tomados}}$$

Donde: D.O: Densidad óptica de las muestras. f : pendiente del gráfico de calibración (1/b). Para calcular la concentración de nitritos se multiplicó los $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de N- Nitrito x 3,29.

Calidad ecotoxicológica

Para evaluar la fitotoxicidad de las aguas utilizadas para regadío se utilizó el ensayo de toxicidad en *A. cepa*, mediante la evaluación de la inhibición del crecimiento promedio de raíces en bulbos de cebolla. Se siguió los procedimientos descritos en Castillo (2004). Para el

ensayo de toxicidad en *A. cepa*, se conformaron tres grupos experimentales, en correspondencia con los tres puntos de muestreo de aguas residuales utilizadas para regadío. Para cada uno de los grupos conformados se prepararon concentraciones decrecientes (100, 75, 50, 25 y 5 %). Se utilizó agua destilada como control negativo y para preparar las diluciones de las muestras.

Protocolo de ensayo: los bulbos de cebolla amarilla fueron cultivados, de forma ecológica por el productor C. José Ignacio Rodríguez Bozón (“Baracoa”) en el huerto “El Mambí” (diciembre-abril 2016) en la ciudad de Santa Clara, Cuba. Los bulbos cultivados no fueron pequeños, de 1,5 cm de diámetro (Castillo, 2004). Por lo que se usó otros de mayor diámetro (2,5-3 cm). Se seleccionaron los bulbos para cada tratamiento, cuidando

que fuesen de similar tamaño y que estuviesen libres de hongos o deformaciones, además de revisar y limpiar cuidadosamente la zona radicular para así garantizar que el desarrollo de los bulbos fuese uniforme. Los tubos se colocaron en un soporte, sobre una mesa que no presentaba vibraciones, y el local de estudio se mantuvo a temperatura 22 ± 2 °C. Se evitó la iluminación directa cubriendo las muestras de agua con papel de aluminio. Durante el periodo de prueba, dos veces al día, se restableció el volumen perdido por evaporación o absorción. Al cabo de 72 h se recolectaron los bulbos y se procedió a medir el largo promedio de las raíces.

Las características del bioensayo de toxicidad en bulbos de *A. cepa*, se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Condiciones para las pruebas de toxicidad en *Allium cepa* (Díaz, 2004).

Tipo de ensayo	Estático
Temperatura	22 ± 2 °C
Iluminación	Indirecta
Recipientes	Tubos de ensayos de 10 x 2,5 cm de diámetro
Material biológico	Bulbos de cebolla
Condición de los bulbos	Pelar los bulbos y la base, evitar dañar el anillo radicular
Control	Agua destilada
Número de concentraciones	5
Duración de la prueba	72 h
Efecto medido	Inhibición de crecimiento de las raíces
Resultado final	CI ₅₀

Posteriormente se calculó el promedio de la longitud de las raíces por concentración en cada grupo experimental y el porcentaje de inhibición de las raíces de cebolla con la siguiente ecuación (Castillo, 2004):

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\text{longitud del control} - \text{longitud de la muestra}}{\text{longitud del control}} \times 100$$

Además, se determinó la media de las concentraciones, de cada réplica, para realizar la prueba de muestras relacionadas. El estudio fue conducido teniendo en cuenta las Buenas Prácticas de laboratorio (BPL) de Toxicología Experimental. Todas las actividades fueron llevadas a cabo, en la UTEX, según lo establecido por los Procedimientos Normativos Operacionales (PNO). Se cumplieron las normas de Bioseguridad establecidas para este tipo de ensayo y los requerimientos de bioética

en la experimentación. El listado de PNO empleados fueron: PNO/AST/0010 Fregado de cristalería. PNO/REG/0004 Redacción, compilación y manipulación del Protocolo de Trabajo. PNO/ASC/0004 Instalación y funciones. Inspecciones por parte de la Unidad de Garantía de la Calidad (UGC).

Análisis estadístico

Se elaboró una hoja de cálculo en el Microsoft Office Excel 2007 y se utilizó el paquete estadístico SPSS, versión 20,0 para Windows y Startgraphics Centurion XV. En el SPSS se realizó el análisis estadístico del ANOVA de un factor, con una prueba Post Hoc de Tukey para comparaciones múltiples entre las muestras. En el Startgraphics Centurion XV se realizaron pruebas múltiples de rango LSD para longitud promedio de raíces en cada muestra por concentración al 95 % de confianza.

Aspectos éticos: Los autores indican que se siguieron todos los procedimientos éticos estándares del país.

RESULTADOS

Teniendo en cuenta que el reúso de aguas residuales, con tratamiento o no, en el riego agrícola constituye un peligro potencial para la salud humana y que éste es el destino planificado para las aguas del sistema hidráulico Arroyo Grande II, se evaluó la calidad del agua teniendo en cuenta indicadores microbiológicos, químicos y ecotoxicológicos.

Calidad microbiológica

De acuerdo a la NC 27:2012 la presa arroyo Grande II está catalogada como un cuerpo receptor "Clase B". Teniendo en cuenta esto, los parámetros microbiológicos

evaluados en las muestras de agua utilizadas para regadío, de cada uno de los grupos experimentales (tabla 2), no se ajustan a los Límites Máximos Admisibles (LMA) exigidos en dicha norma.

En la Tabla 2 se muestran los resultados del monitoreo realizado en el mes de abril del 2016 así como la comparación con las normas vigentes NC 827:2010 Agua Potable — Requisitos Sanitarios y NC 1021:2014. Higiene Comunal — Fuentes de Abastecimiento de Agua — Calidad y Protección Sanitaria. En el país no se dispone de una norma que regule el uso de aguas residuales en el riego, ya que solo existe en relación con la salinización por manejo incorrecto de aguas con alto contenido de sales.

Tabla 2. Parámetros microbiológicos determinados de las muestras de agua utilizadas para regadío y el agua control.

Indicadores	Unidad de medida	Muestras			Control	LMA
		1	2	3	Negativo	NC 827:2010 NC1021:2014
CT	NMP·100mL ⁻¹	>1,6 x 10³	>1,6 x 10³	>1,6 x 10³	<1,8	< 2
CTT	NMP·100mL ⁻¹	>1,6 x 10³	>1,6 x 10³	>1,6 x 10³	< 2	< 2

Leyenda: (CT) Coliformes Totales; (CTT) Coliformes Termotolerantes Los valores en negritas corresponden a valores por encima de los valores límites establecidos

Calidad química

La Tabla 3 muestra los valores obtenidos de los indicadores nitrito y amoníaco de los tres puntos de monitoreo y el agua control. Se observó que los valores de nitrito y

amoníaco presentaron concentraciones superiores a las que establecen las Normas Cubanas 827:2010 y NC 1021:2014, cuyo LMA es de 0,01 mg·L⁻¹ y No presencia, respectivamente.

Tabla 3. Indicadores químicos determinados de las muestras de agua utilizadas para regadío y el agua control.

Parámetros	Unidad de medida	Muestras			Control	LMA
		1	2	3	Negativo	NC 827:2010 NC1021:2014
Nitrito	mg·L ⁻¹	0,06	0,05	0,02	0,0	0,01
Amoníaco	mg·L ⁻¹	0,38	0,14	0,16	0,0	No presencia

Los valores en negritas corresponden a valores por encima de los valores límites establecidos.

Calidad ecotoxicológica

Las figuras 1, 2 y 3 muestran la elongación promedio de las raíces, de cada una de las muestras analizadas, con respecto al control.

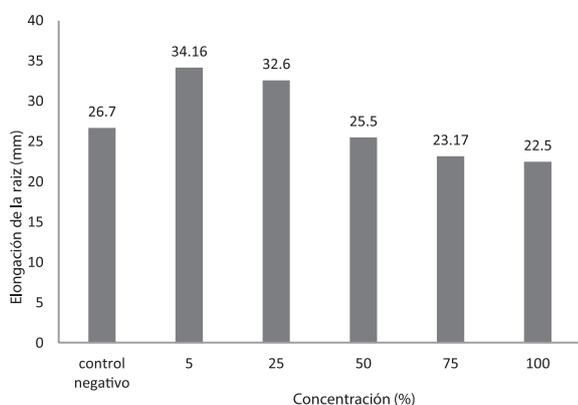


Figura 1. Elongación de las raíces de *Allium cepa* en la Muestra 1: Presa Arroyo Grande II, UEB Albarrán a las concentraciones estudiadas.

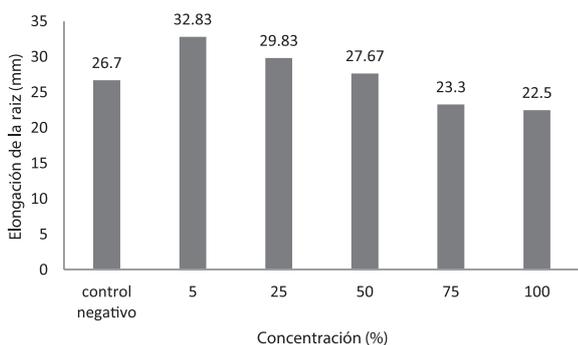


Figura 2. Elongación de las raíces de *Allium cepa* en la Muestra 2: Máquina de riego 1, Conyedo a las concentraciones estudiadas.

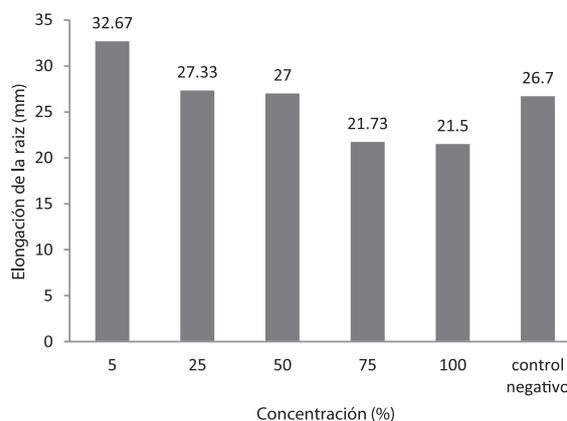


Figura 3. Elongación de las raíces de *Allium cepa* en la Muestra 3: Máquina de riego 2, Conyedo a las concentraciones estudiadas.

La Tabla 4 muestra valores del porcentaje de inhibición, donde se pueden apreciar valores negativos, estos significan aumento del desarrollo radicular respecto al control negativo en lugar de decrecimiento. En todas las muestras evaluadas se observó inhibición del desarrollo radicular de los bulbos de *A. cepa*, pero ningún valor determinado del porcentaje de inhibición fue mayor del 50 %, por tanto, no fue posible calcular la concentración inhibitoria media (CI_{50}).

Tabla 4. Porcentaje de inhibición del desarrollo radicular medido para bulbos de *Allium cepa* en las diferentes concentraciones. Muestra 1: Presa Arroyo Grande II, UEB Albarrán. Muestra 2: Máquina de riego 1, Conyedo. Muestra 3: Máquina de riego 2, Conyedo.

Concentración (%)	% de inhibición		
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
100	15,73	15,73	19,47
75	13,22	12,73	17,60
50	4,49	- 3,63	- 1,12
25	-22,09	- 11,72	- 2,36
5	-27,94	- 22,96	- 22,47

Otros parámetros macroscópicos como: cambio de coloración, formación de tumoraciones, necrosis radicular, cambio en la forma de las raíces, quebradizas o

forma de ganchos, no fueron observadas para ninguna de las muestras estudiadas (Figura 4. A, B y C).



Figura 4. Aspecto macroscópico de las raíces de *Allium cepa* L. a 72 h de exposición. De derecha a izquierda 5, 25, 50, 75 y 100%. A. Muestra 1. Presa Arroyo Grande II, UEB Albarrán. B. Muestra 2. Máquina de riego 1, Conyedo. C. Muestra 3. Máquina de riego 2, Conyedo.

DISCUSIÓN

Es evidente que toda sustancia química puede involucrar peligros a la salud, a la seguridad de los seres vivos y al ambiente, si alcanza una concentración dada y la exposición se prolonga el tiempo suficiente para que ejerza sus efectos (Ronco *et al.*, 2004). Cuando los residuos entran al ambiente pueden ser ingeridos y retenidos en altas concentraciones por los organismos, ocasionándoles serios trastornos, incluso la muerte. Cuando estas concentraciones son bajas causan efectos subletales, como la reducción del tiempo de vida de ciertas especies, incremento de la susceptibilidad a enfermedades y efectos mutagénicos (Adriana *et al.*, 2012) Teniendo en cuenta todo lo anterior, se discuten los resultados obtenidos en la evaluación de la calidad de las aguas utilizadas para regadío en el “Valle del Yabú”.

Los valores microbiológicos obtenidos muestran valores de coliformes totales, entre los que podrían encontrarse bacterias del grupo coliforme de los géneros *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella* y *Enterobacter* pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae, $>1,6 \times 10^3$ NMP·100 mL⁻¹, valor que en opinión de los autores es considerablemente mayor incluso superando el valor máximo especificado en la normativa NC 27:2012, porque la determinación del NMP·100 mL⁻¹ se realizó por la serie de 15 tubos con sólo 3 diluciones y es el máximo valor que se obtiene bajo el método especificado. Los coliformes termotolerantes, subgrupo de las bacterias del grupo coliforme siendo *Escherichia coli* el principal representante, mostraron valores $>1,6 \times 10^3$ NMP·100 mL⁻¹. Los valores de los indicadores de calidad microbiológica determinados, son superiores a los permisibles para un cuerpo receptor “Clase B”, los cuales están fijados en un valor de 5×10^3 NMP·100 mL⁻¹ y 1×10^3 NMP·100 mL⁻¹, respectivamente;

o sea, en este aspecto las aguas en estudio no cumplen con las regulaciones establecidas según la norma de referencia.

Como se observa en la tabla 5 los resultados de los indicadores microbiológicos $>1,6 \times 10^3$ NMP·100 mL⁻¹ para los tres puntos de muestreo, son superiores a los que establecen las normativas cubanas vigentes NC 1021:2014 y NC 827: 2010. Este comportamiento coincide con un estudio realizado en Arroyo Grande II, donde la presencia de coliformes totales y termotolerantes fue similar (DPRH, 2016). Sin embargo en estudio realizado por Peñate (2006), se registró que en el mismo sitio de estudio la presencia de coliformes totales fue $> 4,6 \times 10^3$ NMP·100 mL⁻¹, pero no se detectaron coliformes termotolerantes. Llama la atención que década atrás no se detectó presencia de coliformes termotolerantes, pero los valores encontrados actualmente son un indicador de que la contaminación ha variado en su composición y en altas concentraciones en los últimos años.

Haciendo referencia a las Directrices de la OMS sobre calidad parasitológica y microbiológica de aguas residuales para uso en agricultura que establece 1×10^3 NMP·100 mL⁻¹, la concentración en los tres puntos de monitoreo también supera el valor máximo permitido. Investigaciones realizadas sobre la capacidad auto-depuradora de este sistema, permiten suponer que es un sistema ecológico bien estabilizado; sin embargo el reúso de ésta agua en el riego constituye un peligro sanitario, ya que afecta la calidad bacteriológica de las fuentes de abasto cercanas, así como consecuencias negativas para la salud humana (DPRH, 2016).

Estos resultados permiten inferir que las aguas, embalsadas en Arroyo Grande II y las de las máquinas de riego 1 y 2, se evalúan de No aptas desde el punto de vista

microbiológico para el riego agrícola de cultivos y vegetales que se consumen de forma directa sin cocción, dado que el contenido de coliformes totales y termotolerantes están por encima del LMA en las referidas normas técnicas. Sin embargo, se evalúan de Aptas para el riego exclusivo de viandas y granos, siempre y cuando sean alimentos que requieran cocción en su elaboración.

Los resultados de los análisis muestran concentraciones ligeramente elevadas de nitrito, y similar comportamiento se observa respecto al contenido de amoníaco que también excede en todos los casos cuando se comparan con las normativas cubanas vigentes 827:2010 y 1021:2014, cuyo LMA es de $0,01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y No presencia. En un estudio realizado por Angulo (2015) sobre diagnóstico de la ecotoxicidad de Afluentes del Río Guadalquivir, concluyen que los valores obtenidos de nitrito y amoníaco exceden los LMA establecidos por las normativas de su país, mientras que en la presente investigación, tiene valores entre $0,02 - 0,06 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y $0,14 - 0,38 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

Al comparar los valores de los parámetros químicos se observó que la muestra 1, mostró valores superiores en comparación con las otras dos. Es conocido que Arroyo Grande II, recibe vertimientos de residuales con elevada carga orgánica, de forma permanente fundamentalmente domésticos e industriales, sin tratamiento o con un tratamiento deficiente, procedente de la ciudad de Santa Clara. Este comportamiento coincide con el informe presentado por (Nelson *et al.*, 2009) en el que refiere que la presencia de estos elementos en el agua debe considerarse como un indicio fundamental de contaminación reciente.

El amoníaco se produce naturalmente por descomposición de la materia orgánica y también se fabrica industrialmente, El amoníaco a temperatura ambiente, es un gas incoloro de olor muy penetrante y nauseabundo. Se disuelve fácilmente en el agua y se evapora rápidamente, en disolución acuosa se puede comportar como una base y formarse el ion amonio NH_4^+ . En estudios previos realizados en Colombia se afirmó que los niveles altos de nitrito en el agua pueden ser causados, bien como consecuencia de la oxidación del amoníaco o por la reducción microbiana o no de los nitratos. Según la OMS (2007) cuando el amoníaco está presente en el agua significa que la misma está contaminada con aguas residuales o desechos de zonas ganaderas.

El nitrito es isoeléctricamente similar al oxígeno, si la concentración de nitritos en los fluidos corporales es muy alta, los nitritos ocupan el lugar del oxígeno en la hemoglobina y bajo ciertas circunstancias se puede presentar una condición de anoxia. Esto ocurre cuando

una persona ingiere altas cantidades de nitrito y por su metabolismo es susceptible a esta condición, puede morir por asfixia (Sardiñas *et al.*, 2008).

En la evaluación de la contaminación acuática, los bioensayos de toxicidad son necesarios, debido a que las pruebas fisicoquímicas no resultan suficientes para la valoración de los potenciales efectos sobre los organismos en diferentes ecosistemas, no siendo posible determinar, por ejemplo, la interacción de los factores químicos y los efectos tóxicos de los contaminantes. Por lo tanto, un ensayo de toxicidad es una herramienta complementaria que permite detectar y evaluar la capacidad inherente de un agente de producir efectos tóxicos sobre organismos vivos utilizando especies de prueba (Barceló & Alda, 2008; Çavuşoğlu *et al.*, 2011).

El ensayo de toxicidad en *A. cepa*, es una de las alternativas para determinar los estándares de calidad del agua, se basa en la identificación y cuantificación de cualquier afectación microscópica: daño microscópico y macroscópica: inhibición del crecimiento radicular, que puede producir un compuesto químico dado o una mezcla compleja, cuyos componentes no necesariamente tienen que ser conocidos (Çavuşoğlu *et al.*, 2011; Cabuga Jr *et al.*, 2017). Esta afectación ocasionada se utiliza para indicar el estatus tóxico de la muestra probada (Roa *et al.*, 2012; Cabuga Jr *et al.*, 2017). Por otra parte, es de fácil y rápido desarrollo por lo que es posible realizar la prueba en pocos días y puede emplearse como centinela de contaminantes (Çavuşoğlu *et al.*, 2011; Restrepo-Manrique *et al.*, 2011). Este bioensayo de toxicidad ha sido recomendado y aplicado por diferentes organismos de protección ambiental para la evaluación ecotoxicológica de muestras ambientales y compuestos puros, además de la evaluación del efecto fitotóxico de plaguicidas sobre especies no blanco, necesarios para el registro de estos compuestos (Çavuşoğlu *et al.*, 2011; Restrepo-Manrique *et al.*, 2011).

Debe señalarse que en el ensayo de toxicidad de corta duración de 72 h de exposición al comparar la longitud promedio de elongación de las raíces, en cada una de las muestras tratadas, se encontraron diferencias significativas.

Es importante destacar que en los tres puntos de muestreo, el comportamiento, en lo que a inhibición de la elongación radicular se refiere, fue según lo previsto. Las muestras de agua correspondientes al punto 1 provocaron estimulación del crecimiento de las raíces de *A. cepa*, hasta la concentración 25 %, a partir de la cual se observó inhibición. Las muestras de agua de los puntos 2 y 3 por

su parte, indujeron una estimulación del crecimiento de las raíces hasta 50 % y se observó inhibición a partir de éste. Para todos los casos el efecto inhibitorio más relevante se evidenció a las concentraciones de 75 % y 100 %. De lo anteriormente expuesto se deduce que para el bioensayo de *A. cepa*, las muestras de agua analizadas son fitotóxicas a concentraciones superiores al 25 % en el caso del punto 1, mientras que las muestras correspondientes a los puntos 2 y 3 manifestaron su fitotoxicidad a partir del 75 %.

El ensayo utilizado es de toxicidad de corta duración por lo que en ensayos de toxicidad subcrónicos y crónica pudieran obtenerse otros resultados (Radić *et al.*, 2010; Braga & López, 2014; Cabuga Jr *et al.*, 2017). Una sustancia con propiedades toxicas puede serlo para un tipo de organismo pero no para otro, dependiendo con que compuestos de la célula interactúa, por ello, se considera que tres es el mínimo de especies con las que se debe evaluar la toxicidad de una muestra (Alegre *et al.*, 2018). En la presente investigación sólo se usó una especie por lo que se recomienda realizar bioensayos incluyendo especies de otros niveles tróficos.

También resalta que la muestra 1 a pesar de presentar inhibición a partir del 50 %, de igual forma presentó mayor promedio de elongación de sus raíces en las concentraciones de 25 % y 5 % al comparar con las otras muestras. En relación con lo anteriormente planteado este comportamiento se debe a la incorporación permanente que recibe, éste punto, de aguas residuales por lo que el efecto de los nutrientes disueltos en el agua, enmascaran el efecto de los contaminantes fitotóxicos presentes en su composición y cuyo efecto se hace evidente al disminuir la carga orgánica por el proceso de la dilución. Sin embargo, ninguno de los valores por sí solo podría explicar el comportamiento complejo de los resultados de los bioensayos, sino que más bien debe entenderse como una serie de procesos toxicocinéticos que involucran reacciones de sinergia, en los que se potencian los efectos individuales y antagonismos en los que ocurre lo contrario, el efecto individual es modificado por los efectos de los otros tóxicos presentes que pudieran no ser detectados por este bioensayo (Gaete *et al.*, 2003).

Fiskesjö (1995) indica que cuando un bulbo de cebolla (*A. cepa*) se rehidrata se produce una estimulación del crecimiento de las células, lo cual permite la elongación de las raíces de la planta (Restrepo-Manrique *et al.*, 2011; Braga & López, 2014). Sin embargo, cuando la hidratación se lleva a cabo en presencia de sustancias tóxicas, la división celular de los meristemos radiculares puede inhibirse, ya sea retardando el proceso de mitosis

o destruyendo las células (Restrepo-Manrique *et al.*, 2011; Arya & Mukherjee, 2014; Firbas & Amon, 2014; Babatunde & Anabuikie, 2015). Este tipo de alteraciones generalmente impide el crecimiento normal de la raíz, y por tanto su elongación (Arya & Mukherjee, 2014; Onwuamah *et al.*, 2014). Otros autores han mostrado en la literatura que el *A. cepa*, es una herramienta que no solo permite evaluar la toxicidad, también la mutagenicidad, genotoxicidad y citotoxicidad en efluentes reconocidos por estas características (Castillo, 2004; Arya & Mukherjee, 2014; Firbas & Amon, 2014; Babatunde & Anabuikie, 2015).

La actividad tóxica, ya sea directamente o indirectamente, a través de la interferencia con el equilibrio de las comunidades naturales (Braga & López, 2014), puede llegar a representar incluso, en determinadas circunstancias, un riesgo relevante para las poblaciones humanas.

A la vista de los resultados presentados, podemos comentar que los mismos, aportan varios elementos significativos, el primero de ellos es que aún con concentraciones de especies químicas consideradas fuera de los LMA, en las muestras estudiadas, según las normas de referencias, también se detectaron efectos fitotóxicos en *A. cepa* por lo que la sensibilidad de este ensayo es lo suficientemente alta para identificar la toxicidad de las aguas evaluadas (Restrepo-Manrique *et al.*, 2011; Klauck *et al.*, 2013; Pathiratne *et al.*, 2015; Cabuga Jr *et al.*, 2017; Lerda, 2017). Los resultados obtenidos pueden ser extrapolados a otras especies, incluso el hombre, pues este ensayo se ha comparado con otros sistemas obteniéndose resultados similares (Fiskesjö, 1995). El segundo elemento a tener en cuenta es la factibilidad de acoplar al ensayo determinaciones químicas y microbiológicas para una caracterización ambiental más integral, brindándose así una información importantísima para la gestión de aguas residuales utilizadas para regadío.

Teniendo en cuenta que las aguas investigadas, son empleadas en el riego agrícola en el Valle del Yabú, debemos señalar que los indicadores hasta aquí obtenidos, demuestran que estas aguas tienen mala calidad según la NC 27:2012 y afectan la elongación radicular. Información que también debe ser considerada por las autoridades sanitarias y el Ministerio de la Agricultura (MINAG).

Se concluye, que las aguas utilizadas en el Valle del Yabú no son aptas para el riego agrícola, desde el punto de vista sanitario, en especial donde existan cultivos que se consuman crudos. Las aguas utilizadas para el riego en dicho valle muestran valores de amoníaco y nitrato

superiores a los LMA en las normas de referencia y en el ensayo de toxicidad en *A. cepa*, las muestras de agua analizadas son fitotóxicas a concentraciones superiores al 25 % en el caso del punto 1, mientras que las muestras correspondientes a los puntos 2 y 3 manifiestan su fitotoxicidad a partir del 75 %.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta, L.G. 2016. *Cálculo de la Huella Hídrica en Cultivo de Papa en la Empresa Cultivos Varios Horquita*. In: Facultad de Ciencias Económicas y Empresariales. Cuba: Universidad Carlos Rafael Rodríguez. Cienfuegos, pp. 135.
- Adriana, M.J.G.; Soto, M.; Usma, J.I. & Gutiérrez, O.D. 2012. Contaminantes emergentes en aguas, efectos y posibles tratamientos, *Producción + Limpia*, 7: 52-73.
- Agostinho, A.A.; Pelicice, F.M.; Gomes, L.C. & Júlio, H.F. 2010. Estocagem de peixes: quando um mais um pode ser menos que dois. *Boletim Sociedade Brasileira de Ictiologia*, 100: 49-53.
- Alegre, A.; Bonifaz, E.; Lee, S.E.; Alvaríño, L. & Iannacone, J. 2018. Monitoreo ecotoxicológico de una cuenca en Huancavélica, Perú afectada por metales pesados. *REDVET Rev. Electrón. vet*, 19 N° 5 - <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n050518.html> leído el 20 diciembre del 2018.
- Alonso, L.P. 2017. *Ciudades y comunidades sostenibles: retos para los ayuntamientos españoles en el cumplimiento de los objetivos de desarrollo sostenible de las naciones unidas para el año 2030*. Instituto Pascual Madoz. 44 p.
- Andrioli, N.B.; Wulff, A.F. & Mudry, M.D. 2006. *Allium cepa* como biomonitor de toxicidad y genotoxicidad de metronidazol. *Theoria*, 15: 9-16.
- Angulo, R. 2015. Estudio diagnóstico de la ecotoxicidad de afluentes del Río Guadalquivir, en el área comprendida entre Las Tipas y El Angosto de San Luis, *Acta Nova*, 7: 28-46.
- APHA (American Public Health Association). 1985. *Standard methods for examinations of water and waster water*. USA. APHA, AWW, WPCF. p. 374, p. 379, p. 404.
- Arkipchuk, V.; Romanenko, V.D.; Malinovskaya, M.L.S.; Solomatina, L.K.V. & Krot, Y. 2000. Toxicity assessment of water samples with a set of animal and plant bioassays: Experience of the Ukrainian participation in the watertox program. *Environmental Toxicology*, 15: 277-286.
- Arya, S.K. & Mukherjee, A. 2014. Sensitivity of *Allium cepa* and *Vicia faba* towards cadmium toxicity. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 14: 447-458.
- Barceló, L.D. & Alda, M.J.L. 2008. *Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes*. Instituto de Investigaciones Químicas y Ambientales-CSIC (Barcelona).
- Babatunde, B. & Anabuiké, F. 2015. *In vivo* cytogenotoxicity of electronic waste leachate from Iloabuchi electronic market, Diobu, Rivers State, Nigeria on *Allium cepa*. *Challenges*, 6: 173-187.
- Braga, J.R.M. & Lopes, D.M. 2014. Citotoxicidade e genotoxicidade da água do rio Subaé (Humildes, Bahia, Brasil) usando *Allium cepa* L. como bioindicador. *Ambiente & Água - An Interdisciplinary Journal of Applied Science*, 10: 130-140.
- Cabuga Jr., C.C.; Abelada, J.J.Z.; Apostado, R.R.Q.; Hernando, B.J.H.; Lador, J.E.C.; Owen Obenza, O.L.P.; Presilda, C.J.R. & Havana, H.C. 2017. *Allium cepa* test: An evaluation of genotoxicity. *Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences*, 7: 12-19.
- Calvo, M.D. 2016. *Tratamiento avanzado de aguas residuales para riego mediante oxidación con ozono: una alternativa ecológica*. Bogota colombia: Universidad Nacional de Colombia, pp. 10-12.
- Castillo, G. 2004. *Ensayo de toxicidad y método de evaluación de calidad de aguas*. Instituto mexicano de Tecnología de Agua. Canada: Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo.
- Castro, Í.B.; Iannacone, J.; Santos, S. & Fillmann, G. 2018. TBT is still a matter of concern in Peru. *Chemosphere*, 205: 253-259.

- Çavuşoğlu, K.; Yalçın, E.; Türkmen, Z.; Yapar, K.; Çavuşoğlu, K. & Çiçek, F. 2011. Investigation of toxic effects of the Glyphosate on *Allium cepa*. *Journal of Agricultural Sciences*, 17: 131-142.
- Cepero, R.O. 2012. El cambio climático: su efecto sobre enfermedades infecciosas. *REDVET*, 13(05B). Disponible en: <http://www.veterinaria.org/>
- Ciappina, A.L.; Ferreira, F.A.; Pereira, I.R.; Sousa, T.R.; Matos, F.S.; Melo-Reis, P.R.; Gonçalves, P.J.; Bailão, E.F.L.C. & Almeida, L.M. 2017. Toxicity of *Jatropha curcas* l. latex in *Allium cepa* test. *Bioscience Journal*, Uberlândia, 33: 1295-1304
- Cordón, M.R.A.; Chacón, E.A.V. & Álvarez, N.G. 2016. Aplicación del índice de calidad del Agua (ICA): Caso de estudio: Lago de Izabal, Guatemala. *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias*, 25: 39-43.
- Diéguez, F.L.; Vázquez, C.R.; Mentor, S.V.; Díaz, M.I. & Fimia, D.R. 2012. Culícidos de relevancia médico veterinaria presentes en criaderos naturales de tres áreas de Camagüey, Cuba. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 64: 134-137.
- DPRH. 2016. *Informe Técnico Sobre la evaluación de la calidad del agua del sistema hidráulico Arroyo Grande I y II para su uso en el riego agrícola del Valle de Yabú.*
- Firbas, P. & Amon, T. 2014. Chromosome damage studies in the onion plant *Allium cepa* L., *Caryologia*, 67: 25-35.
- Fiskesjö, G. 1985. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas*, 102: 99-112.
- Forget, G.; Ganon, P.; Sánchez, W. & Dutka, B. 2000. Overview of methods and results of the eight country. International Development Research Center (IDRC) WaterTox project. *Environmental Toxicology*, 15: 264-276.
- Gaete, H.; Soto, E.; Troncoso, L.; Bay-Schmidt, E.; Larrain, A. & Riveros, S. A. 2003. Efecto combinado y riesgo ecológico de las concentraciones de Zn, Cu y Cr presente en el Puerto de San Vicente, Chile. *Gayana Oceanológica*, 4: 99-107.
- Gómez, L.M. & Ramírez, Z. 2004. Microalgas como biomonitores de contaminación. *Revista Cubana de Química*, 16: 34-48.
- Klauck, C.R.; Rodrigues, M.A.S. & da Silva, L.B.. 2013. toxicological evaluation of landfill leachate using plant (*Allium cepa*) and fish (*Leporinus obtusidens*) bioassays. *Waste Management & Research*, 31: 1148-1153.
- Lerda, D. 2017. The Effects of Tartrazine in *Allium cepa* L. *Journal of Food and Nutrition*, 3: 1-5.
- Lorenzo, E.V.; Ocaña, J.G.L.; Fernández, L.A. & Venta, M.B. 2009. Reuso de aguas residuales domésticas para riego agrícola. *Valoración crítica. Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 40: 1-10.
- Macan, K. 2007. Water resources and waste water management in Bosnia and Herzegovina, Croatia and the State Union of Serbia and Montenegro. *Water Policy*, 9: 319-343.
- Maria, F. & Abad, C. 2015. *Factores que modifican la toxicidad.* Instituto Teófilo Hernando Departamento de Farmacología.
- Murray, K.E.; Thomas, S.M. & Bodour, A. 2010. Prioritizing research for trace pollutants and emerging contaminants in the freshwater environment. *Science of the Total Environment*, 158: 3462-3471.
- NORMA CUBANA NC. 827. 2010. *Norma cubana. Obligatoria agua potable requisitos sanitarios.* Oficina Nacional de Normalización (ONN). La Habana. Cuban National Bureau of Standards. pp. 1-11.
- NORMA CUBANA NC. 27. 2012. Vertimiento de aguas residuales a las aguas terrestres y al alcantarillado — especificaciones. 2. Ed. Oct. 2012. pp. 1-13
- NORMA CUBANA NC. 1048. 2014. Calidad del agua para preservar el suelo — especificaciones. 1. Edición Nov. 2014. pp. 2-14.
- NORMA CUBANA NC. 1021. 2014. *Norma cubana. Fuentes de abastecimiento de agua. Calidad y protección sanitaria.* Oficina Nacional de Normalización (ONN). La Habana. Cuban National Bureau of Standards. pp. 1-14.
- Nelson, R.; Rivera, F.E.; Francisco, E.; Rodrigo, P. & Patricia, M. 2009. *La Calidad de las Aguas en el Curso Superior y Medio del Río Traiguén. IX Región-Chile.* Universidad Católica de Temuco,

- Facultad de Recursos Naturales, Escuela de Ciencias Ambientales.
- Onwuamah, C.K.; Ekama, S.O.; Audu, R.A.; Ezechi, O.C.; Poirier, M.C. & Odeigah, P.G.C. 2014. Exposure of *Allium cepa* root cells to Zidovudine or Nevirapine induces cytogenotoxic Changes. PLoS ONE, 9(3): e90296.
- Pathiratne, A.; Hemachandra, C.K. & De Silva, N. 2015. Efficacy of *Allium cepa* test system for screening cytotoxicity and genotoxicity of industrial effluents originated from different industrial activities. Environmental Monitoring and Assessment, 187: 730.
- Peñate, J. 2005. Contaminación de las aguas superficiales de la cuenca del Río Sagua la Grande. Revista Voluntad Hidráulica, 97: 23-29.
- Peñate, J. 2006. *Riesgos y consecuencias ambientales a los suelos y las aguas subterráneas por el uso del agua residual generada en la Ciudad de Santa Clara*. En: Química y Farmacia. Cuba: Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas. pp. 99.
- Radić, S.; Stipančič, D.; Vujčić, V.; Rajčić, M.M. 2010. The evaluation of surface and wastewater genotoxicity using the *Allium cepa* test. Science of the Total Environment, 408: 1228–1233
- Restrepo-Manrique, R.; Ortiz Villamizar, M.C. & Quesada, D.R. 2011. Pruebas de ecotoxicidad para establecer el potencial genotóxico del hipoclorito de sodio, mediante bulbos de cebolla *Allium cepa* L y semillas de lechuga *Lactuca sativa* L como bioindicadores. Iteckne, 8: 7-14.
- Roa, O.; Yeber, MC. & Venegas, W. 2012. Genotoxicity and toxicity evaluations of ECF cellulose bleaching effluents using the *Allium cepa* L. Test. Brazilian Journal of Biology, 72: 471-477.
- Robles, J.E.A. & García, E.F.M. 2012. Crecimiento de cebolla (*Allium cepa* L.) var. "Roja Arequipena" en función de la fertilización NxK. Scientia Agropecuaria, 1: 7-14.
- Rodríguez, J.M.; Cepero, O. & Rodríguez, A. 2006. Vigilancia y control en criaderos temporales y permanentes de culícidos en Villa Clara. REDVET, 7:12-16. Disponible en: <http://www.veterinaria.org/>
- Ronco, A.; Díaz, M.C. & Pica, Y. 2004. *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones*. México: pp. 17-22.
- Sánchez, A.D.; Viviana, B.; Graciela, E.R. & Sosa, M.C. 2015. Biocontrol con *Trichoderma spp.* de *Fusarium oxysporum* causal del "mal de almácigos" en pre y post emergencia en cebol. Revista de la Facultad de Agronomía, La Plata, 114: 61-70.
- Sardiñas, O.; García, M.; Castillo, I. & Fernández, M. 2008. Evaluación físico-química del agua de depósitos positivos a focos de *Aedes aegypti*. Revista Cubana de Higiene y Epidemiología, 2: 46-51.
- Seid, E.; Guabloche, A.; Tuesta, E.; Iannacone, J. & Castro, I.B. 2019. Imposex responses in *Thaisella chocolata* and *Xanthochorus buxeus* from Callao harbor, Peru. Regional Studies in Marine Science, 26: 100510.
- Smital, T. 2008. Acute and chronic effects of emerging contaminants. In: Emerging contaminants from industrial and municipal waste: occurrence. Analysis and effects, 5: 105-142.
- Tomailla, J. & Iannacone, J. 2018. Toxicidad letal y subletal del arsénico, cadmio, mercurio y plomo sobre el pez *Parachanna innesi* neon tetra (Characidae). Revista de Toxicología, 35: 95-105.
- UNESCO-WWAP & OMS. 2015. *Water for people, water for life*. Paris, France: UNESCO/Mundi-Prensa Libros. pp. 24-34.
- Veliz, J.I.Y.D.; Gonzalez, A.B.; Rodriguez, Y.S., Jiménez, M.R. & Castellanos, L.M. 2012. *Ordenamiento y Gestión ambiental de los ríos Bélico y Cubanicy en la ciudad de Santa Clara*. Delegación Provincial de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente. Unidad de Ciencia y Tecnología, Cuba: Centro de Estudios y Servicios ambientales de Villa Clara (CESAM), pp. 1- 51.

Received March 11, 2019.

Accepted May 1, 2019.