



**Universidad Michoacana
de San Nicolás de Hidalgo**



**Facultad de Químico
Farmacobiología**

TESIS

Evaluación de la fitotoxicidad de un lixiviado de Relleno Sanitario sobre *Phaseolus vulgaris* L (frijol)

PRESENTA:

Vanessa Ruby Garcia Ortiz

Para obtener el título de
Química farmacobióloga

Asesor: Doctor en Ciencias especialidad en Microbiología
Juan Manuel Sánchez Yáñez
Laboratorio de Microbiología Ambiental
Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas

Morelia, Michoacán. Septiembre 2014

RECONOCIMIENTO



**Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
Coordinación de la Investigación Científica
Instituto de Investigaciones Químico Biológicas
Laboratorio de Microbiología Ambiental**

Esta investigación fue financiada por el proyecto 2.7 (2014) de la Coordinación de la Investigación Científica perteneciente a la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en el Laboratorio de Microbiología Ambiental del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, bajo la dirección del **Dr. Juan Manuel Sánchez-Yáñez**.



“Tesis apoyada por el Consejo Estatal de Ciencia, Tecnología e innovación del Estado de Michoacán” con folio: 1021

	Acrónimo	Significado
1	AEAM	Agar eosina azul de metileno
2	AN	Agar nutritivo
3	APA	Agua peptonada alcalina
4	As	Arsénico
5	ATCBS	Agar-Tiosulfato-citrato-sales biliares-sacarosa
6	CA	Control Absoluto
7	CBVB 2%	Caldo bilis verde brillante 2%
8	Cr	Cromo
9	CR	Control Relativo
10	Cu	Cobre
11	DBO ₅	Demanda bioquímica de oxígeno
12	DQO	Demanda química de oxígeno
13	Fe	Hierro
14	FO	Fracción orgánica
15	ICL	Índice de contaminación de Lixiviado
16	LX	Lixiviado
17	NH ₄ ⁺	Amonio
18	NMP	Número más probable
19	Pb	Plomo
20	PCAT	<i>Pseudomona cepacia</i> acida azaleico y tryptamina

21	PFA	Peso fresco aéreo
22	PFR	Peso fresco radical
23	PSA	Peso seco aéreo
24	PSR	Peso seco radical
25	RESA	Relleno sanitario
26	RSU	Residuos sólidos urbanos
27	Zn	Zinc

ÍNDICE

1. Introducción.....	1
2. Antecedentes	2
3. Justificación	5
4. Hipótesis	5
5. Objetivo general	5
5.1. Objetivos específicos.....	5
6. Material y métodos	5
6.1 Bioensayo de fitotoxicidad del lixiviado de Toluca en <i>Phaseolus vulgaris</i> L con cajas de Petri.....	6
6.1.1 Obtención del lixiviado del relleno sanitario de Toluca estado de México.....	6
6.1.2 Desinfección de semillas de <i>Phaseolus vulgaris</i> L.....	7
6.1.3 Siembra de semillas de <i>Phaseolus vulgaris</i> L en cajas Petri.....	7
6.1.4 Evaluación de las variables respuesta de <i>Phaseolus vulgaris</i> L.....	8
6.2 Bioensayo de fitotoxicidad de lixiviado de Toluca en <i>Phaseolus vulgaris</i> L. (frijol) en jarras de Leonard.....	9
6.2.1 Preparación de jarras de Leonard para el bioensayo de fitotoxicidad en <i>Phaseolus vulgaris</i> L.....	10
6.2.2 Siembra de semillas de <i>Phaseolus vulgaris</i> L en jarras de Leonard.....	11
6.3 Análisis microbiológico del lixiviado de Toluca.....	13
7. Resultados y discusión.....	14
7.1 Caracterización fisicoquímica del lixiviado de Toluca.....	14
7.2 Efecto fitotóxico del lixiviado de Toluca en la germinación de <i>Phaseolus</i> <i>vulgaris</i> L. (frijol) variedades: Bayo, flor de Junio, Negro y Peruano	15

7.2.1	Efecto fitotóxico del lixiviado de Toluca en la fenotipia y biomasa de <i>Phaseolus vulgaris</i> L var. Flor de Junio.....	16
7.2.2	Efecto fitotóxico del lixiviado de Toluca en la fenotipia y biomasa de <i>Phaseolus vulgaris</i> L var. Bayo.....	18
7.2.3	Efecto fitotóxico del lixiviado en la fenotipia y biomasa de <i>Phaseolus vulgaris</i> L var. Negro.....	19
7.2.4	Efecto fitotóxico del lixiviado en la fenotipia y biomasa de <i>Phaseolus vulgaris</i> L var. Peruano.....	21
7.3	Efecto fitotóxico del lixiviado de Toluca en <i>Phaseolus vulgaris</i> L. (frijol) var. Flor de Junio a plántula y floración.....	22
7.3.1	Efecto fitotóxico del lixiviado en la fenotipia y biomasa de <i>Phaseolus vulgaris</i> L en su fase de plántula.....	22
7.3.2	Efecto fitotóxico del lixiviado en la fenotipia y biomasa de <i>Phaseolus vulgaris</i> L en su fase de floración.....	23
7.4	Análisis microbiológico del lixiviado de Toluca.....	24
8.	Conclusión.....	25
9.	Bibliografía.....	26

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	Diseño experimental para determinar la fitotoxicidad del lixiviado de Toluca en <i>Phaseolus vulgaris</i> L. (frijol)	6
Cuadro 2.	Diseño experimental para la fitotoxicidad del lixiviado en <i>Phaseolus vulgaris</i> L. (frijol) en jarras de Leonard a plántula y floración.....	10
Cuadro 3.	Caracterización fisicoquímica del lixiviado de Toluca, estado de México.....	15
Cuadro 4.	Efecto del lixiviado de Toluca en el porcentaje (%) de germinación de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. (frijol) var: Bayo Flor de Junio Negro y Peruano.....	16

Cuadro 5. Efecto del lixiviado de Toluca en la fenotipia y biomasa de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. (frijol) var. Flor de Junio.....	17
Cuadro 6. Efecto del lixiviado de Toluca en la fenotipia y biomasa de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. (frijol) var. Bayo.....	18
Cuadro 7. Efecto del lixiviado de Toluca en la fenotipia y biomasa de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. (frijol) var. Negro.....	20
Cuadro 8. Efecto del lixiviado de Toluca en la fenotipia y biomasa de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. (frijol) var. Peruano.....	21
Cuadro 9. Efecto del lixiviado de Toluca en <i>Phaseolus vulgaris</i> L. (frijol) var. Flor de Junio a plántula.....	23
Cuadro 10. Efecto del lixiviado de Toluca a diferente concentración en <i>Phaseolus vulgaris</i> L. (frijol) var. Flor Junio a floración.....	23
Cuadro 11. Análisis microbiológico del lixiviado de Toluca.....	24

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Localización del Relleno Sanitario de Zinacantepec Edo de México, México.....	7
Figura 2. Diagrama de flujo del bioensayo de fitotoxicidad del lixiviado de Toluca en <i>Phaseolus vulgaris</i> L en caja Petri....	9
Figura 3. Jarra de Leonard.....	11
Figura 4. Diagrama de flujo del bioensayo de fitotoxicidad del lixiviado en <i>Phaseolus vulgaris</i> L con jarras de Leonard	12
Figura 5. Primordios tallo/raíz de <i>Phaseolus vulgaris</i> L var. Flor de Junio usado como control relativo alimentado con solución mineral.....	17

Figura 6. Efecto fitotóxico del lixiviado al 75% al inhibir la germinación de <i>Phaseolus vulgaris</i> L var. Flor de Junio	17
Figura 7. Primordios tallo/raíz de <i>Phaseolus vulgaris</i> L var. Bayo usado como control relativo alimentado con solución mineral.....	19
Figura 8. Efecto fitotóxico del lixiviado al 100% al inhibir la germinación en <i>Phaseolus vulgaris</i> L var. Bayo.....	19
Figura 9. Primordios tallo/raíz de <i>Phaseolus vulgaris</i> L var. Negro usado como control relativo alimentado con solución mineral.....	20
Figura 10. Efecto fitotóxico del lixiviado al 50% al deformar la raíz de <i>Phaseolus vulgaris</i> L var. Negro.....	20
Figura 11. Primordios tallo/raíz de <i>Phaseolus vulgaris</i> L var. Peruano usado como control absoluto.....	22
Figura 12. Efecto fitotóxico del lixiviado al 50% al inhibir la formación del primordio del tallo y la raíz <i>Phaseolus vulgaris</i> L var. Peruano.....	22

RESUMEN

Un relleno sanitario (RESA) es una obra de infraestructura para la disposición final de los residuos sólidos urbanos (RSU). En un RESA la fracción orgánica de los RSU se degrada anaeróbicamente con la formación de un líquido contaminante llamado lixiviado (LX). El objetivo de este trabajo fue analizar la fitotoxicidad de un LX de RESA en *Phaseolus vulgaris* L (frijol). Con un primer bioensayo en cajas de Petri con 4 variedades de *P. vulgaris*: Bayo, Flor de Junio, Negro y Peruano; se determinaron las variables respuesta: porcentaje de germinación, fenotipia y biomasa del primordio del tallo y raíz de *P. vulgaris*; así las semillas de *P. vulgaris* se trataron con un LX diluido al: 6.25, 12.5, 25, 50, 75 y 100% (v/v); mientras que *P. vulgaris* fue alimentado con una solución mineral como control relativo (CR); y *P. vulgaris* irrigado solo con agua como control absoluto (CA). Se realizó un segundo bioensayo en jarras de Leonard con *P. vulgaris* var. Flor de Junio, bajo un diseño experimental de bloques al azar donde *P. vulgaris* se trató con el LX diluido al: 25, 50, 75 y 100% (v/v); con *P. vulgaris* como CR; a nivel de plántula y floración; con las variables respuesta fenotipia: altura de planta, longitud de raíz y su biomasa: peso fresco aéreo y radical y peso seco aéreo y radical. Además se incluyó un análisis microbiológico para detectar la presencia de microorganismos de riesgo para la salud humana. Los datos experimentales se analizaron por Tukey con un valor de significancia $p < 0.05$. Los resultados del bioensayo en cajas Petri mostraron que el LX fue fitotóxico para *P. vulgaris*, lo que sugiere un efecto oligodinámico de los metales pesados Hierro (Fe), Plomo (Pb), Zinc (Zn) y Cobre (Cu) en el crecimiento del primordio de tallo y raíz de *P. vulgaris*. Mientras que los resultados del bioensayo en jarras de Leonard muestran que el efecto del LX fue proporcional al nivel de dilución del LX. Por tanto se sugiere que los metales

pesados en el LX también evitaron la supervivencia de los microorganismos de importancia sanitaria. Por lo que se concluye que el grado de toxicidad de un LX para *P. vulgaris* y microorganismos, depende de su concentración.

Palabras clave: Efecto oligodinámico, alcalinidad extrema, fisiología vegetal

ABSTRACT

A landfill is an infrastructure for disposing municipal solid waste (MSW). In landfill the organic fraction of MSW is anaerobically degraded generating a polluting liquid called leachate (LCH). The aim of this research was to analyze phytotoxicity of LCH from landfill in *Phaseolus vulgaris* L (bean). In that sense a bioassay in Petri dish with 4 beans varieties: Bayo, June Flower, Peruvian and Black; response variables used were: percentage of germination, phenotype and biomass of stem and root primordium of *P. vulgaris*. Seeds were treated with LCH diluted at: 6.25, 12.5, 25, 50, 75 and 100% (v/v) as relative control (RC) *P.vulgaris* was fed with mineral solution (RC); and as absolute control (AC) *P.vulgaris* was irrigated with water. A second bioassay was performed in Leonard jars with *P.vulgaris* var. June flower under an experimental randomized block design where *P.vulgaris* was treated with diluted LCH: 25, 50, 75 and 100% (v) and *P. vulgaris* as RC; at seedling and flowering level; using as response variables: plant height, root length and biomass: fresh aerial/root weight and dry aerial/root weight. Additionally microbiological analysis was included to detect human pathogen microorganisms. Experimental data were analyzed by Tukey with significance value $p < 0.05$. Results showed and suggested that at Petri bioassay and Leonard's jar LCH was phytotoxic for *P. vulgaris* growing, due to alkalinity and its heavy metals as well as: Iron (Fe), Lead (Pb), Zinc (Zn) and Copper (Cu), which also inhibit human pathogen microorganism. It is concluded that toxicity of LCH on *P. vulgaris* depends on its concentration.

Keywords: Oligodynamic effect, extreme alkalinity, plant physiology

1. Introducción

Los residuos sólidos urbanos (RSU) son desechos que resultan de la actividad doméstica y comercial (DOF, 2003). La disposición final adecuada de los RSU son los rellenos sanitarios (RESA), que son obras de infraestructura para controlar el impacto ambiental (NOM-083-SEMARNAT 2003). En un RESA la fracción orgánica (FO) de los RSU constituida: por carbohidratos 60%, proteínas 2.5% y lípidos 6% (Westlake, 1995), se degrada anaeróbicamente con la formación de un líquido llamado lixiviado (LX) (Colmenares y Santos, 2007). Un LX contiene elevadas concentraciones de materia orgánica, metales pesados y otros compuestos inorgánicos.

La no separación de los RSU, en especial de la FO causa que durante su descomposición se libere LX ácido que se combina agua de lluvia; así los ácidos débiles como: acético, láctico y fórmico disuelven los metales pesados tóxicos para el hombre y el ambiente (Sánchez-Yáñez *et al.*, 2006). Un LX de RESA se considera un residuo peligroso de acuerdo a la norma (NOM-052-SEMARNAT-2005), el riesgo que tiene un LX para el ambiente puede ser estimado mediante dos enfoques uno por su composición química y el otro basado en su toxicidad sobre una forma de vida animal y/o vegetal. Un ejemplo del tipo químico es el Índice de Contaminación de Lixiviado (ICL) herramienta que califica el potencial de contaminación de un LX, numéricamente del 5-100 (Kumar y Alappat 2005). La otra manera para establecer la toxicidad de un LX son los bioensayos que determinan los efectos contaminantes del LX incluso de aquellos no detectables por análisis químicos (Thomas *et al.*, 1986).

Otro aspecto de valor para establecer si un LX tendrá un impacto negativo en humanos o el ambiente, es la detección e identificación de microorganismos patógenos humanos oportunistas y entéricos; sin embargo normalmente en una caracterización de un LX rara vez se incluyen a pesar de que en el LX es posible encontrar desechos hospitalarios y de rastros que llegan al RESA constituyendo un riesgo para la salud humana (Flores-Tena *et al.*, 2007).

2. Antecedentes

Clement y Bouvet, 1993. Realizaron un bioensayo con *Lemna minor* L. (lenteja) para evaluar la fitotoxicidad de un LX de 17 RESA. Para ello seleccionaron 6 semillas de *L. minor* expuestas a 6 concentraciones de cada LX. Las variables respuesta usadas en este bioensayo fueron: la biomasa; y los parámetros fisicoquímicos del LX: demanda química de oxígeno (DQO), pH, alcalinidad, conductividad, sólidos en suspensión, amonio (NH_4^+), Hierro (Fe), Zinc (Zn) y Cobre (Cu). Los resultados mostraron la fitotoxicidad de los 17 lixiviados en *L. minor* fue debida a su salinidad, alcalinidad y elevada concentración de NH_4^+ .

Cheng y Chu, 2006. Realizaron un estudio de fitotoxicidad de un LX en la germinación y primordio de las semillas *Brassica chinensis* L. (col china) y *Lolium perenne* L. (ballica). Colocaron 20 semillas de cada especie en cajas de Petri con 5 ml de LX diluido. Contaron las semillas germinadas y se midió la longitud del primordio después de 4 días.

Los resultados mostraron un efecto fitotóxico del LX a concentración mayor al 10% en la germinación y primordio de tallo y raíz, en comparación con las mismas plantas utilizadas como CA irrigadas solo con agua.

Žaltauskaitė y Čypaitė, 2008. Evaluaron la fitotoxicidad de un LX de un RESA en la germinación de semillas y en plántulas de *Lactuca sativa* L. (lechuga) y *Lepidium sativum* L. (maztuerzo). Colocaron semillas de *L. sativa* y *L. sativum* en placas de Petri tratadas con LX diluido al 100, 50, 25, 12,5 y 6,25% y semillas irrigadas solo con agua como CA. Los resultados mostraron que el LX al 100% fue severamente fitotóxico para *L. sativa* y *L. sativum* ya que la germinación de las semillas de ambas disminuyó un 61% en *L. sativum* y un 72% en *L. sativa* en comparación con las semillas irrigadas con agua CA sin efecto fitotóxico. El LX también inhibió a nivel de plántula el crecimiento de la raíz hasta un 74.5% en *L. sativum* y un 86% en *L. sativa*.

Bialowiec y Randerson, 2010. Analizaron la fitotoxicidad del LX de un RESA en *Salix amigdalina* L. (sauce joven). Para ello diluyeron el LX: 6,25 12.5, 25, 50 y 100% y como CA *S.amigdalina* irrigado solo con agua. *S.amigdalina* se expuso a la gama de diluciones de LX con 2 regímenes diferentes: A) cortes de *S.amigdalina* colocados directamente en las diluciones de LX y B) cortes de *S.amigdalina* cultivados inicialmente en el agua durante 4 semanas, la que se sustituyó por las diluciones de LX.

Los resultados mostraron que el LX entre el 5.44% y 6.50% causó efecto fitotóxico en el régimen A mientras que el LX entre los intervalos 5,32 a 6,59 % causó un efecto fitotóxico ligeramente superior comparado con lo observado en *S.amigdalina* usado como

CA. El LX al 100% causó una fuerte fitotoxicidad en ambos regímenes con inhibición de su crecimiento en el régimen A, y necrosis en los tejidos vegetales de *S.amigdalina* del régimen B, lo que indica cierta tolerancia a elevadas concentraciones del LX si se tratan con diluciones de LX desde el principio. El LX al 50%, fue fitotóxico en *S.amigdalina* ya que solo 4 plantas supervivieron en el régimen A. Mientras que en el régimen B todas las plantas murieron.

Guerrero, 2014. Evaluó la fitotoxicidad de 2 lixiviados uno de Guanajuato (Gto) y otro de Toluca (Tol) en *Phaseolus vulgaris* L. (frijol). Para ello realizó dos bioensayos uno en caja de Petri donde determinó el efecto del LX sobre la germinación de sus semillas en el tallo y la raíz de *P.vulgaris*, ambos lixiviados se aplicaron diluidos al: 6.25, 12.5, 25, 50, 75 y 100% y como CA *P.vulgaris* irrigado solo con agua. En el segundo bioensayo se determinó el efecto de los 2 lixiviados al 25, 50, 75 y 100% a plántula, floración y madurez, con variables respuesta: porcentaje (%) de germinación, fenotipia, biomasa y rendimiento del grano. Los resultados indicaron que el LX al 25% de Gto por sus propiedades fisicoquímicas con un mayor ICL, fue más fitotóxico para *P.vulgaris* en su etapa de plántula, mientras que el LX de Tol a partir del 50% fue fitotóxico para *P. vulgaris*. Mientras en los resultados del segundo bioensayo mostraron que el LX de Gto y Tol causaron un efecto benéfico en *P. vulgaris* a plántula y floración en comparación con *P.vulgaris* usado como CA.

3. Justificación

Un bioensayo de fitotoxicidad con *P. vulgaris* puede dar certeza del grado de daño de un LX en una vida superior.

4. Hipótesis

Un LX en función del grado de dilución podría ser fitotóxico en el crecimiento de *P. vulgaris*.

5. Objetivo general

Analizar la fitotoxicidad de un lixiviado de relleno sanitario de Toluca en *Phaseolus vulgaris* L.

5.1 Objetivos específicos

- a) Evaluar el efecto tóxico del LX de Toluca en la germinación y primeros estadios de crecimiento de *P. vulgaris*
- b) Determinar el efecto tóxico del LX de Toluca sobre la fenotipia y biomasa de *P. vulgaris*.

6. Material y métodos

La investigación se realizó en el Laboratorio de Microbiología Ambiental del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

6.1 Bioensayo de fitotoxicidad del lixiviado de Toluca en *Phaseolus vulgaris* L. con cajas de Petri

En el cuadro 1 se muestra el diseño experimental para evaluar el efecto del LX para un bioensayo a nivel caja Petri; consistente en: 8 tratamientos para el *P.vulgaris* con 4 semillas por caja y 5 repeticiones.

Cuadro 1. Diseño experimental para determinar la fitotoxicidad del lixiviado de Toluca en *Phaseolus vulgaris* L. (frijol)

<i>P.vulgaris</i>		Lixiviado Toluca
Control absoluto (agua)		5 repeticiones
Control relativo (solución mineral)		
% Lixiviado	6.25	
	12.5	
	25	
	50	
	75	
	100	

6.1.1 Obtención del lixiviado de relleno sanitario de Toluca estado de México.

El LX fue proporcionado por el Instituto Tecnológico de Toluca del RESA en el municipio de Zinacantepec estado de México, México (figura 1) el cual está situado en el ejido de San Luis Mextepec en el km 11.5 de la carretera Toluca-Zitácuaro. Zinacantepec se localiza en la porción occidental del valle de Toluca a los 19°17'00" de latitud norte y a los 99°44'00" de longitud oeste del meridiano de Greenwich. Limita al norte, con Almoloya de Juárez; al sur con Texcaltitlán, al este con Toluca y Calimaya; al oeste con Temascaltepec y Amanalco de Becerra; al sureste con Villa Guerrero y Coatepec Harinas.



Figura 1. Localización del Relleno Sanitario de Zinacantepec, Edo de México, México

Del LX de Toluca se obtuvo una muestra simple de lixiviados de la descarga correspondiente a la fosa de la celda 1 del RESA mediante bombeo de la laguna en base a la norma (NMX-AA-003-1980).

6.1.2 Desinfección de semillas de *Phaseolus vulgaris* L.

El ensayo de fitotoxicidad se realizó en cajas Petri con semillas de *P. vulgaris*: Bayo, Flor de Junio, Negro y Peruano previamente desinfectadas con una solución de hipoclorito de sodio al 4%/10 min se enjuagaron con agua estéril 6 veces, se colocaron en etanol al 70%/10 min se enjuagaron 6 veces con agua estéril (Sánchez-Yáñez, 2007).

6.1.3 Siembra de semillas de *Phaseolus vulgaris* L en cajas Petri.

Se sembraron 4 semillas de *P. vulgaris* en cada caja Petri con una base de papel secante y algodón estéril (Žaltauskaitė y Čypaitė, 2008). Con *P. vulgaris* como CA irrigado solo

con agua, *P. vulgaris* como CR alimentado con una solución mineral y *P.vulgaris* con 10 mL de un LX diluido: 6.25, 12.5, 25, 75 y 100% de acuerdo a las recomendaciones de la (EPA, 2000), las cajas Petri con *P. vulgaris* se colocaron en oscuridad a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ con un régimen de 16:8 h luz: oscuridad durante un periodo de 120 h (Castillo, 2004).

6.1.4 Evaluación de las variables respuesta de *Phaseolus vulgaris* L.

Después de la germinación se midió la fenotipia del primordio de tallo y raíz: altura y longitud de *P. vulgaris* así como su biomasa: peso fresco aéreo (PFA) y radical (PFR); peso seco aéreo (PSA) y peso seco radical (PSR) (García-González *et al.*, 2005).

6.2 Bioensayo de fitotoxicidad del lixiviado de Toluca en *Phaseolus vulgaris* L. (frijol) en jarras de Leonard.

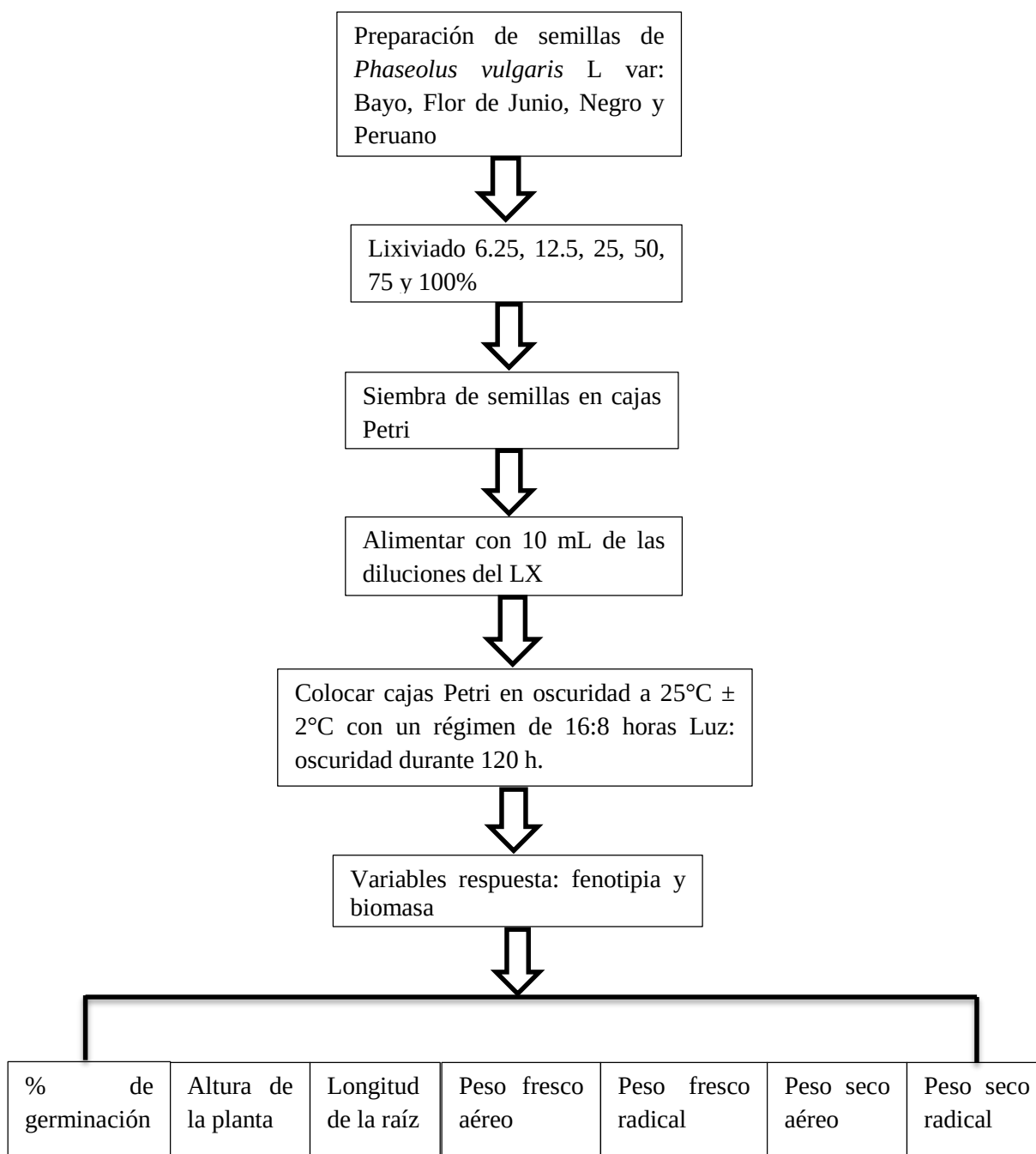


Figura 2. Diagrama de flujo del bioensayo de fitotoxicidad del lixiviado de Toluca en *Phaseolus vulgaris* L. en cajas Petri

Cuadro 2. Diseño experimental para la fitotoxicidad del lixiviado en *Phaseolus vulgaris* L. (frijol) en jarras de Leonard a plántula y floración

<i>P. vulgaris</i>		Lixiviado Toluca	Solución mineral
Control relativo		-	100%
% Lixiviado	25	+	50%
	50		
	75		
	100		

+ = aplica - = no aplica

6.2.1 Preparación de jarras de Leonard para el bioensayo de fitotoxicidad en *Phaseolus vulgaris* L.

En la parte superior de las jarras de Leonard se colocó 800g de un suelo: arena 50%, turba 30% y suelo franco arcillosos 20%, en la base se colocó 250 ml de solución mineral de acuerdo al diseño experimental, la base de la jarra fue cubierta con plástico negro como se muestra en la figura 3 (García-González *et al.*, 2005).

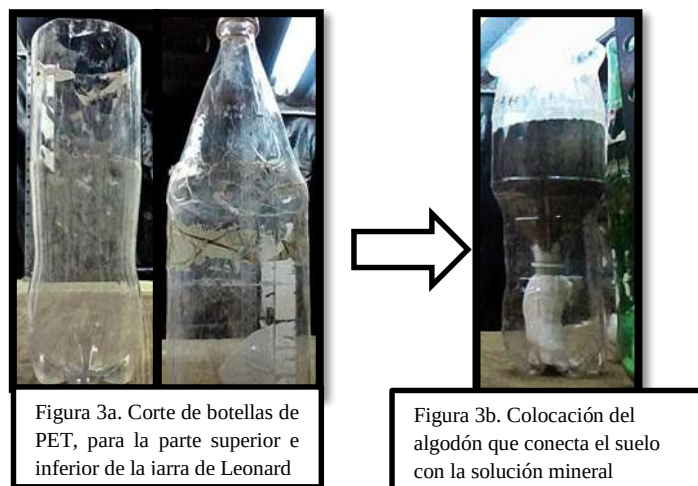


Figura 3. Jarra de Leonard

6.2.2 Siembra de semillas de *Phaseolus vulgaris* L en jarras de Leonard.

El bioensayo de fitotoxicidad del LX se realizó en semillas de *P. vulgaris* var. Flor de Junio; las que se embebieron en agua tibia a 35°C /40 min; luego se desinfectaron en 200 ml de cloro comercial Clorox ® al 25%./25 min., se lavaron con agua estéril 6 veces y trataron con Tecto ® al 10% /1 min; luego en jarras de Leonard se colocaron 4 semillas en los 4 puntos cardinales, cuando *P. vulgaris* alcanzó la fase de plántula se realizó el aclareo y se dejaron dos plántulas por jarra, posteriormente se trataron con el LX y se expusieron por 3 días, después se alimentaron con una solución mineral al 50% hasta floración y nuevamente se trataron con el LX (Guerrero, 2014).

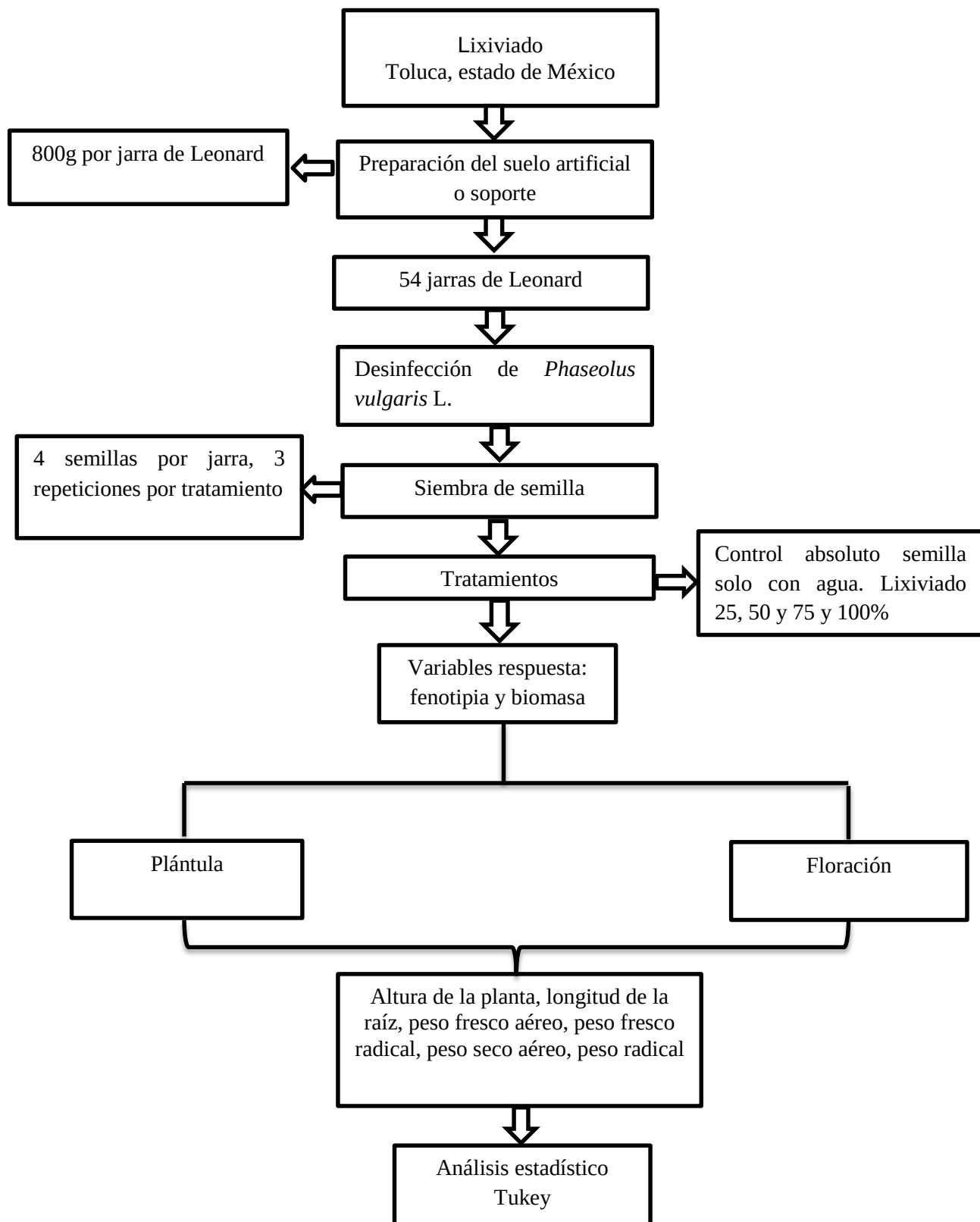


Figura 4. Diagrama de flujo del bioensayo de fitotoxicidad del lixiviado en *Phaseolus vulgaris* L. con jarras de Leonard

6.3 Análisis microbiológico del lixiviado de Toluca

Se realizó el análisis microbiológico del LX para buscar: hongos, levaduras, bacterias mesófilas aerobias totales, coliformes totales y fecales, *Pseudomonas aureginosa* y *Vibrio cholerae* de interés sanitario humano. Para la determinación de bacterias coliformes en el LX se empleó la técnica del número más probable (NMP) con 1.0, 0.1 y 0.01 mL de LX, se transfirieron en serie de tres tubos con 9.0, 9.9 y 9.99 mL de caldo bilis verde brillante 2% (CBVB); se incubó a 35°C/ 24h se examinaron para la formación de ácido y gas, los tubos positivos se sembraron en agar eosina azul de metileno (AEAM) para la prueba confirmatoria de acuerdo a la norma (NOM-112-SSA1-1994). En la búsqueda de *Vibrio cholerae* en el LX se utilizaron 2 matraces Erlenmeyer de 500 mL con 225 mL de agua peptonada alcalina (APA) estéril, se inoculó 25 mL de LX en cada matraz e incubaron a 35°C y 42°C/24h; para la prueba confirmatoria, sin agitar la película se transfirió el inóculo a una placa con agar Tiosulfato-citrato-sales biliares-sacarosa (ATCBS), fue incubado a 35°C/24 h. después las placas se examinaron para detectar *V. cholerae* (Norma ISO 21872 – 1: 2007). La detección de *Pseudomonas aureginosa* y *Burkholderia cepacia* en LX se inocularon 1.0, 0.1 y 0.01 mL de LX, en serie de tres tubos con 9, 9.9 y 9.99 mL de caldo *Pseudomona cepacia* ácido azaleico y tryptamina (CPCAT) con la siguiente composición química g/L: MgSO₄ 0.1; ácido azaleico 2.0; tryptamine 0.4; K₂HPO₄ 4.0; KH₂PO₄ 4.0; extracto de levadura 0.02; el pH se ajustó a 5.7 con ácido acético 2% v/v; se incubo a 37°C/24-48h, la presencia de *Pseudomonas aureginosa* se determinó por turbidez y siembra en APCAT a 35°C/ 24h. (Sánchez-Yáñez 2007). Para determinar la densidad de bacterias mesófilas aerobias totales en el LX, se sembró por triplicado 0.01, 0.1 y 1.0 mL

de LX en agar nutritivo (AN) con la siguiente composición (g/L): 5.0 peptona de gelatina; 3.0 extracto de carne; 10 mL solución Tecto® al 10%; 15.0 agar bacteriológico, pH 6.8 ± 0.2 se incubó a $35^\circ/24\text{h}$ (NOM-092-SSA1-1994). Para el conteo de hongos y levaduras en el LX se preparó caldo Sabouraud con la siguiente composición (g/L): 10 peptona; 40 glucosa; 1.0 mL cloranfenicol 0.5%; pH de 5.6. Para ello se realizaron serie de 3 tubos por triplicado con 9.0, 9.9 y 9.99 mL de caldo Sabouraud y se inocularon con 10, 1.0, y 0.1 mL del LX incubados a $25^\circ\text{C}/24\text{h}$; se examinaron los tubos con gas. En los tubos donde se inoculó 1.0 y 0.1 mL de LX se incubaron a $25^\circ\text{C}/48\text{h}$ si se reporta presencia de gas en los tubos con 1.0 mL de LX a las 72h o reporta gas en los tubos inoculados con 0.1 mL de LX. Posteriormente se sembraron en agar Sabouraud y se incubaron a $25^\circ\text{C}/7\text{días}$ (NOM-111-SSA1-1994).

7. Resultados y discusión

7.1 Caracterización fisicoquímica del lixiviado de Toluca.

En el cuadro 3 se muestran los resultados de la caracterización fisicoquímica del LX del RESA de Toluca. Los valores de Plomo (Pb), Cromo (Cr) y Arsénico (As) están debajo del límite máximo permisible de acuerdo a la norma (NOM-052-SEMARNAT-2005) sin riesgo para la salud humana. El pH del LX fue alcalino de 8.5 de acuerdo con lo reportado por Tchobanoglous 2002, rebasa los valores típicos de un LX maduro de 7.5 por la existencia de compuestos inorgánicos que lo elevan como el NH_4^+ .

Cuadro 3. Caracterización fisicoquímica del lixiviado de Toluca, estado de México

Parámetro	Concentración en el lixiviado (mg/L)
Ph	8.5*
Sólidos disueltos totales	11,790.0
Demanda bioquímica de oxígeno	1,032.0
Demanda química de oxígeno	1,084.7
Total Nitrógeno Kjeldhal	1,792.0
Nitrógeno Amoniacal	1,095.2
Hierro Total	15.692
Cobre	0.008
Níquel	0.354
Zinc	0.38
Plomo	0.14
Cromo total	0.468
Mercurio	0.002
Arsénico	1.89
Compuestos fenólicos	ND
Cloruros	3,349.0
Cianuros	0.025

*Todos los valores en mg/L excepto pH

(Guerrero, 2014)

7.2 Efecto fitotóxico del lixiviado de Toluca en la germinación de *Phaseolus vulgaris* L. (frijol) variedades: Bayo, Flor de Junio, Negro y Peruano.

En este caso se consideró la aparición del embrión con la formación de la raíz: los porcentajes de germinación de las variedades de *P.vulgaris* se muestran en el cuadro 4 donde todas las variedades de *P.vulgaris* fueron sensibles a la fitotoxicidad de los componentes químicos del LX en especial a la exposición del LX concentrado que la inhibió por completo, lo anterior coincide con lo reportado con Castillo 2004, que señala que existen agentes fitotóxicos del LX que interfieren en la germinación de la semilla de *P. vulgaris* como sus metales pesados que inhiben la síntesis de proteínas involucrados en la terminación de la latencia de la semilla (Ivanov *et al.*, 2003).

Cuadro 4. Efecto del lixiviado de Toluca en el porcentaje (%) de germinación de *Phaseolus vulgaris* L. (frijol) var: Bayo Flor de Junio Negro y Peruano.

Tratamiento		<i>P.vulgaris</i>			
		Bayo	Flor de Junio	Negro	Peruano
Control absoluto		95 ^{a*}	80 ^a	95 ^a	100 ^a
Control relativo		90 ^a	80 ^a	85 ^a	100 ^a
% Lixiviado de Toluca	6.25	100 ^a	100 ^a	80 ^a	90 ^a
	12.5	100 ^a	100 ^a	90 ^a	50 ^b
	25	100 ^a	90 ^a	100 ^a	70 ^c
	50	85 ^a	80 ^a	90 ^a	0 ^d
	75	80 ^a	0 ^b	0 ^b	0 ^d
	100	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^d

*Comparación de medias usando prueba de Tukey HSD ($p < 0.05$). Letras distintas con diferencia estadística significativa

7.2.1 Efecto fitotóxico del lixiviado de Toluca en la fenotipia y biomasa de *Phaseolus vulgaris* L var. Flor de Junio.

El LX de Toluca del 25 al 100% fue fitotóxico para *P. vulgaris* en su primordio de raíz, al respecto se sugiere que este tipo de LX por su contenido en metales pesados inhibieron el crecimiento radical por su acción oligodinámica (Fiskesjo, 1993). Los valores numéricos de este bioensayo de *P. vulgaris* tratado con el LX fueron estadísticamente significativos comparados con *P. vulgaris* CR. El efecto del LX fue fitotóxico al 6.25% en la biomasa de *P.vulgaris* en su PFA con 1.04 mg con diferencia estadística significativa comparado con el PFA con 1.49 mg de *P. vulgaris* CR, sin embargo en su PFR, PSA y PSR solo fue a partir del 75% (figura 6). Los valores numéricos de este ensayo de *P. vulgaris* con el LX tuvieron una diferencia estadística significativa comparados con los mismos parámetros de *P.vulgaris* usado como CR alimentado con una solución mineral (figura 5).

Cuadro 5. Efecto del lixiviado de Toluca en la fenotipia y biomasa de *Phaseolus vulgaris* L. (frijol) var. Flor de Junio

<i>P.vulgaris</i> Var. Flor de Junio		Fenotipia (cm)		Biomasa (mg)			
		Altura del primordio del tallo	Longitud del primordio de raíz	Peso fresco aéreo	Peso fresco radical	Peso seco aéreo	Peso seco radical
Control relativo		11.09 ^{a*}	11.65 ^a	1.49 ^a	0.21 ^a	0.19 ^a	0.02 ^a
Control absoluto		11.23 ^a	12.76 ^a	1.47 ^a	0.24 ^a	0.18 ^a	0.02 ^a
% Lixiviado Toluca	6.25	9.33 ^{ab}	10.82 ^a	1.04 ^b	0.15 ^a	0.18 ^a	0.01 ^a
	12.5	8.45 ^{ab}	10.95 ^a	0.96 ^b	0.22 ^a	0.21 ^a	0.01 ^a
	25	7.16 ^{ab}	6.36 ^b	0.92 ^b	0.13 ^a	0.21 ^a	0.01 ^a
	50	5.28 ^b	4.34 ^b	0.81 ^b	0.17 ^a	0.23 ^a	0.01 ^a
	75	---	---	---	---	---	---
	100	---	---	---	---	---	---

*Comparación de medias usando prueba de Tukey HSD ($p < 0.05$), letras distintas con diferencia estadística significativa.
(--) Sin germinar



Figura 5. Primordios tallo/raíz de *Phaseolus vulgaris* L. var. Flor de Junio usado como control relativo alimentado con solución mineral



Figura 6. Efecto fitotóxico del lixiviado al 75% al inhibir la germinación de *Phaseolus vulgaris* L. var. Flor de Junio

7.2.2 Efecto fitotóxico del lixiviado de Toluca en la fenotipia y biomasa de *Phaseolus vulgaris* L var. Bayo.

Se registró un efecto fitotóxico del LX a partir del 6.25% en la altura del primordio del tallo de 11.50cm con diferencia estadística significativa en comparación con la altura del primordio del tallo de *P. vulgaris* CA con 17.01cm, el LX desde el 50% causó fitotoxicidad en la disminución de longitud del primordio de raíz de *P.vulgaris* con 3.35cm comparado con la longitud del primordio de raíz de *P.vulgaris* CR con 13.81cm. EL efecto del LX al 100% sobre la biomasa de *P. vulgaris* fue fitotóxico dado que este valor fue estadísticamente diferente comparado con *P. vulgaris* CR.

Cuadro 6. Efecto del lixiviado de Toluca en la fenotipia y biomasa de *Phaseolus vulgaris* L. (frijol) var. Bayo

<i>P.vulgaris</i> Var. Bayo		Fenotipia (cm)		Biomasa (mg)			
		Altura del primordio del tallo	Longitud del primordio de raíz	Peso fresco aéreo	Peso fresco radical	Peso seco aéreo	Peso seco radical
Control relativo		15.26 ^{ab*}	13.81 ^a	1.62 ^a	0.45 ^a	0.12 ^d	0.01 ^{ab}
Control absoluto		17.01 ^a	11.75 ^a	1.82 ^a	0.40 ^{abc}	0.15 ^{cd}	0.03 ^a
% Lixiviado Toluca	6.25	11.50 ^{bc}	13.32 ^a	1.90 ^a	0.42 ^{ab}	0.20 ^{bc}	0.02 ^{ab}
	12.5	8.54 ^c	14.78 ^a	1.39 ^{ab}	0.27 ^{abcd}	0.25 ^{ab}	0.02 ^{ab}
	25	7.06 ^c	15.49 ^a	1.42 ^{ab}	0.11 ^d	0.24 ^{ab}	0.02 ^{ab}
	50	2.17 ^d	3.35 ^b	0.64 ^b	0.12 ^{cd}	0.25 ^{ab}	0.01 ^{bc}
	75	2.20 ^d	1.55 ^b	0.70 ^b	0.18 ^{bcd}	0.29 ^a	0.00 ^c
	100	---	---	---	---	---	---

*Comparación de medias con prueba de Tukey HSD ($p < 0.05$), letras distintas con diferencia estadística significativa.
(--) Sin germinar



Figura 7. Primordios tallo/raíz de *Phaseolus vulgaris* L. var. Bayo usado como control relativo alimentado con solución mineral



Figura 8. Efecto fitotóxico del lixiviado al 100% al inhibir la germinación en *Phaseolus vulgaris* L. var. Bayo

7.2.3 Efecto fitotóxico del lixiviado en la fenotipia y biomasa de *Phaseolus vulgaris* L. var. Negro

El LX desde el 50% (figura 10) fue fitotóxico para la altura del primordio del tallo con 6.28cm y la longitud del primordio de la raíz con 3.87cm de *P.vulgaris* se observó la inhibición de su crecimiento en comparación con el primordio de tallo con 9.95cm y raíz con 14.94cm de *P.vulgaris* CR (figura 9). Se registra fitotoxicidad del LX a partir del 75% en el PFA, del 6.25 al 100% en su PFR, del 75 al 100% en su PSA y del 50 al 100% en su PSR de *P. vulgaris*, lo que sugiere que en estas diluciones había una elevada concentración de agentes tóxicos (Ramírez y Pérez, 2006).

Cuadro 7. Efecto del lixiviado de Toluca en la fenotipia y biomasa de *Phaseolus vulgaris* L. (frijol) var. Negro

<i>P.vulgaris</i> <i>Va. Negro</i>		Fenotipia (cm)		Biomasa (mg)			
		Altura del primordio del tallo	Longitud del primordio de raíz	Peso fresco aéreo	Peso fresco radical	Peso seco aéreo	Peso seco radical
Control relativo		8.5 ^{a*}	12.79 ^a	0.94 ^a	0.21 ^a	0.11 ^a	0.01 ^{ab}
Control absoluto		9.95 ^{ab}	14.94 ^a	1.08 ^a	0.23 ^a	0.16 ^a	0.02 ^a
% Lixiviado Toluca	6.25	10.11 ^a	10.86 ^a	1.11 ^a	0.07 ^b	0.11 ^a	0.01 ^{ab}
	12.5	6.73 ^{ab}	11.0 ^a	0.94 ^a	0.06 ^b	0.13 ^a	0.01 ^{ab}
	25	8.69 ^{ab}	11.1 ^a	0.98 ^a	0.13 ^b	0.16 ^a	0.01 ^{ab}
	50	6.28 ^b	3.87 ^b	0.77 ^a	0.06 ^b	0.16 ^a	0.01 ^b
	75	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	100	-----	-----	-----	-----	-----	-----

*Comparación de medias usando prueba de Tukey HSD ($p < 0.05$), letras distintas con diferencia estadística significativa.
(--) Sin germinar

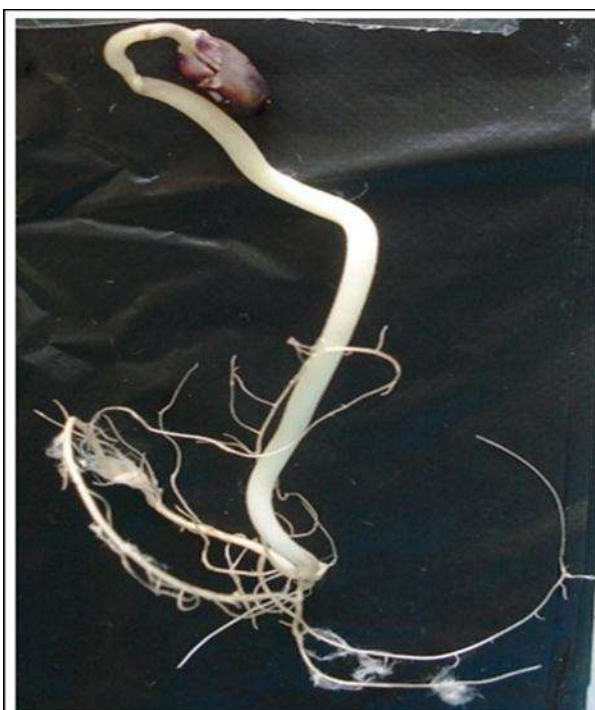


Figura 9. Primordios tallo/raíz de *Phaseolus vulgaris* L. var. Negro usado como control relativo alimentado con solución mineral



Figura 10. Efecto fitotóxico del lixiviado al 50% al deformar la raíz de *Phaseolus vulgaris* L. var. Negro

7.2.4 Efecto fitotóxico del lixiviado en la fenotipia y biomasa de *Phaseolus vulgaris* L var. Peruano

Respecto a la fitotoxicidad del LX al 25% se observó una inhibición de la altura del primordio del tallo con 8.0 cm y longitud del primordio de raíz con 9.92 cm de *P.vulgaris* con una diferencia estadística significativa comparado con la altura del primordio del tallo con 27.54 cm y la longitud del primordio de raíz con 17.83cm de *P.vulgaris* CA (figura 11), en tanto que el LX a partir del 50% (figura 12) inhibió por completo la germinación de *P. vulgaris*. El LX tuvo un efecto fitotóxico a partir del 6.25% en el PFA con 1.79 mg y PFR con 0.22 mg de *P. vulgaris* con diferencia estadística significativa comparado con el PFA con 1.89 mg y PFR 0.37 mg *P. vulgaris* CA.

Cuadro 8. Efecto del lixiviado de Toluca en la fenotipia y biomasa de *Phaseolus vulgaris* L. (frijol) var. Peruano

<i>P.vulgaris</i> Var. Peruano		Fenotipia (cm)		Biomasa (mg)			
		Altura del primordio del tallo	Longitud del primordio de raíz	Peso fresco aéreo	Peso fresco radical	Peso seco aéreo	Peso seco radical
Control relativo		11.91 ^{ab*}	10.7 ^b	1.45 ^{ab}	0.16 ^b	0.21 ^a	0.02 ^a
Control absoluto		27.54 ^a	17.83 ^a	1.89 ^a	0.37 ^a	0.24 ^a	0.02 ^a
% Lixiviado Toluca	6.25	12.13 ^{ab}	15.11 ^{ab}	1.79 ^{ab}	0.22 ^b	0.25 ^a	0.03 ^a
	12.5	12.14 ^{ab}	15.0 ^{ab}	1.67 ^{ab}	0.13 ^b	0.25 ^a	0.02 ^a
	25	8.0 ^b	9.92 ^b	1.29 ^b	0.11 ^b	0.27 ^a	0.02 ^a
	50	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	75	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	100	-----	-----	-----	-----	-----	-----

*Comparación de medias con prueba de Tukey HSD ($p < 0.05$), letras distintas con diferencia estadística significativa.
(--) Sin germinar



Figura 11. Primordios tallo/raíz de *Phaseolus vulgaris* L. var. Peruano usado como control absoluto



Figura 12. Efecto fitotóxico del lixiviado al 50% al inhibir la formación del primordio del tallo y la raíz *Phaseolus vulgaris* L. var. Peruano.

7.3 Efecto fitotóxico del lixiviado de Toluca en *Phaseolus vulgaris* L. (frijol) var. Flor de Junio a plántula y floración

7.3.1 Efecto fitotóxico del lixiviado en la fenotipia y biomasa de *Phaseolus vulgaris* L en su fase de plántula.

EL efecto del LX al 25, 50, 75 y 100% no mostró diferencia estadística significativa en su altura de *P. vulgaris* comparado con el mismo valor en *P.vulgaris* CR; sin embargo el LX a partir del 75% fue fitotóxico para la longitud radical con 18.5 cm de *P.vulgaris* pues causó disminución con diferencia estadística significativa en comparación con la longitud radical con 28.3 cm de *P.vulgaris* CR. El LX no fue fitotóxico en el PFA de *P.vulgaris* sin diferencia estadística significativa en comparación con *P.vulgaris* CR, mientras que el LX a partir del 50% fue fitotóxico para el PFR con 0.7 g y PSR con 0.04 g comparado con el PFR con 1.9 g y PSR con 0.1 g de *P. vulgaris* CR, por lo que sugiere que a nivel es una de las partes más sensibles de la planta (Prieto-Méndez *et al.* 2009).

Cuadro 9. Efecto del lixiviado de Toluca en *Phaseolus vulgaris* L. (frijol) var. Flor de Junio en su fase de plántula

<i>P.vulgaris</i> Var. Flor de Junio		Fenotipia (cm)		Biomasa (g)			
		Altura de la planta	Longitud radical	Peso fresco aéreo	Peso fresco radical	Peso seco aéreo	Peso seco radical
Control relativo		53.2 ^{a*}	28.3 ^{a*}	5.6 ^a	1.9 ^a	0.4 ^a	0.1 ^a
% lixiviado Toluca	25	60.0 ^a	20.2 ^a	5.2 ^a	0.9 ^a	0.3 ^a	0.06 ^a
	50	60.4 ^a	21.1 ^a	4.8 ^a	0.7 ^b	0.3 ^a	0.04 ^b
	75	56.7 ^a	18.5 ^{b*}	4.0 ^a	0.4 ^b	0.3 ^a	0.03 ^b
	100	48.7 ^a	14.7 ^b	2.8 ^a	0.2 ^b	0.2 ^b	0.02 ^b

*Comparación de medias con prueba de Tukey HSD ($p < 0.05$), letras distintas con diferencia significativa diferente

7.3.2 Efecto fitotóxico del lixiviado en la fenotipia y biomasa de *Phaseolus vulgaris* L. en su fase de floración

El efecto del LX al 25, 75, 50 y 100% en la etapa de floración sobre la altura de *P.vulgaris* fue positiva, equivalente a la aplicación de un fertilizante químico, lo que sugiere que contenía los principales minerales en balance requeridos para el sano crecimiento de esta leguminosa (Utria *et al.*, 2008), dado que los valores registrados de su fenotipia y biomasa fueron iguales comparados con los observados en *P.vulgaris* (CR), sin diferencia estadística significativa.

Cuadro 10. Efecto del lixiviado de Toluca en *Phaseolus vulgaris* L. (frijol) var. Flor Junio en su floración

<i>P.vulgaris</i> Var. Flor de Junio		Fenotipia (cm)		Biomasa (g)			
		Altura de la planta	Longitud radical	Peso fresco aéreo	Peso fresco radical	Peso seco aéreo	Peso seco radical
Control relativo		49.5 ^a	34.2 ^a	11.5 ^{b*}	4.0 ^a	2.1 ^b	0.4 ^a
% lixiviado Toluca	25	45.8 ^a	32.0 ^a	11.3 ^b	2.1 ^b	2.9 ^{ab}	0.3 ^a
	50	47.5 ^a	35.4 ^a	23.8 ^{a*}	5.4 ^a	6.5 ^a	0.6 ^b
	75	42.7 ^a	34.7 ^a	21.4 ^b	4.6 ^a	2.5 ^b	0.3 ^a
	100	43.6 ^a	33.9 ^a	17.8 ^{ab}	2.8 ^a	4.5 ^a	0.2 ^a

*Comparación de medias con prueba de Tukey HSD ($p < 0.05$), letras distintas con diferencia significativa diferente

7.4 Análisis microbiológico del lixiviado de Toluca

Se realizó el análisis microbiológico del LX de Toluca para detectar hongos levaduras, coliformes totales y fecales, bacterias mesófilas aerobias totales, *Vibrio cholerae* y *Pseudomonas aureginosa*. Sin detectar ningún tipo de microorganismo de valor sanitario en el LX de Toluca lo que sugiere que dado su contenido de elementos tóxicos como los metales pesados, posiblemente causo la inhibición del crecimiento microbiano de importancia sanitaria (Keswick 1984, Lipták 1991, Tchobanoglous *et al.* 1993). Respecto a las 292.5UFC/mL de bacterias mesófilas aerobias totales se sugiere que es difícil establecer si eran o no parte del LX desde el RESA o llegaron al LX por su manipulación durante su colecta y análisis. Sin embargo el hecho de que haya un numero viable de este grupo implica que a pesar de la composición química del LX por sus elementos tóxicos es posible la supervivencia de diversos microorganismos patógenos humanos sean dispersados por el LX que contaminan el ambiente (Avila, 2014).

Cuadro 11. Evaluación microbiológica del lixiviado de Toluca

Muestra	Coliformes totales y fecales (NMP/mL)	Bacterias mesofilas aéreas (UFC/mL)	<i>Vibrio cholerae</i>	<i>Pseudomonas</i> sp (NMP/mL)	Hongos (UFC/mL)	Levaduras (UFC/mL)
Lixiviado Toluca	<1,1	292.5	Ausente	<1,1*	<1	<1

*≤1.1= negativo

8. Conclusión

El efecto del LX en *P. vulgaris* fue proporcional a su nivel de dilución en especial sobre sus primeras etapas de crecimiento; sin embargo cuando el LX se aplicó a etapas posteriores del ciclo vegetativo de *P.vulgaris* el efecto del LX fue el de un fertilizante mineral porque suplió los requerimientos de nutrientes básicos que la leguminosa necesita para un sano crecimiento.

Por lo que el grado de toxicidad de un LX para *P. vulgaris* y la existencia de microorganismos patógenos humanos fue dependiente de la concentración de los agente tóxicos del LX de Toluca Edo de México, México.

9. Bibliografía

Avila, L.V. 2014. Respuestas fisiológicas de tres especies vegetales sembradas en humedales contruidos expuestas a lixiviado de relleno sanitario. Tesis de licenciatura para obtener el título de bióloga. Universidad del Valle. Cali, Colombia. (Inédita).

Álvarez., A. y Suárez., J. 2006. Tratamiento biológico del lixiviado generado en el relleno sanitario “El Guayabal” de la ciudad San José de Cúcuta. Ingeniería y desarrollo. 20: 95-105.

Bialowiec, A., and Randerson, P.F. 2010. Phytotoxicity of landfill leachate on willow--*Salix amygdalina* L. Waste management. 30:1587–93.

Castillo, G. 2004. Ensayos ecotoxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones, 1ª edición, Centro Internacional de Investigación para el Desarrollo – CIID e Instituto Mexicano de Tecnología del Agua – IMTA, México, DF, pp: 188

Colmenares, W., Santos, K., 2007. Generación y manejo de gases en sitios de disposición final. Fases en la biodegradación de Residuos Sólidos. Disponible en: <http://www.ingenieriaquimica.org/system/files/relleno-sanitario.pdf>. Consultado: 16 de junio de 2014.

Clément, B., and Bouvet, Y. 1993. Assessment of landfill leachate toxicity using the duckweed *Lemna minor*. The Science of the Total Environment, Supplement. 1179-1190.

Cleuvers M., Ratte H.-T. 2002. Phytotoxicity of coloured substances: is *Lemna Duckweed* an alternative to the algal growth inhibition test?. Chemosphere. 49: 9-15.

Cheng, C.Y., and Chu, L.M. 2006. Phytotoxicity data safeguard the performance of the recipient plants in leachate irrigation. Environmental Pollution. 145: 192-202

Diario Oficial Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos.2003. Gobierno de México.

EPA, 2000. Method Guidance and Recommendations for Whole Effluent Toxicity (WET) Testing (40 CFR Part 136). United States Environmental Protection Agency.

Flores-Tena, F.J., Guerrero-Barrera A. L., Avelar-González, F.J., Ramírez-López, E.M., Martínez-Saldaña, M.C. 2007. Pathogenic and opportunistic Gram-negative bacteria in soil, leachate and air in San Nicolás landfill at Aguascalientes, Mexico. Revista Latinoamericana de Microbiología. 49: 25-30

Floréz., Y. y Cotes., A. 2006. Bioabsorción de metales pesados por *Salvinia natans* de los lixiviados del relleno sanitario Combeima Ibagué. Tumbaga. 1:89-100

Fiskesjö G. 1993. The Allium Test in Wastewater Monitoring. Environmental Toxicology and Water Quality: 8:291-298

García-González, M.M., Farías-Rodríguez, R., Peña-Cabriales, J.J., Sánchez-Yáñez, J.M. 2005. Inoculación del trigo var. Pavón con *Azospirillum spp.* y *Azotobacter beijerinckii*. TERRA Latinoamericana. 23: 65-72.

Guerrero, D. 2014. “Relación del índice de contaminación de lixiviados con el impacto fitotóxico de un lixiviado”. Tesis de maestría para obtener el título de maestra en ingeniería ambiental. Laboratorio de Microbiología Ambiental, Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Laboratorio de Manejo de Residuos Sólidos y Medio Ambiente, Instituto de Investigaciones Agrícolas y Forestales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia Michoacán México. (Inédita).

Ivanov VB, Bystrova EI, Seregin IV. 2003. Comparative impacts of heavy metals on root growth as related to their specificity and selectivity. Russian Journal of Plant Physiology 50: 398-406.

ISO/TS 21872-1:2007. Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the detection of potentially enteropathogenic *Vibrio* spp. -- Part 1: Detection of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae*. México.

Keswisck B.H. 1984. Sources of groundwater pollution; En: Groundwater Pollution Microbiology (G. Bitton y C.P.Geba, Eds.) Krieger, Malabar, Florida, USA. Pp;39-64.

Kumar, D. and Alappat, B.J., 2005. Analysis of leachate pollution index and formulation of sub-leachate pollution indices. Waste Management. 23: 230–239

Lipták B.G. 1991. Municipal waste disposal in the 1990's. Chilton, Radnor, Pennsylvania, USA. pp;23-43

Norma Mexicana NMX-AA-003-1980 Aguas residuales.- muestreo. Diario oficial de la federación. México.

Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa. México.

Norma Oficial Mexicana NOM-111-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos. México.

Norma Oficial Mexicana NOM-112-SSA1-1994, Bienes y servicios. Determinación de bacterias coliformes. Técnica del número más probable. México.

Norma Oficial Mexicana NOM-083-SEMARNAT, 2003. Especificaciones de protección ambiental para la selección del sitio, diseño, construcción, operación monitoreo, clausura y obras complementarias de un sitio de disposición final de residuos sólidos urbanos y de manejo especial. Diario oficial de la federación. México.

Norma oficial Mexicana NOM-052-SEMARNAT-2005, Que establece las características, el procedimiento de identificación, clasificación y los listados de los residuos peligrosos. México.

Pandard P., Devillers J., Charissou A.-M., Poulsen V., Jourdain M.J., Férard J. F., Grand C., Bispo A. 2006. Selecting a battery of bioassays for ecotoxicological characterization of wastes. *Science of Total Environment*, 114–12.

Prieto-Méndez, J., González-Ramírez, C., Román-Gutierrez, A., y Prieto-García, F. 2009. Contaminación y fitotoxicidad en plantas por metales pesados provenientes de suelos y agua. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 10: 2–44

Ramírez, R. y Pérez, I. 2006. Evaluación del potencial de los biosólidos procedentes del tratamiento de aguas residuales para uso agrícola y su efecto sobre el cultivo de rábano rojo (*Raphanussativus L.*) *Revista Facultad Nacional de Agronomía. Colombia*. 59:3543-3556.

Sánchez- Yañez. 2006. Una propuesta de gestión integral de residuos sólidos en el campus de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
<http://www.monografias.com/trabajos33/gestion-residuos/gestion-residuos.shtml#ixzz34aNgmvBy>

Sánchez-Yañez J.M., 2007. Breve Tratado de Microbiología Agrícola, teoría y práctica, Ed. Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo, Centro de Investigacion y Desarrollo del Estado de Michoacán, Corporativo de Desarrollo Sustentable, Coordinación de La Investigacion Cientifica . Morelia Michoacán México. ISBN: 978-970-95424-1-7. pp: 130-133, 136-138, 153-155.

Thomas J., Skalski J., Cline J., Shane M., Miller W., Peterson S. 1986. Characterization of chemical waste site contamination and determination of its extent using bioassays. *Environmental Toxicology Chemical*. 5:487–501.

Tchobanoglous G., Theisen H. y Vigil S. L. A. 1993. Integrated solid waste management. Mc-Graw Hill New York. USA.

Tchobanoglous, G. 2002. Handbook of solid waste management. 2ª Edición. Mc-Graw Hill. Handbooks. New York. USA.

Utria-Borges E., Cabrera-Rodriguez J., Reynaldo-Escobar I., Morales-Guevara D., Fernandez A., Toledo E. 2008. Utilización agraria de los biosólidos y su influencia en el crecimiento de plántulas de tomate (*Lycopersicon esculentum Mill*). *Revista Chapingo*. 14:33-99

Westlake, K. 1995. "Landfill waste pollution and control", L Albion. Publishing, ISBN 1-898563-08-X. Chichester, England.

Žaltauskaitė, J., and Čypaitė, A. 2008. Assessment of Landfill Leachate Toxicity Using Higher Plants. Engineering and Management. 4:42-47