

Evaluación del Riesgo Genotóxico de Aguas Superficiales y Sistemas de Riego Mediante Estudios Ecotoxicológicos Empleando Células de Raíces de *Allium cepa*.

Assessment of the Genotoxic Risk of Surface Water and Irrigation Systems by Means of Ecotoxicological Studies Using Allium cepa Root Cells.

Ibañez Solano Dylar E., Angulo Reyes M. Rosalva

Universidad Católica Boliviana San Pablo, Centro de Investigación de Ingenierías y Ciencias Exactas, Tarija, Bolivia.

rangulo@ucb.edu.bo

Resumen: Poco se sabe sobre el efecto que los contaminantes presentes en cuerpos de agua pueden tener sobre los organismos y los ecosistemas. El empleo de métodos basados en efectos permite evaluar la respuesta de organismos vivos a efluentes y aguas superficiales de composición compleja. El objetivo del estudio fue determinar los efectos fitotóxicos y genotóxicos de aguas superficiales usadas para riego, empleando el protocolo para la evaluación genotóxica en cuerpos de agua con células de raíces de cebollines. Los bulbos fueron expuestos a muestras de agua del río Camacho (RC), el sistema de riego Guadalquivir-CENAVIT-Calamuchita (GC) y el canal de Riego Calamuchita (CC) en época de estiaje y de lluvias. Se observaron efectos genotóxicos significativos en los bulbos expuestos a muestras de agua de todos los sitios, con leves diferencias entre la estación lluviosa y la seca. En la época de estiaje, el agua de (GC) provocó el mayor porcentaje de micronúcleos (MNC=9,5%) respecto al control (MNC=1,8%), se hipotetiza que el mayor aporte de las aguas residuales de las Lagunas de oxidación de San Luis puede ser la causa. En época de lluvias la frecuencia de micronúcleos del (RC) fueron las más elevadas (MNC=10,2%), respecto del control (MNC=1,5%). Se puede afirmar que existe riesgo genotóxico en todos los sitios evaluados. Para las raíces en época de lluvias, se obtuvo valores de inhibición positivos (hormesis) para las muestras del (RC). En la época de estiaje las diferencias en el crecimiento no fueron estadísticamente significativa en ninguno de los sitios evaluados.

Palabras clave: Río Camacho, Sistema de riego Guadalquivir-CENAVIT-Calamuchita, genotoxicidad, micronúcleos, riesgo genotóxico, *Allium cepa*.

Abstract: Little is known about the effect that pollutants present in surface water have on organisms and ecosystems. The use of Effects-Based Methods allows the assessment of the response of living organisms to effluents and surface waters of complex composition. The main aim was to determine the phytotoxic and genotoxic effects of surface water used for irrigation, using the protocol for

genotoxic evaluation in water bodies with onion root cells. The bulbs were exposed to water samples from the Camacho River (RC), the Guadalquivir-CENAVIT-Calamuchita (GC) irrigation system and the Calamuchita Irrigation Canal (CC) during dry and rainy seasons. Significant genotoxic effects were observed in bulbs exposed to water samples from all sites, with slight differences between the rainy and dry seasons. In the dry season, the water from (GC) caused the highest percentage of micronuclei (MNC=9.5%) compared to the control (MNC=1.8%). It is hypothesized that the most significant contribution of wastewater from the treatment plant ponds in San Luis may be the cause. In the rainy season, the frequency of micronuclei of the (RC) was the highest (MNC=10.2%) compared to the control (MNC=1.5%). It can be affirmed that there is a genotoxic risk in all the evaluated sites. Positive inhibition values (hormesis) were obtained for the (RC) samples for the roots in the rainy season. In the dry season, the differences in growth were not statistically significant in any of the evaluated sites.

Keywords: Camacho River, Guadalquivir-CENAVIT-Calamuchita irrigation system, genotoxicity, micronuclei, genotoxic risk, *Allium cepa*.

1 Introducción.

Las actividades humanas han producido cambios en la composición de las aguas superficiales por la introducción de una gran variedad de compuestos xenobióticos. Algunas de las principales fuentes de contaminación de los recursos hídricos son las descargas de efluentes industriales, agrícolas y/o domésticos, los cuales contienen diversos tipos de compuestos químicos [1], [2]. La variedad de compuestos presentes en el medio acuático favorece la formación de mezclas complejas que pueden causar problemas a la salud de seres humanos y de los organismos que lo habitan o utilizan [1], [3]. Muchos de estos compuestos tóxicos tienen la capacidad de interactuar con el material genético, lo que puede ser causa de daño o mutaciones en el ADN, estos agentes comúnmente llamados citotóxicos, genotóxicos y/o mutagénicos, pueden afectar a los organismos que habitan en áreas influenciadas por la presencia de descargas de efluentes contaminantes [4], [5].

Debido a la compleja composición de las muestras ambientales los análisis químicos tienen una capacidad limitada para caracterizar la composición química de las aguas, además de no permitir una evaluación posterior de la genotoxicidad o carcinogenicidad química específica. En contraposición los bioensayos proporcionan un medio para evaluar la toxicidad de mezclas complejas sin un conocimiento previo de la identidad del tóxico y/o de las propiedades fisicoquímicas [6]. Es así que, en la evaluación de los efectos tóxicos y genotóxicos de los productos químicos ambientales, actualmente se utilizan diferentes sistemas de pruebas biológicas. Las plantas se consideran excelentes bioindicadores de genotoxicidad, debido a su alta sensibilidad en la detección de agentes mutagénicos [7]. Dentro de las plantas empleadas para los bioensayos de genotoxicidad se destaca el uso de *Allium cepa*. Este

test es reconocido como uno de los mejores sistemas de prueba para evaluar daños cromosómicos y alteraciones del ciclo mitótico debido a su alta sensibilidad, buena correlación con otros sistemas de prueba, fácil manejo, bajo costo y por tener cromosomas grandes y en número reducido ($2n = 16$) [8]. Los micronúcleos pueden formarse durante la división celular por la pérdida de fragmentos de cromosomas o cromosomas completos que quedan fuera del núcleo durante la mitosis [9], [10]. Esto puede ocurrir espontáneamente o por causa de agentes que rompen cromosomas o que alteran el huso de división [10], [11]. Radiaciones ionizantes, sustancias químicas como plaguicidas, fármacos y otros contaminantes ambientales pueden promover la formación de micronúcleos. Actualmente en Bolivia se sugiere el empleo del ensayo de micronúcleos en el análisis de genotoxicidad de cuerpos de agua utilizando células de raíces de cebollines [12], pero su aplicación no es obligatoria por lo que la prueba no es utilizada en los monitoreos rutinarios de cuerpos de agua superficiales.

El sistema de riego Guadalquivir-Cenavit-Calamuchita proporciona aguas para riego a 16 comunidades en departamento de Tarija beneficiando a la producción agrícola que en la zona es mayoritariamente uva de mesa y uva para vinificación. Las aguas provienen de la unión del río Guadalquivir y de la represa del lago San Jacinto. Existe una gran probabilidad de contaminantes con actividad tóxica en estas aguas debido a que el río Guadalquivir en sus tramos finales recibe la descarga del efluente de las Lagunas de Oxidación de San Luis que como sistema de tratamiento de aguas residuales ya ha cumplido su vida útil y está en malas condiciones de funcionamiento por lo que no se puede asegurar la remoción de los contaminantes que llegan en las aguas residuales de la ciudad de Tarija. Por otro lado, tanto en las aguas de la represa de San Jacinto como en el río Camacho, que pasa por la comunidad de Calamuchita, es factible la presencia de trazas de pesticidas y subproductos de su degradación provenientes de la escorrentía de los terrenos de cultivo aledaños. En este sentido, este estudio tuvo como objetivo evaluar los efectos genotóxicos y fitotóxicos en muestras de agua provenientes del Río Camacho (RC), del Sistema riego Guadalquivir-Cenavit-Calamuchita (GC) y del canal de riego Calamuchita (CC), durante la época de lluvias, que coincide con la temporada de vendimia y en época de estiaje.

2 Metodología.

2.1 Área de estudio y sitios de muestreo.

El área de estudio comprendió un área ubicada en la provincia Uriondo del departamento de Tarija-Bolivia. El primer punto situado en el embalse del sistema de riego Guadalquivir-Cenavit, el segundo punto en el río Camacho que pasa por la

comunidad de Calamuchita y el tercer punto en el canal de Calamuchita que en tiempos de lluvia capta agua del río Camacho. Figura 1 y Tabla 1

Tabla 1. Ubicación de los sitios de muestreo.

Punto	Nombre	Ubicación		
		Latitud	Longitud	Altitud m s.n.m.
1	GC	-21,68114998 S	-64,66262713 N	1.809
2	RC	-21,704041 S	-64,646428 N	1.741
3	CC	-21,697404 S	-64,628451 N	1.726

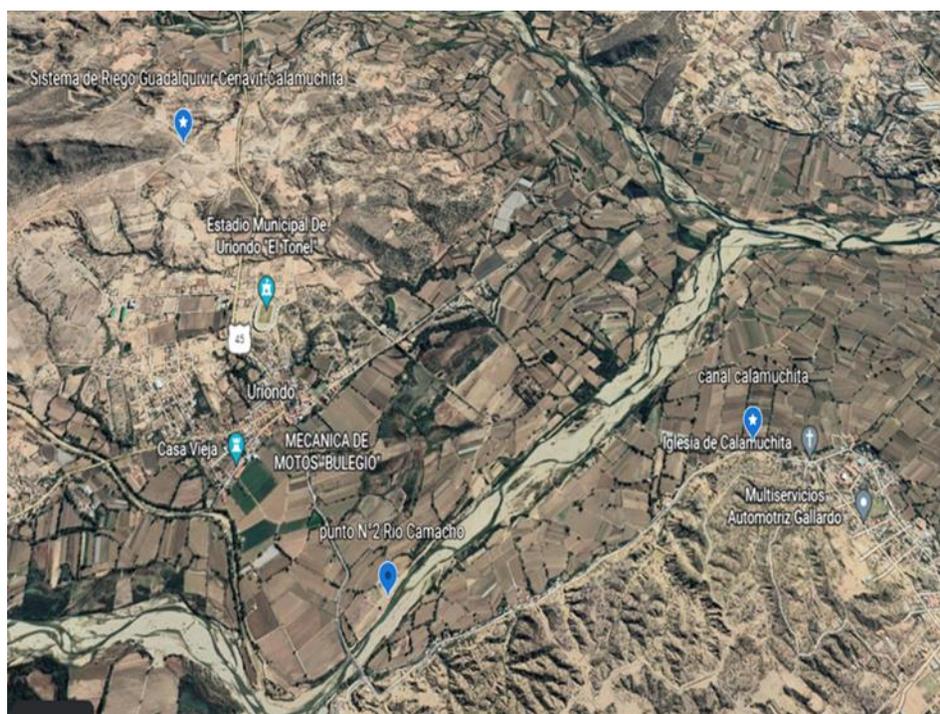


Figura 1: Vista en Google Earth de la ubicación geográfica de los sitios de muestreo.

2.2 Toma de muestras.

Las muestras se recolectaron manualmente a 20 cm de la superficie de acuerdo con las recomendaciones de la Guía para la Evaluación Genotóxica en Cuerpos de Agua Utilizando Células de Raíces de Cebollines [12], fueron conservadas en frío hasta su traslado al Laboratorio de Servicios Ambientales de la Universidad Católica Boliviana sede Tarija (UCB-Tarija)

Se realizaron mediciones *in situ* de pH, temperatura (T), oxígeno disuelto (O.D.), conductividad y sólidos disueltos totales (T.D.S.). Las muestras se tomaron a inicios de marzo durante la temporada de lluvia que coincide con la época de vendimia en la provincia Uriondo y en el mes de mayo durante la época de estiaje.

2.3 Pruebas con *Allium cepa*.

Los bulbos de cebolla fueron adquiridos en el mercado local de Tarija. Se seleccionó los cebollines de apariencia saludable, sin hongos ni daños radiculares. Luego se limpiaron las capas exteriores cuidando de no dañar el anillo radicular.

2.4 Evaluación macroscópica

Cada muestra de agua se diluyó con agua del grifo previamente hervida, para obtener concentraciones de 6,25 %, 12,50 %, 25,00 %, 50,00 % y 100,00 % (sin diluir). Diez cebollines por triplicado (n=30) por dilución se colocaron en agua de grifo previamente hervida y fría en la muestra de agua dentro de vasos de precipitados por 48 a 72 horas hasta que las raíces tuviesen una longitud de 1,5 cm como mínimo. Después de este tiempo se sacó el manojito de cebollines de la solución y se lavó con agua hervida y dejando luego 48 horas más en las diluciones respectivas (6,25%, 12,55%, 25%, 50%, 100%). El control negativo se preparó solo con agua de grifo. Luego de ese tiempo se midieron con una regla las longitudes de al menos 20 raíces colectadas al azar de cada uno de los tratamientos. Los resultados se compararon con los del control.

El porcentaje de inhibición de las raíces de cebolla se calculó con la siguiente ecuación [13]:

$$\%Inhibición = \frac{\text{Longitud del control} - \text{longitud de la muestra}}{\text{longitud del control}} \times 100 \quad [\text{Ec. 1}]$$

2.5 Evaluación microscópica.

Las raíces de los cebollines se cortaron y fijaron en metanol/ácido acético (3:1) dentro de botellas de vidrio y se mantuvieron a 4 °C durante 24 h antes de su uso. Las raíces fijadas se hidrolizaron en HCl 1N a temperatura ambiente durante 5 minutos. Las raíces hidrolizadas se lavaron varias veces con agua desionizada. Se

corto el extremo terminal de tres raíces (unos 3 mm) se trituraron en cada portaobjetos y se tiñeron con orceína acética durante 10 a 15 minutos. Se eliminó el exceso de colorante. Se observaron un total de 1.000 células de 2 portaobjetos por concentración (con un aumento de 100x). Se reportaron las células que contenían uno o más micronúcleos de acuerdo con los criterios explicados por Fenech [11]. Se consideró que existe riesgo genotóxico si el número de micronúcleos (MCN) formados en el agua evaluada es igual o mayor al doble de los micronúcleos formadas en el ensayo de control [12], (figura 2).

El porcentaje de micronúcleos (MCN%) se calculó empleando la siguiente fórmula:

$$MCN\% = \frac{\text{Número de células con micronúcleos}}{\text{Número total de células contadas}} \times 100 \quad [\text{Ec. 2}]$$

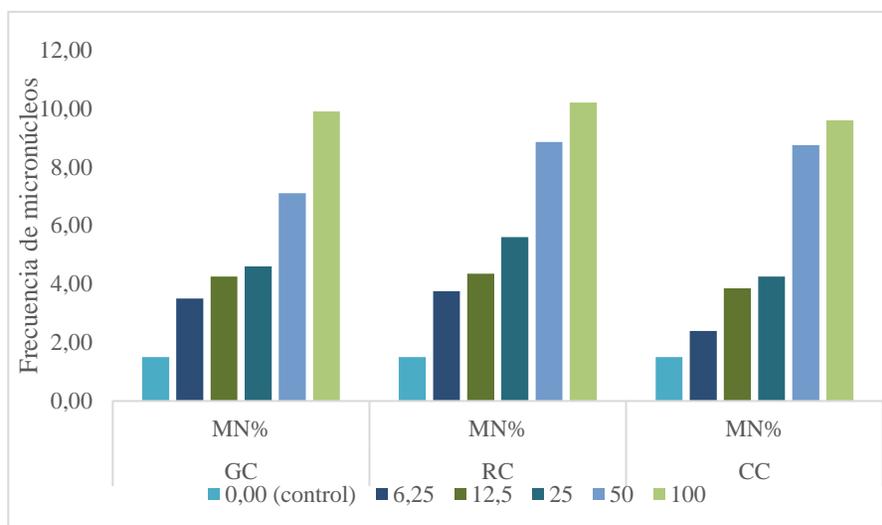


Figura 2: Frecuencia de micronúcleos en las células de cebollines tratadas con diluciones de aguas del Sistema de riego Guadalquivir-CENAVIT-Calamuchita (GC), del Río Camacho (RC) y del canal de riego de Calamuchita (CC).

2.6 Análisis estadístico.

Se calculó la media de la longitud de las raíces y los datos cuantitativos se resumieron como medias \pm desviación estándar. Los micronúcleos fueron expresados como porcentajes. La normalidad de los datos se evaluó con la prueba de Shapiro-Wilk, la de homogeneidad de varianzas con la prueba de Levene, y se hizo el análisis de varianza ANOVA de una vía. En los casos en los que la prueba ANOVA

resultó significativo se aplicó la prueba de Dunnett, una prueba *post hoc* de comparaciones múltiples frente al control (blanco) utilizando SPSS versión 25.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, EE. UU.). Se compararon los efectos de las muestras de agua y los controles sobre el crecimiento de las raíces y la formación de micronúcleos de *A. cepa*. Las diferencias significativas se establecieron en $p \leq 0,05$.

3 Resultados.

Los parámetros medidos *in situ* y en el laboratorio para todas las muestras de aguas tomadas de los tres puntos analizados, en ambas campañas de muestreo, se encontraban dentro de los valores máximos admisibles de acuerdo con el Reglamento en Materia de Contaminación Hídrica (Anexo A). Sin embargo, en la temporada de estiaje el agua del sistema de riego GC mostraba espuma y olor característico a aguas residuales, esto es probablemente debido a que en esta época un mayor porcentaje del caudal lo compone el efluente de las lagunas de oxidación de San Luis.

3.1 Evaluación macroscópica.

Los efectos de las muestras de agua sobre el crecimiento de las raíces de los cebollines indican sus niveles de toxicidad utilizando la inhibición del crecimiento como biomarcador de efecto. Todas las muestras de agua en época de estiaje redujeron el crecimiento de las raíces de *A. cepa*, pero no de manera dosis-dependiente (Tabla 2). Ninguna de las muestras de agua, en ambos periodos de muestreo, indujo una inhibición del 50% del crecimiento de raíces respecto del control negativo, por lo que no fue posible calcular el CI50. En el muestreo en época de lluvia todas las diluciones de RC promocionaron el crecimiento (hormesis) por encima de los valores del control. Las diluciones de 12,5%, 50% y 100% produjeron porcentajes de crecimiento mayor al del control estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$). Lo contrario ocurrió con las muestras del RC tomadas en la época de estiaje ya que todas las diluciones mostraron inhibir el crecimiento radicular hasta en un 30% respecto al control, sin embargo, la diferencia no fue estadísticamente significativa. La inhibición del crecimiento de raíces por las muestras de agua sin diluir (100%) de GC y CC durante la época de lluvias fue menor al 5%, aumentando en las muestras en época seca a 16,10% para GC y 18,58% para CC.

Tabla 2. Efectos de las muestras de agua y el control en el crecimiento de las raíces de *Allium cepa*.

Concentración (%)	GC			RC			CC		
	Long. Raíz ±SD	Creci. raíz (%)	Inhib. (%)	Long. Raíz ±SD	Creci. raíz (%)	Inhib. (%)	Long. Raíz ±SD	Creci. raíz (%)	Inhib. (%)
Época de lluvias									
0,00 (control)	4,05±1,86	100,00	0,00	4,05±1,86	100,00	0,00	4,05±1,86	100,00	0,00
6,25	3,90±1,10	96,30	3,70	4,25±0,98	104,94	0,00	3,85±0,88	95,06	4,94
12,50	4,05±1,07	100,00	0,00	4,40±1,22	108,64	0,00	3,84±0,99	94,81	5,19
25,00	3,50±1,22	86,42	13,58	4,20±1,18	103,70	0,00	3,60±0,77	88,89	11,11
50,00	3,50±0,91	86,42	13,58	4,50±1,03	111,11	0,00	4,30±1,34	106,17	0,00
100,00	3,95±1,14	97,53	2,47	4,40±1,13	108,64	0,00	3,85±0,85	95,06	4,94
Época de estiaje									
0,00 (control)	3,23±0,50	100,00	0,00	3,23±0,50	100,00	0,00	3,23±0,50	100,00	0,00
6,25	2,44±0,58	75,54	24,46	2,8±0,72	86,69	13,31	2,53±0,60	78,33	21,67
12,50	2,64±0,50	81,73	18,27	3,03±0,80	93,81	6,19	2,73±0,63	84,52	15,48
25,00	2,61±0,55	80,80	19,20	2,28±0,53	70,59	29,41	2,57±0,62	79,57	20,43
50,00	2,81±0,36	87,00	13,00	2,63±0,48	81,42	18,58	2,66±0,96	82,35	17,65
100,00	2,71±0,41	83,90	16,10	2,24±0,46	69,35	30,65	2,63±0,52	81,42	18,58

3.2 Evaluación microscópica.

La genotoxicidad de GC, RC y CC en ambas épocas analizadas se determinaron en función de sus impactos en la división celular con la formación de micronúcleos en *A. cepa*. La frecuencia de micronúcleos MN% (Tabla 3) en la época de lluvia, fue mayor y significativamente diferente del control ($p \leq 0,05$) en todas las diluciones ensayadas excepto 6,25 % en las muestras de las tres zonas analizadas. En el caso de los tratamientos realizados durante la época seca todas las diluciones de las aguas de GC y RC excepto la de 6,25% provocaron un aumento significativo de la frecuencia de micronúcleos. Mientras que en el caso de las diluciones del agua del CC la frecuencia de micronúcleos únicamente fue significativamente mayor respecto al control para las diluciones de 25%, 50% y 100%. El riesgo genotóxico se calculó en función al número de micronúcleos de cada muestra respecto al control, si el número de micronúcleos de la muestra era mayor o igual a dos veces el número de micronúcleos del control se considera que existe riesgo genotóxico.

Tabla 3. Frecuencia de micronúcleos (MN) inducidos en las células de *A. cepa* por las muestras de agua respecto al control en época de lluvias y de estiaje.

	GC	RC	CC	GC	RC	CC
Concentración (%)	MN%	MN%	MN%	MN%	MN%	MN%
Época de lluvias				Época de estiaje		
0,00 (control)	1,50	1,50	1,50	1,80	1,80	1,80
6,25	3,50	3,75	2,40	2,20	2,00	2,50
12,5	4,25	4,35	3,85	3,10	3,80	2,90
25	4,60	5,60	4,25	6,00	6,10	4,20
50	7,10	8,85	8,75	7,10	7,40	6,50
100	9,90	10,20	9,60	9,50	8,30	8,50

4 Discusión.

La prueba con *Allium cepa* es un ensayo sencillo y de bajo costo, la determinación de micronúcleos es un parámetro utilizado para evaluar el potencial mutagénico de las muestras porque es el resultado de la ausencia o reparación incorrecta de alteraciones en las células mitóticas. Es considerado por muchos autores como un punto final efectivo, simple de analizar y eficiente para evaluar la contaminación ambiental [6], [8], [9], [11], [14], [15]. A pesar de que los ensayos genotóxicos y

mutagénicos no identifican los contaminantes presentes en las muestras de agua, son capaces de diagnosticar los posibles efectos de esos contaminantes, lo que no es posible utilizando únicamente el enfoque clásico de monitoreo ambiental.

Respecto a las observaciones macroscópicas podemos decir que los contaminantes presentes en las aguas analizadas no inhibieron el crecimiento de las raíces de manera significativa y por el contrario en la época de lluvia el agua del río Camacho (RC) promovió el crecimiento de las raíces superando al control, este fenómeno conocido como hormesis puede presentarse cuando se tienen nutrientes en las aguas testeadas que puedan enmascarar el efecto de otros contaminantes tóxicos [16].

La observación microscópica develó un potencial riesgo genotóxico en las muestras de agua testeadas traducida en el incremento del número de micronúcleos encontrados en las células de las raíces de cebollines. La genotoxicidad de los puntos de muestreo fue estadísticamente significativa en los tres sitios estudiados y en ambas épocas del año, caracterizando la presencia de genotóxicos en todo el año. Similares situaciones han sido reportadas en ríos en Brasil que reciben descargas de aguas residuales. [17]. Como se mencionó antes, los cuerpos de agua analizados están expuestos a ser contaminados por la escorrentía proveniente de los suelos agrícolas, que arrastran restos de los productos utilizados para abonar, así como los pesticidas empleados para el control de las enfermedades en las plantas y el ganado. Se ha reportado el efecto genotóxico de varios de los pesticidas comúnmente empleados en la agricultura [18] por lo que la presencia de trazas de pesticidas podría ser la causa de los efectos observados. Por otro lado el aporte de las aguas residuales provenientes de las lagunas de oxidación es un factor importante a considerar al momento de buscar las causas de la genotoxicidad reportada en las muestras de agua del sistema de riego Guadalquivir-CENAVIT- Calamuchita, pues varios autores han reportado efectos genotóxicos tanto de muestras de agua residual cruda como tratada [17], [19], [20]

La comparación de los resultados de la inhibición del desarrollo de las raíces con la frecuencia de micronúcleos muestra que el análisis de los micronúcleos puede servir para detectar sitios con riesgo genotóxico antes que los efectos sean más severos que se vea afectados parámetros morfológicos como el largo de las raíces y el porcentaje de inhibición del crecimiento.

5 Conclusiones.

De acuerdo con los hallazgos de este estudio, se puede afirmar de manera preliminar que las aguas de los sistemas de riego GC y CC y del RC presentan riesgo

genotóxico por la frecuencia de micronúcleos encontrada en las células de las raíces de cebollines tratadas con muestras de agua de los tres sitios de estudio comparadas con el control.

Es importante enfatizar que estas tres fuentes de agua para riego no habían sido previamente analizadas por potenciales genotóxicos por lo que este estudio pretende ser un diagnóstico inicial que muestre la necesidad de incluir este tipo de estudios a los monitoreos de calidad de agua. Existe la necesidad de estudios adicionales de los sitios de muestreo para identificar las fuentes de contaminación con potencial citotóxico y mutagénico, sin embargo, la prueba de *A. cepa* es una herramienta útil para establecer sitios prioritarios para realizar más análisis.

Referencias Bibliográficas

- [1] B. C. Manzano, M. M. Roberto, M. M. Hoshina, A. A. Menegário, and M. A. Marin-Morales, "Evaluation of the genotoxicity of waters impacted by domestic and industrial effluents of a highly industrialized region of São Paulo State, Brazil, by the comet assay in HTC cells," *Environ. Sci. Pollut. Res.*, vol. 22, no. 2, pp. 1399–1407, 2015, doi: 10.1007/s11356-014-3476-5.
- [2] N. J. Carvalho Batista *et al.*, "Genotoxic and mutagenic evaluation of water samples from a river under the influence of different anthropogenic activities," *Chemosphere*, vol. 164, pp. 134–141, 2016, doi: 10.1016/j.chemosphere.2016.08.091.
- [3] D. Hering *et al.*, "Managing aquatic ecosystems and water resources under multiple stress - An introduction to the MARS project," *Sci. Total Environ.*, vol. 503–504, pp. 10–21, 2015, doi: 10.1016/j.scitotenv.2014.06.106.
- [4] A. Akinboro, S. Mohammed, Kamaruzaman Rathnasamy, and V. R. Muniandy, "Genotoxicity Assessment of Water Samples from the Sungai Dua River in Pulau Pinang, Malaysia, Using the *Allium cepa* Test," *Trop. Life Sci. Res.*, vol. 22, no. 2, pp. 23–25, 2011.
- [5] J. Dutta, A. Ahmad, and J. Singh, "Study of industrial effluents induced genotoxicity on *Allium cepa* L.," *Caryologia*, vol. 71, no. 2, pp. 139–145, 2018, doi: 10.1080/00087114.2018.1447631.
- [6] S. Tabrez, S. Shakil, M. Urooj, G. A. Damanhour, A. M. Abuzenadah, and M. Ahmad, "Genotoxicity testing and biomarker studies on surface waters: An overview of the techniques and their efficacies," *J. Environ. Sci. Heal. - Part C Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.*, vol. 29, no. 3, pp. 250–275, 2011, doi: 10.1080/10590501.2011.601849.

- [7] W. F. Grant, “The present status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens,” *Mutat. Res. Regul. Pap.*, vol. 310, no. 2, pp. 175–185, 1994, doi: 10.1016/0027-5107(94)90112-0.
- [8] D. M. Leme and M. A. Marin-Morales, “Allium cepa test in environmental monitoring: A review on its application,” *Mutat. Res. - Rev. Mutat. Res.*, vol. 682, no. 1, pp. 71–81, 2009, doi: 10.1016/j.mrrev.2009.06.002.
- [9] B. J. Majer, T. Grummt, M. Uhl, and S. Knasmüller, “Use of plant bioassays for the detection of genotoxins in the aquatic environment,” *Acta Hydrochim. Hydrobiol.*, vol. 33, no. 1, pp. 45–55, 2005, doi: 10.1002/aheh.200300557.
- [10] M. Fenech, S. Knasmueller, C. Bolognesi, N. Holland, S. Bonassi, and M. Kirsch-Volders, “Micronuclei as biomarkers of DNA damage, aneuploidy, inducers of chromosomal hypermutation and as sources of pro-inflammatory DNA in humans,” *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, vol. 786, 2020, doi: 10.1016/j.mrrev.2020.108342.
- [11] M. Fenech, “The in vitro micronucleus technique,” *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.*, vol. 455, no. 1–2, pp. 81–95, 2000, doi: 10.1016/S0027-5107(00)00065-8.
- [12] Ministerio de Medio Ambiente y Agua (Bolivia), *Guía de evaluación genotóxica de cuerpos de agua utilizando células de raíces de cebollines*. 2014.
- [13] G. Castillo Morales, *Ensayos Toxicológicos Y Métodos De Evaluación De Calidad De Aguas Estandarización, Intercalibración, Resultados Y Aplicaciones*, IDRC, Canada 2004.
- [14] T. H. Ma *et al.*, “The improved Allium/Vicia root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants,” *Mutat. Res. Mutagen. Relat. Subj.*, vol. 334, no. 2, pp. 185–195, 1995, doi: 10.1016/0165-1161(95)90010-1.
- [15] T. Platt, “Producción, tecnología y trabajo en la Rivera de Potosí durante la República temprana,” in *EL SIGLO XIX: BOLIVIA Y AMÉRICA LATINA*, R. Barragán and S. Qayum, Eds. Lima: Institut français d’études andines, 1997, pp. 395–435.
- [16] E. J. Calabrese, “The Maturing of Hormesis as a Credible Dose-Response Model,” *Nonlinearity Biol. Toxicol. Med.*, vol. 1, no. 3, pp. 319–343, 2003, doi: 10.1080/15401420390249907.
- [17] J. M. de Castro e Sousa *et al.*, “Cytotoxicity and genotoxicity of Guaribas river water (Piauí, Brazil), influenced by anthropogenic action,” *Environ. Monit. Assess.*, vol. 189, no. 6, 2017, doi: 10.1007/s10661-017-6015-2.

- [18] A. Mesi (Dizdari) and D. Kopluku, "Cytotoxic and Genotoxic Potency Screening of Two Pesticides on *Allium cepa* L.," *Procedia Technol.*, vol. 8, pp. 19–26, 2013, doi: 10.1016/j.protcy.2013.11.005.
- [19] M. K. Alotaibi and I. O. Barnawi, "Cytogenetic biomonitoring of almadinah almunawarah municipal wastewater treatment plant using the *allium cepa* chromosome aberration assay," *Pakistan J. Bot.*, vol. 50, no. 6, pp. 2245–2249, 2018.
- [20] R. P. Gomes *et al.*, "Evaluation of the raw water quality: physicochemical and toxicological approaches," *Environmental Geochemistry and Health*, vol. 41, no. 6, pp. 2425–2442, 2019, doi: 10.1007/s10653-019-00292-9.