



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**ECOTOXICIDAD PRODUCIDA POR AGROQUÍMICOS EMPLEADOS  
EN EL CULTIVO DE *Gerbera jamesonii* EN INVERNADERO, EN  
VILLA GUERRERO, ESTADO DE MÉXICO**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS AMBIENTALES**

PRESENTA:

**Q.F.B. MARÍA GUADALUPE TECUAPETLA VARGAS**

DIRIGIDO POR:

**DRA. ARACELI AMAYA CHAVEZ**

**DR. JUAN CARLOS SÁNCHEZ MEZA**



TOLUCA, ESTADO DE MÉXICO; ENERO 2014



3º (EV. DE GRADO)  
OFICIO NO 559/2013

Toluca, México, 28 de noviembre de 2013

**P. DE MAESTRIA EN CIENCIAS AMBIENTALES  
MARIA GUADALUPE TECUAPETLA VARGAS  
FACULTAD DE QUIMICA  
P R E S E N T E**

La que suscribe Directora de la Facultad de Química, dependiente de la Universidad Autónoma del Estado de México, comunica a Usted que el Jurado de su Evaluación de Grado estará formado por:

- Dr. Juan Carlos Sánchez Meza  
**PRESIDENTE**
- Dra. Patricia Balderas Hernández  
**SECRETARIO**
- Dra. Araceli Amaya Chavez  
**PRIMER VOCAL**
- Dra. Gabriela Roa Morales  
**SEGUNDO VOCAL**
- Dra. Angeluz Olivera Velona  
**TERCER VOCAL**
- Dra. Julieta Castillo Cadena  
**SUPLENTE**
- Dra. Edith Erielia Gutiérrez Segura  
**SUPLENTE**

FIRMA

**ATENTAMENTE**  
**PATRIA, CIENCIA Y TRABAJO**  
*"2013, 50 Aniversario Luctuoso del Poeta Heriberto Enriquez"*  
  
**M. en A.P. GUADALUPE OFELIA SANTAMARÍA GONZALEZ**  
**DIRECTORA**

c.c.p. Archivo



www.uaemex.mx

Facultad de Química • Paseo Colón Esq. Paseo Toluca • Toluca Estado de México  
Tel y Fax: 217-5109 y 217-3890 • lquim@uaemex.mx

El presente trabajo se desarrolló en el Departamento de Toxicología y Farmacología de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma del Estado de México., contando con el apoyo de la beca CONACYT número de registro 412193

---

Este trabajo fue registrado con el título “Ecotoxicidad producida por agroquímicos empleados en el cultivo de *Gerbera jamesonii* en invernadero, en Villa Guerrero, Estado de México” con el número de registro MACIAS-2012.

El proyecto se inscribe en la línea de prevención, efectos y control de la contaminación ambiental en el área de calidad ambiental del programa de Maestría en Ciencias Ambientales de la Facultad de Química de la UAEM.

## DEDICATORIAS

A mi familia

Especialmente a mis padres Lupita y Jorge, hermanos Jorge y Alejandro por todo el apoyo y amor que me brindan en todo momento... Gracias... los amo

A las familias Tecuapetla y Vargas

Por todo su cariño y apoyo.

A Ricardo Velázquez Gómez

Por estar a mi lado, por su cariño, cuidados y apoyo incondicional... Te amo

A mis amigos

Por todas los momentos compartidos.

A mis abuelos

Que desde el cielo me brindan su amor.

A todos mis compañeros de Ruta con cariño.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Divinidad

Por llenarme de bendiciones todos los días, por guiarme, por darme la fortaleza para poder terminar este proyecto y .sobre todo por rodearme de personas maravillosas.

A la Dra. Araceli Amaya Chávez

Con cariño por su dedicación y paciencia para el desarrollo de este proyecto, pero sobre todo por su comprensión y calidad humana.

Al Dr. Juan Carlos Sánchez M., la Dra. Angeluz Olvera V., la Dra. Gabriela Roa M., la Dra. Julieta Castillo C. y la Mtra Patricia Mireles L.

Por su apoyo, por compartir sus conocimientos y por inspirar en mí el deseo de aprender cada día más.

A Claudia Cano Rodríguez

Por todo su apoyo, por compartir sus conocimientos y principalmente por brindarme su amistad.

A la Dra. Patricia Balderas Hernández y el Lic. Juan José Millán Gómez

Por el apoyo y por guiarme con paciencia a lo largo de la maestría.

A Elizabeth Ramírez

Por compartir todas las vivencias del trabajo de campo, por su apoyo y participación en el desarrollo de este trabajo.

A los señores Rodolfo, Jesús y Asunción

Por el apoyo brindado y disposición para llevar a cabo el estudio en sus invernaderos.

A las técnicas Patricia Ruíz, Silvia Ramírez e Isabel Arzate.

Por sus atenciones, amistad y apoyo para este trabajo.

A la Alianza Interdisciplinaria Socio Ambiental Che Tuumben S.C.

Por su apoyo e inspiración.

A CONACYT por el apoyo brindado con la beca número 412193.

## ÍNDICE

|  |           |
|--|-----------|
| Índice.....                                    | 7         |
| Resumen.....                                   | 12        |
| Abstract.....                                  | 13        |
| Introducción.....                              | 14        |
| <b>1. MARCO TEÓRICO.....</b>                   | <b>17</b> |
| 1.1 Floricultura.....                          | 17        |
| 1.2 Plaguicidas.....                           | 19        |
| 1.3 Ecotoxicología.....                        | 21        |
| 1.4 Evaluación de Riesgo.....                  | 23        |
| 1.4.1 Riesgo ambiental en Villa Guerrero.....  | 25        |
| 1.4.1.1 Características de Villa Guerrero..... | 26        |
| 1.4.1.2 Ecosistema.....                        | 28        |
| 1.5 Ambiente en Villa Guerrero.....            | 30        |
| 1.6 Bioensayos.....                            | 39        |
| 1.7 Coeficiente de Impacto Ambiental.....      | 41        |
| 1.8 Antecedentes.....                          | 41        |
| <b>2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>      | <b>45</b> |
| 2.1 Hipótesis.....                             | 46        |
| <b>3. OBJETIVOS.....</b>                       | <b>47</b> |
| 3.1 Objetivo general.....                      | 47        |
| 3.2 Objetivos específicos.....                 | 47        |
| <b>4. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....</b>         | <b>48</b> |

|                                   |     |
|-----------------------------------|-----|
| <b>5. RESULTADOS</b> .....        | 58  |
| 5.1 Resultados a publicar.....    | 58  |
| 5.2 Resultados no publicados..... | 85  |
| <b>6. DISCUSIÓN GENERAL</b> ..... | 101 |
| <b>7. CONCLUSIONES</b> .....      | 104 |
| <b>8. ANEXO</b> .....             | 106 |
| <b>9. REFERENCIAS</b> .....       | 112 |

### Índice de figuras

|   |    |
|---|----|
| Fig.1. Imagen del Inv1 y el depósito donde almacena el agua de riego.....   | 85 |
| Fig.2. Imagen del Inv2 y el depósito donde almacena el agua de riego.....   | 86 |
| Fig.3. Imagen del Inv3 y el depósito donde almacena el agua de riego.....   | 86 |
| Fig. 4. Porcentaje de mortalidad de <i>Daphnia pulex</i> expuesta al agua de riego de invernaderos. ....  | 88 |
| Fig. 5. Porcentaje de inducción de <i>Selenastrum capricornutum</i> expuesta al agua de riego de invernaderos. ....   | 89 |
| Fig. 6. Porcentaje de semillas germinadas ( <i>Lactuca sativa L.</i> ) expuestas al agua de riego de invernaderos de gerbera.....                                   | 90 |
| Fig. 7. Promedio del crecimiento de la radícula de <i>Lactuca sativa L.</i> expuestas al agua de riego de invernaderos de gerbera en estudio.....                   | 91 |
| Fig. 8. Porcentaje de inhibición de la elongación de la radícula de semillas <i>Lactuca sativa L.</i> expuestas al agua de riego de los invernaderos en estudio.... | 92 |
| Fig. 9. Índice de germinación de la radícula de <i>Lactuca sativa L.</i> expuesta al agua de riego de los invernaderos en estudio.....                              | 93 |

|   |     |
|---|-----|
| Fig. 10. Promedio del crecimiento del hipocotilo de <i>Lactuca sativa</i> L. expuestas al agua de riego de los invernaderos de gerbera en estudio.....            | 94  |
| Fig. 11. Porcentaje de inhibición de la elongación del hipocotilo de semillas <i>Lactuca sativa</i> L. expuestas al agua de riego de invernaderos de gerbera..... | 94  |
| Fig. 12. Índice de germinación del hipocotilo de <i>Lactuca sativa</i> L. expuesta al agua de riego de los invernaderos de gerbera en estudio. ....               | 95  |
| Fig. 13. Imagen de plántula de <i>Lactuca sativa</i> L. expuesta 120 horas a la sustancia control (agua destilada).....   | 96  |
| Fig. 14. Imágenes de plántulas de <i>Lactuca sativa</i> L. expuesta 120 horas al agua de riego de los invernaderos en estudio.....                                | 96  |
| Fig. 15. Imágenes de plántulas de <i>Lactuca sativa</i> L. expuesta 120 horas al agua de riego de los invernaderos en estudio.....                                | 97  |
| Fig. 16. Imágenes de plántulas de <i>Lactuca sativa</i> L. expuesta 7 días al suelo de los invernaderos en estudio. ....  | 97  |
| Fig.17. Actividad colinesterásica de <i>Eisenia andrei</i> expuesta a suelo del Inv1. * ANOVA Diferencia significativa ( $p < 0.05$ ), $n = 3$ .....              | 99  |
| Fig.18. Actividad colinesterásica de <i>Eisenia andrei</i> expuesta a suelo del Inv2. * ANOVA Diferencia significativa ( $p < 0.05$ ), $n = 3$ .....              | 99  |
| Fig.19. Actividad colinesterásica de <i>Eisenia andrei</i> expuesta a suelo del Inv3. * ANOVA Diferencia significativa ( $p < 0.05$ ), $n = 3$ .....              | 100 |

## Índice de tablas

|  |     |
|--|-----|
| Tabla 1. Parámetros fisicoquímicos de las muestras de agua de riego de los invernaderos de gerbera en estudio..... | 87  |
| Tabla 2. Datos de plaguicidas aplicados en el Invernadero 1.....   | 106 |
| Tabla 3. Datos de plaguicidas aplicados en el Invernadero 2.....   | 107 |
| Tabla 4. Datos de plaguicidas aplicados en el Invernadero 3.....   | 109 |

## LISTA DE ABREVIACIONES

|      |                                   |
|------|-----------------------------------|
| VG   | Villa Guerrero                    |
| Inv1 | Invernadero 1                     |
| Inv2 | Invernadero 1                     |
| Inv3 | Invernadero 1                     |
| OP   | Organofosforados                  |
| OCI  | Organoclorados                    |
| C    | Carbamatos                        |
| T    | Triazinas                         |
| P    | Piretroides                       |
| SG   | Semillas Germinadas               |
| PC   | Promedio del crecimiento          |
| IG   | Índice de Germinación             |
| CIA  | Coefficiente de Impacto Ambiental |

## RESUMEN

En Villa Guerrero (VG), Estado de México la floricultura es una actividad importante para la población. Uno de los cultivos que más se producen es el de la gerbera, para el cual se utilizan grandes cantidades de agroquímicos, entre ellos los plaguicidas que causan efectos adversos a la salud humana y al ecosistema. Se ha documentado que de la cantidad de plaguicidas aplicados un gran porcentaje no llega a los organismos blanco y es depositado en agua y suelo, contribuyendo de manera importante a la contaminación ambiental. El objetivo de este estudio fue estimar el riesgo ecotoxicológico resultado de la aplicación de agroquímicos para el cultivo de gerbera en invernadero. El efecto tóxico producido por la cantidad residual de agroquímicos en el suelo fue determinado con bioensayos con *Lactuca sativa L.* y lombrices de tierra *Eisenia andrei*, y en el agua con *Daphnia pulex* y *Selenastrum capricornutum*. Fue calculado el Coeficiente de Impacto Ambiental (CIA) para estimar el riesgo ecotoxicológico producido por el uso de plaguicidas específicos en cada estudio. En las pruebas de toxicidad se encontró que el suelo y agua de los invernaderos resultaron tóxicos para los organismos de prueba. El impacto ambiental obtenido mediante la determinación de los CIA considera el número de compuestos aplicados así como la toxicidad y persistencia del compuesto bajo las condiciones ambientales, resultando el mayor valor el del invernadero 2 debido al tipo, cantidad y frecuencia de los productos aplicados. La información obtenida es relevante para la complementación de información sobre los cultivos de gerbera, así como para tomar medidas preventivas en el uso y manejo de los plaguicidas, contribuyendo a una mejor calidad de vida de la población y el ambiente.

## ABSTRACT

In Villa Guerrero (VG), State of Mexico the floriculture is the most important economic activity of the population. One of the most widely produced crop is the gerbera, for its cultivate the farmers used large amounts of agrochemicals including the pesticides that causing adverse effects to human health and the ecosystem. It has been documented that of the amount of pesticides applied a great percentage not reach to the target organisms and they are deposited in water and soil, contributing significantly to environmental pollution. The aim of this study was to determine the eco toxicological risk resulting from the application of agrochemicals for cultivation of gerbera in greenhouse. The toxic effect that produces the residual amount of the agrochemicals in the ground was determined with bioassays with *Lactuca sativa* L. and the earthworm, *Eisenia andrei*, and in the water with *Daphnia pulex*, and *Selenastrum capricornutum*. Also we calculated the environmental impact coefficient (CIA) for estimated the ecological risk produced by the use of specific pesticides in each greenhouse in study. In toxicity tests found that the amount residual of agrochemicals in ground and the water of the greenhouses were toxic to the test organisms. The environmental impact found by determining the CIA of the compounds applied taken the data of toxicity and persistence of the pesticides under ambient conditions, we obtained greater value in the greenhouse 2, due to the type, quantity and frequency of products applied. These data are relevant for information complementing gerbera crops and later preventive measures may be taken in the use and handling of pesticides contributing to a better quality of life for people and care for the environment.

## INTRODUCCIÓN

La producción florícola del Estado de México representa el 46.5% del total de la superficie ornamental nacional, de ahí su importancia como actividad económica. En cuanto a la producción destaca el municipio de Villa Guerrero, en el que se cultivan especies como: crisantemo, clavel, rosa, liliium, gerbera, statice, entre otros (SEDAGRO, 2012).

Los principales agroquímicos que dañan el ambiente son los plaguicidas y por lo mismo los más estudiados. Las personas pueden quedar expuestas a los plaguicidas durante la fabricación, el embalaje, el transporte, la mezcla y la aplicación de estas sustancias, ya sea por derrames, por envenenamiento accidental o por trabajar en zonas recientemente fumigadas. La mayoría de los plaguicidas no se usan de manera directa sobre las plagas en cuestión, se les controla con mayor eficacia cuando se rocía la vegetación con una cubierta protectora, asegurándose así que los insectos quedarán expuestos al veneno (Wagner, 1996).

Las personas que trabajan con estos productos y demás pobladores muchas veces no cuentan con la suficiente información para el manejo adecuado de estas sustancias lo que conlleva a un uso indiscriminado incrementando los riesgos a la salud de los pobladores y del ecosistema.

La mayor cantidad de plaguicidas aplicados no llega al organismo blanco y es depositado en agua y suelo, siendo una manera importante de contaminación ambiental, es por lo cual que en todo el mundo se hacen trabajos para determinar el efecto tóxico que pueden causar. Dicha información es importante para tomar medidas correctivas y/o preventivas en el uso y manejo de los agroquímicos contribuir para una mejor calidad vida de la población, sin afectar la productividad.

Se han identificado posibles efectos sobre el ecosistema por uso de agroquímicos, algunos de estos: el manejo y disposición inadecuada, intoxicaciones, agotamiento de los nutrientes del suelo y contaminación, así como contaminación de ríos y cuerpos de agua, lo que hace necesario evaluar la naturaleza y magnitud del daño al ambiente y a la salud de los pobladores.

Los efectos ecotoxicológicos y el riesgo ambiental que implica el uso inadecuado de los agroquímicos a llevado a realizar una gran diversidad de estudios en todos los aspectos, desde el manejo, la prevención, el uso, el impacto y los efectos en los ecosistemas, incluso se están buscando alternativas para sustituir los productos por unos menos dañinos para nuestro planeta. Es por esto que existen diversas técnicas y métodos para evaluar el impacto ambiental y riesgo de estos productos.

En el suelo se deposita gran parte de los agroquímicos aplicados en los invernaderos; una situación problemática se deriva de la aplicación abusiva de estos con el fin de aumentar el rendimiento de las cosechas.

Los fertilizantes contienen nitrógeno, fósforo o potasio, por separado o en productos formados por mezclas; el problema ambiental más grave procede de los nitratos por su alta solubilidad (Doménech X., 2009).

Los plaguicidas presentan cierto impacto ambiental por la aplicación en el suelo en prácticas agrícolas. La aplicación de estos puede realizarse bien directamente en el suelo o rociándolo encima de las hojas de las plantas, donde permanece absorbido en la superficie de las hojas y arrastrado, posteriormente, hacia el suelo por deposición seca o lixiviación por el agua de precipitación. Ya en el suelo, el plaguicida puede permanecer absorbido sobre las partículas edáficas y sufrir alguna transformación química o lixiviarse hacia horizontes más profundos e incorporarse en los acuíferos (Doménech X., 2009).

Es por lo anterior la importancia de los estudios sobre los efectos de los residuos de agroquímicos en el suelo, pudiendo así conocer los efectos de estos en el ambiente. Durante las últimas décadas la comunidad científica y reguladora ha comenzado a considerar metodologías biológicas para la valoración de los efectos toxicológicos de los contaminantes, las evaluaciones de efectos obtenidas con este tipo de técnicas integran el impacto de todos los contaminantes a los que la biota está expuesta (Persoone et. al., 2000). Algunos de los efectos se pueden observar mediante los bioensayos, los cuales se han utilizado en varios trabajos para observar la susceptibilidad y efecto de varias sustancias específicas a nivel laboratorio.

## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1 Floricultura

La floricultura es una actividad agrícola que utiliza gran cantidad de mano de obra en relación con la superficie de terreno que se cultiva, los productores trabajan en la propagación de las plantas, mejora de las cosechas, abonos de las plantaciones además de genética, bioquímica y fisiología de la planta, así como, el almacenaje, procesado y transporte de las mismas. La actividad de la floricultura era considerada artesanal pero ha ido evolucionando y cada vez son más utilizados procesos típicos de una industria de producción de planta y flor ornamental a gran escala y con la tecnología adecuada puede extender los períodos de producción pudiendo así tener sus productos en el mercado durante todo el año (Sánchez, 2009).

En la década de los 60's, se llevó a cabo la difusión masiva de un sistema de producción conocido como Revolución Verde, basado en el uso de gran cantidad de insumos, entre semillas mejoradas, fertilizantes, plaguicidas y riegos, pero muy pronto se comenzaron a evidenciar los problemas causados por la intensificación de la agricultura y las malas prácticas de manejo: degradación de tierras por erosión, compactación y enfermedades, contaminación de aguas, alimentos y personas, pérdida de especies silvestres, dependencia creciente de plaguicidas por resistencia (Asociación de Hortelanos Tricantinos, 2007).

A lo largo de la historia del país, el mercado nacional ha jugado un papel relevante para la floricultura mexicana, a tal grado que hoy en día alrededor del 80% de la producción nacional se consume internamente, por lo que dicha actividad ha llegado a tener un papel importante en algunos estados, especialmente en el Estado de México. (Ochoa, 1999).

La actividad florícola en el Estado de México tiene sus antecedentes en 1955 cuando un grupo de japoneses inició con una producción de claveles en el municipio de Villa Guerrero (Fenner y Gebauer, 1992), al ver el éxito obtenido esta actividad se difundió rápidamente en la década de 1950 y 1960. Éste y otros municipios, como Tenancingo y Coatepec Harinas, conformaban una importante franja de producción de aguacate, posteriormente las restricciones del mercado para este producto favorecieron el desarrollo de la floricultura como principal actividad para esta zona, principalmente con cultivos a cielo abierto (Sánchez, 2009).

La floricultura ha presentado obstáculos que dificultan su desarrollo pleno. Si bien la producción ha ido en aumento, una parte no cumple con los estándares de calidad que exigen los mercados internacionales, así como no se ha profundizado en el desarrollo de nuevas variedades, presentaciones, aromas, entre otros, que son actualmente estándares de los mercados internacionales y por lo cual la mayoría de las veces están dispuestos a pagar un precio mayor.

El interés por esta actividad ha ido creciendo en los últimos años, haciendo que la imagen de las flores mexicanas empiece a ofrecer una nueva cara, para que no sea sólo en volumen, sino también con estándares de calidad internacional.

La gerbera es uno de los principales cultivos de la zona florícola del Estado de México, originaria de Transvaal (África del Sur); también se conoce como margarita del Transvaal. La gerbera lleva el nombre de Trangott Gerber, un médico alemán que coleccionó muchas plantas, sobre todo en la península danesa de Jutlandia. El nombre científico viene dado por un coleccionador de plantas llamado Jameson, quien descubrió la gerbera en Transvaal (InfoAgro, 2010).

Existen muchos cultivos de gerbera distintos y múltiples apariciones año tras año. En el proceso de cultivo de la gerbera existe una etapa en donde se utilizan los plaguicidas. Los plaguicidas son sustancias químicas utilizadas para controlar, prevenir o destruir las plagas que afectan a las plantaciones.

## **1.2 Plaguicidas**

Los plaguicidas son sustancias naturales o sintéticas elaboradas fundamentalmente para matar, ahuyentar o controlar organismos vivos considerados plagas, especies que los seres humanos tienen por indeseable. Las personas pueden quedar expuestas a los plaguicidas durante la fabricación, el embalaje, el transporte, la mezcla y la aplicación de estas sustancias, ya sea por derrames, por envenenamiento accidental o por trabajar en zonas recientemente fumigadas. La mayoría de los plaguicidas no se usan de manera directa sobre las plagas en cuestión, se les controla con mayor eficacia cuando se rocía la vegetación con una cubierta protectora, asegurándose así que los insectos quedarán expuestos al veneno (Wagner, 1996).

Existen diferentes clases de plaguicidas, algunos producen efectos a largo plazo, pueden llegar a causar enfermedades serias y hasta cáncer. Existen agroquímicos de alta toxicidad que puede causar intoxicaciones, la persona puede sufrir intoxicación con solo respirarlo o al tener contacto con la piel y la ingestión puede ser mortal.

Existen dos tipos de toxicidad por plaguicidas, aguda y crónica, una toxicidad aguda es cuando el efecto es de inmediato, la intoxicación crónica se refiere cuando un trabajador ha estado expuesto en forma repetida a los plaguicidas por algún tiempo, puede aparecer con síntomas importantes (Klaassen, 2001).

Durante años se ha promovido la venta de plaguicidas sin la información adecuada sin importar el riesgo que pueden generar para la salud, para el ambiente y para la agricultura misma. Es importante que al adquirir un plaguicida se informe cuáles son los riesgos que se corre al aplicar dicho plaguicida, qué cantidades debe aplicar, cuáles son las normas establecidas para el manejo, también es recomendable que la persona lea la información que viene en la etiqueta del producto, sus precauciones o advertencias (Ortiz, 2009).

El mal uso de este tipo de químicos trae efectos dañinos en la salud de los agricultores y de la población, no sólo en el momento en que se utiliza, sino que la mayor parte del plaguicida aplicado se queda en el entorno contaminando agua, suelo y aire, por lo que se realizan estudios de riesgos ecotoxicológicos para determinar la naturaleza y magnitud del daño, de acuerdo a los índices de exposición reportado por las autoridades competentes.

La American Psychological Association (APA) utiliza ciertos criterios de exposición a los plaguicidas para evaluar el riesgo potencial que representan los compuestos que no son cancerígenos. La dosis de referencia (DRf) se basa en el insumo diario aceptable.

Una DRf es una estimación del nivel de exposición cotidiano que la población humana puede tolerar sin un riesgo apreciable de sufrir perjuicios durante la vida de una persona. El DRf se obtiene determinando experimentalmente la concentración que no produce perjuicios observables y dividiéndola por un factor de incertidumbre, con el fin de reflejar la calidad y el tipo de los datos (Wagner, 1996). Esta información ayuda y complementa los estudios que se realizan para conocer y evaluar los efectos de los plaguicidas, de esta manera determinar cuáles son los que más afectan el ecosistema.

### **1.3 Ecotoxicología**

La ecotoxicología es una disciplina en rápido desarrollo de la ciencia ambiental, mejor definida como el estudio del destino y de los efectos de las sustancias tóxicas sobre un ecosistema. La ciencia en sí requiere una comprensión de los principios ecológicos y de la teoría ecológica, así como del modo en que las sustancias químicas afectan en potencia a individuos, poblaciones, comunidades y ecosistemas (Klaassen, 2001).

Por su naturaleza la ecotoxicología requiere integrar el conocimiento de otras ciencias como Química, Toxicología, Epidemiología y Ecología para entender el comportamiento de un contaminante desde que se libera a partir de una fuente, las vías de transporte y su destino final en el ambiente (Sánchez, 2003).

Uno de los aspectos conceptuales más frecuentemente discutidos es el del papel de la ecotoxicología en la protección del ser humano. Evidentemente puede considerarse que el ser humano forma parte del ecosistema y por lo tanto debería incluirse dentro del conjunto de poblaciones y comunidades bióticas consideradas por la ecotoxicología. Ahora bien, el nivel de protección que requiere el ser humano es muy diferente.

La ecotoxicología estudia aquellos cambios que resultan relevantes para la conservación de la estructura y función de los ecosistemas, y en este sentido los efectos sobre los individuos sólo son relevantes cuando afectan a las poblaciones; y los efectos sobre las poblaciones sólo son relevantes si afectan a las comunidades (Tarazona, 2010).

La ecotoxicología incluye el estudio de las fuentes de emisión de los contaminantes (su naturaleza, sus características espaciales, temporales, entre otras), del seguimiento y de las transformaciones ambientales de los productos emitidos, de la interacción entre ellos y los seres vivos y, por lo tanto de su impacto ambiental (Azevedo, 1986).

La ecotoxicología aplicada tiene como objetivo el desarrollo de protocolos de ensayo para ser utilizados como herramientas de predicción tempranas que permitan definir umbrales permisibles, con niveles de incertidumbre aceptables, y sirvan de guía a las entidades reguladores para la toma de decisiones (Day et al., 1988).

## 1.4 Evaluación de riesgo

En la actualidad un cambio social y cultural importante que ha vivido nuestro país es la creciente preocupación por el deterioro ambiental. Hasta hace tiempo este tipo de asuntos sólo era tratado por activistas o bien por profesionales de las cuestiones ambientales, pero en general la gente no se acercaba a estos temas.

En los últimos años la situación ha cambiado, la preocupación por el ambiente ha aumentado y en este tema la evaluación de riesgos es una herramienta útil para fundamentar la toma de decisiones con base en la mejor información científica disponible y no en percepciones o juicios de valor.

La información que proporciona la evaluación de un riesgo puede apoyar decisiones de control ambiental, evaluar y jerarquizar la importancia ambiental de una medida, así como estimar cuantitativamente los daños a la salud humana o a los ecosistemas derivados de la exposición a un contaminante ambiental.

El riesgo se define como la probabilidad de un resultado adverso y la valoración de riesgo es la caracterización científica y sistemática de efectos en potencia adversos para la salud, originados por la exposición de seres humanos a agentes o situaciones peligrosos. Los objetivos de la valoración de riesgo pueden variar con las necesidades de gestiones para disminuir el mismo.

La evaluación del riesgo ecológico según Sutter en 1993, es un proceso de asignación de magnitudes y probabilidades a los efectos adversos de actividades antrópicas y catástrofes naturales; recurre tanto a métodos predictivos para la evaluación de la exposición, como de las reacciones de sustancias tóxicas a distintos niveles de organización y escala trófica (Sutter, 1993).

Por lo anterior la evaluación de riesgo ecotoxicológico se puede definir como un proceso sistemático, fundado en evidencia científica, que tiene por objeto evaluar la probabilidad de que daños ecológicos puedan o estén ocurriendo, como consecuencia de la exposición a factores de estrés ambiental. En general el proceso consta de tres fases, la formulación del problema, seguida del análisis y finalmente la caracterización del riesgo (Klaassen, 2001).

La evaluación del riesgo constituye un procedimiento para sintetizar información y juicios científicos con el propósito de estimar la probabilidad que se produzca un efecto adverso en el ambiente o en los organismos derivado de la exposición a un agente químico (Maciorowski, 1993; Alonzo y Laborde, 2005).

Dado que en la mayoría de los casos no es posible la eliminación de la toxicidad, los organismos de protección ambiental deben definir la proporción de mortalidad o la reducción del crecimiento tolerable de las especies expuestas.

### **1.4.1 Riesgo ambiental en Villa Guerrero, Estado de México**

La evaluación del riesgo forma una parte importante de la administración de riesgos de sustancias liberadas al ambiente y que pueden afectar la salud humana. En términos generales la evaluación del riesgo incluye tres elementos importantes: la identificación del peligro, la evaluación de la exposición y la evaluación de la relación que existe entre la dosis de exposición y la respuesta observada en una población de organismos. La información obtenida a partir de estos tres elementos se analiza e integra para determinar la relevancia que tiene la presencia de una sustancia en el ambiente en una situación real, a esta integración de la información se le conoce como caracterización del riesgo (Maciorowski, 1993).

En muchos lugares no se cuenta con instrumentos normativos con respecto al riesgo ambiental por lo que no está demás contar con procedimientos que puedan ayudar en la prevención de problemas ambientales, todo esto derivado de la debida evaluación de riesgos mencionada anteriormente. Resulta interesante crear instrumentos técnico-legales que permitan hacer más fácil y completa la tarea en el ámbito de la prevención de riesgos (Ize Lema, 2010).

La primera etapa de la evaluación de riesgo, para nuestro caso riesgo ecotoxicológico, es la identificación del peligro pues necesitamos tener claro cuál es el problema que queremos analizar. Para el tema en cuestión será el uso de agroquímicos en los invernaderos de Villa Guerrero como potencial riesgo para el ecosistema.

Aunque el manejo integrado de plagas se aplica en forma creciente todavía una amplia gama de plaguicidas es utilizada con el fin de controlar apropiadamente las principales plagas agrícolas.

Para la segunda etapa, que es la evaluación de la exposición, resulta de gran importancia tener un amplio conocimiento de la zona y sus actividades, toda información que se pueda tener acerca del sitio de estudio, resulta de gran relevancia para la caracterización final y toma de decisiones. La información como localización, extensión, actividades económicas, orografía, el clima y la biodiversidad, son puntos clave para nuestra evaluación de riesgo ecotoxicológico.

#### **1.4.1.1 Características de Villa Guerrero, Estado de México**

Se localiza en las laderas australes de la Sierra Nevada de Toluca, cuya eminencia geográfica principal es el "Chignahuitecatl". El asentamiento urbano principal es la Villa Guerrero, considerada oficialmente como cabecera municipal. Colinda hacia el norte con Zinacantepec, Toluca, Calimaya y Tenango del Valle; hacia el oriente, con los municipios de Tenancingo y Zumpahuacán; al sur con Ixtapan de la Sal; y al occidente con el mismo Ixtapan de la Sal y con Coatepec Harinas.

Su extensión territorial abarca 267.8 kilómetros cuadrados que representa el 9.2% del Estado de México. Cuenta con cinco localidades que tienen categoría de pueblos son: Porfirio Díaz, San Mateo Coapexco, Santiago Oxtotitlán, Totolmajac y Zacango. Y veintinueve rancherías.

Las principales montañas del municipio son El Cerro Cuate o de Cuaximalpa con una altitud de 3,760 msnm, seguido por el Cerro Cuexcontepec 3,330 msnm. Hacia el occidente se localiza una larga cordillera que desciende desde el Chignahuitecatl y se prolonga de norte a sur hasta Ixtapan y Tonatico, dividiendo en su transcurso a los municipios de Coatepec Harinas e Ixtapan de la Sal. Lo más importante de su geografía son las profundas barrancas con acantilados rocosos.

El municipio da origen en su territorio a numerosos arroyos y ríos que en su conjunto forman parte de la cuenca del Alto Balsas; destacan por su importancia el río Grande o Texcaltenco, el río Chiquito de Santa María, el río San Gaspar, el arroyo Los Tizantec, el Tequimilpa, el río Cruz Colorada o San Mateo y el río Calderón.

En su trayecto dan lugar a numerosas cascadas y saltos, los principales son: el Salto de Candelitas, la Atlaquisca; el del Maquintero; el Salto del Río Grande de San Gaspar, y Salto de la Neblina, llamado así porque sus aguas cristalinas jamás terminan de caer porque se convierten en una refrescante brisa.

Entre los principales manantiales se destacan: el manantial de La Estrella, el de la Piedra Ahuecada, el de El Coponial; el de Los Chicamoles, y El Agua de la Pila. Existe también un manantial de aguas termales popularmente conocido como El Salitre.

En términos muy generales, Villa Guerrero posee un extraordinario clima en el que predomina el templado, subhúmedo con lluvias en verano e invierno benigno. Su temperatura máxima es de 39° C y la mínima es de 2° C. Su temperatura media en el mes más frío es inferior a 13°C pero superior a -3°C. Su temperatura media anual, oscila alrededor de los 18.8°C.

Por lo general la temporada de lluvias inicia a finales del mes de abril, pero suele interrumpirse durante el mes de mayo, continúa durante los meses de junio y julio y se agudiza en los de agosto y septiembre. Aunque el invierno es benigno, las primeras heladas se presentan entre octubre y noviembre y rara vez se prolongan más allá del mes de febrero.

Los vientos dominantes soplan de suroeste a noreste y se presentan generalmente durante los meses de febrero y marzo; en noviembre y diciembre generalmente son más intensos que los que los primeros meses del año; no obstante, las lluvias suelen venir del sureste ingresando al municipio a partir del sistema montañoso del Nixcongo, conocido localmente como La Malinche (EdoMex, 2011).

#### **1.4.1.2 Ecosistema**

Parte importante para la evaluación del riesgo ecotoxicológico resulta el conocimiento del propio ecosistema, para lo que encontramos la siguiente información.

La fauna propia del municipio se caracteriza por la abundancia de especies de las llamadas menores, aunque aun se pueden ver algunos especímenes de la llamada caza mayor, como son el jabalí, tejón, coyote, entre otros. Subsisten también verdaderas reminiscencias de la fauna antdiluviana como son el armadillo, camaleón y otros reptiles. Destaca la supervivencia de especies en extinción como son el halcón dorado, conejo teporingo o zacatuche, coyote, xalcoyote, zorra y quebrantahuesos o coxcacuauhtli.

Por su variada posición altimétrica, su privilegiada situación geográfica y su excelente clima templado, Villa Guerrero es origen de una muy variada flora, tanto silvestre como cultivada. En la parte media del municipio su vegetación ha sido transformada una y otra vez, primero en una hermosa arboleda de aguacate criollo, durazno, manzano, peral, la cual rivaliza con su entorno de fresno, cedro blanco y otras variedades más.

Las superficies de cultivos de flor a cielo abierto representan un 83% de la superficie total cultivable. Las principales flores que actualmente se cultivan son: la rosa en sus múltiples calidades y variedades, los colores predominantes son el rojo, rosa, blanco, amarillo y naranja. La gerbera con colores muy brillantes en rojo, lila, morado, naranja, amarillo, coral. La casablanca y el stargeiser, cuya belleza las hace ser de las más cotizadas en los mercados; el tulipán holandés, en colores rosa, lila y amarillo preponderantemente; el girasol; el agapando azul y blanco, así como una gran cantidad de especies micro, en clavel, rosa clavelito, entre otras.

Existen también diversas variedades de crisantemos, como el polar, el spider y las palomas, el margaritón y la nube. En cuanto a los follajes complementarios, se destacan el eucalipto dólar, cedrito, clavo, aster, ghipsophila y, recientemente, la comercialización de la palma real, especie que requiere ser controlada ya que está en peligro de extinción. También es común la comercialización del camedor, helecho y otros arbustos adecuados para la elaboración de arreglos.

Aunque es muy importante la producción de flores de exportación, una amplia mayoría se dedica a la producción en pequeño, utilizando técnicas rudimentarias e improvisando túneles bajos para proteger sus siembras del granizo y de la contaminación de plagas en cultivos cercanos.

La comercialización de la producción florícola, destinada al consumo nacional, se hace en tres puntos de venta principales: el mercado de flores de Tenancingo, la central de abastos de la Ciudad de México y en pequeña escala en otros mercados (EdoMex1, 2011).

### **1.5 Ambiente en Villa Guerrero**

Al llegar al municipio de Villa Guerrero podemos notar como los invernaderos se encuentran entre zonas habitacionales, escuelas, llanos y la toda extensión de tierra donde sea posible la producción florícola.

Villa Guerrero tiene la fortuna de contar con el clima idóneo para el cultivo de flor. Esta actividad se ha extendido tanto que al venir sobre la carretera se observan cientos de túneles de plástico y terrenos dedicados a la floricultura. Es por esto que esta es la principal actividad económica de la región (EdoMex1, 2011).

Sin embargo, como se reporta en algunos estudios realizados en esta región, las millonarias ganancias que ha dejado la explotación intensiva contrastan con la pobreza ambiental de la zona, donde los floricultores resienten una disminución en su productividad ante el uso indiscriminado de plaguicidas, fungicidas, insecticidas, herbicidas y nematocidas.

Existe una numerosa lista de fuentes de contaminación por el uso de agroquímicos en esta región, lo que pone en riesgo al ecosistema. Para entender cómo se comporta un plaguicida en el ambiente se necesita conocer cierta información sobre las propiedades físico-químicas de la molécula y su mecanismo de transporte, así como las características medio ambientales y la geografía del lugar en el que se le encuentra.

Con la gran complejidad y cantidad de datos requeridos, los científicos no siempre pueden predecir exactamente lo que ocurrirá con una partícula de plaguicida cuando ésta ha entrado en el ambiente. A este problema, se suma el hecho de que los datos de las investigaciones son obtenidos bajo condiciones controladas de laboratorio y con cantidades conocidas de plaguicida, lo cual no ocurre en la naturaleza.

A pesar de lo complejo del problema, los científicos han logrado determinar ciertas características físico-químicas cuantificables para los plaguicidas, como es la solubilidad, presión de vapor, Constante de la Ley de Henry, el Coeficiente de Carbono orgánico ( $K_{oc}$ ) y el Coeficiente de Partición Octanol-Agua ( $K_{ow}$ ).

Por otra parte, la molécula de plaguicida no permanece intacta por tiempo indefinido en el ambiente, ya que con el tiempo sufre una degradación influenciada por microorganismos, actividad química, pH, clima, y contenido de materia orgánica del suelo, entre otros.

El uso excesivo de agroquímicos, así como el inadecuado manejo y disposición de sus envases, ha sido un problema generalizado en México. Según la Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Químicas (CICOPLAFEST) en el año 2000, muchos de los plaguicidas empleados en el país hasta la fecha, se han prohibido en otros países por su toxicidad. Sin embargo, el número de plaguicidas se incrementa a razón de 10% al año. Esto ha permitido que el número de productos que entran en contacto con la población, se incremente en más de seis veces.

Todas estas sustancias son compuestos químicos tóxicos y por su aplicación en tierras de cultivo, evidentemente son compuestos que se encuentran como contaminantes de grandes extensiones de suelos en todo el país.

En México aún continúan en el mercado agroquímicos organoclorados como el ácido 2,4 dicloro-fenoxiacético (2,4-D), el pentaclorofenol (PCP) y dicofol, además de plaguicidas a base de carbamatos y los organofosforados como el malatión.

Un serio problema es que las plagas, enfermedades y hongos que atacan a las flores han generado resistencia a los agroquímicos. La consecuencia es un incremento en las dosis para combatirlos y, por tanto, en la generación de envases, y de los riesgos para el ambiente y la salud.

Un ejemplo de esto es un insecto que muere con un miligramo de insecticida, pero si genera resistencia se requerirá de cinco miligramos para matarlo, además que hereda la tolerancia a su próxima generación, que la sigue desarrollando. Se puede dar la situación a tal grado que si la dosis recomendada es de 100 mililitros de agroquímico por 200 litros de agua, el productor puede llegar a aplicar 700 u 800 en la misma cantidad de agua creyendo que con esto se combatirá la plaga de una manera más efectiva.

Robles Bermúdez quien ha hecho estudios en esta zona asegura que esto incrementa la resistencia de los insectos, encarece el costo del cultivo y se contamina más el ambiente, “sí hay un incremento en las dosis de aplicación en la zona” (2000Agro, 2005).

El uso desmedido e irracional genera una serie de efectos nocivos no sólo en la salud de los aplicadores de la región, sino también es un problema de salud regional, ya que son moléculas tóxicas que se evaporan y quedan en el ambiente por lo que niños, jóvenes y adultos están expuestos.

En Villa Guerrero coexisten en el mismo espacio las casas y los invernaderos. Prácticamente no hay límites y es por eso que la contaminación por plaguicidas es un riesgo para la población en general.

Una de las fuentes de contaminación son los envases de agroquímicos. Cifras de la Asociación Mexicana de la Industria Fitosanitaria (AMIFAC) refieren que en la zona florícola del Estado de México se generan cerca de 150 toneladas de envases de agroquímicos, de las cuales sólo se recolectan 15 toneladas al año.

Una vez que se realiza la fumigación en los invernaderos, los envases son abandonados sin el mínimo cuidado. En el recorrido por la zona florícola nacional encontramos envases al interior de los invernaderos, en los pasillos externos de los mismos, junto a la basura o en otros lugares inapropiados para su almacenamiento.

Además de los invernaderos y las barrancas uno de los sitios más recurrentes para tirar los envases de agroquímicos, es el basurero municipal. En este sitio se pueden observar cientos de envases de agroquímicos entremezclados con todo tipo de basura.

Gabriel Díaz Izeta reporta que en la zona florícola la AMIFAC cuenta con centros de acopio de envases de agroquímicos en Villa Guerrero, Atlacomulco, Ixtlahuaca, Valle de Bravo y Coatepec Harinas, que existen por lo menos desde el año 2000.

Los productores no realizan el triple lavado a los envases para llevarlo al centro de acopio y en varios terrenos observamos envases almacenados en los patios o tirados por los invernaderos. Los empresarios o trabajadores no tienen la conciencia y el hábito de llevarlos, por lo que se estima que debe llegar al centro de acopio apenas 50 por ciento de lo generado.

La venta de agroquímicos sin restricción también es un problema ya que se puede adquirir cualquier producto, ejemplo, se puede adquirir un Teodal (Endosulfan), primo hermano del DDT, ambos clorados, en cualquiera de sus presentaciones químicas. Estos se aplican y sus residuos persisten por años contaminando desde peces, corrientes de agua, suelos y hasta los humanos. Muchas veces el productor desconoce los productos y piensa que está haciendo rotación de agroquímicos y aplica Aldrin o un Lannate, cuando es la misma sustancia activa.

En este municipio hay alrededor de 40 distribuidores y algunos están al lado de establecimientos como la farmacia, el kínder o la tienda de abarrotes, cuando esto no debería ocurrir ya que con estas condiciones aumenta la exposición de la población a estos productos.

Otra fuente de contaminación en la zona es la cantidad de plástico que se genera es muy grande. Los lugareños aseguran que por lo general las grandes o medianas empresas no están mandando los plásticos que cubren los invernaderos al depósito adecuado, normalmente los tiran a sus basureros o a los basureros municipales. Los datos oficiales informan que entre 1997 y 2002 se recogieron 240 toneladas de película de invernadero. Existen varias formas en que los plaguicidas pueden llegar a producir efectos adversos no solo en la salud de los pobladores sino del ecosistema y por lo cual es necesario tener el conocimiento del sitio y las características de las actividades que se llevan a cabo.

Una parte importante de la evaluación es la percepción del riesgo, que es comprender y medir la respuesta de la gente a los peligros o riesgos que enfrentan y, debido a la importancia de sus implicaciones en los programas de educación para la salud, el manejo y la comunicación del riesgo, relacionarla con la evaluación probabilística del riesgo hecha por los científicos. En la zona de Villa Guerrero, se ha incrementado el trabajo agrícola por lo redituable que ha sido el cultivo de la flor, tal situación permite la exposición de la población y el ecosistema a algún tipo de plaguicida que pueda dar como resultado algún efecto adverso. Sin embargo se desconoce cuál es la percepción que tiene la población con respecto al riesgo asociado al uso de plaguicidas, así como los factores que la determinan. Por lo que es necesario precisar tal situación y documentarla para prevenir las consecuencias negativas de potenciales conductas de riesgo, mediante la estructura de adecuados programas de educación en salud, basados en la información obtenida (Karam, et. al., 2006).

Para el tercer elemento importante de nuestra evaluación que es la relación dosis – respuesta de los organismos es que se llevó a cabo una batería de bioensayos con diversos organismos.

Idealmente, este tipo de pruebas deberían llevarse a cabo *in situ* y utilizando especies nativas del lugar donde se desarrolla la Evaluación de Riesgo Ecológico (ERE). Sin embargo, esto sólo se logra en raras ocasiones, por lo que debe suponerse que las especies locales reaccionan a los compuestos tóxicos de la misma manera que los organismos utilizados en las pruebas.

Una razón por la cual normalmente se utiliza la información generada en las pruebas de laboratorio como parte de la ERE, es simplemente porque ésta ya existe, puede consultarse con facilidad y abarca un gran número de contaminantes prioritarios.

Además, en el caso de los ecosistemas acuáticos, incluye varios grupos taxonómicos ampliamente distribuidos en estos sistemas. Existe un buen número de bases de datos mantenidas por agencias gubernamentales que pueden ser consultadas electrónicamente, como el Sistema de Información de Sustancias Químicas de la USEPA (Ize Lema, 2010).

Los resultados de estas pruebas en conjunto con la evaluación de la exposición dan pie a una caracterización del riesgo.

La base fundamental de la caracterización es entender que para que haya riesgo los organismos u otra parte del ecosistema deben estar en contacto, o por lo menos coincidir en espacio y tiempo, con el contaminante.

Es importante considerar que en la segunda etapa el término exposición abarca desde la liberación del contaminante físico, químico o biológico, a partir de la fuente de origen, hasta su captación o interacción con el ecosistema o con alguno de los componentes que lo integran. Estos procesos corresponden a lo que en una evaluación de un riesgo para la salud se conoce como rutas de exposición. Los modelos mecanicistas sirven para evaluar la exposición, ya que su propósito es describir en términos cuantitativos la relación que existe entre algún fenómeno y las causas que lo producen. Sus parámetros tienen significado biológico, al menos en principio, y pueden medirse de manera independiente. Es cierto que la complejidad del ambiente no puede ser descrita por completo con este tipo de modelos, y que los supuestos y simplificaciones que se deben hacer pueden introducir errores e incertidumbres, pero generan información de mucha utilidad (Ize Lema, 2010).

Para el análisis y caracterización de los efectos ecológicos, los evaluadores deben determinar la naturaleza de los efectos tóxicos del contaminante y su magnitud en función de la exposición. Los datos sobre efectos pueden obtenerse por monitoreo en campo, pruebas de toxicidad de los medios contaminados, y pruebas tradicionales de toxicidad en el laboratorio por compuesto o mezclas de compuestos.

Debido a diferencias fundamentales entre los métodos para caracterizar los efectos en la salud humana y en los ecosistemas, las evaluaciones de riesgos basadas en individuos tienen un uso muy limitado en las evaluaciones del riesgo ecológico. En las ERE los efectos deben ser evaluados a nivel de poblaciones o niveles jerárquicos incluso más altos, como las comunidades. Aunque las pruebas toxicológicas miden efectos en individuos, las consecuencias a nivel de poblaciones son las más importantes.

La evaluación de un riesgo de cualquier tipo, en este caso ecotoxicológico, no es cosa fácil, se requiere de mucha información, observación y sobre todo de personas con experiencia en el análisis de riesgo ya que los resultados son de gran relevancia para la toma de decisiones.

## **1.6 Bioensayos**

Los ensayos biológicos son herramientas de diagnóstico adecuadas para determinar el efecto de agentes físicos y químicos sobre organismos de prueba bajo condiciones experimentales específicas y controladas; estos pueden ser tanto de inhibición como de magnificación, evaluados por la reacción de los organismos, tales como muerte, crecimiento, proliferación, multiplicación, cambios morfológicos, fisiológicos o histológicos. Los cambios pueden manifestarse a diferentes niveles, desde estructuras subcelulares o sistemas de enzimas, hasta organismos completos, poblaciones o comunidades.

Los resultados de los bioensayos se refieren, en primer lugar, a los organismos usados en el ensayo y las condiciones estipuladas en el procedimiento de prueba. Un efecto nocivo evaluado por medio de ensayos biológicos normalizados puede indicar niveles de peligrosidad trasladables y asimilables a organismos que forman parte de los sistemas naturales (Castillo, 2003).

En Europa se realizó un estudio relacionado con el desarrollo de un marco basado en un enfoque de servicios de los ecosistemas para obtener los objetivos específicos de protección con la evaluación del riesgo ambiental de los plaguicidas.

Este trabajo informa sobre los objetivos generales de protección del medio ambiente que se establecen en la legislación Europea. Estos son cruciales para el diseño de sistemas adecuados y se propone el desarrollo de opciones de “Objetivos Específicos de Protección” por 7 factores clave para los servicios de ecosistemas (microbios, algas, plantas, invertebrados acuáticos, artrópodos terrestres y no terrestres), que cubre el ecosistema y que podrían ser afectados por el uso de plaguicidas.

Estos “Objetivos Específicos de Protección” deben ser definidos también en seis dimensiones: entidad biológica, atributo, la magnitud, la escala temporal y geográfica del efecto, y el grado de certeza de que el nivel específico de efecto no se supere. En general, para asegurar los servicios de los ecosistemas, los principales factores identificados deben ser protegidos a nivel de población.

Se encontró que para algunos vertebrados y especies que tienen un estatus de protección en la legislación, la protección puede ser a nivel individual. Para proteger los impactos sobre la biodiversidad se menciona que deben ser evaluados por lo menos la escala de agua y tierra (Nienstedt, 2011).

### **1.7 Coeficiente de impacto ambiental (CIA)**

El impacto ambiental (EI) es un indicador que sirve para valorar el potencial riesgo causado por el uso de los plaguicidas. Este indicador valora el impacto ocasionado por los plaguicidas a los agricultores que los aplican, a los consumidores y a los componentes ecológicos. Existen valores de coeficiente de impacto ambiental (CIA) para muchos plaguicidas, pero no para todos. Cuando un plaguicida específico no tiene un valor de CIA, ese valor deberá ser estimado usando el valor promedio de CIA según la clase de plaguicida de que se trate. También puede usarse la clasificación de plaguicidas por peligrosidad, recomendada por la Organización Mundial de la Salud para ayudar en la estimación del CIA de aquellos plaguicidas que no han sido evaluados (Ortiz, 2009).

### **1.8 Antecedentes.**

El uso inadecuado de agroquímicos, en especial los plaguicidas, en la actividad florícola ha llevado durante varios años a estudios e investigaciones sobre los daños al ambiente y los efectos en la salud alrededor de todo el mundo.

En Venezuela se realizó un estudio documental para determinar la magnitud de la contaminación ambiental, en el ámbito global y local, producto de la actividad agrícola intensiva, fundamentalmente del uso de agroquímicos. El resultado obtenido refleja un alto nivel de contaminación no sólo del ambiente, sino en los seres humano, lo que se manifiesta en enfermedades, destrucción de flora, fauna y de los recursos naturales disponibles (Torres, 2004).

La Universidad de Talca Chile describe y analiza la contaminación por plaguicidas y sus efectos sobre la calidad de vida en la región del Maule Chile mediante una metodología de indagación empírica que contempló la búsqueda y utilización de información primaria referida a entrevistas con expertos y mediante archivos y documentos oficiales de instituciones gubernamentales y privadas relacionadas al tema.

Los resultados obtenidos en Chile muestran que en los últimos diez años, de 1430 marcas de plaguicidas importados, 43 están en la lista de no aprobados internacionalmente. Los recursos naturales más afectados han sido suelo agua y aire. La caracterización de plaguicidas utilizados muestra que dentro de los tóxicos, los más usados, de acuerdo a su importancia, son organofosforados, carbamatos y triazicos. Este estudio sugiere que, de un total de 288 tipos de productos químicos usados, un 60% corresponde a ligeramente tóxicos y los principales efectos causados derivan en personas intoxicadas, siendo las provincias más afectadas Linares, Cúrico, Talca y Cauquenes (Bustamante, 2004).

Sobre el uso de bioensayos, en China se evaluaron los efectos toxicológicos de la mezcla de contaminantes resultado del reciclado de desechos electrónicos y la bioacumulación de difenil éteres polibromados (PBDE) en lochas (peces) Chinas, se pudo observar una diferencia muy importante en la tasa de supervivencia, ya que en el sitio de reciclado se obtuvo el 27% (19/70) en comparación con el de referencia que se obtuvo el 70% (49/70).

Se encontró también que como resultado del proceso de bioacumulación de los PBDE los hígados de lochas examinados presentaron respuestas histopatológicas, derivado de la mezcla de contaminantes. Este hecho los llevo a estudiar también la concentración total media de los PBDE en sedimentos, donde se encontraron dos tipos principalmente, la concentración BDE209 fue mayor en muestras de agua y de BDE47 fue encontrado en mayor cantidad en lochas (Xiaofei, 2009).

Dentro de la República Mexicana en Veracruz se realizó un estudio en trigo, en el que los cultivos agrícolas incorporan residuos de plaguicidas del suelo por las raíces y adsorben vapores y partículas en su superficie. Para este trabajo se analizaron los niveles de plaguicidas organoclorados en suelo y plantas de trigo para observar su distribución desde el suelo hacia las plantas, utilizándose la técnica de cromatografía de gases. En conclusión al moverse los plaguicidas acumulados en los suelos agrícolas penetran a las plantas de trigo y son una fuente de contaminación adicional para los consumidores (Waliszewski, 2002).

En la Facultad de Química de la U.A.E.M. se han realizado varios trabajos acerca de la cuantificación y determinación de agroquímicos en la zona florícola del Estado de México: Villa Guerrero, Tenancingo, Coatepec Harinas y alrededores Toluca, Lerma, Atlacomulco, Temoaya, Valle de Bravo y Metepec, La determinación de plaguicidas carbámicos en suelos de invernaderos y su relación con la cantidad aplicada (Argueta, 2008); La determinación de plaguicidas y plomo en muestras de agua de varias jurisdicciones sanitarias (Verduzco, 2007) y La modelación y análisis de la dispersión de plaguicidas utilizando elemento finito apoyado en un sistema de información geográfica (Ramos, 2006), Otros relacionados con la salud y la exposición ocupacional como La detección de efectos neurotóxicos sobre sujetos laboralmente expuestos (Pedraza, 1999), La evaluación de estrés oxidativo en células sanguíneas (Aguilar, 2009). La frecuencia de aberraciones cromosómicas en individuos cromosómicamente normales expuestos (Vargas, 2008), El estudio de malformaciones congénitas (Soteno, 1999) y La determinación del índice mitótico en individuos expuestos crónicamente (Hernández, 2000), así como muchos otros trabajos realizados para desarrollar y validar técnicas de extracción y cuantificación de plaguicidas, así como sus efectos como el de la inhibición de colinesterasa en lombrices (*Eisenia andrei*) expuestas a suelos contaminados con plaguicidas organofosforados y carbamatos (Cruz, 2008). Hablando de zonas florícolas, en el Estado de México, Villa Guerrero es el municipio más relevante y por lo tanto más estudiado en cuanto a la cuantificación de los plaguicidas en suelo y sus consecuencias en la salud, una evaluación de riesgos ecotoxicológicos permite tener una visión global de los daños tanto en agua, suelo y aire así como, en la salud de los pobladores de este municipio.

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

En la historia de México el mercado nacional ha jugado un papel importante para la floricultura y ésta ha tomado gran relevancia específicamente en el Estado de México, en donde se desarrolla principalmente en municipios como Villa Guerrero. El mayor porcentaje de la producción se queda en el país (Sánchez, 2009) ya que la flor no cuenta con las características de calidad que especifican las normas de exportación y por lo que no tiene gran participación en el mercado internacional, a pesar del gran potencial productivo de nuestro país.

En Villa Guerrero se encuentra el mayor porcentaje de invernaderos que tiene el Estado, por lo que la floricultura es considerada la principal actividad económica en este municipio.

Debido a la importancia económica que esta actividad representa, los agricultores y habitantes de la comunidad están dejando de lado las consecuencias y riesgos que con lleva esta actividad debido al mal uso de agroquímicos.

El municipio de Villa Guerrero cuenta con 53, 004 habitantes, siendo su principal actividad la floricultura. De 2006-2008 se registraron 225 casos de intoxicación provocados por plaguicidas en la jurisdicción Sanitaria de Tenancingo a la cual pertenece, de un total de 487 que se presentaron en el Estado, equivalente al 46.2% del total de casos solo en esta zona (Aguilar, 2009).

Algunos de los problemas que se han identificado por el uso indiscriminado de plaguicidas relacionados con posibles efectos sobre el ecosistema son: manejo y disposición inadecuada, aparición de plagas resistentes, intoxicaciones involuntarias de animales e incluso seres humanos, agotamiento de los nutrientes del suelo y contaminación, así como contaminación de ríos y cuerpos de agua, lo que hace necesario evaluar la naturaleza y magnitud del daño al ambiente (agua, suelo y aire) así como a la salud de los pobladores que se presenta por el contacto directo e indirecto de los agroquímicos.

Por lo antes expuesto es que se considera de gran importancia conocer el riesgo ecotoxicológico que implica el uso de los plaguicidas en los cultivos y dentro de esta evaluación se llevan a cabo dos etapas, la evaluación de la exposición y la evaluación toxicológica. Dentro de este trabajo se analizó la toxicidad mediante bioensayos con diferentes biomarcadores, los cuales nos pueden dar características de diferentes niveles tróficos y que se pueda inferir esta información a niveles más altos.

## 2.1 Hipótesis

La toxicidad producida por la cantidad residual en suelo y agua de los agroquímicos utilizados en el cultivo de gerbera en invernadero en Villa Guerrero, Estado de México, evaluada mediante bioensayos con organismos como: *Daphnia pulex*, *Selenastrum capricornutum*, *Lactuca sativa L.* y *Eisenia andrei*, representa un riesgo importante para el ambiente.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo general

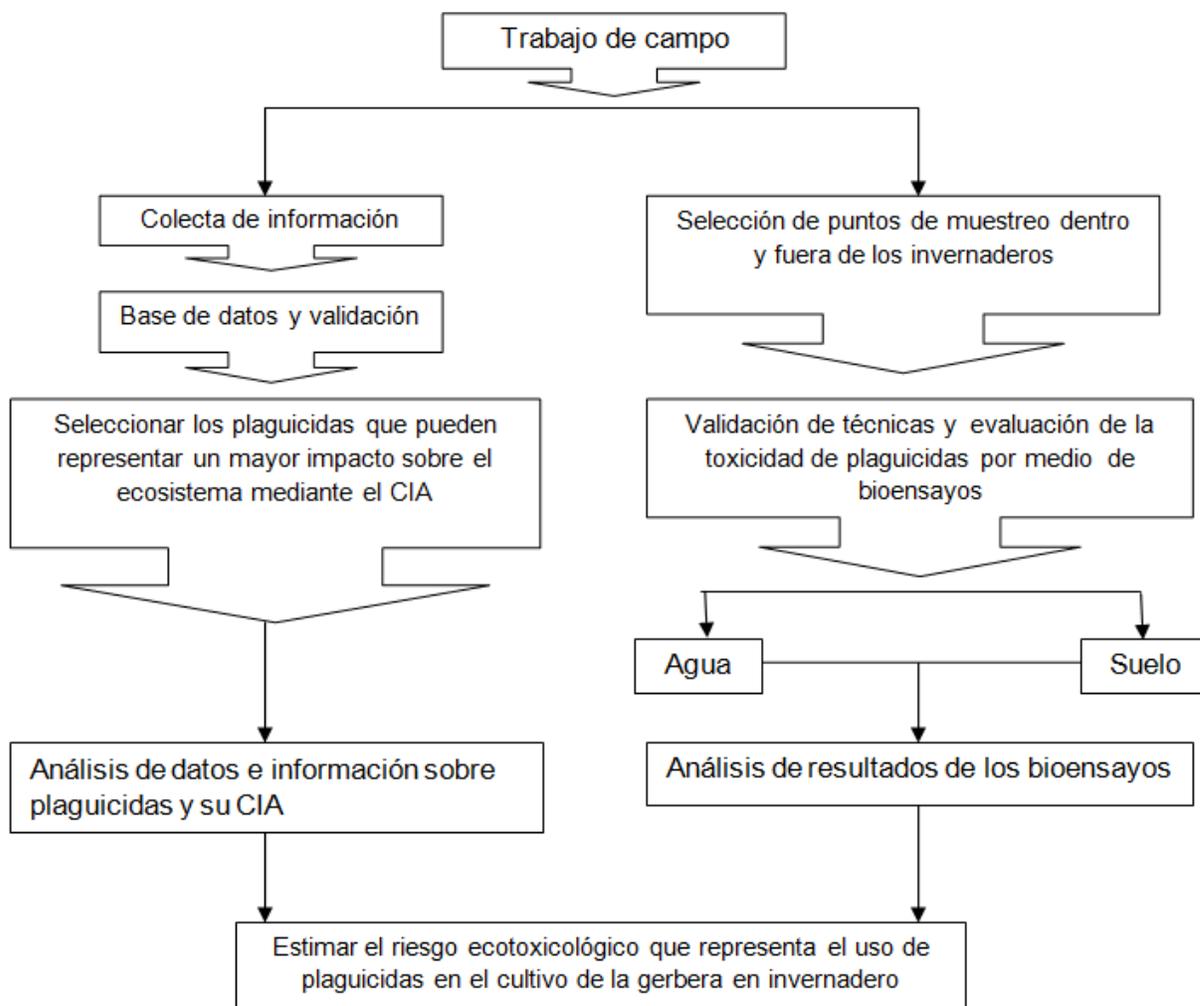
Evaluar el efecto tóxico producido por la cantidad residual en suelo y agua de los agroquímicos utilizados en el cultivo de gerbera en invernaderos de Villa Guerrero, Estado de México, mediante el uso de bioensayos empleando *Daphnia pulex*, *Selenastrum capricornutum*, *Lactuca sativa L.* y *Eisenia andrei*, para generar información relevante para la caracterización del riesgo a la salud y al ecosistema de estas áreas.

#### 3.2 Objetivos específicos:

- a) Identificar los invernaderos que producen gerbera en Villa Guerrero y determinar los sitios de estudio de acuerdo a su factibilidad.
- b) Identificar los agroquímicos aplicados para el cultivo de la gerbera en invernadero y estimar la carga anual de los mismos a través de encuestas.
- c) Seleccionar los puntos de muestreo de agua y suelo dentro y fuera de los invernaderos de gerbera y caracterizar dichas muestras.
- d) Estimar la toxicidad de las concentraciones residuales de plaguicidas en las muestras de suelo y agua mediante bioensayos.
- e) Determinar mediante el cálculo del coeficiente de impacto ambiental (CIA) los plaguicidas que pueden representar un mayor impacto sobre el ecosistema.
- f) Estimar el riesgo ecotoxicológico que representa el uso de plaguicidas empleados en la floricultura de Villa Guerrero.

## 4. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

### Diagrama de flujo



#### **4.1 Identificación de los invernaderos en estudio**

- Obtención de información y el mapa de localización de invernaderos de cultivo de gerbera en Villa Guerrero, Estado de México; por medio de instituciones como SEDAGRO e ICAMEX y realizando una revisión bibliográfica.
- Determinación de los sitios de estudio de acuerdo a su factibilidad, es decir, tomar en cuenta el número de invernaderos que cultivan gerbera, su ubicación y que los floricultores de manera voluntaria permitan la realización del estudio.

#### **4.2 Identificación de los agroquímicos aplicados**

Búsqueda de información sobre el proceso de cultivo de la gerbera.

- Estructuración de las herramientas de trabajo (cuestionario)
- Realización del trabajo de campo: observación y entrevistas.
- Identificar los plaguicidas aplicados para el cultivo de la gerbera en invernadero (carbamatos y organofosforados) y estimar la carga anual de los mismos.

### **4.3 Selección de los puntos de muestreo**

Identificados los invernaderos en estudio se realizó la selección de puntos de muestreo:

- Para muestras en suelo, se consideraron 5 muestras dentro del invernadero, una en cada esquina y una al centro; 2 externas, una de cada lado.
- Para muestras de agua se tomaron dos del agua de riego.

### **4.4 Evaluación de la toxicidad en las muestras de suelo y agua**

- Validación de las técnicas para los bioensayos.
- Desarrollo de los bioensayos.

Se cuantificaron biomarcadores de efecto, cada experimento se realizó por triplicado.

### **Muestras de Suelo.**

El suelo utilizado en este estudio es proveniente de invernaderos de gerbera en el Municipio de Villa Guerrero (VG), Estado de México, en el cual se aplican diferentes tipos de agroquímicos. El suelo fue colectado de tres diferentes invernaderos, se realizaron dos muestras compuestas una de suelo interno y otra de suelo externo de cada invernadero.

Las muestras de suelo utilizadas para los ensayos fueron acondicionadas con tamices de 2mm (N°10) y a una humedad de 80% con el fin de realizar las pruebas con *Eisenia andrei* y *Lactuca sativa L*, además de determinarse características como densidad real y aparente, materia orgánica y carbono orgánico.

*Eisenia andrei* – Según el estudio realizado por Cruz en 2008, el porcentaje de inhibición de la actividad colinesterásica en *Eisenia andrei* es un buen indicador de la contaminación de suelos por plaguicidas carbamatos y organofosforados (Cruz, 2008), por lo cual se realiza esta determinación por el método de Ellman (Ellman et. al., 1961), para lo cual se trabajó con un homogenado del tejido de la lombriz.

El ensayo con *Eisenia andrei* se realizó según la prueba de toxicidad aguda de OECD N ° 222: Reproducción Prueba Lombriz de tierra (*Eisenia fetida* / *Eisenia andrei*), 2004, con algunas adaptaciones debido a las características y condiciones de laboratorio. Se realizaron pruebas por triplicado de la muestra interna, externa y control negativo. La duración del ensayo fue de 14 días, y la temperatura de la prueba fue de  $20 \text{ }^\circ \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ . Se utilizaron organismos de un peso individual entre 300 mg y 1000 mg. Se realizó la prueba colocando 120 g de muestra en cajas de plástico de 14 cm. de diámetro por 3 de altura, colocando la muestra a una humedad de 80% y en cada caja 10 organismos previamente pesados y cuidando que queden en cada caja lombrices de pesos similares. Se realizaron pruebas de actividad colinesterásica al homogenado de 3 lombrices, de manera individual de cada caja, por el método de Ellman (Ellman et. el., 1961) a los 3, 7 y 14 días.

Se colocó en el homogenizador una lombriz previamente pesada y se adicionó 0.5mL de solución buffer de fosfatos pH 7.0, se trituró por aproximadamente 5 minutos, enseguida se refrigeró 10 minutos y centrifugó a 3500 rpm por 10 minutos. Para la prueba se utilizó el sobrenadante.

Para la prueba de colinesterasa en 3 mL de solución de trabajo DTNB se agregan 20  $\mu$ L de sobrenadante y se incuba a 25 °C durante 10 minutos, después de esto se adicionan 50  $\mu$ L de solución de acetilcolina, se mezcla, agita y mide en el espectrofotómetro a 405 nm. Se determina la actividad colinesterásica mediante las fórmulas siguientes (Milla y Palomino, 2002).

$$\text{Actividad Colinesterásica (U/mL)} = (\text{Amp}) (\text{VT}) (10^3) / (\text{e}) (\text{LCO}) (\text{VM})$$

Donde:

Apm= Promedio de las diferencias de absorbancia obtenidas a cada minuto.

U= Cantidad de enzima que convierte un  $\mu$ mol de sustrato (acetilcolina) por minuto en condiciones normales.

e= Coeficiente de absortividad molar del 5 tio-2 nitrobenzoato equivalente a 13,162 a 405 mn.

$10^3$ = Factor de corrección para pasar de mmol a  $\mu$ mol.

VT= Volumen total de la reacción.

VM= Volumen de la muestra sin diluir.

LCO= Longitud de camino óptico (1 cm).

$$\text{Actividad colinesterásica/mg} = ((\text{Act. Colinesterásica}) / ((\text{alícuota} * \text{peso corporal}) / 500))$$

Donde:

Act. Colinesterásica= determinada con la fórmula anterior.

Alícuota= Cantidad de homogenado de lombriz adicionado en el ensayo en  $\mu\text{L}$ .

Peso corporal= peso corporal de la lombriz en miligramos.

500= Cantidad total de buffer pH 7,0 (Medio en el que se realiza el homogenado de lombriz).

Bioensayo con *Lactuca sativa L.* - Esta prueba se llevó a cabo según la técnica de Castillo, G. (2003) y otras referencias, adaptándonos a las condiciones del laboratorio, se realizaron por triplicado para muestra interna, externa y control negativo. Se pesaron 100 g de muestra para cada caja y se llevaron a 80% de humedad, se colocaron 30 semillas previamente medidas en el rango adecuado al lote y lavadas con agua destilada, se colocaron cuidando dejar espacio aproximadamente de 2 cm. entre cada semilla, se incuban por 7 días a una temperatura entre 22 y 26 °C. Al cabo de los 7 días se sacan las semillas de manera cuidadosa para medir la longitud de la radícula y el hipocotilo de cada una, permitiendo así determinar la inhibición en el crecimiento.

## **Muestras de agua:**

Los organismos que se utilizaron para los bioensayos fueron *Daphnia pulex*, *Lactuca sativa* L y *Selenastrum capricornutum*

*Daphnia pulex*–En esta prueba de toxicidad se utilizaron neonatos menores de 24 h de edad los cuales fueron expuestos individualmente a diferentes diluciones de la muestra a probar (100%, 50%, 25%, 12.5% y 6.25%), por un periodo de 48 h, al término del cual se cuantifica el número de organismos muertos (n = 10). Con estos resultados se establece la proporción de mortalidad producida (Castillo, 2003; OECD 1984, 2012).

*Selenastrum capricornutum*– Es un alga verde unicelular con forma de media luna, cuando las células son expuestas a muestras que contienen contaminantes tóxicos su reproducción se afecta, alterando la tasa de crecimiento de población de las algas.

El efecto de inhibición de la población causada por los agentes tóxicos en una muestra luego de 72 h de exposición, bajo condiciones de temperatura controlada, se determina comparándola con el crecimiento normal observado en un sistema libre de agentes contaminantes conocidos como control. Dependiendo del número de concentraciones y réplicas se determina la CL<sub>50</sub> (Concentración de letal media) (Castillo, 2003).

Para esto se probaron 5 diluciones (100%, 50%, 25%, 12.5% y 6.25%) cada una por triplicado, se coloca en cada tubo 2.5 mL de la disolución hecha con la muestra y solución amortiguadora, se inocula cada tubo con 100  $\mu$ L del cultivo de algas previamente determinada su concentración y se incuban durante 72 h con agitación e iluminación constante. Al final se hace el recuento de células para determinar el porcentaje de inhibición.

Los bioensayos se realizaron en varios organismos y por triplicado para una mayor confiabilidad de los resultados.

Semillas de lechuga *Lactuca sativa* L.- Se prepararon cinco diluciones de la muestra y se evaluaron los efectos fitotóxicos, determinando la inhibición de la germinación y la inhibición de la elongación de la radícula y del hipocotilo.

Se trabajó por triplicado con 5 diluciones (100%, 50%, 25%, 12.5% y 6.25%), el control negativo (agua destilada) y Zn(II) como control positivo. Se colocaron las cajas petri, marcadas correctamente, con un disco de papel filtro el cual fue humedecido con 4 mL de dilución correspondiente, posteriormente se colocaron 20 semillas en forma ordenada para dejar espacio de aproximadamente un centímetro para la elongación, se taparon las cajas y se incubaron entre 20-24 °C.

Al finalizar se mide la elongación de la radícula y del hipocotilo para determinar el porcentaje de inhibición.

#### 4.5 Selección de plaguicidas de mayor impacto sobre el ecosistema.

El cálculo del CIA se basa en una metodología de ponderación para evaluar el riesgo ambiental y de salud de un esquema de aplicación de un plaguicida en particular. El modelo de CIA usa datos toxicológicos e información de parámetros químicos para calcular el riesgo por la exposición al plaguicida de los agricultores, consumidores y organismos ambientales y, de esta manera, generar un coeficiente compuesto del impacto ambiental para cada plaguicida que está siendo comparado. La ecuación para calcular el valor del coeficiente de impacto ambiental (CIA) para cada plaguicida seleccionado es:

$$\text{CIA} = \{C [(DT * 5) + (DT * P)] + [(C * ((S + P) / 2) * SY) + (L)] + [(C * R) + (D * ((S + P) / 2) * 3) + (Z * P * 3) + (B * P * 5)]\} / 3$$

Donde:

C = toxicidad crónica DT = toxicidad dérmica

P = vida media de residuos en la superficie de la planta

S = vida media de residuos en el suelo

SY = sistemicidad

L = potencial de lixiviación

F = toxicidad en peces R = potencial de escorrentía

D = toxicidad en aves Z = toxicidad en abejas

B = toxicidad en artrópodos benéficos

Los valores en la ecuación son determinados por la información toxicológica de varias bases de datos que incluyen el “Extension Toxicology Network” (EXTOXNET), CHEM-NEWS, SELCTV, fichas de datos de los fabricantes de los químicos y fuentes de datos públicos como las disponibles en la “US Environmental Protection Agency”. La información sobre los valores de toxicidad crónica (C) en la porción de salud humana de la ecuación, provienen de base de datos de estudios de efectos mutagénicos en animales, teratogénicos, reproductivos y oncogénicos de estos químicos (Ortiz, 2009).

#### **4.6 Estimación del riesgo ecotoxicológico.**

Se estimó el riesgo ecotoxicológico que representa el uso de agroquímicos en el cultivo de la gerbera en invernadero por medio del análisis de la información encontrada en las fuentes primarias, en las entrevistas, el resultado de los bioensayos y el cálculo del CIA de campo, el que consistió en el cálculo del impacto ambiental que representa cada uno de los programas de plaguicidas aplicados en los invernaderos mediante la suma de los CIA de campo de cada producto aplicado mediante la ecuación:

$$\text{CIA campo} = (\text{CIA}) (\text{x\% de ingrediente activo}) (\text{tasa por hectárea}).$$

## 5. RESULTADOS

Una parte de los resultados acerca de la toxicidad de suelo se presenta en el apartado 5.1 con el artículo enviado a una revista, mientras los resultados complementarios de suelo y los de toxicidad de agua se presentan en el inciso 5.2 sobre resultados no publicados.

### 5.1 RESULTADOS A PUBLICAR

Los resultados sobre la identificación de los invernaderos en estudio, la identificación de los agroquímicos aplicados, la selección de puntos de muestreo de suelo, evaluación de toxicidad de las muestras, así como la selección de plaguicidas de mayor impacto sobre el ecosistema se presentan en el artículo anexo, titulado **Ecological risk related to use of chemicals in flowergreenhouses in the State of Mexico**, enviado a la revista Journal of Environmental Science and Health - Part A: Toxic / Hazardous Substances & Environmental Engineering con un factor de impacto de 1.19.

manuscript ecological risk

Página 1 de 1

**manuscript ecological risk**

Araceli Amaya Chavez

Enviado el: viernes, 15 de noviembre de 2013 12:52 p.m.

Para: skhan6@gnmu.edu

Importancia: Alta

Datos adjuntos: Cover Letter.docx (1 MB) ; manuscript.docx (155 KB)

---

Dear Dr. Shahamat U. Khan  
Editor-in-Chief  
Journal of Environmental Science and Health, Part A

I send you the manuscript "ECOLOGICAL RISK RELATED TO USE OF CHEMICALS IN FLOWER GREENHOUSES IN THE STATE OF MEXICO", to be considered for publication in Journal of Environmental Science and Health, Part A

Kind regard

Dra. Araceli Amaya Chávez  
Facultad de Química de la  
Universidad Autónoma del Estado de México  
Paseo Tollocan Esq. Paseo Colón  
Toluca Edo. Méx., CP 50100  
Tel./Fax. 722 2 17 38 90

<https://correoweb.uaemex.mx/owa/?ae=Item&amp;t=IPM.Note&id=RgAAAAACgxFPuy3u...> 15/11/2013

## ECOLOGICAL RISK RELATED TO USE OF CHEMICALS IN FLOWER GREENHOUSES IN THE STATE OF MEXICO

Tecuapetla Vargas MG<sup>1</sup>, Sánchez Meza JC<sup>1</sup>, Olvera Velona A<sup>2</sup>, Amaya-Chávez A<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>University of the State of Mexico, Department of Pharmacy, Paseo Colón Esq Paseo Toluca, Tel: (52) 722 217 38 90, CP 50120, Toluca, Mexico

<sup>2</sup>Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Biotechnology Research Center.

### ABSTRACT

Intensive production of agriculture crops and ornamentals requires the use of agrochemicals frequently, these compounds contribute to soil degradation and to the lost of fertility. The aim of this study was the Ecological risk assessment by the use of agrochemicals (pesticides and fertilizers) in the greenhouse crop of *Gerbera jamesonii*. The toxic effects produced for the residual concentration of pesticides in soil was evaluated by bioassays with *Lactuca sativa* and *Eisenia andrei*, were determinate the physicochemical characteristics of soils from greenhouse and was estimated the environmental impact quotient (EIQ). Each one greenhouse under study use different type and quantity of pesticides, mainly organophosphorus and carbamate compounds. The soils from the greenhouses showed a higher acidification, compactation and reduced organic matter. The soil samples obtained such Inside as outside of greenhouse produced toxic effects on *Eisenia andrei* and to *Lactuca sativa L*. The values of the EIQ estimated were related with the number of pesticides used for the crop, toxicity and persistence of these compounds under the specific environmental conditions. Therefore the use of agrochemicals on flower greenhouse crops produced an important adverse effect on the health of organisms and ecosystem.

KEYWORDS: Agrochemicals, Greenhouses, Soil, Toxicity, *Eisenia andrei*, *Lactuca sativa L*.

## INTRODUCTION

The increasing demand for food and agricultural products has led to intensive agriculture characterized by indiscriminate use of agrochemicals (fertilizers and pesticides). This, along with inadequate disposal of waste and packaging reduces the productive capacity of farmland. Pesticides are known for their efficiency in pest control, but are also toxic to non-targeted species thus implying a significant environmental risk <sup>[1]</sup>.

Only a fraction of the agrochemicals sprayed onto soil or sprinkled onto plants, reaches the target organism, the remainder is volatilized or rainwashed from foliage <sup>[2]</sup>, undergoes biodegradation (by fungi and bacteria) and abiotic degradation (hydrolysis, redox or photochemical reactions) whose byproducts are at times more mobile or more toxic than the original agrochemical <sup>[3-4]</sup>.

Frequent application of fertilizers and pesticides has contributed to soil degradation and thus fertility loss <sup>[5]</sup>. Frequent high doses accumulate, overcome the natural degradation processes causing pollutants and degradation products to reach all environmental compartments (soil, water and air) with toxic effects for a diversity of organisms and humans <sup>[6-7]</sup>.

Faced with this problem calls for identifying environmental risks generated by frequent use of agrochemicals. In vitro bioassays are widely used to evaluate toxic effects caused by pollutants, or mixtures thereof, replicating pH, temperature, organic matter content, soil type and other environmental conditions <sup>[8]</sup>.

Different organisms and endpoints have been used to assess solid waste ecotoxicity: growth inhibition in lettuce (*Lactuca sativa*), the most sensitive species followed by watercress (*Nasturtium officinale*) and barley (*Hordeum vulgare*); mortality in *Eisenia fetida*; mobility inhibition of *Daphnia magna* in the liquid extract of solid waste; growth inhibition in *Pseudokirchneriella subcapitata*; reproduction inhibition in *Ceriodaphnia dubia*; and inhibition of light emission in *Vibrio fischeri* <sup>[9-10]</sup>.

In addition to toxicity bioindicator organisms, molecular biomarkers are used. *E. fetida* and other earthworms have a well-known physiology. Assessments of soil chemical pollution by pesticides, especially organophosphates and carbamates, rely on cholinesterase activity changes in these organisms <sup>[11-14]</sup>.

Another measurement of ecotoxicity is provided by the environmental impact coefficient (EIC) model developed to simplify and organize data on pesticides effects, reducing the environmental impact information to a single value. Three main components of the agricultural systems are considered: the agricultural worker, consumer and environmental components <sup>[15]</sup>. This study focuses on the latter component.

Intensive cultures, often focusing on expensive products and external markets are likely to use more agrochemicals. One such culture is gerbera, one of the most lucrative flowers exported from Mexico. In the study area in the municipality of Villa Guerrero (VG), State of Mexico, intensive cultivation of flowers in greenhouses and open tunnel takes place among residential areas, around schools, and in every tract of land where flower production is possible. Floriculture is the main economic activity with gladiolas, chrysanthemums, roses, carnations, lilies, tulips, gerberas and alstroemeria as leading crops <sup>[16-17]</sup>. Villa Guerrero's annual production volume of 83 377 tonnes places the State of Mexico among the leading Mexican producers <sup>[18]</sup>.

The information available on the effect of pesticides in tropical horticulture such as conducted in Mexico is insufficient to establish a causal association between exposure to pesticides and production. This seriously hampers access to those overseas markets requiring responsible production. Accordingly, this work aims at estimating the ecotoxicological risk posed by the use of agrochemicals in greenhouse flower cultivation (gerbera) through appraisal of agrochemical use, ecotoxicology bioassays and EIC estimation.

## MATERIALS AND METHODS

### Study site

The soil used in this study was from three gerbera greenhouses in the State of Mexico, Mexico, the main producer of flowers with 46.5% (7,074 ha) of the national ornamental flower cultivation surface, and specifically from Villa Guerrero (VG), a municipality with 82.2% of the state production [18]. The municipality is located between 18°34'-19°05' N and 99°36'-99°46' W. Its climate is predominantly temperate with 2°-39 °C temperatures and 1242.53 mm average annual rainfall [16]. A 58.3% proportion of the population is economically active out of which 73% is devoted to floriculture [19]. There are 750 greenhouses in the 228.5 municipal area, and 113 of them are devoted to the cultivation of gerbera [20].

### Selection of greenhouses

To be selected, the greenhouses had to have a metallic structure, plastic cover, drip irrigation system with a water reservoir, and  $\geq 1000 \text{ m}^2$ .

### Identification of agrochemicals applied to the cultivation of gerbera.

A survey was conducted with all the persons in charge of crop management in order to know the characteristics of each greenhouse such as cultivated area, production process, form of irrigation, types of agrochemicals used, quantity and frequency of application of the products.

### Sampling

The soil collection technique was quincunx sampling (4 corners and 1 center points) inside and outside the greenhouse. Samples of approximately 1 kg of soil were collected at a 0-40 cm depth, and transported in labeled bags. In the lab they were mixed thoroughly to form two

composite samples, one inside and one outside the greenhouse. The samples were dried at room temperature, sieved through a 2 mm mesh and stored in a dry place until analysis.

#### Determining physicochemical parameters of the soil samples

The following parameters were measured as per the methods included in the the NOM-021-SEMARNAT-2000 [21] official guidelines. pH was measured in a soil:water solution (1:5) with a Hanna potentiometer (method AS-02, 2002). Bulk and actual density were determined via method AS-03, 2002 and pycnometer method AS-04, 2002 respectively. Moisture content was measured by gravimetry, based on water content (in g) in a soil sample obtained as the difference between the mass of moist and dry soil (oven dried at 105 °C until constant mass), as per method AS-05, 2002. The soil organic matter was measured according to the organic carbon content method described by Walkley-Black (method AS-07, 2002).

#### Evaluation of toxicity

To evaluate the residual toxicity of chemicals in the soil samples, toxicity bioassays with *Eisenia andrei* and *Lactuca sativa L.* were conducted. The soil samples were sieved with a 10 µm-mesh and brought to 80% humidity using a FD-03 ECO hygrometer.

#### Bioassay with *Eisenia andrei*

##### Test Organisms

The earthworm *Eisenia andrei* is considered a bioindicator of soil quality; it is only able to grow and reproduce under 85%-moisture conditions, 25-30 °C temperature, 6.5-7.5 soil pH, using adequate organic material feed. It is also a user-friendly organism in the lab [22]. Only earthworms with well-developed clitellum were used. They were cultured in laboratory in plastic containers in the shade. The mass for those used in the acute toxicity bioassay was 461 mg ± 48 mg, and the total average biomass per experiment was 4600 mg ± 484 mg.

## Bioassay

The bioassay was performed according to the 2004 OECD Guidelines [23]. Ten organisms weighing  $461 \text{ mg} \pm 48 \text{ mg}$ , were incubated at  $24 \text{ }^\circ\text{C}$  for 14 days in Petri dishes 14 cm in diameter and 3 cm in height, with 150 g of soil adjusted to a relative humidity of 80%. At days 3, 7 and 14 of exposure, weight loss was measured in three organisms. They were then ground in a Bio Gen PRO 200 homogenizer. In the homogenate, cholinesterase activity was measured by the method of Ellman et al., 1961 [24], which is based on the fact that acetylcholinesterase produces acetylthiocholine and in turn/while forming thiocholine and acetate. The released thiocholine reacts with 5,5 dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) to produce a yellow compound, dithiobisnitrobenzoate, which generates yellow compounds in alkaline medium. The speed of the coloration is proportional to the enzyme activity measured at 405 nm. The bioassay was performed in triplicate and compared to a control soil from Hermenegildo Galeana Park in Tenancingo, State of Mexico.

## *Lactuca sativa L.* bioassay

### Preparation of seeds

Norton Seed Co. *Lactuca sativa L.* seeds (lot number 399466-13) with 99% purity and 90% germination were obtained from local dealer. The seeds were measured with a digital vernier caliper, washed with distilled water and tested in Petri dishes using 20 seeds to verify that the seed batch had a germination rate above 90% [25]. The experiment was performed in triplicate.

## Bioassay

The bioassay was performed according to the EPA 1999 handbook [28]. Three petri dishes 14 cm in diameter and 3 cm in height were prepared with 100 g of soil adjusted to a relative humidity of 80%; 30 seeds were placed 2 cm from each other. They were incubated for 7

days at 25 °C. After 7 days the following were observed: possible chlorosis, and form and length of the radicle and hypocotyl, to determine growth inhibition and germination percentage. The experiment was performed in triplicate.

#### Environmental Impact Coefficient (EIC)

For each pesticide used in the greenhouses the EIC was estimated using Equation 1.

#### Equation 1

$$\text{EIC} = \{C [(DT * 5) + (DT * P)] + [(C * ((S + P) / 2) * SY) + (L)] + [(C * R) + (D * ((S + P) / 2) * 3) + (Z * P * 3) + (B * P * 5)]\} / 3$$

where

DT = dermal toxicity, C = chronic toxicity, SY = systematic toxicity, F = toxicity to fishes, L = leaching potential, R = surface loss potential, D = toxicity to birds, S = half-life in soil, Z = toxicity to bees, B = toxicity to beneficial arthropods, P = half-life of the pesticide on the surface of the plant [15].

Field use was then calculated, based on the dose, formulation or percent active ingredient of the product and the frequency of application of each pesticide. This score was calculated by multiplying the value of the pesticide EIC in tables by the percentage of active ingredient and the use rate, as per Equation 2 [15].

#### Equation 2

Field EIC= (EIC) (% active ingredient) (use rate per acre)

Field EICs were calculated for pesticides with higher environmental impacts and as the sum of all pesticide EICs in each greenhouse under study, to compare the impacts of their pest control programs.

## RESULTS

### Study site

Three gerbera greenhouses (G1, G2 and G3) met the selection criteria: they were constructed with metal and covered with plastic, had their own water tanks, were drip-irrigated and applied agrochemicals by sprayer. G1 was 1000 m<sup>2</sup> and the other two 2000 m<sup>2</sup>. G1 and G2 had been cultivated for 4 years and G3 for 8 years. Figure 1 shows the location of the study site/greenhouses.

Figure 1. Location map of the gerbera greenhouses under study, municipality of Villa Guerrero, State of Mexico.



### Identification of agrochemicals applied for growing gerbera

The questionnaires showed that the pesticide use pattern differed in every greenhouse (Table 1): G1 used one disinfectant, 5 fertilizers and 6 pesticides. G2 used 6 fertilizers and 16 pesticides. And G3 used 8 fertilizers and 16 pesticides. In total 30 different pesticides were applied in the three greenhouses, the highest percentage of which were carbamate compounds (23.3%) followed by organophosphates (20%) and triazines (10%). The remaining 46.7% included pentacyclines, imides and pyrethroids. Noteworthy one organochlorine was still in use (endosulfan, 3.3%).

Table 1. Agrochemicals applied in each greenhouse per year over 1000 m<sup>2</sup>

| Active ingredient   | G1        | G2        | G3      |
|---|-----------|-----------|---------|
| Disinfectant  |           |           |         |
| Methyl bromide (organohalogen: OH)  | 1 kg      |           |         |
| Fertilizers   |           |           |         |
| Monoammonium phosphate  | 104.28 Kg | 78.21 Kg  | 150 Kg  |
| Calcium nitrate   |           | 78.21 Kg  | 36 Kg   |
| Nitric N, Ammonia N, Urea N, phosphorus pentoxide, potassium oxide, sulfur trioxide, magnesium oxide, Boron, Copper, Iron, Manganese, Molybdenum and Zinc |           | 312.84 Kg | 37.5 Kg |
| Sulfur and magnesium  | 52.14 L   |           |         |
| Ammonium nitrate, potassium and phosphorus  | 364.98 L  |           |         |
| Total nitrogen: 16% (3% nitric nitrogen)  | 312.84 Kg |           |         |

|   |          |          |           |
|---|----------|----------|-----------|
| ,ammoniacalnitrogen 13%)                        |          |          |           |
| Nitrogen and calcium oxide                      | 52.14 Kg |          |           |
| Potassium nitrate                               |          | 78.21 Kg |           |
| Fulvic Acid                                     |          | 52.14 L  |           |
| Humic Acid                                      |          | 52.14 L  |           |
| 18-6-18   |          |          | 300 Kg    |
| Magnesium sulfate                               |          |          | 30 Kg     |
| NKS   |          |          | 228.12 Kg |
| Megafof   |          |          | 5.21 L    |
| Maxigrow  |          |          | 5.21 L    |
| Pesticides: active ingredient (chemical family) |          |          |           |
| Abamectin (Pentacyclin)                         | 0.156 L  | 0.840 L  | 0.72 L    |
| Iprodione (Imide)                               | 0.272 Kg | 0.5 Kg   | 0.80 Kg   |
| Cyromazine (Triazine: T)                        | 0.886 Kg | 0.6 Kg   |           |
| Thiocyclam (Oxalate)                            |          | 1.5 Kg   | 1.20 Kg   |
| Endosulfan (Organochlorine: OC)                 |          | 2.4 L    | 4.69 L    |
| Thiabendazole (Benzimidazole)                   |          | 0.5 Kg   | 0.80 Kg   |
| Methomyl (Carbamate: C)                         | 5.21 L   |          |           |
| Benomyl (Benzimidazole)                         | 1.07 Kg  |          |           |
| Amitraz (Triazapentadiene)                      | 6.95 L   |          |           |
| Acephate (Organophosphate: OP)                  |          | 2.40 Kg  |           |
| Spinosad  |          | 0.6 L    |           |
| Omethoate (Organophosphate)                     |          | 1.50 L   |           |

|  |  |         |         |
|--|--|---------|---------|
| Monocrotophos (Organophosphate)                |  | 2.40 L  |         |
| Flufenoxuron (benzoyl urea)                    |  | 9.0 L   |         |
| Propamocarb hydrochloride<br>(Carbamate)       |  | 1.80 L  |         |
| Flutolanil (Benzanilide: B)                    |  | 2.00 L  |         |
| Furathiocarb (Carbamate)                       |  | 0.50 Kg |         |
| Captan (Carboxamide)                           |  | 0.50 Kg |         |
| Zineb (Dithiocarbamate)                        |  | 0.50 Kg |         |
| Chlorpyrifos (Organophosphate)                 |  |         | 5.21 L  |
| Fludioxonil + Ciprodinil (Dithiocarbamic )     |  |         | 15.64 L |
| Bifenthrin (Pyrethroid)                        |  |         | 0.30 L  |
| Pymetrozine (Triazine)                         |  |         | 0.60 Kg |
| Oxamyl (Carbamic)                              |  |         | 1.20 L  |
| Methamidophos (Organophosphate)                |  |         | 0.96 L  |
| Sulfur (Inorganic)                             |  |         | 1.50 Kg |
| Folpet (Phtalimide)                            |  |         | 1.80 Kg |
| Chlorpyrifos / Permethrin<br>(Organophosphate) |  |         | 2.40 L  |
| Thiophanate-methyl (Thiocarbamate)             |  |         | 1.60 Kg |
| Fenpropathrin (Pyrethroid: P)                  |  |         | 0.72 L  |

OP = organophosphate

OCl = organochlorine

### Physicochemical characterization of soils

The average temperature in the greenhouses was 21.5 °C, 2 °C warmer than the exterior. The soil pH was 4.7-6.9 (Table 2); the lowest values were inside the greenhouses, and this soil acidification was possibly due to indiscriminate use of agrochemicals. The moisture content was higher in G3 compared to G1. While no significant bulk density differences between greenhouses were observed, real density was greater in G1 and G2.

Table 2. Physicochemical properties of the soil composite samples inside and outside the gerbera greenhouses

| G | Sample   | pH  | Humidity (%) | Bulk density (g/mL) | Real density (g/mL) | Organic matter (%) | Organic Carbon (%) |
|---|----------|-----|--------------|---------------------|---------------------|--------------------|--------------------|
| 1 | Exterior | 6.9 | 5.29         | 1.02                | 4.07                | 4.05               | 1.86               |
|   | Interior | 6.0 | 4.00         | 1.04                | 3.29                | 3.55               | 1.59               |
| 2 | Exterior | 6.8 | 4.83         | 0.95                | 3.37                | 2.77               | 1.24               |
|   | Interior | 5.7 | 4.45         | 0.89                | 7.81                | 3.52               | 1.58               |
| 3 | Exterior | 6.6 | 8.77         | 1.03                | 1.92                | 4.46               | 1.94               |
|   | Interior | 4.7 | 9.92         | 0.99                | 2.81                | 2.52               | 1.13               |

### Toxicity assessment

#### Bioassay with *Eisenia andrei*

Cholinesterase activity (AChE) decreased significantly with longer exposures (ANOVA,  $p < 0.05$ ), both for control and exposed earthworms. After 3 days, G1 showed 34.0% AChE inhibition in earthworms exposed to soil inside the greenhouse, and 28.5% enzyme induction

caused by external-soil contaminants compared with control. A two-fold AChE significant difference ( $p < 0.05$ ) occurred in earthworms exposed inside G1 compared with the exterior. AChE after 7 and 14 days was not significantly different from the control, nor between the exterior and interior of the greenhouse (Fig. 2).

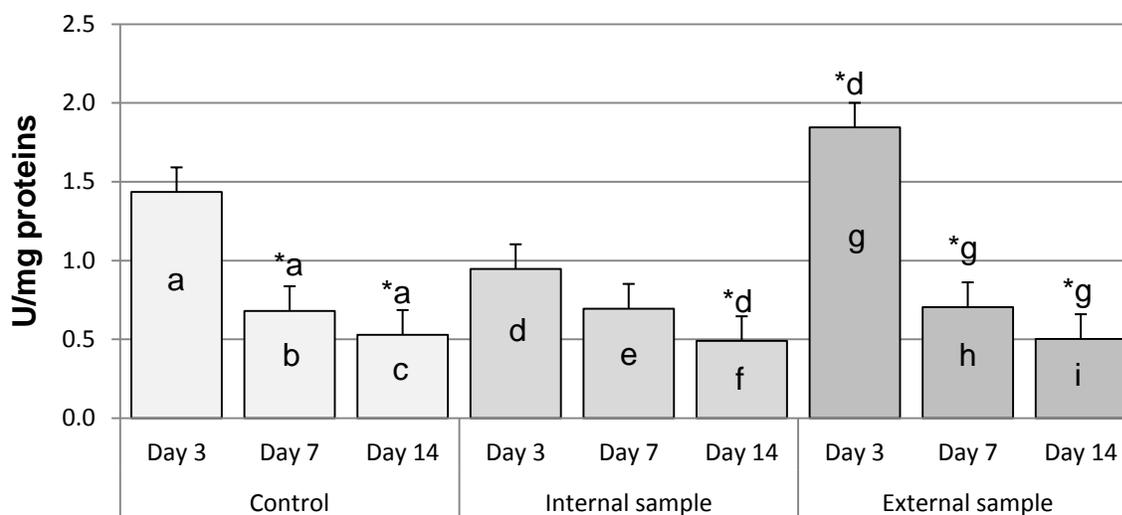


Figure 2. Cholinesterase activity of *Eisenia andrei* exposed to G1 soil. \*One-way ANOVA significant difference ( $p < 0.05$ ),  $n = 3$ .

G2 also showed AChE decreasing significantly with longer exposure time ( $p < 0.05$ ) in both samples and control. In this greenhouse, the only significant inhibition of AChE compared with the control was 42% after 7 days of exposure (Fig. 3).

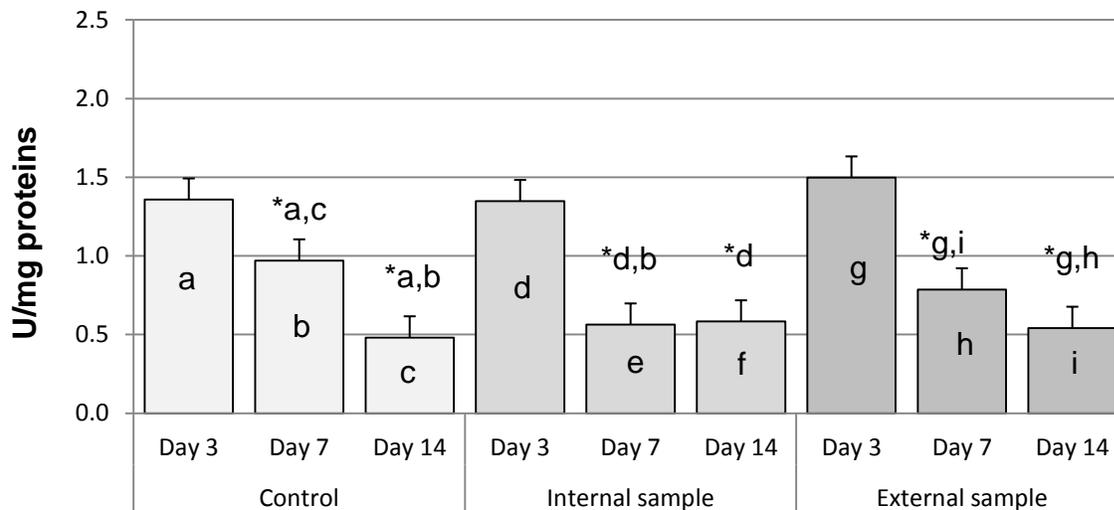


Fig.3. - Cholinesterase activity of *Eisenia andrei* exposed to G2 soil. \*One-way ANOVA significant difference ( $p < 0.05$ ),  $n = 3$ .

G3 stood out compared to the other greenhouses: although AChE was rapidly and significantly inhibited in the exposed samples, AChE increased significantly after 14 days of exposure ( $p < 0.05$ ) e.g. outside the greenhouse (Fig. 4).

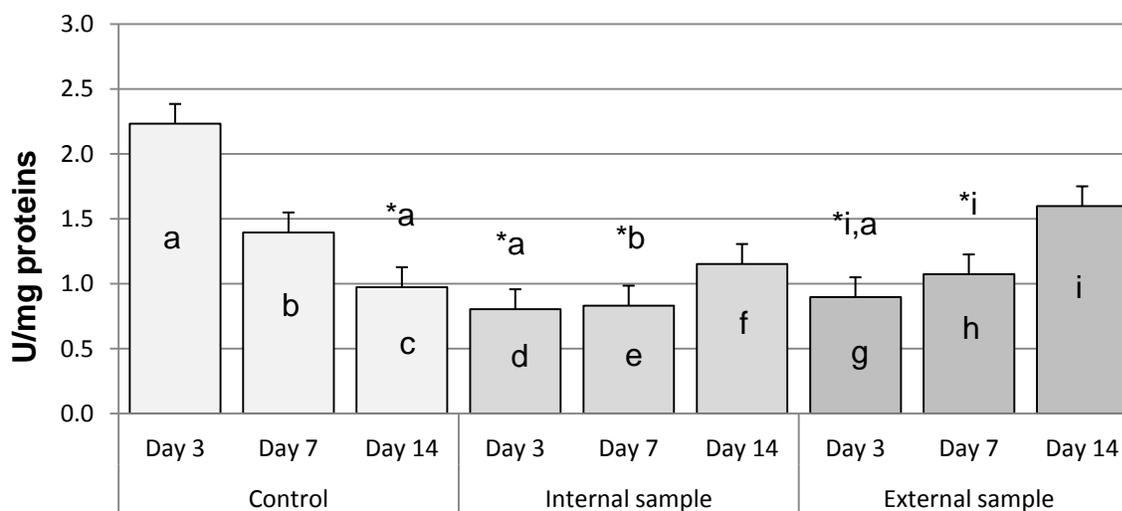


Fig.4. - Cholinesterase activity of *Eisenia andrei* exposed to G3. \*One-way ANOVA significant difference ( $p < 0.05$ ),  $n = 3$ .

*Lactuca sativa L.* bioassay

The germination percentage was 95.5% in the sample of 200 *L. sativa L.* seeds whose length was 3.9-4.5 mm.

In G1 the percentage of germinated seeds after 7 days of exposure was higher both inside and outside the greenhouse (18.9 and 4.4% respectively) compared to the control (Fig. 5). Average radicle growth was 8.9 mm higher outside the greenhouse than the interior and control samples (not shown). The germination index was greater in the exposed samples (30.3 and 88.6%); the exterior and control samples were significantly different ( $p < 0.05$ ).

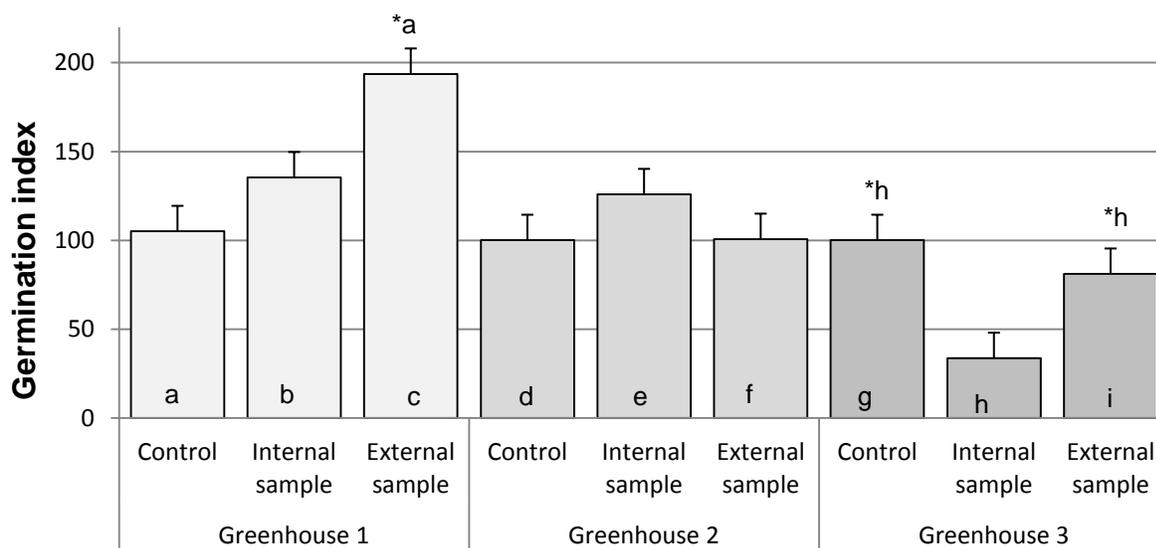


Fig.5 . - *Lactuca sativa L.* germination index in gerbera greenhouses. \*One-way ANOVA significant difference ( $p < 0.05$ ),  $n = 3$  .

In G2 (Fig. 5) average germination was higher in the control. Radicle growth was 14 and 10% higher in the interior and exterior than in the control, respectively (not shown). for significant difference between the greenhouse soil 14 and 10 % in the interior and exterior than in the control. The IG was 12.5 % higher in the inland soil sample compared to the control and to external sample yielded a similar value.

Germination of exposed seeds in G3 was significantly inhibited ( $p < 0.05$ ) especially inside the greenhouse; this concurred with a germination percentage 7.4% lower than the control and radicle growth twice smaller.

In all three greenhouses conspicuous morphological differences were visible in exposed *L. sativa* seedlings, accompanied with flimsiness and yellowing of the radicle and hypocotyl, e.g. in G2 and G3.

#### Environmental Impact Coefficient

Patterns of agrochemicals use differed markedly in each greenhouse. Organophosphate and carbamate pesticides predominated however. In terms of greenhouse EIC, predominance was Methomyl (C) > Methyl bromide (OH) > Amitraz (T) in G1; propamocarb hydrochloride (C) > Flutolanil (B) > Zineb (C) in G2; and Fludioxonil combined with Ciprodinil (C) > Chlorpyrifos (OP) > Endosulfan (OCI) in G3 (Tables 3 to 5). Noteworthy, Endosulfan was used in G2 and G3.

Table 3. Environmental impact coefficients (EIC) of pesticides applied in greenhouse 1.

| Active Ingredient | Use                        | Field EIC | Reported EIC* |
|-------------------|----------------------------|-----------|---------------|
| Methyl bromide    | Disinfectant and acaricide | 53.30     | 53.57         |
| Abamectin         | Insecticide                | 0.10      | 34.68         |
| Methomyl          | Insecticide                | 103.24    | 22            |
| Benomyl           | Fungicide                  | 16.21     | 30.24         |

|            |             |        |       |
|------------|-------------|--------|-------|
| Iprodione  | Fungicide   | 3.30   | 24.25 |
| Cyromazine | Insecticide | 12.16  | 18.29 |
| Amitraz    | Acaricide   | 37.95  | 25.17 |
|            | TOTAL EIC   | 226.25 | 208.2 |

\*A Method to Measure the Environmental Impact of Pesticides, Table 2: List of Pesticides 2012. Integrated Pest Management Program.

| Active ingrediente        | Use         | Field EIC | Reported EIC* |
|---------------------------|-------------|-----------|---------------|
| Thiocyclam                | Insecticide | 50.66     | 33.77         |
| Cyromazine                | Insecticide | 16.46     | 18.29         |
| Abamectin                 | Insecticide | 1.05      | 34.68         |
| Endosulfan                | Insecticide | 61.06     | 38.55         |
| Acephate                  | Insecticide | 95.54     | 24.88         |
| Spinosad                  | Insecticide | 2.00      | 14.38         |
| Omethoate                 | Insecticide | ND        | ---           |
| Monocrotophos             | Insecticide | ND        | ---           |
| Flufenoxuron              | Insecticide | 10.03     | 27.87         |
| Propamocarb hydrochloride | Fungicide   | 499.99    | 23.89         |
| Flutolanil                | Fungicide   | 211.71    | 23.07         |
| Iprodione                 | Fungicide   | 126.44    | 24.25         |
| Thiabendazole             | Fungicide   | 194.21    | 31.04         |

|              |             |         |       |
|--------------|-------------|---------|-------|
| Furathiocarb | Insecticide | 138.90  | 33.3  |
| Captan       | Fungicide   | 82.22   | 15.77 |
| Zineb        | Fungicide   | 317.51  | 38.06 |
|              | TOTAL EIC   | 1807.79 | 381.8 |

\* A Method to Measure the Environmental Impact of Pesticides, Table 2: List of Pesticides

2012. Integrated Pest Management Program. ND: No data reported

| Active ingredient         | Use         | Field EIC | Reported EIC* |
|---------------------------|-------------|-----------|---------------|
| Thiocyclam                | Insecticide | 20.26     | 33.77         |
| Chlorpyrifos              | Insecticide | 62.27     | 24.88         |
| Fludioxonil + Ciprodinil  | Fungicide   | 233.36    | 23.87         |
| Bifenthrin                | Insecticide | 1.62      | 44.35         |
| Abamectin                 | Insecticide | 0.45      | 34.68         |
| Pymetrozine               | Insecticide | 5.87      | 19.57         |
| Iprodione                 | Fungicide   | 9.70      | 24.25         |
| Thiabendazole             | Fungicide   | 14.90     | 31.04         |
| Oxamyl                    | Insecticide | 9.60      | 33.33         |
| Methamidophos             | Insecticide | 21.21     | 36.83         |
| Sulphur                   | Fungicide   | 39.19     | 32.66         |
| Folpet                    | Fungicide   | 45.69     | 31.73         |
| Chlorpyrifos / Permethrin | Insecticide | 24.87     | 26.85         |
| Thiophanate methyl        | Fungicide   | 17.15     | 23.82         |

|             |             |        |        |
|-------------|-------------|--------|--------|
| Fenprothrin | Insecticide | 7.02   | 25.33  |
| Endosulfan  | Insecticide | 59.70  | 38.55  |
|             | TOTAL EIC   | 572.86 | 485.51 |

\* A Method to Measure the Environmental Impact of Pesticides, Table 2: List of Pesticides 2012. Integrated Pest Management Program.

In all three greenhouses, EIC field data were higher than reported in the literature (Tables 3-5), since dose, use frequency and active ingredient content were taken into account at the greenhouse level. G2 had the highest EIC (8.2 times the greenhouse 1 and 3 in 3).

## DISCUSSION

In the study area pesticide use quantity and frequency are driven by production and flower cost regardless of harmful impacts to the environment i.e. health of organisms. In the three greenhouses under study use is dominated by carbamates and organophosphates (43.3%), cholinesterase-inhibiting pesticides that produce acute and chronic toxic effects <sup>[28-29]</sup>.

### Soil physicochemical characteristics

All three greenhouse soils had density lower than 1.3 g / mL, indicating a porous soil condition which facilitates water and air circulation. Organic matter and organic carbon were in a range from 1.13 to 1.94%, and were highest inside greenhouse 1, contributing to soil structure, aeration and moisture retention promoting plant growth <sup>[30-31]</sup>. Organic matter can also contribute to adsorption phenomena and so decreased pesticide mobility in the soil <sup>[32]</sup>.

Greenhouse 3 had a higher moisture content (2.3 times that of the other two) and a low true density. Excess water can leach nitrates to depths beyond root reach and also displace the air contained in the soil causing shortage of oxygen at root depth <sup>[30,33-34]</sup>.

pH was similar in all greenhouses, on average 6 (slightly acidic). A higher acidity in greenhouse 3 stood out (pH=4.7), possibly due to the highest use of agrochemicals. This acidity likely produced unfavorable farming conditions <sup>[33]</sup>.

The greenhouse with best agricultural soil also used a lesser amount of pesticides (G 1).

## Evaluation of toxicity

### **Bioassay with *Eisenia andrei***

Exposure was as follows. G1 did not use organophosphates and only sprayed one carbamate (methomyl). Both G2 and G3 used 3 organophosphates and 3 carbamates; this is where AChE was most pronounced inside the greenhouse.

No mortality in *Eisenia andrei* was recorded at any dose, despite their exposure to undiluted soil containing a residual mixture of compounds applied in flower cultivation.

However, AChE inhibition was observed in all greenhouses, confirming *E. fetida* AChE inhibition as a good biomarker of carbamate and organophosphorate toxicity <sup>[35-36]</sup>. AChE inhibition was time-dependent in all greenhouses. In G3 after 3 and 7 days' exposure AChE inhibition was greatest, similar inside and outside the greenhouse. By day 14 enzyme induction was observed in earthworms exposed to exterior soil that were likely undergoing recovery due on the one hand to pesticide half-life of degradation (2.4 hours to 7 days for carbamates and 2-12 days for organophosphates), and on the other hand to absorption through the intestinal tract and subsequent biotransformation <sup>[37-40]</sup>. In acute toxicity of 24 insecticides to *Eisenia fetida* (including abamectin, chlorpyrifos and fenprothrin used in this study) LC50 decreased between exposure days 7 and 14 <sup>[41]</sup>. Organophosphate toxicity is lower than carbamate and inhibition is concentration- and exposure-time-dependent <sup>[42]</sup>.

### ***Lactuca sativa* L. bioassay**

Seed germination and GI increased in greenhouse interior and exterior soils, probably due to soil preparation and fertilizer use. However, phytotoxicity effected morphological changes in seedlings such as radicle and hypocotyl elongation (interpreted as a toxic response by Grassi et al. 2000 and Ronco, 2005)<sup>[43-44]</sup>, yellowing and brittleness, known to occur in exposures to organic and inorganic contaminants. This confirmed the efficiency of phytotoxicity bioassays in soluble soils <sup>[45]</sup>.

### **Environmental Impact Coefficient**

Field EICs accounted for dose, frequency and percentage of active ingredient used in each greenhouse. The values proved higher than reported for each pesticide in the Integrated Pest Management Program (2012). Greenhouse field EICs were 1807 (G2) > 572.86 (G3) > 226.25 (G1). G3 used more pesticides than the other but its field EIC less than a third that of G2 suggested that the environmental impact depended not only on the number of compounds but also their toxicity and persistence <sup>[41]</sup>.

## **CONCLUSIONS**

Greenhouse flower cultivation used a wide array of chemicals. Organophosphate and carbamate pesticides predominante but organochlorines such as the highly persistent endosulfan were still in use despite international phase-out.

According to the physicochemical characteristics of the greenhouse soil tends to degradation observed on soil acidification, compaction and organic matter decline, probably were due to intensive cultivation and uncontrolled application of agrochemicals.

Both interior and exterior greenhouse soils proved toxic to *Eisenia andrei* and *Lactuca sativa* L. suggesting organophosphate and carbamate pesticide mobility.

Observed environmental impacts depended on the number of sprayed compounds and also on the toxicity and persistence of the compounds under ambient conditions.

## REFERENCES

- [1] Hafez, H. F. H.; Thiemann, W. H. P. Persistence and biodegradation of diazinone and imidacloprid in soil. Italy, 2003, 35-42.
- [2] Bezchlebova, J.; Cernohlavkova, J.; IvanaSochova, J. L.; Kobeticova, K.; Hofman, J. Effects of toxaphene on soil organisms. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 2007, 68 (3) 326-334.
- [3] Vicente Andreu, V.; Picó, Y. Determination of pesticides and their degradation products in soil: critical review and comparison of methods. *Trend in Analytical Chem.*, 2004, 23, 10–11.
- [4] Doménech X. Química del suelo, El impacto de los contaminantes, Ed. Miraguano S.A., España. 2009, 127-153.
- [5] Zhu, G.; Wu, H.; Guo, J.; Kimaro, F. M. E. Microbial degradation of fipronil in clay loam soil. *Water, Air, Soil Pollut.* 2004, 53, 35-44.
- [6] Moore, M. N.; Depledge, M. N.; Readman, J. W. An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management. *Mutat. Resp.* 2004, 522, 247-268.
- [7] Snape, J. R.; Maund, S. J.; Pickford, D. B. Ecotoxicogenomics: the challenge of the integrating genomics into aquatic and terrestrial ecotoxicology. *Aquat.Tox.* 2004, 67, 143-154.
- [8] Ruiyang, X.; Zijian, W.; Chunxia, W.; Guo, Y. Soil screening for identifying ecological risk stressors using a battery of in vitro cell bioassays, *Chemosphere China*, 2006, (68), 71-78.
- [9] Pandard, P.; Devillers, J.; Charissou, A. M.; Poulsen, V.; Jourdain, M. J.; Féraud J. F.; Grand, C.; Bispo, A. Selecting a battery of bioassays for ecotoxicological characterization of wastes, *Science of the Total Environment*, France, 2006, 114-125.
- [10] Boluda, R.; Roca-Pérez, L.; Marimón, L. Soil plate bioassay: An effective method to determine ecotoxicological risks. *Chemosphere. Spain*, 2011, (84), 1-8.
- [11] Edwards, C. A. Testing the effects of chemicals on earthworms. The advantages and limitations of field tests, In: *Ecology of Earthworms*, U. Kingdom, 1992, 75-84.

- [12] Kwong, T. C. Organophosphato pesticides: biochemistry and clinical toxicology. *Ther. Drug Monit.* 2002, 24, 144-149.
- [13] EC, Biological test method: tests for toxicity of contaminated soil to earthworms (*Eisenia foetida*, *Eisenia andrei*, or *Lombricus terrestris*). Report EPS 1/ RM/43, Environment Canada, Environmental Technology Centre, Ottawa, ON, Canada, 2004.
- [14] Carmo, E. L.; Bueno, A. F.; Bueno, R. C. O. F. Pesticide selectivity for the insect egg parasitoid *Telenomus remus*. *BioControl*, 2010, 55, 455-464.
- [15] Kovach J.; Petzoldt, C.; Degni, J.; Tette, J. A Method to Measure the Environmental Impact of Pesticides, IPM Program, Cornell University, New York State Agricultural Experiment Station Geneva, New York, 2013.
- [16] EdoMex1 (2011), Villa Guerrero, Actividad económica, Principales Sectores, Productos y Servicios; [www.estadodemexico.com.mx](http://www.estadodemexico.com.mx), consultada el 03/07/2012.
- [17] EdoMex (2011) Villa Guerrero, Medio físico, Localización; [www.estadodemexico.com.mx](http://www.estadodemexico.com.mx), consultada el 03/07/2012.
- [18] SEDAGRO, Información Básica Sector Florícola 2011. México, 2012.
- [19] IGCEM, Estadística Básica Municipal del Estado de México, Villa Guerrero, 2011
- [20] SAGARPA, Sistema de Georeferenciación del Inventario de Productores de Invernadero en el Estado de México, 2011.
- [21] NOM-021-SEMARNAT-2000, Norma Oficial Mexicana que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudio, muestreo y análisis. *Diario Oficial*, 2002.
- [22] Kaplan, D. L.; Hartenstein, E. F.; Neuhauser, M .R.; Maleckit..Physicochemical requirements in the environment of the earthworm *Eisenia foetida*. *Soil Biology and Biochemistry*. 1980, 12, 347-352.
- [23] Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). Terrestrial Plants: Growth Test. Guideline for Testing of Chem. N ° 208. OECD Publications Serv., París. 2006.

- [24] Ellman L.; Courtney D.; Andres V.; Featherstone M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 1961, 7:88-95.
- [25] Castillo G., *Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de aguas*, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, Santiago de Chile, 2004, 17-22, 52, 71, 80.
- [26] EPA, Prevention, Pesticides and Toxic Substances (7101), *Ecological Effects Test Guidelines*, OPPTS 850.4200, Seed Germination/Root Elongation Toxicity Test, 1996.
- [27] A Method to Measure the Environmental Impact of Pesticides, Table 2: List of Pesticides 2012. Integrated Pest Management Program
- [28] EPA, 1999; Insecticidas <http://www.epa.gov/>
- [29] Hurtado, C. C. M.; Gutiérrez, S. M. Enfoque del paciente con intoxicación aguda por plaguicidas organofosforados. *RevFacMedUnivNacColomb.* 2005, (4). 53.
- [30] FitzPatrick, E.A. *Introducción a la ciencia de los suelos*, Ed. Trillas, México, 1996, 125-8.
- [31] Martínez, H. E.; Fuentes, J. P.; Acevedo, H. E. Carbono orgánico y propiedades del suelo, Chile. *R.C.SueloNutr. Veg.* 8 (1), 68-96. *J. Soil Sc. Plant Nutr.*, 2008, 8 (1) 68-96.
- [32] Esteve T.A. *Preparación de muestras para el análisis de plaguicidas mediante microondas y fluidos presurizados*. Universidad de Valencia, España, 2007.
- [33] Labrador, 2001; Labrador M. J., *La materia agricultura, pesca y alimentación*, Ed. Mundi-prensa, 2a edición, España, 2001, 33.
- [34] Infoclima, 2013 Infoclima (2013), Humedad del suelo, <http://agro.infoclima.com>, consultada el 15/10/2013.
- [35] Frasco et al. (2005) Frasco, M., Fournier, D., Carvalho, F., Guilhermino, L., Do metals onhibitacetylcholinesterase (AChE) Implementation of assay conditions for the use of -AChE activity as a biomarker of metal toxicity. *Biomarkers*, 10 (5). 2005, 360-375.
- [36] Key y Fulton (2002), Key, P. Fulton, M., Characterization of cholinesterase activity in tissues grass shrimp (*Palaemonetes pugio*). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 72. 2002, 186-192.

- [37] Saavedra, G.M. Biodegradación de alperujo utilizando hongos del género *Plurotus* y anélidos de la especie *Eisenia foetida*. Instituto de Biotecnología, Granada, España, 2007;
- [38] De Silva, P.M.C.S.; Van Hestel, C.A.M. Comparative sensitivity of *Eisenia andrei* and *Perionyxex cavatus* in earthworm avoidance tests using two soil types in the tropics. *Chemosphere*. 2009, 77, 1609-1613.
- [39] Udovic, M.; Lestan, D. *Eisenia fetida* avoidance behavior as a tool for assessing the efficiency of remediation of Pb, Zn and Cd polluted soil. *Env.Poll.* 2010, 158, 2766-2772.
- [40] INECC, 2013. <http://www2.inecc.gob.mx>,
- [41] Wang, Y.; Wu, S.; Chen, L.; Wu, C.; Yu, R.; Wang, Q.; Zhao, X. Toxicity assessment of 45 pesticides to the epigeic earthworm *Eisenia fetida*. *Chemosphere*. 2012, 88, 484-491.
- [42] Chakra, R. N.; Venkateswara, R. J. Biological response of earthworm, *Eisenia foetida* (Savigny) to an organophosphorous pesticide, prefenofos. *Ecotoxicology and Environmental Safety, India*, 2008, 71, 574-582.
- [43] Grassi, V; Rives, C; Sobrero, C.; Ronco, A. Aplicación de bioensayos de toxicidad para la evaluación de riesgo de suelos contaminados por la actividad petrolera. XX Jornadas Interdisciplinarias de Toxicología ATA, Buenos Aires, 2000.
- [44] Ronco, A. E.; Castillo, G.; Díaz-Báez, M. C.; BulusRossini, G.; Sobrero, C.; Apartin C.; Ahumada, I.; Espinosa, R. A.; Mendoza, J. Chapter 7. The Application of hazard assessment schemes using the Watertox toxicity testing battery. En: *Small Scale Fresh Water Toxicity Investigations. Vol. 2: Hazard Assessment Schemes*. C Blaise and JS Ferard, Eds, Springer, New York.2005, 422.
- [45] Escoto, V.; Fernández, G. J.; Martín, P. F. Determination of phytotoxicity of soluble elements in soils, based on a bioassay with lettuce (*Lactuca sativa L.*). *Science of the Total Environment Science of the Total Environment* 378, Spain, 2007, 63-66.

## 5.2 RESULTADOS NO PUBLICADOS

Los resultados para el análisis de agua de los invernaderos son los siguientes:

### Muestreo.

El agua fue colectada de los depósitos cercanos a los invernaderos de donde se obtiene el agua de riego para el cultivo de gerbera.

#### Invernadero 1.

El depósito del Inv1 (Fig.1) es de concreto y está ubicado a 10 metros del invernadero, el agua es obtenida por medio de tuberías desde un manantial que se ubica en el mismo predio, y es llevada al invernadero por medio de un sistema de bombeo.



Fig.1. Imagen del Inv1 y el depósito donde almacenan el agua de riego.

## Invernadero 2

El Inv2 tiene su depósito de agua junto al invernadero como se observa en la figura 2, está cubierto de plástico y cuenta con sistema de bombeo; el agua proviene del canal general de Municipio de VG.



Fig.2. Imagen del Inv2 y el depósito donde almacenan el agua de riego.

## Invernadero 3

El depósito de agua del Inv3 (Fig.3) se encuentra en el interior del mismo invernadero, está cubierto de plástico y obtiene el agua del canal general de VG.



Fig.3. Imagen del Inv3 y el depósito donde almacenan el agua de riego.

Se colectaron aproximadamente 3 litros de agua de la superficie de cada depósito en envases de plástico previamente lavados, se transportaron debidamente etiquetados al laboratorio donde se mantuvieron a una temperatura menor de 4 °C hasta su análisis.

### **Determinación de parámetros fisicoquímicos de las muestras de agua.**

Por medio de un equipo Hanna Instruments HI 9811 Conductronic PC18 se midieron *in situ* pH, conductividad eléctrica y temperatura de cada muestra.

Tabla 1. Parámetros fisicoquímicos de las muestras de agua de riego de los invernaderos de gerbera en estudio.

| <b>Invernadero</b> | <b>pH</b> | <b>Temperatura °C</b> | <b>Conductividad µS</b> |
|--------------------|-----------|-----------------------|-------------------------|
| <b>1</b>           | 7.7       | 18.5                  | 319                     |
| <b>2</b>           | 7.0       | 14.1                  | 311                     |
| <b>3</b>           | 7.3       | 19                    | 334                     |

Observándose un pH promedio cercano a la neutralidad (7.3), la temperatura en un rango de 14 a 19 °C y la conductividad entre 311 y 334 µS.

El Inv1 presenta el pH más alto de los tres invernaderos en estudio, y el Inv3 la temperatura y conductividad más altas.

## Evaluación de la toxicidad de agua de riego

### Bioensayo con *Daphnia pulex*.

En la figura 4 se observan distintos comportamientos en el porcentaje de mortalidad para las tres muestras en estudio, de manera general se observa que en ninguna de las diluciones se alcanza una mortalidad del 50%. El ANOVA de una vía para este ensayo no encontró diferencias significativas entre los diferentes invernaderos ni entre las diluciones. El mayor porcentaje de mortalidad lo presenta la muestra al 100% del Inv3. El porcentaje de mortalidad en el Inv2 presenta un comportamiento irregular, mientras en el Inv3 la mortalidad disminuye conforme disminuye la concentración de la muestra. En el Inv1 podemos observar que a la concentración más baja y a la más alta se presenta el 10 % de mortalidad que para dicha muestra es el porcentaje mayor.

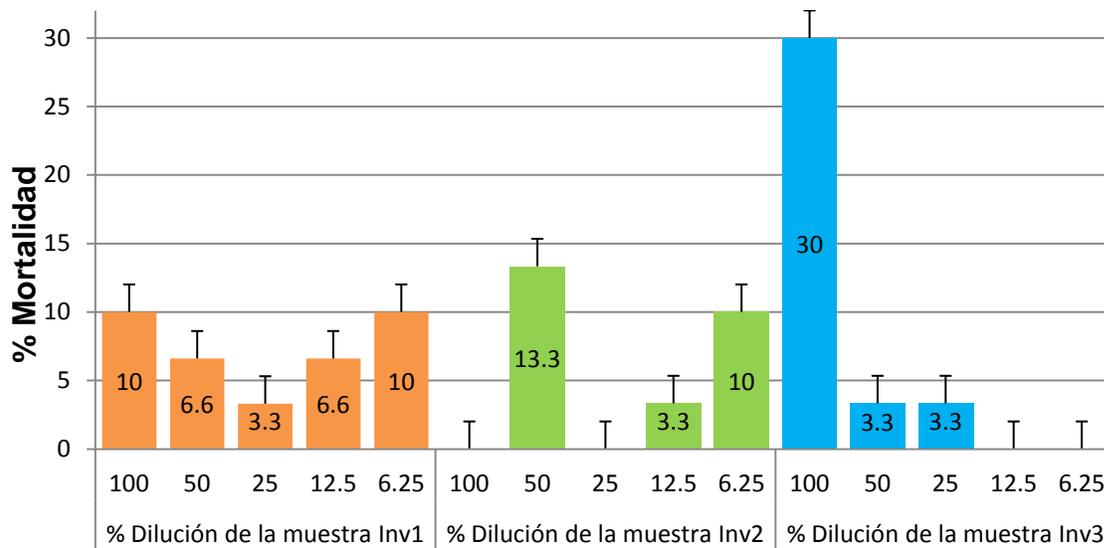


Fig. 4. Porcentaje de mortalidad de *Daphnia pulex* expuesta al agua de riego de invernaderos. ANOVA, \* Diferencia significativa ( $p < 0.05$ ),  $n = 3$ .

### Bioensayo con *Selenastrum capricornutum*.

Para el ensayo con *Selenastrum capricornutum* la figura 5 se observa que no se presentó un efecto de inhibición del organismo a prueba, por el contrario, el agua de riego utilizada en los tres invernaderos produce una inducción, a excepción de la muestra al 100% del Inv1 y la dilución al 6.25% del Inv2 que si producen inhibición, cabe mencionar que ninguno de los dos alcanza el 50 % de inhibición.

La inducción del crecimiento del alga es mayor en el agua del Inv2, presentando el mayor porcentaje de inducción las muestras al 100 y 50 %. En los Inv1 y 2 el porcentaje de inducción aumenta conforme disminuye la dilución, el Inv2 presenta el efecto contrario, entre más alta la concentración de la muestra la inducción es mayor.

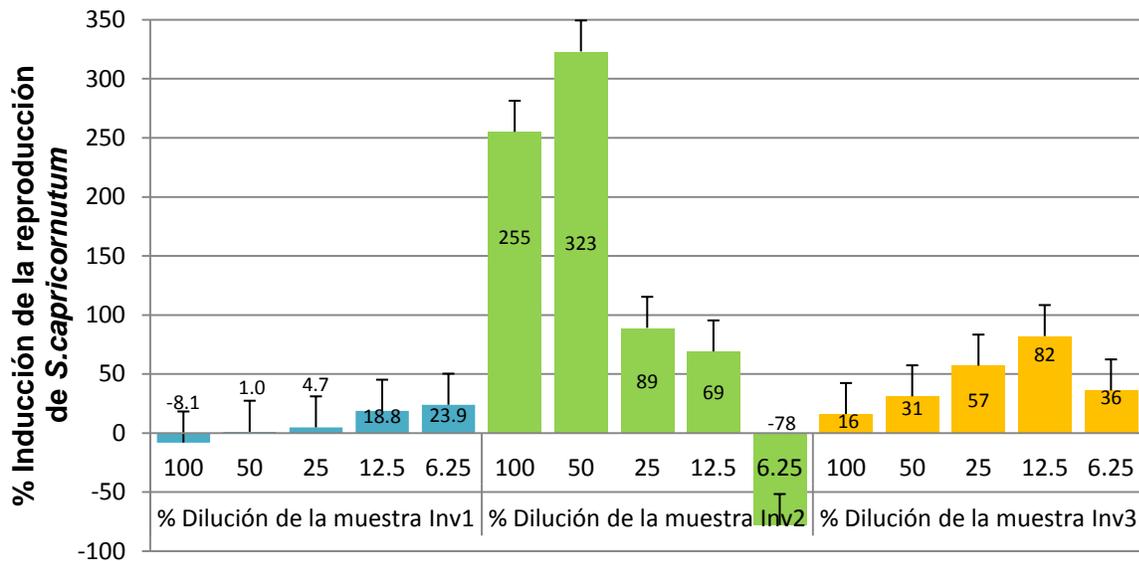


Fig. 5. Porcentaje de inducción de *Selenastrum capricornutum* expuesta al agua de riego de invernaderos. ANOVA, \* Diferencia significativa ( $p < 0.05$ ),  $n = 3$ .

### Bioensayo con *Lactuca sativa* L.

Se obtuvieron semillas de *Lactuca sativa* L. en semilleras locales, con número de lote 399466-13, marca Norton Seed Co, pureza de 99% y germinación de 90%. Se verificó que el lote de semillas tuviera un porcentaje de germinación superior al 90%.

El porcentaje de semillas germinadas (Fig.6) varía entre los tres invernaderos, presentando una diferencia significativa entre el Inv2 y el 3, observándose que el Inv2 presenta los porcentajes de germinación más bajos en un rango de 62.1 a 87.9, y el Inv3 presentaron valores por arriba del 95 %.

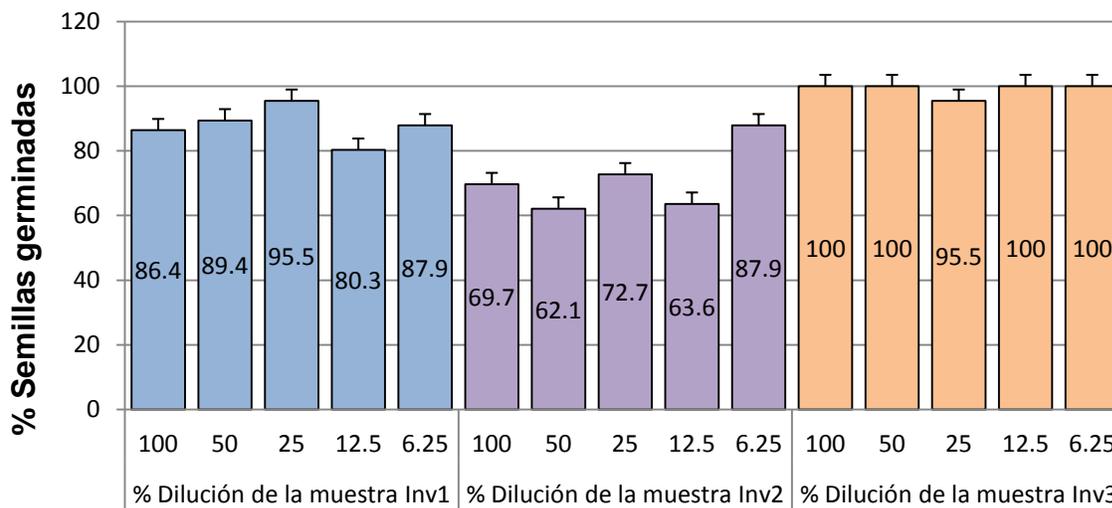


Fig. 6. Porcentaje de semillas germinadas (*Lactuca sativa* L.) expuestas al agua de riego de invernaderos de gerbera. ANOVA y Comparación Múltiple por el método Dunn. \*Diferencia significativa ( $p < 0.05$ ),  $n = 3$ .

## Toxicidad en radícula

En la figura 7 se observa el promedio del crecimiento de la radícula en los tres invernaderos. De manera individual no existe diferencia significativa entre las diluciones de cada invernadero, pero si existe una diferencia significativa de los Inv1 y 2 con respecto al Inv3.

El Inv1 es el que presenta promedios de crecimiento más bajos, en un rango de 18.2 a 29.7 mm. El crecimiento más bajo se presentó en las dilución 6.25 % del Inv2 (16 mm), seguido de la dilución 25 % del Inv1. El Inv3 con un rango de 25 a 37 mm es el que produce un crecimiento mayor de la radícula. En los Inv2 y 3 se encontró que el promedio del crecimiento aumenta conforme la concentración de la muestra es más baja, en el Inv1 el efecto es al contrario.

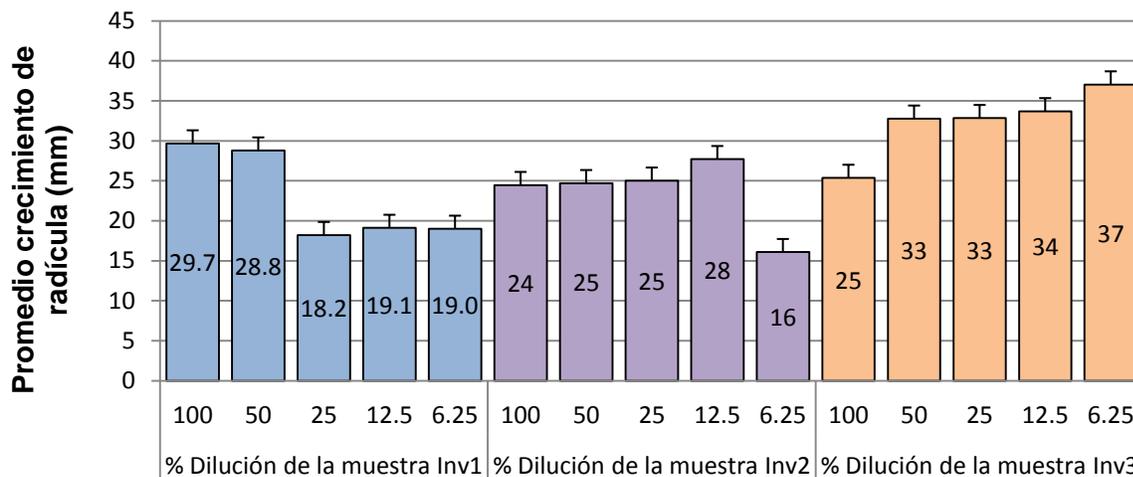


Fig. 7. Promedio del crecimiento de la radícula de *Lactuca sativa L.* expuestas al agua de riego de los invernaderos de gerbera en estudio. ANOVA y Comparación Múltiple por el método Holm-Sidak. \*Diferencia significativa ( $p < 0.05$ ),  $n = 3$ .

El porcentaje de inhibición de la elongación de la radícula varía para los tres invernaderos como se puede observar en la figura 8 la inhibición es mayor en el Inv2 en un rango de 13.4 hasta 65 %, en tanto en el Inv3 solo se presenta inhibición en la dilución al 25 %, por lo cual nuestro análisis estadístico determina un diferencia significativa entre los Inv2 y 3.

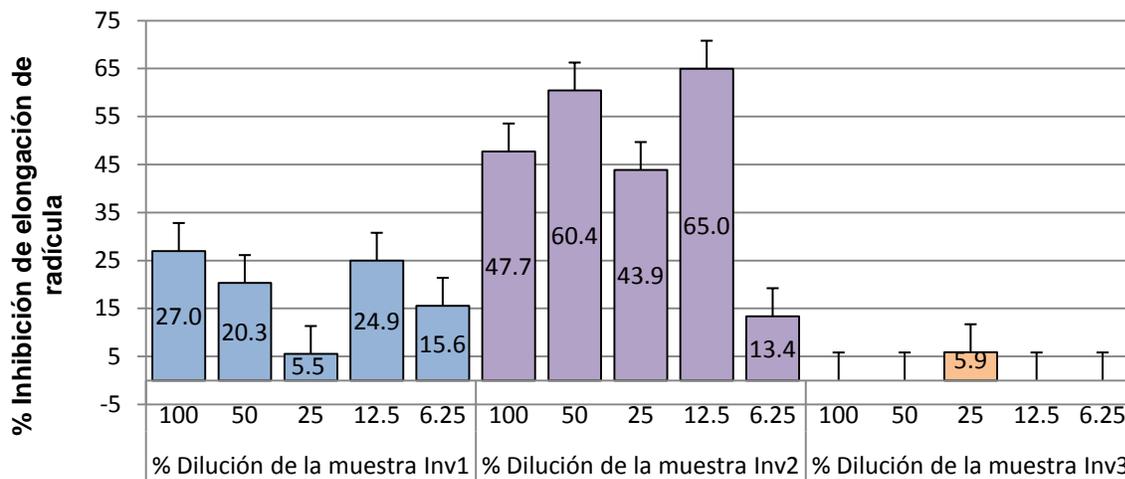


Fig. 8. Porcentaje de inhibición de la elongación de la radícula de semillas *Lactuca sativa* L. expuestas al agua de riego de los invernaderos de gerbera en estudio. ANOVA y Comparación Múltiple por el método Dunn. \*Diferencia significativa ( $p < 0.05$ ),  $n = 3$ .

Relacionando los resultados de porcentaje de semillas germinadas y el promedio de crecimiento de la radícula obtenemos el índice de germinación (IG), el cual para los tres invernaderos en todas sus diluciones está en un rango de 98 a 173.

Como se observa en la figura 9 no se presenta diferencia significativa en los valores de IG de los invernaderos, ni entre ellos ni entre sus diluciones.

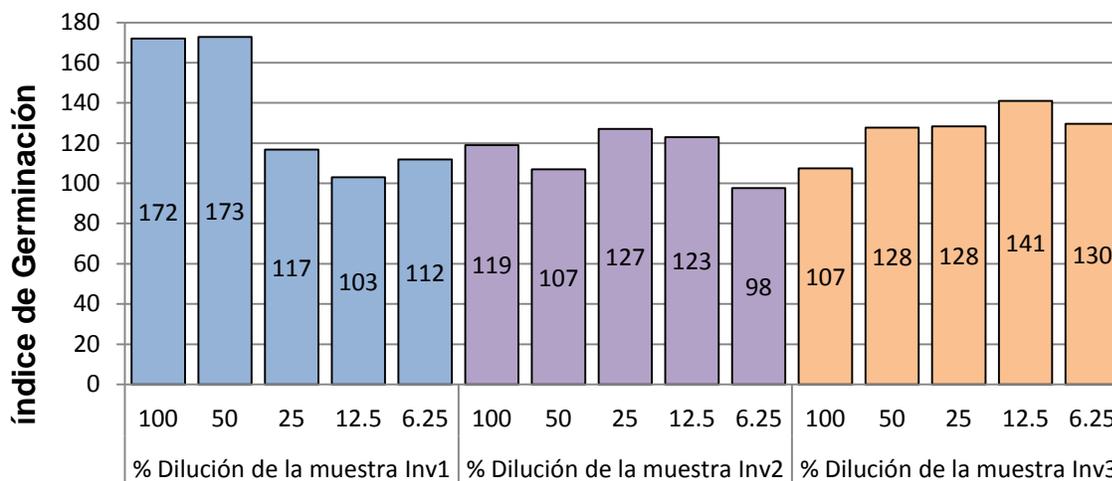


Fig. 9. Índice de germinación de la radícula de *Lactuca sativa* L. expuesta al agua de riego de los invernaderos de gerbera en estudio. ANOVA y Comparación Múltiple por el método Dunn. \*Diferencia significativa ( $p < 0.05$ ),  $n = 3$ .

### Toxicidad en hipocotilo

El promedio de crecimiento del hipocotilo para los tres invernaderos lo podemos observar en la figura 10 en donde encontramos que de manera individual en cada invernadero no se presenta diferencia significativa, sin embargo el crecimiento en el Inv3 es mayor presentando un rango de 27 a 36 mm de crecimiento, por lo cual se presenta una diferencia significativa con el Inv2 en donde se presenta un menor promedio del crecimiento con un rango de 18 a 22 mm.

El efecto que se encontró para las tres muestras de agua es que el promedio del crecimiento aumenta conforme disminuye la concentración de la muestra.

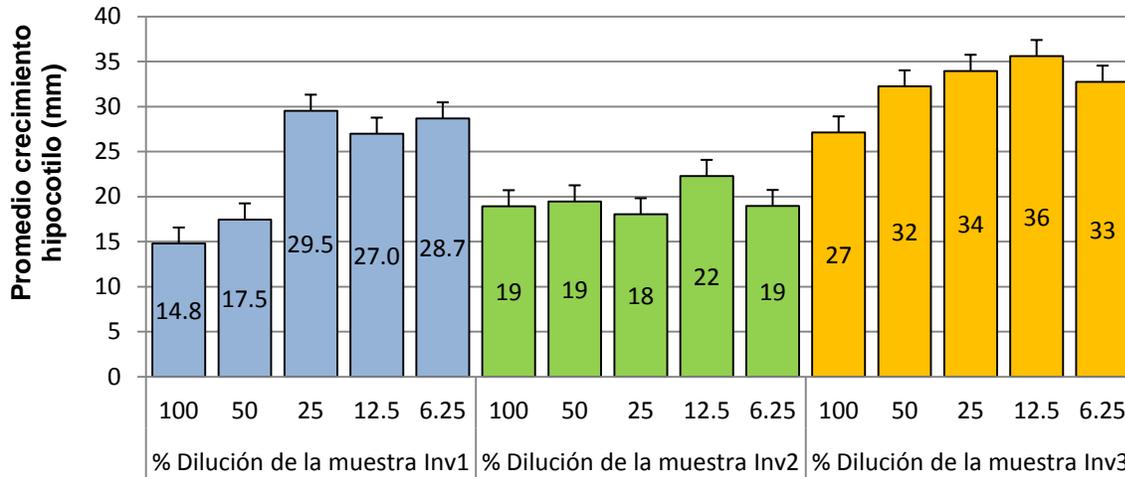


Fig. 10. Promedio del crecimiento del hipocotilo de *Lactuca sativa L.* expuestas al agua de riego de los invernaderos de gerbera en estudio. ANOVA y Comparación Múltiple por el método Dunn. \*Diferencia significativa ( $p < 0.05$ ),  $n = 3$ .

El porcentaje de inhibición de la elongación del hipocotilo resultó igual al de la radícula como se observa en las figuras 8 y 11.

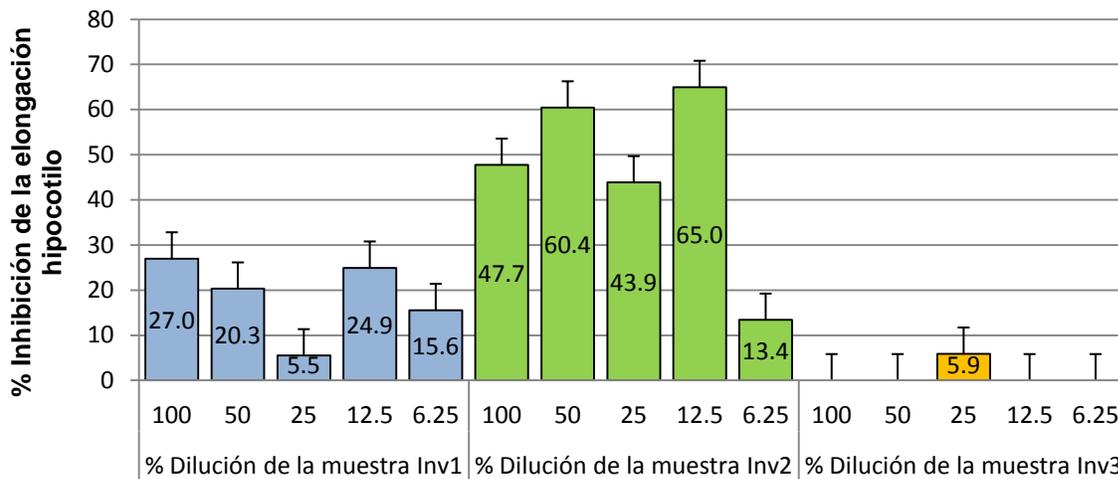


Fig. 11. Porcentaje de inhibición de la elongación del hipocotilo de semillas *Lactuca sativa L.* expuestas al agua de riego de los invernaderos de gerbera en estudio. ANOVA y Comparación Múltiple por el método Dunn. \*Diferencia significativa ( $p < 0.05$ ),  $n = 3$ .

Para el IG del hipocotilo (Fig.12) el Inv3 presenta los valores más altos, mientras que en el Inv1 se presentan los valores más bajos, siendo la muestra al 100 % de este el que presenta el IG más bajo (57.5).

Los rango de IG para los Inv1 y 2 son más bajos (57.5 a 126.4 y 76 a 106 respectivamente) que el del Inv3 en donde el rango es de 107 a 141, presentando diferencia significativa del Inv1 y 2 con el Inv3.

El IG presenta un efecto creciente con respecto a la dilución, entre menor sea la concentración de la muestra el IG aumenta.

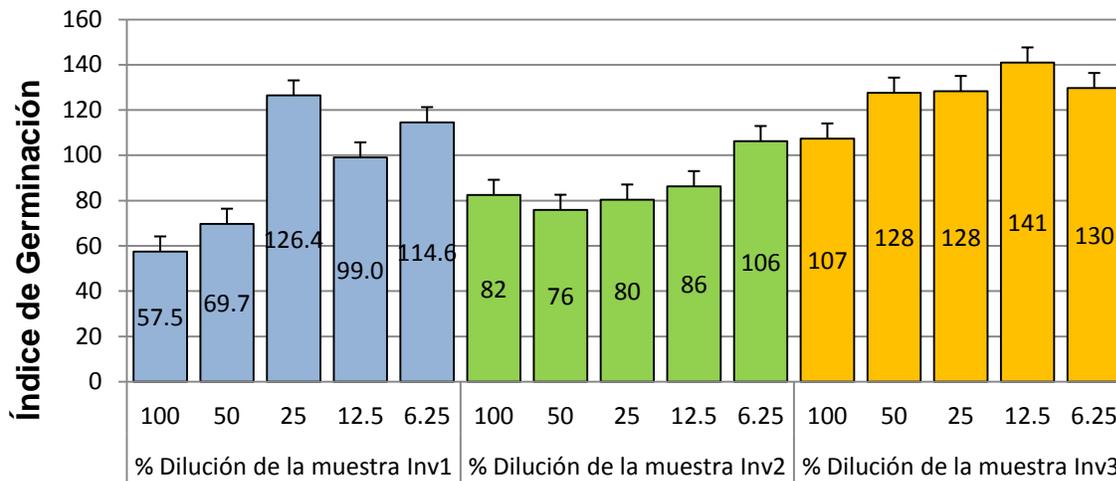


Fig. 12. Índice de germinación del hipocotilo de *Lactuca sativa L.* expuesta al agua de riego de los invernaderos de gerbera en estudio. ANOVA y Comparación Múltiple por el método Holm-Sidak. \*Diferencia significativa ( $p < 0.05$ ),  $n = 3$ .

## Observaciones de las características morfológicas de las plántulas

Las figuras 13, 14 y 15 nos muestran la diferencia entre las plántulas del control y de las muestras, la plántula del control presenta un color blanco y denota firmeza, las plántulas de las muestras se observan amarillentas, en algunos casos frágiles.



Fig. 13. Imagen de plántula de *Lactuca sativa* L. expuesta 120 horas a la sustancia control (agua destilada).

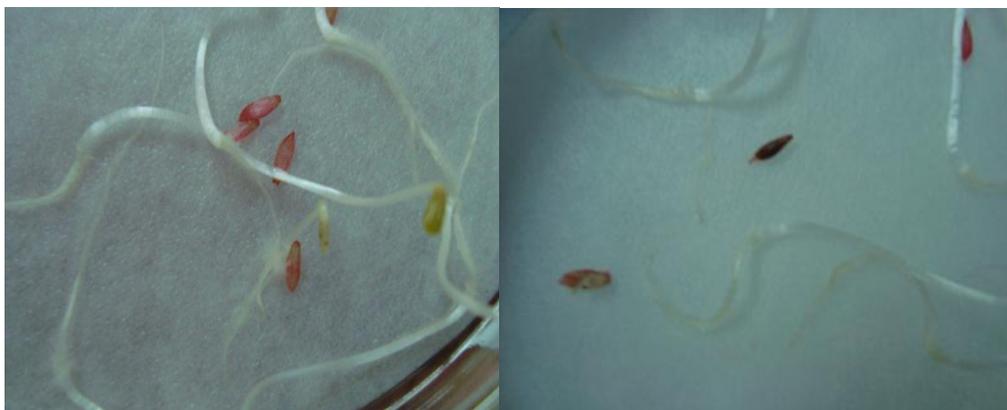


Fig. 14. Imágenes de plántulas de *Lactuca sativa* L. expuesta 120 horas al agua de riego de los invernaderos en estudio.

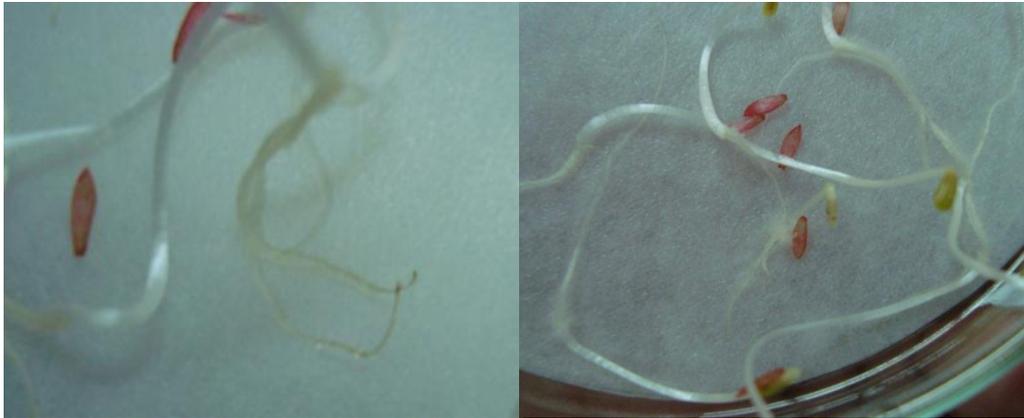


Fig. 15. Imágenes de plántulas de *Lactuca sativa* L. expuesta 120 horas al agua de riego de los invernaderos en estudio.

El mismo efecto pero más evidente se presenta en las plántulas de las muestras de suelo (Fig.16), en donde se puede observar que además de que las plántulas difieren en el tamaño, las radículas se muestran marrones y demasiado frágiles.



Fig. 16. Imágenes de plántulas de *Lactuca sativa* L. expuesta 7 días al suelo de los invernaderos en estudio.

## **Evaluación de la toxicidad de suelo**

El suelo utilizado como control, como se menciona en el artículo, fue obtenido del parque Hermenegildo Galeana (HG) en el Municipio de Tenancingo, Estado de México. Este suelo presentó características (pH, carbono orgánico, densidad real y aparente) similares a las muestras de invernaderos por lo que la AChE de las lombrices expuestas a este suelo presentó el mismo comportamiento que las muestras de los invernaderos en estudio, es por esto que se realizó la comparación utilizando como control el suelo en el que se mantienen las lombrices en el laboratorio, el cual no está expuesto a ningún agroquímico. La AChE de este suelo control se mantuvo en un rango de 0.62 a 0.97 U/mg proteína durante los 14 días de exposición con un promedio de 0.66 U/mg proteína.

### **Invernadero 1**

En el Inv1 se observa que tanto las muestras interna y externa del invernadero como la muestra del Parque HG presentan una disminución de la AChE respecto al tiempo de exposición, en comparación con el control que mantiene su actividad, obteniéndose una diferencia significativa entre la muestra externa y la muestra del Parque con el control.

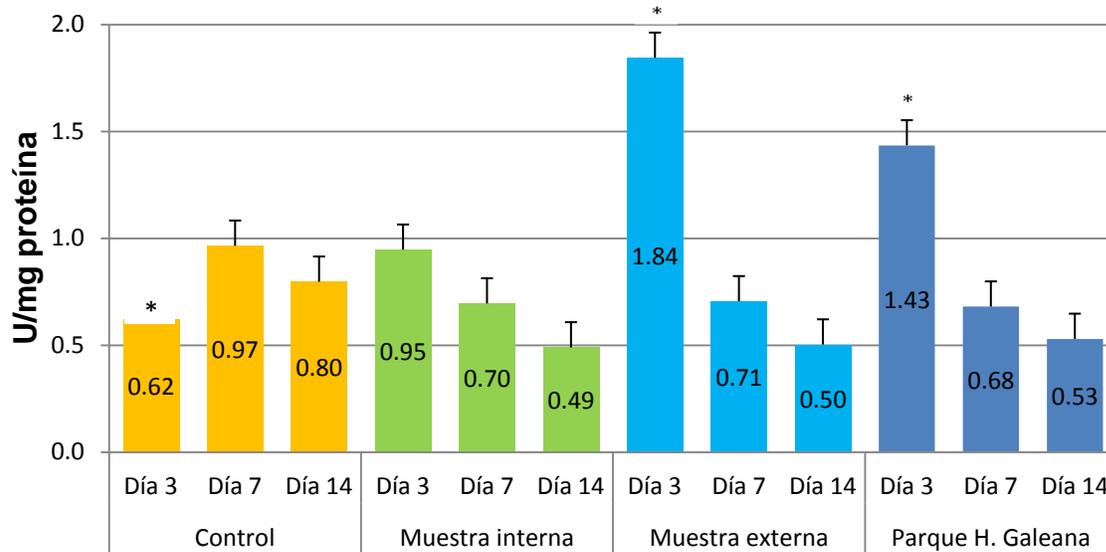


Fig.17. Actividad colinesterásica de *Eisenia andrei* expuesta a suelo del Inv1. \* ANOVA Diferencia significativa ( $p < 0.05$ ),  $n = 3$

## Invernadero 2

Al igual que el Inv1 se observa que la AChE de las muestras y del parque disminuye respecto al tiempo de exposición y se presenta diferencia significativa en el día 3.

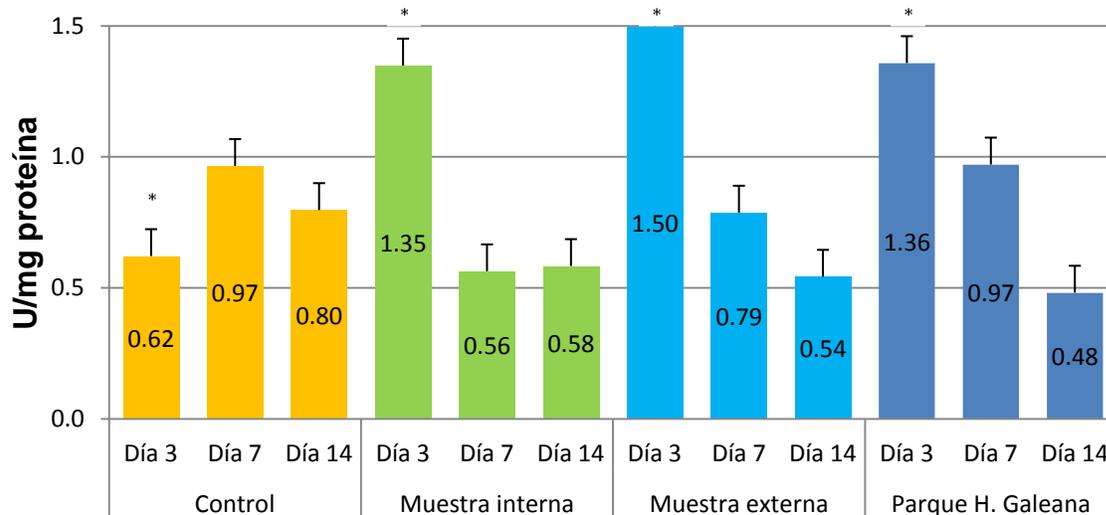


Fig.18. Actividad colinesterásica de *Eisenia andrei* expuesta a suelo del Inv2. \* ANOVA Diferencia significativa ( $p < 0.05$ ),  $n = 3$

### Invernadero 3

A diferencia de los dos primeros invernaderos en este se observa que las muestras tanto interna como externa del invernadero presentan un aumento de la AChE con respecto al tiempo, a diferencia del control que se mantiene y del suelo del parque H que disminuye, resultando una diferencia significativa entre el control y la muestra externa en el día 14 y el control y el parque en el día 3.

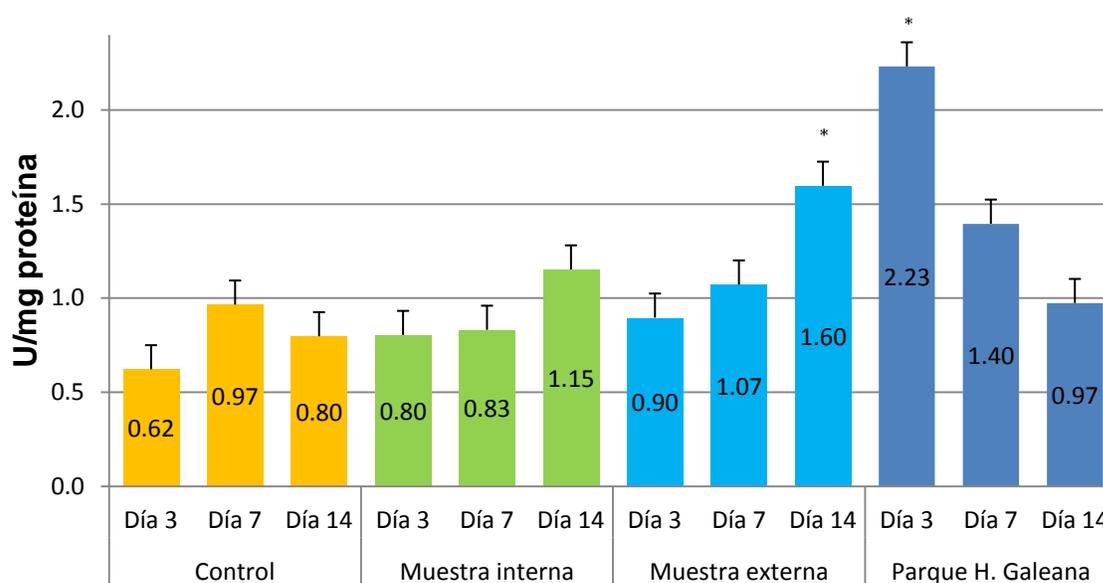


Fig.19. Actividad colinesterásica de *Eisenia andrei* expuesta a suelo del Inv3. \*

ANOVA Diferencia significativa ( $p < 0.05$ ),  $n = 3$

## 6. DISCUSIÓN GENERAL

En la zona de estudio se observa un uso indiscriminado de plaguicidas en cantidad y frecuencia, elegidos por la eficiencia para la producción de la flor y costos sin tomar en cuenta los impactos nocivos al ambiente o a la salud de los organismos. En los tres invernaderos en estudio el mayor porcentaje de productos aplicados son del tipo de los carbamatos y organofosforados (43.3 %).

### **Evaluación de la toxicidad**

#### **Bioensayo con *Daphnia pulex***

Las muestras de agua no fueron tóxicas para este organismo, debido probablemente a las características de las muestras como materia orgánica y el pH que en los tres invernaderos es mayor de 7, siendo de 7.6 a 8 el pH óptimo para *Daphnia*.

#### **Bioensayo con *Selenastrum capricornutum***

El bioensayo con *Selenastrum capricornutum* ha sido utilizado como herramienta de valoración de la contaminación del agua, debido a su habilidad para detectar efectos adversos a mezclas complejas de sustancias químicas (Bohórquez-Echeverry et al., 2007). De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio no hubo un efecto claro de inhibición debido a la influencia que tuvo la presencia de materia orgánica en las muestras de agua, lo que estimuló el crecimiento de los dos indicadores.

Resultados similares obtuvieron O'Farrel et al., (2002) y Olgún et al., (2000) al observar un aumento en la tasa de crecimiento de las células de *S. capricornutum*, *Scenedesmus acutus* y *Chlorella pyrenoidosa* al evaluar la calidad de los ríos Luján y Reconquista (Argentina).

### **Bioensayo con *Lactuca Sativa***

Los resultados muestran que hubo mayor porcentaje de germinación de las semillas e IG que tuvieron como sustrato al agua y suelo tanto interno como externo de los invernaderos, esto puede ser debido a su preparación y uso de fertilizantes para el cultivo de la flor. La exaltación de la elongación de la radícula o del hipocotilo ha sido e interpretada como una respuesta tóxica. Así mismo, las características morfológicas de las plántulas se observa el efecto fitotóxico, ya que presentaron color amarillento y fragilidad, efecto producido cuando están expuestas a contaminantes orgánicos e inorgánicos.

### **Bioensayo con *Eisenia andrei***

En el bioensayo con *Eisenia andrei*, no se obtuvo mortalidad aún exponiéndolas al suelo sin diluir a pesar de que en el existe una cantidad residual de la mezcla de compuestos aplicados para el cultivo de la flor. Frasco et al. y Key y Fulton, indican que la inhibición colinesterásica es un buen biomarcador para evaluar la toxicidad de plaguicidas carbamatos y organofosforados. Chakra R. et al., demostraron que la toxicidad que provocan los organofosforados es menor que la de carbamatos y esta

inhibición es concentración y tiempo de exposición dependiente. En el invernadero 3 los resultados mostraron que para el día 14 se observa una inducción enzimática en las lombrices expuestas a la muestra externa, comparando la actividad obtenida para el control, es probable que en este tiempo la lombriz este en proceso de recuperación dado que la cantidad de plaguicidas inicial disminuye por su tiempo de vida media de degradación bajo las condiciones ambientales del estudio, de 2.4 h a 7 días para carbámicos y de 2 a 12 días para los organofosforados aplicados, por la absorción principalmente por el tracto intestinal y su posterior biotransformación.

### **Coefficiente de Impacto Ambiental**

Los resultados CIA calculado con la dosis, frecuencia y porcentaje de principio activo que manifestaron utilizar en cada invernadero, es mayor que el reportado para cada plaguicida..El Inv2 presenta un aumento considerable del CIA de campo, lo que lo coloca como el invernadero con mayor impacto ambiental con un valor de 1807 < Inv3 572.86 < Inv1 226.25. El Inv3 que utiliza más plaguicidas que los otros dos su CIA de campo es menos de la tercera parte que el obtenido para el segundo, esto nos muestra que el impacto ambiental no solo depende del número de compuestos aplicados sino también de la toxicidad y persistencia en el medio.

## 7. CONCLUSIONES

Para el cultivo de la flor en invernadero, se utilizan una gran cantidad de agroquímicos entre los que destacan los plaguicidas del tipo de los organofosforados y carbámicos y aún se aplican OCI como el endosulfán que es altamente persistente en el ambiente.

De acuerdo a las características fisicoquímicas el suelo de los invernaderos tiende a una degradación observándose en la acidificación, compactación y disminución de materia orgánica, probablemente debido al cultivo intensivo y a la aplicación sin control de agroquímicos.

Tanto el suelo interno como el externo de los invernaderos resultaron tóxicos para la *Eisenia andrei* y para *Lactuca sativa* lo que indica una movilidad de los plaguicidas OP y C aplicados.

El suelo del Parque Hermenegildo Galeana resultó ser tóxico para los dos organismos probados.

Los plaguicidas con mayor CIA de campo son para el Invernadero 1 metomilo, para el 2 es Propamocarb y para el 3 Fludioxonil con Ciprodinil.

En los resultados de las muestras con *Daphnia pulex* se puede observar que a bajas y altas concentraciones la mortalidad es mayor pero apenas alcanzando el 10%, por lo que el agua de riego no es tóxica para este organismo.

Para *Selenastrum capricornutum* existe una inducción del crecimiento por lo que las muestras de agua se consideran tóxicas.

El impacto ambiental obtenido no solo depende del número de compuestos aplicados sino también de la toxicidad y persistencia del compuesto bajo las condiciones ambientales.

## 8. ANEXO

**Tabla 2. Datos de plaguicidas aplicados en el Invernadero 1**

| Ingrediente activo | Clasificación     | Categoría Toxicológica | CIA-Inv | Persistencia  | Toxicidad   |
|--------------------|-------------------|------------------------|---------|---|---|
| Bromuro de metilo  | Organo halogenado | II                     | 53.30   | En forma gaseosa puede persistir por meses. En suelo puede sufrir hidrólisis, biodegradarse rápidamente o lixiviarse hasta las aguas subterráneas. En los acuíferos es degradado en forma moderada. | Tóxico para mamíferos, aves, peces, crustáceos, plantas, algas y organismos del suelo. Altera temporalmente la estructura trófica de los suelos fumigados. No se considera un riesgo importante para el ambiente por su rápida degradación. |
| Abamectina         | pentaciclina      | I                      | 0.10    | Poco persistente (Hasta 8 semanas). Es rápidamente degradado por los microorganismos del suelo. No es bioacumulable.  | Ligeramente tóxico para peces y abejas.   |
| Metomilo           | carbamato         | II                     | 103.24  | Moderadamente persistente.  | Altamente tóxico a aves y mamíferos, de moderada a altamente tóxico a peces y otros organismos acuáticos  |
| Benomilo           | benzimidazol      | IV                     | 16.21   | Altamente persistente, su vida media es hasta de 12 meses.  | Moderadamente tóxico para las aves, altamente tóxico a peces, letal para lombrices de tierra, no tóxico para abejas.  |
| Iprodiona          | imida             | IV                     | 3.30    | Ligeramente persistente   | Tóxico a peces, no tóxico a aves, abejas ni mamíferos pequeños.   |
| Ciromazina         | triazina          | IV                     | 12.16   | Soluble en agua. Persistencia en el suelo: alta a no persistente. Movilidad en el suelo: extrema a ligera. Persistencia en agua sedimento: más persistente. No volátil.                             | Tóxico para organismos acuáticos, pudiendo causar efectos adversos duraderos en el ambiente acuático; prácticamente no tóxico para peces, aves y abejas.  |
| Amitraz            | Triazapenta dieno | IV                     | 37.95   | Moderadamente persistente. Descomposición aeróbica en suelo rápida. Fuertemente absorbido por el suelo  | Ligeramente tóxico a abejas e insectos predadores, moderadamente tóxico a mamíferos pequeños, aves y peces.   |

Catálogo de plaguicidas COFEPRIS 2013

**Tabla 3. Datos de plaguicidas aplicados en el Invernadero 2**

| <b>Ingrediente activo</b> | <b>Clasificación</b> | <b>Categoría Toxicológica</b> | <b>CIA-Inv</b> | <b>Persistencia</b>   | <b>Toxicidad</b>  |
|---------------------------|----------------------|-------------------------------|----------------|---|---|
| Tiocyclam                 | Oxalato              | III                           | 50.66          | Poco persistente  | Tóxico para aves, animales domésticos y vida silvestre.   |
| Ciromazina                | Triazina             |                               | 16.46          | Soluble en agua y se descompone sólo lentamente, tanto en el suelo como en el agua.   | Poco tóxica para muchos organismos benéficos. Tóxica para ciertos invertebrados acuáticos.                |
| Abamectina                | Pentaciclina         | I                             | 1.05           | Poco persistente (Hasta 8 semanas). Es rápidamente degradado por los microorganismos del suelo. No es bioacumulable.  | Ligeramente tóxico para peces y abejas.   |
| Endosulfán                | Organoclorado        | II                            | 61.06          | En el aire viaja largas distancias. En suelo, la fracción disponible es degradada biológicamente en semanas; sin embargo, la fracción adsorbida a las partículas puede persistir por años y es poco propensa a lixiviarse. Su vida media en el agua es de pocos días. | Muy tóxico para organismos acuáticos, especialmente para los peces. Moderadamente tóxico para las abejas. |
| Acephate                  | Organofosforado      | IV                            | 95.54          | Ligeramente persistente, se ha identificado a metamidofos como su metabolito.   | Altamente tóxico a abejas, moderadamente tóxico a aves y mamíferos pequeños, ligeramente tóxico a peces.  |
| Spinosad                  |                      | III                           | 2.00           | Poco persistente  | Extremadamente tóxico a abejas  |
| ometoato                  | organofosforado      | II                            | SD             | Ligeramente persistente. (26 días)  | Ligeramente tóxico a aves, moderadamente tóxico a peces, extremadamente tóxico para abejas                |
| Monocrotofos              | organofosforado      | I                             | SD             | Poco Persistente  | Altamente tóxico a invertebrados acuáticos, aves, abejas, y otras formas de vida silvestre                |

| Ingrediente activo      | Clasificación  | Categoría Toxicológica | CIA-Inv | Persistencia   | Toxicidad  |
|-------------------------|----------------|------------------------|---------|--|--|
| Flufenoxuron            | benzoylurea    | IV                     | 10.03   | Moderadamente persistente.                                       | Ligeramente tóxico a las abejas adultas, altamente tóxico a las larvas de estas y al camarón de agua dulce         |
| propamocarb clorhidrato | carbamato      | IV                     | 499.99  | Moderadamente persistente  | Tóxico a peces pero no tóxico a las abejas.  |
| flutolanil              | benzanilida    | IV                     | 211.71  | Poco persistente (40 a 60 días)                                  | Ligeramente tóxico a mamíferos y aves, tóxico a peces.   |
| Iprodiona               | imida          | IV                     | 126.44  | Ligeramente persistente  | Tóxico a peces, no tóxico a aves, abejas ni mamíferos pequeños.  |
| Tiabendazol             | benzimidazol   | III                    | 194.21  | Altamente persistente. (403 días).                               | Poco tóxico a peces y otros organismos acuáticos.  |
| furathiocarb            | carbamato      | III                    | 138.90  | Altamente persistente en agua y ligeramente persistente en suelo | Tóxico para los organismos acuáticos, puede provocar a largo plazo efectos negativos en el medio ambiente acuático |
| Captan                  | carboxamida    | IV                     | 82.22   | Ligeramente persistente (hasta 2 semanas).                       | Altamente tóxico a peces   |
| Zineb                   | ditiocarbamato | IV                     | 317.51  | Ligeramente persistente  | Tóxico a peces   |

Catalogo de plaguicidas COFEPRIS 2013

**Tabla 4. Datos de plaguicidas aplicados en el Invernadero 3**

| <b>Ingrediente activo</b> | <b>Clasificación</b> | <b>Categoría Toxicológica</b> | <b>CIA-Inv</b> | <b>Persistencia</b>  | <b>Toxicidad</b>   |
|---------------------------|----------------------|-------------------------------|----------------|--|--|
| thiocyclam                | oxalato              | III                           | 20.26          | Poco persistente   | Tóxico para aves, animales domésticos y vida silvestre. Moderadamente tóxico a las abejas.     |
| clorpirifos               | organofosforado      | IV                            | 62.27          | Ligeramente persistente. Se degrada principalmente por acción microbiana a 3,5,6-tricloropiridin-2ol, y este en compuestos organoclorados y finalmente en dióxido de carbono | Tóxico a peces y crustáceos, altamente tóxico a abejas   |
| Fludioxonil + Ciprodinil  | ditiocarbámico       | IV                            | 233.36         | Ligeramente persistente.   | Altamente tóxico a peces e invertebrados acuáticos. Tóxico a aves.                             |
| Bifentrina                | piretroide           | III                           | 1.62           | Moderadamente persistente (hasta 32 semanas)   | Moderadamente tóxico a aves, altamente tóxico a peces, crustáceos, animales acuáticos y abejas |
| Abamectina                | pentaciclina         | I                             | 0.45           | Poco persistente (Hasta 8 semanas). Es rápidamente degradado por los microorganismos del suelo. No es bioacumulable.   | Ligeramente tóxico para peces y abejas.  |
| Pymetrozine               | triazina             | IV                            | 5.87           | Ligeramente móvil en suelo y se degrada rápidamente (8 a 30 días).   | Ligeramente tóxico en aves y mamíferos, moderadamente tóxico para peces y abejas               |
| Iprodiona                 | imida                | IV                            | 9.70           | Ligeramente persistente  | Tóxico a peces, no tóxico a aves, abejas ni mamíferos pequeños.                                |

| <b>Ingrediente activo</b>  | <b>Clasificación</b>           | <b>Categoría Toxicológica</b> | <b>CIA-Inv</b> | <b>Persistencia</b>  | <b>Toxicidad</b>   |
|----------------------------|--------------------------------|-------------------------------|----------------|--|--|
| Tiabendazol                | benzimidazol                   | III                           | 14.90          | Altamente persistente. (403 días).   | Poco tóxico a peces y otros organismos acuáticos.  |
| Oxamil                     | carbámico                      | I                             | 9.60           | Ligeramente persistente (hasta 3 semanas).   | Extremadamente tóxico para las aves, moderadamente tóxico para peces y organismos acuáticos. |
| Metamidofos                | organofosforado                | I                             | 21.21          | Su persistencia en el aire es baja (horas). En los cuerpos de agua y en suelos es degradado rápidamente (días) por fotólisis, por acción de los microorganismos (aerobios y anaerobios) o por reacciones de hidrólisis. Presenta una alta movilidad en suelos. Presenta un bajo potencial de bioacumulación. | Es tóxico para invertebrados acuáticos (crustáceos), peces, abejas, aves y mamíferos.        |
| Azufre                     | inorgánico                     | IV                            | 39.19          | Altamente Persistente  | No tóxico a aves, peces, invertebrados acuáticos ni abejas.                                  |
| Folpet                     | ftaleimida                     | IV                            | 45.69          | Poco persistente   | Altamente tóxico a peces. Ligeramente tóxico a aves, no tóxico a abejas.                     |
| Clorpirifos/<br>Permetrina | organofosforado/<br>piretroide | III                           | 24.87          | Ligeramente Persistente. (4 semanas)   | Tóxico para peces y abejas.  |
| Metil tiofanato            | tiocarbamato                   | IV                            | 17.15          | Ligeramente persistente. (3 a 4 semanas).  | Tóxico a peces y abejas  |

| Ingrediente activo | Clasificación | Categoría Toxicológica | CIA-Inv | Persistencia   | Toxicidad   |
|--------------------|---------------|------------------------|---------|--|---|
| Fenpropatrin       | piretroide    | I                      | 7.02    | Ligeramente persistente. (1 a 5 días) La degradación en agua es por fotólisis  | Ligeramente tóxico a aves, tóxico a peces, organismos acuáticos y abejas.                                 |
| Endosulfán         | organoclorado | II                     | 59.70   | Puede viajar largas distancias. En el suelo, la fracción disponible es degradada biológicamente en semanas; sin embargo, la fracción adsorbida a las partículas puede persistir por años y es poco propensa a lixiviarse. Su vida media en el agua es de pocos días, pero su biodegradación puede prolongarse. | Muy tóxico para organismos acuáticos, especialmente para los peces. Moderadamente tóxico para las abejas. |

Catálogo de plaguicidas COFEPRIS 2013

## 9. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

- Aguilar J., tesis “Evaluación de estrés oxidativo en células sanguíneas, producido por la exposición a agroquímicos”, Facultad de Química, U.A.E.M., 2009, pág. 33-36
- Alonzo C., Laborde A. 2005. Priority setting for risk assessment: The benefit of human experience. *Toxicol. Appl. Pharm.* 207:S692-S696
- Álvaro J.E., La bioseguridad en sustratos para la floricultura, Universidad de Almería, España, *Revista Plantflor*, pág. 14-17
- Argueta G.D., tesis “Determinación de plaguicidas en suelos de invernaderos de una zona florícola del Edo. de México y su relación con la cantidad aplicada de estos productos”, Facultad de Química, U.A.E.M., 2008, pág. I-II, 9-12, 19
- Asociación de Hortelanos Tricantinos, “Horticultura Ecológica” 2007, <http://www.asociacionht.es/files/Horticultura%20ecologica.pdf> 24/05/11
- ASTM (American Society for Testing and Materials). Standard guide for conducting *Daphnia magna* life cycle toxicity tests. E 1193, Draft, 1996.Nº9, pp 66.
- Azevedo F.A., Colacioppo S., “Guía sobre las necesidades mínimas para un laboratorio de ecotoxicología”, Metepec, México, 1986, pág. 5-9.
- Bustamante M., Campos R.T., “Contaminación por plaguicidas en la región del Maule Chile”, *Panorama Socioeconómico*, 2004, No 028, Universidad Talca Chile, pág. 2-16
- Castillo G., *Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de aguas*, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, Santiago de Chile, 2003, pág. 17-22, 52, 71, 80.

- Chunlong Z., Fundamentals Environmental Sampling and Analysis, 2ª edición, Ed. Wiley-Interscience, U.S.A, 2007, pág.1-6
- Cruz T. M. C., “Inhibición de la colinesterasa en lombrices (*Eisenia andrei*) expuesta a suelos contaminados con plaguicidas organofosforados y carbamatos”, Facultad de Química, U.A.E.M., 2008, pág. 1, 2, y 64.
- Day K.E., Ongley E.D., Scroggins R.P. y Eisenhauer R.P., “Biology in the New Regulatory Framework for Aquatic Protection”, Proceeding for de Alliston Workshop. National Water Research Institute and Environment Canadá, Ottawa 1988.
- Doménech X., Química del suelo, El impacto de los contaminantes, Ed. Miraguano S.A., España (2009), 127-153
- EdoMex (2011), Villa Guerrero, Medio físico, Localización; [www.estadodemexico.com.mx](http://www.estadodemexico.com.mx), consultada el 03/07/2012
- EdoMex1 (2011), Villa Guerrero, Actividad económica, Principales Sectores, Productos y Servicios; [www.estadodemexico.com.mx](http://www.estadodemexico.com.mx), consultada el 03/07/2012
- Ellman L., Courtney D., Andres V., Featherstone M., A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochemical Pharmacology, 1961, pág. 7:88-95.
- Gómez R., tesis “Desarrollo y validación de un método de extracción y cuantificación por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas de una mezcla de plaguicidas organofosforados en agua”, facultad de Química, U.A.E.M, 2008, pág. 34-44

- Hernández H. N., “Determinación del índice mitótico en individuos expuestos crónicamente a agroquímicos”, Facultad de Química, U.A.E.M., 2000, pág.1, 2 y 66.
- InfoAgro.com, Agricultura, El cultivo de la gerbera 1ª parte, Productos ABC Garden, 2008, <http://www.infoagro.com/flores/flores/gerbera.htm>, 22/05/11
- Ize Lema I., Zuk M., Rojas-Bracho L., Introducción al análisis de riesgos ambientales., México, 2010, pág. 13,21
- Karam C.,M.A., Camarena P.A., Bustamante M.P., Sánchez L.E.M., Percepción del riesgo del uso de plaguicidas por adolescentes de Villa Guerrero, 2006
- Katzung B. G., Farmacología básica y clínica, 9ª edición, Ed. Manual Moderno, México 2005, pág. 945-947
- Kirk R., Othmer D., Enciclopedia de Tecnología Química, Tomo XII, Ed. Hispano-Americana, México, 1972, pág. 21-25
- Klassen Curtis D., Watkins III John, Manual de Toxicología 5ª edición, Ed. McGraw Hill, México D.F., 2001, pág. 837-840
- Maciorowski, A.F. Ecotoxicology and ecological assessment of hazardous waste sites. En: Ecological assessment of hazardous waste sites. J.T. Maughan, Van Nostrand Reinhold. New York, 1993.
- Milla Costos O.M., Palomino Horna W.R., Niveles de colinesterasa sérica en agricultores de la comunidad de Carapongo (Perú) y determinación de residuos de plaguicidas inhibidores de la acetilcolinesterasa en frutas y hortalizas cultivadas. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú, 2002.

- Mohammad H.B., Varela S., Insecticidas organofosforados: Efectos sobre la Salud y el Ambiente, Toxicología de Insecticidas Culcyt. México 2008, pág. 5-17
- Nienstendt K.M., Brock T.C.M., et.al., “Development of a framework based on an ecosystem services approach for deriving specific protection goals for environmental risk assessment of pesticides”, Science of the Total Environmental, 2011.
- OECD. 1993. *Daphnia* sp. acute immobilization test and reproduction test, Method 202, OECD Guidelines for Testing Chemicals.
- Ochoa B., Ortega R., La Floricultura Mexicana, el Gigante que está despertando, Revista “Claridades Agropecuarias”, No 2116-102, 1999, pág. 3.
- Ortiz O., Pradel W., “Guía introductoria para la evaluación de impactos en programas de manejo integrado de plagas (MIP)”, Perú, 2009, 53-55.
- Pedraza M.L., tesis “Detección de efectos neurotóxicos sobre sujetos laboralmente expuestos a plaguicidas”, Facultad de Química, U.A.E.M., 1999, pág.1, 4-10.
- Persoone G., Janssen C., de Coen W. New microbiotest for routine toxicity screening and biomonitoring. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2000, pág. 550.
- Ramos L., tesis “Modelación y análisis de la dispersión de plaguicidas de la zona florícola de Villa Guerrero y Tenancingo, utilizando elemento finito apoyado en un sistema de información geográfica”, Facultad de Química, U.A.E.M., 2006, pág. IX, X, 1-3
- Sánchez Meza J.C., Principios básicos de toxicología ambiental, Ed. UAEM, México, 2003, pág.279-290

- Skoog D., Leary J., Análisis Instrumental, 4ª edición, Ed. McGraw Hill, 1992, pág. 674-678
- Soteno S. E., “Malformaciones congénitas según etiología en una zona con uso intensivo de agroquímicos”, Facultad de Química, U.A.E.M., 1999, pág. 1, 2 y 55.
- Soto A. R., García F., “Para muestra una flor”, Unidad de Información, Planeación, Programación y Evaluación de la Secretaría de Desarrollo Agropecuario, Nuestros rincones y tradiciones, Gobierno del Estado de México, 2007, pág. 21-22.
- Sutter G. W., Ecological Risk Assessment, Lewis Publisher, Boca Ratón, 1993.
- Tarazona L. J.V., Metodología europea para el desarrollar los estándares de calidad ecológica: Conceptos Generales, Proyección y Utilización Normativa, INIA, España, 2010, pág. 1-3
- Torres D., Capote T. Agroquímicos un problema ambiental global: uso del análisis clínico como herramienta para el monitoreo ambiental, Asociación española de ecología terrestre, Venezuela, 2004, pág. 3 y 85..
- Vargas M. E. M., “Frecuencia de aberraciones cromosómicas de individuos cromosómicamente normales expuestos ocupacionalmente a agroquímicos”, Facultad de Química, U.A.E.M., 2008
- Verduzco K., tesis “Determinación de plaguicidas y plomo en muestras de agua de las jurisdicciones sanitarias de Toluca, Lerma, Atlacomulco, Temoaya, Valle de Bravo y Metepec”, Facultad de Química, U.A.E.M., 2007, pág. 7, 11-13,27, 64
- Vicente H., Pereira M.E., Nilda A. G., Detección biológica de la exposición humana a agentes químicos, Ed. ECO, México, 1991, pág. 32-56, 73-78.

- Wagner T., "Contaminación, causas y efectos", Ed. Gernika, México, 1996, pág. 323-365.
- Waliszewski S., Infazón R., "Diferencias en concentración de plaguicidas organoclorados persistentes, en suelo, paja y granos de trigo" Revista Internacional de Contaminación Ambiental UNAM, 2003, vol.19, D.F. pág. 5-11
- WinderA.,Fundación Agua Clara, Organización Panamericana de la Salud, "Los plaguicidas y sus efectos en la salud", 2004, <http://www.aguaclara.org/pdf/Relacion%20entre%20Plaguicidas,%20Contaminantes%20y%20la%20Salud.pdf>, 23/05/11
- Xiaofei QIN, Xijuan XIA, et.al., "Ecotoxicological effects of mixed pollutants resulted from e-wastes recycling and bioaccumulation of polybrominateddiphenyl ethers in Chinese loach (Misgurnusanguillicaudatus)", Journal of Environmental Sciences, 2009.
- 2000Agro, Marchita floricultura medio ambiente, Revista Industrial del campo, 2005, <http://www.2000agro.com.mx/agroindustria/marchita-floricultura-medio-ambiente/>, 03/01/14