

Higiene y Sanidad Ambiental, **9**: 505-509 (2009)

Determinación toxicológica en aguas de río mediante el empleo de un bioensayo con planta

Marina T. TORRES RODRÍGUEZ y Nélica M. HERNÁNDEZ PERERA

Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología (INHEM). Infanta n° 1158 entre Clavel y Llináz, Centro Habana, Cuba. Telf. 8781736. Correo-e: marina@inhem.sld.cu

RESUMEN

La necesidad de un rápido tamizaje de la toxicidad de sustancias químicas presentes en muestras ambientales, ha conducido al desarrollo de diferentes bioensayos a corto plazo para la determinación de toxicidad aguda, entre los que se encuentran los ensayos con plantas. Tomando en cuenta las ventajas que ellas ofrecen para su aplicación en la evaluación toxicológica ambiental, en el presente trabajo se utilizó la prueba de inhibición de la prolongación de la raíz con *Lactuca sativa* L. empleando semillas de lechuga (var. BSS) utilizadas en cultivos cubanos. Se evaluaron muestras de agua de dos ríos en Ciudad de la Habana. Se realizaron 2 muestreos por punto en cada río. Se evaluó el efecto de diferentes concentraciones (50%, 25%, 10% y 5%) en las muestras analizadas, así como la muestra pura, sobre la germinación y el crecimiento radicular de la planta utilizada. En todos los casos se realizaron los ensayos por duplicado con controles positivo (cloruro de sodio) y negativo (agua destilada). En las muestras analizadas, se presentó el fenómeno de hormesis, mostrado por la estimulación significativa del crecimiento radicular. Al aplicar la prueba de Student Neuman Keuls, no se encontraron diferencias significativas entre las dosis probadas, en los dos ríos analizados. Se destacó la importancia de medir en el ensayo tanto la letalidad como el efecto subletal debido a la inhibición de la prolongación de las raíces. El empleo de la prueba permitió identificar la toxicidad de muestras de agua de río, complementando de esa forma la evaluación sanitaria de las mismas.

Palabras clave: Bioensayos, toxicidad, prolongación de la raíz, *Lactuca*.

INTRODUCCIÓN

Tomando en cuenta la necesidad creciente que tienen los países en desarrollo de contar con procedimientos baratos y rápidos en la evaluación toxicológica ambiental, se ha propuesto como instrumento alternativo y que complementa los tradicionales análisis químicos para la determinación de toxicidad de muestras ambientales, la utilización de bioensayos con plantas, ya que los organismos vivos presentan alguna respuesta a niveles peligrosos de cualquier sustancia química o mezcla compleja de tóxicos presentes¹.

La prueba de toxicidad a corto plazo de la inhibición de la germinación y la prolongación de la raíz de un vegetal² se justifica en la importancia de los eventos de desarrollo temprano en el crecimiento y supervivencia de las plantas. Este bioensayo puede ser ejecutado con cualquier cantidad de especies económicamente importantes, fácilmente disponibles y que germinen y crezcan rápidamente³.

Una de las especies más utilizada en la evaluación toxicológica de muestras ambientales es *Lactuca sativa* L., ya que muestra sensibilidad a estrés ambiental y cumple como especie de prueba, con los requisitos anteriormente citados.

En nuestro país, el control de la contaminación del agua se basa fundamentalmente en análisis físicoquímicos y microbiológicos, y recién comienza a ser considerada la problemática de la evaluación toxicológica sobre la salud de los ecosistemas acuáticos por lo que tomando en consideración lo anteriormente planteado y ante la factibilidad y beneficios que brinda el bioensayo con semillas de *Lactuca sativa* L., en el Laboratorio de Ensayos Toxicológicos del INHEM nos dimos a la tarea de implementar el bioensayo empleando semillas de *Lactuca sativa* L. procedentes de cultivos de Cuba y utilizarlo en la evaluación toxicológica de muestras de agua de río.

MATERIAL Y MÉTODOS

El trabajo se desarrolló en el Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología (INHEM), utilizando como fuente de información el desarrollo y la aplicación del bioensayo de inhibición de la germinación y prolongación de la raíz en la evaluación toxicológica de muestras de agua de río

Material biológico

Fueron utilizadas semillas de lechuga variedad BSS (variedad de invierno empleada en nuestros cultivos) que fueron seleccionadas con similares dimensiones por observación directa, las cuales fueron adquiridas en los puntos de venta de la Agricultura Urbana. Las semillas se conservaron en placas de petri en refrigeración (4°C), en oscuridad y en ambiente seco. En el momento de la prueba, se seleccionaron cuidadosamente las semillas por su tamaño, forma y color.

Material de prueba

Se analizaron muestras de agua de dos ríos en Ciudad de la Habana: río Almendares y Luyanó. Se realizaron 2 muestreos por punto en cada río, uno en enero y otro en septiembre del 2008. Los puntos de muestreo fueron seleccionados de acuerdo a la accesibilidad para la toma de muestra.

Las muestras fueron

Diluciones (muestra/agua)			
1:1	1:5	1:10	1:20
10 mL de muestra	4 mL de muestra	2 mL de muestra	1 mL de muestra
10 mL de agua destilada estéril	16 mL de agua destilada estéril	18 mL de agua destilada estéril	19 mL de agua destilada estéril

Tabla 1. Preparación de las diluciones de trabajo

mantenidas a 4°C y procesadas dentro de las 24 horas después de su recepción en el laboratorio.

Procedimiento

El método a corto plazo utilizado fue el bioensayo de la inhibición de la prolongación de la raíz⁴. Este ensayo sufrió modificaciones en algunos de los pasos para su ejecución, es por ésta razón que el procedimiento ejecutado es descrito a continuación:

a) Se prepararon e identificaron placas de petri con papel de filtro absorbente.

b) Se seleccionaron 25 semillas por placa de petri las cuales fueron colocadas en 5 filas de 5 semillas cada una.

c) En cada experimento, se probó de 2 a 3 mL de cada tratamiento por placa. El volumen fue controlado de manera que el papel de filtro se mantuviera húmedo pero la placa se mantuviera libre de líquido sin ser absorbido.

d) Las placas fueron incubadas en la oscuridad a 20°C por 120 horas (5 días).

e) Después de la incubación, se anotó el número de semillas que germinaron y se midió la longitud de la raíz en cm, desde el punto de transacción entre el hipocotilo y la raíz primaria.

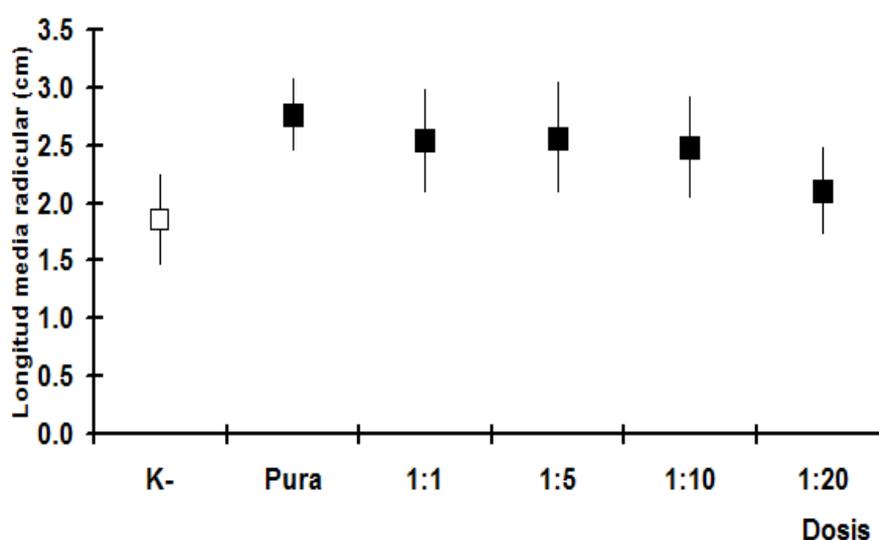


Figura 1. Comportamiento de la inhibición de la prolongación de la raíz en las dosis probadas para el río Almendares.

	<i>Dosis probadas del río Almendares</i>				
	Muestra pura	1:1	1:5	1:10	1:20
Porcentaje	82	70	80	82	78
Clasificación	T	MT	T	T	T
	<i>Dosis probadas del río Luyanó</i>				
	Muestra pura	1:1	1:5	1:10	1:20
Porcentaje	48	44	52	48	44
Clasificación	MT	MT	MT	MT	MT

T: Tóxica; MT: Muy tóxica.

Tabla 2. Porcentaje de semillas germinadas de *Lactuca sativa L.* (lechuga) var. BSS con relación al control en los ríos Almendares y Luyanó.

Se realizaron cuatro diluciones por muestra, preparadas en alícuotas de 20 mL (tabla 1), además de la muestra pura en cada experimento.

Evaluación de los datos

La toxicidad fue evaluada mediante la medición de los efectos subletales (inhibición de la prolongación de la raíz) como por el porcentaje de semillas germinadas con relación al control (efecto letal)⁵. El % de inhibición de la prolongación de la raíz (IP)⁵, se obtuvo mediante la fórmula:

$$IP (\% \text{ de inhibición}) = \frac{\text{Muestra} - \text{Control}}{\text{Control}} \times 100$$

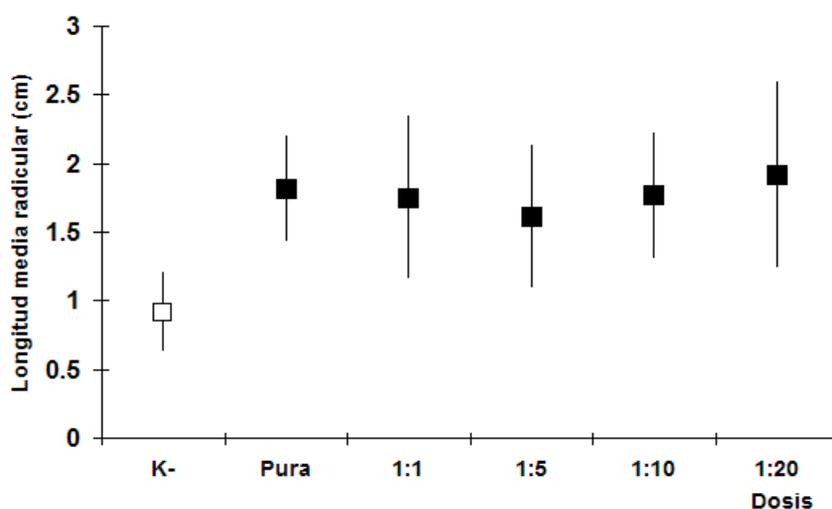


Figura 2. Comportamiento de la inhibición de la prolongación de la raíz en las dosis probadas para el río Luyanó.

IP = negativa. Tóxica (inhibición de la elongación de la raíz).
 IP = positiva. Se consideró estimulación del crecimiento.
 IP = 0. No tóxica.

Se determinó la toxicidad medida por el porcentaje de semillas germinadas con relación al control⁵ de la siguiente forma:
 No tóxica = con más del 90 % de semillas germinadas con relación al control.

Tóxica = con valores entre 75-90 % de germinación.

Muy tóxica = con valores menores del 75 % de germinación con respecto al control.

Se comprobó la existencia de diferencias significativas entre las medias de la longitud de las raíces de todas las dosis probadas en relación con el control negativo, es decir, se realizó un análisis de varianza (ANOVA $p < 0,05$). Una vez comprobada la existencia de diferencias significativas, se aplicó la prueba de comparaciones múltiples de media post hoc de Student Newman Keuls (SNK) para identificar donde radicaban las diferencias. Se verificaron los supuestos de homogeneidad de varianza y normalidad de los datos⁶. La variable dependiente fue la longitud radicular y el factor (variable independiente) las dosis probadas.

El procesamiento estadístico de toda la información se realizó en Microsoft Excel 2003, y con el paquete de programas STATISTICA, versión 5 para Windows (StaSoft, Inc., 1996). Se emplearon diagramas de cajas y bigotes para la presentación de los resultados.

RESULTADOS

Se verificó que en el río Almendares no existieron diferencias significativas en cuanto a la longitud media de las raíces entre las dosis ($gl = 5$; $F = 2.24$; $p > 0.05$). De forma clara, se observó una estimulación del crecimiento radicular ya que todos los valores obtenidos de IP (tanto en la muestra pura como en las diluciones) fueron positivos (Fig. 1). Con relación al efecto letal medido, de forma general, el por ciento de

semillas germinadas con relación al control arrojó valores tóxicos (tabla 2).

En el río Luyanó se demostró que no existen diferencias significativas en cuanto a la longitud media de las raíces entre las dosis ($gl = 5$; $F = 1.26$; $P > 0.05$). También se observó una estimulación del crecimiento radicular ya que todos los valores obtenidos de IP (tanto en la muestra pura como en las diluciones) fueron positivos (Fig. 2). Con relación al efecto letal medido, el por ciento de semillas germinadas con relación al control arrojó valores muy tóxicos para todas las dosis probadas (tabla 2)

DISCUSIÓN

Es de señalar que hubiera sido provechoso haber analizado muestras de diferentes puntos en cada río así como su análisis desde el punto de vista químico, sobre todo en sitios cercanos a lugares donde el agua pudiera poseer diferentes concentraciones tanto de cloruros como de otros contaminantes y de esta forma tratar de correlacionar la aparición de la toxicidad evaluada mediante ésta prueba, con la existencia de la sustancia química en el sustrato evaluado.

La estimulación significativa del crecimiento radicular presentada por los resultados de los ríos Almendares y Luyanó, puede ser atribuida al fenómeno conocido como hormesis. Por esta razón, esta respuesta debe ser considerada como un efecto biológico, lo cual fue verificado mediante el efecto letal medido (porcentaje de semillas germinadas con relación al control) el cual reportó resultados tóxicos y muy tóxicos para ambos ríos. Nuestros resultados concuerdan con los reportados por Burton y cols.⁷ y Barbero y cols.⁸ en la evaluación ecotoxicológica de las aguas intersticiales de los sedimentos del lago Orta, Italia. Es de señalar que en ambos ríos analizados se presenta una alta carga orgánica contaminante producto de que reciben efluentes industriales y domésticos provenientes de la ciudad, resultando *Lactuca sativa L.*, un bioindicador sensible de contaminación por la presencia de productos químicos tóxicos.

La toxicidad obtenida como resultado del porcentaje de semillas germinadas con relación al control en las diferentes dosis analizadas tanto para el río Almendares como para el río Luyanó, concuerda con lo reportado por Poi de Neiff y Ramos⁹, en su estudio ecotoxicológico de los ríos Salado y Negro, en Argentina mediante el empleo de la técnica de prolongación de la raíz con *Lactuca sativa L.*

Si bien hace más de diez años^{10,11} se planteó que el crecimiento de la raíz como punto final de lectura era más sensible a la toxicidad que la germinación de las semillas, debido al alto coeficiente de variación que presentaba ésta última¹²; los resultados destacan la importancia de medir a la vez ambos efectos, letal (porcentaje de germinación de las semillas con relación al control negativo) y subletal (inhibición de la prolongación de la raíz) como

indicadores de ecotoxicidad. La relevancia de la evaluación de la toxicidad mediante el empleo de estos dos criterios toxicológicos, fue justificado en el análisis de éste tipo de muestra (donde el efecto letal justifica el efecto biológico que se presenta por estimulación del crecimiento radicular), ambos efectos se complementan y explican la compleja respuesta observada producto de los posibles efectos resultantes de los contaminantes presentes.

Se debe tener en cuenta que así como no existe ninguna prueba universal que pueda ser utilizada en todas las situaciones para la evaluación de la toxicidad no existe organismo que pueda ser usado para evaluar todos los efectos letales posibles sobre el ecosistema bajo las diversas condiciones abióticas y bióticas presentes¹³. En la práctica, solamente unas pocas especies (entre ellas las plantas vasculares), que representan funciones ecológicas relevantes, pueden ser ensayadas¹⁴.

BIBLIOGRAFÍA

1. CETESB. Bioensaios Microbianos Aplicados no Controle de Contaminantes Tóxicos Ambientais; Serie Didática, 1991, PROCOP. 1-75.
2. Gustavson KE, Sonsthagen SA, Crunkilton RA y Harkin JM. Groundwater toxicity assessment using bioassay, chemical, and toxicity identification evaluation analysis. *Environmental Toxicology*, 2000; 15: 421-430.
3. Red Internacional WaterTox. [Sitio de Internet]. 2000. Manual de procedimientos para la ejecución de bioensayos de toxicidad aguda. 2000. [Citado 3 de Julio del 2003]: [3P]. Disponible en <http://www.idrc.ca/lacro/bioensayos/manual.html>
4. Dutka BJ. Short-Term root elongation toxicity bioassay. *Methods for microbiological and toxicological analysis of waters, wastewaters and sediments*, National Water Research Institute (NWRI), Environment Canada., 1989.
5. Ramírez S. Influencia de las precipitaciones ácidas sobre el crecimiento radicular de *Lactuca sativa L.* y *Amaranthus hypochondriacus*. XXVIII Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental, Cancún, México, 2002.
6. Zar JH. *Bioestatistical analysis*. 3^{era} Ed. Prentice - Hall; New jersey: 1996.
7. Burton GA, Baudo R, Beltrami M and Rowland C. Assessing sediment contamination using six toxicity assays. *Journal Limnology*, 2001; 60: 263-267.
8. Barbero P., Beltrami M, Baudo R y Rossi D. Assessment of Lake Orta sediments phytotoxicity after the liming treatment. *J. Limnology*, 2001; 60: 269-276.
9. Poi de Neiff, A y Ramos A. [Sitio de Internet] 2001. Utilización de bioensayos para el estudio ecotoxicológico de los ríos Salado y Negro

- (Chaco, Argentina). [Citado 12 de Enero del 2005]: [1p]. Disponible en: <http://www.UNNE.edu.ar/cyt/2001/6-Biologicas/B-019.pdf>
10. Dutka BJ, Kwan KK, Rao SS, Jurkovic A, McInnis R. Use of bioassays to evaluate river water and sediment quality. *Environmental Toxicology and Water Quality: An International Journal*, 1991; 6:309-32.
 11. Wang, W. Literature review on higher plants for toxicity testing. *Water, Air and Soil Pollution*, 1991, 59: 381-400. Citado por: Iannacone J y Alvaríño L. Efecto ecotoxicológico de tres metales pesados sobre el crecimiento radicular de cuatro plantas vasculares. *Agricultura Técnica*, 2004, 26: 198-203.
 12. Rosa CEV., Sierr M. y Radetsk CM. Use of plant tests in the evaluation of textile effluent toxicity. *Ecotoxicology of Environmental Research*, 1991; 2:56-61. Citado por Iannacone J y Alvaríño L. Efecto ecotoxicológico de tres metales pesados sobre el crecimiento radicular de cuatro plantas vasculares. *Agricultura Técnica*, 2004, 26: 198-203.
 13. CEPIS-OPS. [Sitio de Internet]. 1998. Manual de evaluación y manejo de sustancias tóxicas en aguas superficiales. [Citado 25 de Enero del 2005]: [1p]. Disponible en: <http://www.Cepis.ops-oms.org/eswww/fulltext/publica/manueval/anecap05.html>
 14. Dutka BJ, Bourbonniere R, McInnis R, Kwan KK, Jurkovic A.. Bioassay assessment of impacts of tar sands extractions operations. *Environmental Toxicology and Water Quality: An International Journal*, 1995; 10:107-117.