

Fitotoxicidad con *Lactuca sativa* para evaluar calidad del agua subterránea contra peligro potencial de contaminación

PHYTOTOXICITY WITH LACTUCA SATIVA TO ASSESS GROUNDWATER QUALITY AGAINST POTENTIAL CONTAMINATION HAZARD

Dainelys CANTERO BARROSO¹, Asela M. DEL PUERTO RODRÍGUEZ², William BROWN VEGA², Susana SUÁREZ TAMAYO², Arístides Camilo VALDÉS GONZÁLEZ¹

¹ Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología. Laboratorio Química Sanitaria. La Habana, Cuba.

² Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología. Centro de Epidemiología y Salud Ambiental, Departamento Evaluación de Riesgo. La Habana, Cuba.

Correspondencia: Dainelys Cantero Barroso. Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología. Laboratorio Química Sanitaria. Calzada Infanta entre Llinas y Clavel, 1158. Centro Habana, La Habana, 10300, Cuba.

RESUMEN

Las aguas subterráneas constituyen un recurso estratégico, sobre todo en países en vías de desarrollo y crecimiento demográfico. Si bien estas aguas suelen ser seguras y difícil de contaminar, existen diferentes acciones naturales o antropogénicas que comprometen su calidad y de esta manera, ponen en riesgo la salud de los consumidores. Los ensayos toxicológicos con plantas como biomodelos, juegan un rol crucial en la evaluación medioambiental. Este estudio se realizó la evaluación de la calidad de las aguas subterráneas a través de un ensayo de fitotoxicidad con semillas de lechuga. Se evaluaron tres fuentes de aguas subterráneas que abastecen a la ciudad de Matanzas y tres del municipio San Juan y Martínez en Pinar del Río, Cuba. Este ensayo permite evaluar la contaminación de las aguas a través de la medida del efecto letal sobre la germinación y el sub-letal sobre la elongación de la raíz. Las tres fuentes de Matanzas, así como la de Vivero, en Pinar del Río, no presentaron contaminación para el efecto letal, mientras si lo presentan las fuentes de Hoyo de Mena y Calderón en Pinar del Río. Sin embargo, las fuentes de ambas provincias presentaron toxicidad para el efecto subletal.

Palabras clave: Fitotoxicidad, *Lactuca sativa*, contaminación, agua subterránea.

ABSTRACT

Groundwater is a strategic resource, especially in developing countries and demographic growth. Although these waters are usually safe and difficult to pollute, there are different natural or anthropogenic actions that compromise their quality and thus put the health of consumers at risk. Toxicological tests with plants as biomodels play a crucial role in environmental evaluation. This study was carried out evaluating the quality of groundwater through a phytotoxicity test with lettuce seeds. Three groundwater sources that supply the city of Matanzas and three from the San Juan y Martínez municipality in Pinar del Río, Cuba, were evaluated. This test makes it possible to evaluate water contamination by measuring the lethal effect on germination and the sub-lethal effect on root elongation. The three sources of Matanzas, as well as that of Vivero, in Pinar del Rio, did not present contamination for the lethal effect, while the sources of Hoyo de Mena and Calderón in Pinar del Río did. However, the sources of both provinces presented toxicity for the sublethal effect.

Keywords: Phytotoxicity, *Lactuca sativa*, contamination, groundwater.

INTRODUCCIÓN

El agua es un recurso elemental para la vida y su calidad, decisiva para la salud. Si bien se dice que el agua subterránea por lo general tiene mejores condiciones de calidad y su contaminación es más difícil que las superficiales, gracias a su localización, hay actividades naturales y sobre todo de carácter antropogénico que provocan su contaminación, la cual es más difícil de eliminar. Esto se debe al ritmo de renovación lento de las aguas del subsuelo. Se calcula que mientras el tiempo de permanencia medio del agua en los ríos es de días, en un acuífero es de cientos de años, lo que hace muy difícil su purificación (Romero y del Puerto, 2013). En este sentido, hay actividades provocadas por la acción del hombre que pueden contaminarlas. La localización de viviendas, letrinas, animales domésticos y de corral, fábricas, zonas de cultivos, lugares con actividades recreativas, malas condiciones estructurales del pozo de captación del agua entre otros aspectos causados por la actividad humana, son vías de entrada de contaminantes a estas aguas naturales (Del Puerto *et al.*, 2018; NC:1021, 2014). Por otra parte, si se suman las condiciones naturales como las lluvias e inundaciones, que pueden arrastrar los contaminantes y provocar la entrada directa o filtración de estos, los cursos de agua reciben una carga adicional de contaminantes provenientes del "lavado" del suelo y de la atmósfera los cuales son introducidos a los cuerpos de agua subterráneos. De igual forma, los desastres naturales como huracanes, temblores de tierra, derrumbes etc, tienen un aporte considerable de contaminantes.

La calidad del agua se puede evaluar a través de diferentes indicadores microbiológicos, químicos y toxicológicos (NC: 827,2012), empleando una serie de metodologías analíticas validadas. La determinación específica de los productos y subproductos residuales es compleja, costosa y necesaria cuando se ha detectado previamente cierto nivel de contaminación o factores de riesgos. De allí la importancia que adquieren los bioensayos llevados a cabo con biomodelos representativos del ecosistema terrestre, ejemplo de ello son las semillas de plantas vasculares (rúcula, lechuga, rabanito, berro, tomate, arroz), consideradas sensibles, que en un reducido tiempo de exposición y sin requerir equipamiento sofisticado ni altos costos, resultan sumamente útiles para ser aplicados en muestras ambientales o en el monitoreo de procesos de detoxificación, saneamiento, control de efluentes o reutilización de biosólidos, detección de salinidad o presencia de herbicidas en aguas, etc.

El bioensayo de inhibición de la prolongación de la raíz del vegetal propuesta por Dutka (1989), con el empleo de semillas de *Lactuca sativa* variedad BSS

(Black Seed Simpson, variedad de invierno) permite determinar el efecto letal a través del porcentaje de semillas germinadas con relación al control negativo y el efecto subletal con la inhibición de la prolongación de la raíz con respecto al control negativo. A las semillas germinadas se le mide la radícula y el hipocotilo y se registran los valores para calcular el porcentaje de inhibición de elongación de la raíz. Se puede evaluar también malformaciones en el crecimiento normal del vegetal como anomalías en el sistema radicular; raíces raquílicas y raíces atrofiadas o ausentes, las malformaciones del sistema apical; hipocotilo corto y grueso, hipocotilo curvado formando un lazo o hipocotilo retorcido formando un espiral (Cantero, 2018; Dutka, 1989).

Entre las características más importantes de los ensayos con plantas terrestres están: que se les puede usar con muestras coloreadas o turbias, en ensayos en estático, semi-estático y de flujo continuo y con un mínimo costo de mantenimiento en el laboratorio, gran estabilidad genética, uniformidad en población, fácil cultivo y representatividad del nivel trófico (Wang 1991). En este mismo orden de ideas, el empleo de la lechuga *Lactuca sativa* como herramienta ecotoxicológica es ventajoso por requerirse poco volumen de muestra (3-7 ml/envase), en comparación con otras especies bioindicadoras (Arambasic *et al.* 1995). Los ensayos de fitotoxicidad con semillas son simples, versátiles y útiles para evaluar la toxicidad de aguas y sedimentos (Walsh *et al.* 1991; Wang 1991). Especies como la lechuga y el tomate han sido recomendadas por la United States Environmental Protection Agency (US EPA) y por la Food and Drug Administration (FDA), encontrándose entre las más sensibles, en comparación con otras seis especies de semillas de plantas terrestres (Wang 1991).

En el presente trabajo se evaluó la calidad del agua subterránea para consumo humano de dos provincias del occidente de Cuba, a través de un ensayo de fitotoxicidad aguda con semillas de lechuga y desde ahí establecer la relación entre los resultados encontrados y los peligros de contaminación antropogénica cercanos a las fuentes de captación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Sustancia de ensayo

Muestras de aguas subterráneas.

Condiciones de muestreo, traslado y conservación de la muestra

En el punto de captación de la fuente se dejó bombear el agua durante 5 minutos antes de la recolección de la muestra y se procedió a endulzar el frasco. Las muestras fueron recolectadas en frascos plásticos identificados, estériles, de 50 ml con tapa, y

trasladados de manera inmediata al laboratorio en neveras para mantener una temperatura adecuada (NC: 827,2012).

Identificación del grupo experimental

Cada fuente se consideró un grupo experimental.

- Municipio San Juan y Martínez, provincia Pinar de Río: Las fuentes de abasto Hoyo de Mena, Vivero y Calderón.

- Ciudad de Matanzas: Las fuentes de abasto San Juan, Camilito y Canimar.

Controles

Control positivo: Cloruro de potasio al 0,5%.

Control negativo: Agua destilada.

Organismo de ensayo

Semillas de lechuga variedad BSS, utilizada en los cultivos cubanos, las cuales se seleccionaron con similares dimensiones por observación directa. Las semillas se conservaron en placas Petri en refrigeración (4°C), en oscuridad y en ambiente seco, compradas en el Centro Provincial de Semillas de la Ciudad de Cienfuegos debido a su gran % de germinación, previamente comprobado en el Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología (INHEM), lugar donde se realizaron los ensayos.

Condiciones del ensayo de fitotoxicidad

Este ensayo se realizó siguiendo la regulación de la Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD) N°208,1984, mediante el empleo del bioensayo de la inhibición de la prolongación de la raíz del vegetal propuesta por Dutka (1989), y conforme con el método adaptado por Sobrero y Ronco (2004) de la Guía 850.4200 US EPA-OPPTS.

Es un ensayo en estático para evaluar toxicidad aguda. Se prepararon e identificaron las placas Petri sobre cada una de las cuales se depositó papel de filtro Whatman N° 3. Se depositaron 20 semillas en cada placa Petri, las cuales se colocaron en 5 filas de 4 semillas cada una. El papel de filtro se saturó con 4 mL de la muestra evitando que se formaran bolsas de aire. Las placas se incubaron en la oscuridad a 22 ± 2 °C por 120 horas durante 5 días. El ensayo se realizó por duplicado en cada grupo experimental y en los controles positivo y negativo. Después de la incubación, se anotó el número total de semillas que germinaron, cuantificando el porcentaje de germinación (efecto letal) y a través de la elongación de la radícula en cm, se midió el porcentaje de inhibición de su prolongación (efecto subletal). En cada estudio se promedia el valor de las 40 semillas. Las malformaciones en el crecimiento del vegetal en el sistema radicular y apical no fueron objeto de evaluación en este ensayo (Cantero, 2018; Sobrero, 2004; Dutka, 1989).

La toxicidad de las muestras se evaluó mediante el efecto letal, medido por el porcentaje de semillas

germinadas con relación al control negativo, calculado de la siguiente forma:

No tóxicas = con más del 90 % de semillas germinadas con relación al control negativo

Tóxicas = con valores entre 75 - 90 % de germinación

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

El efecto subletal se determinó por el porcentaje de inhibición (PI) de la elongación de la raíz, el cual se obtuvo mediante la fórmula siguiente:

$$\text{Porcentaje de inhibición (PI)} = \frac{\text{Media (muestra)} - \text{Media (control negativo)}}{\text{Media (control negativo)}} \times 100$$

PI = valor negativo. Tóxica (inhibición de la elongación de la raíz).

PI = valor positivo. Se consideró estimulación del crecimiento.

PI = 0. No tóxica.

Se realizó una Inspección Higiénico-Sanitario a las fuentes en estudio basado en la Norma Cubana de Fuentes de Abastecimiento de agua del 2014 (NC: 1021,2014), para evaluar el riesgo potencial de contaminación en las cercanías de las fuentes de captación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El empleo de la *Lactuca sativa* como herramienta ecotoxicológica es ventajoso por requerirse poco volumen de muestra comparado con otros biomodelos indicadores, por su rápida germinación, facilidad de medición, viabilidad económica, alta sensibilidad a tóxicos, representatividad del nivel trófico y adaptabilidad a las condiciones del laboratorio. Esta especie ha sido recomendada por la EPA, la FDA y por OECD, encontrándose entre una de las más sensibles, en comparación con otras seis especies de semillas de plantas terrestres (US EPA, 1996; OECD, 1984). Este biomodelo permite estimar los efectos dañinos de diferentes xenobióticos sobre los ecosistemas acuáticos y terrestres por su marcada sensibilidad a la contaminación ambiental, lo que justifica su utilización y por tanto la inclusión dentro de las baterías de ensayos ecotoxicológicos (Hernández, 2014; Aranda, 2010).

La Tabla 1 muestra los resultados del ensayo de fitotoxicidad en las fuentes de la provincia de la ciudad Matanzas. Como se puede observar, para los tres cuerpos de agua analizados en la provincia de Matanzas, el número de semillas germinadas (36-40) es similar a las del control negativo (39), lo cual reporta porcentajes de germinación superiores al 90 % con respecto al control negativo (39), por lo que las aguas estudiadas no presentan un efecto letal de toxicidad. Por su parte, el control positivo tuvo menor número de semillas germinadas (25), es decir que

Tabla 1. Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga para evaluar aguas subterráneas de fuentes de abasto de la ciudad de Matanzas.

Fuentes de Abasto	Efecto letal		Efecto subletal	
	Número de semillas germinadas	Porcentaje de germinación*	Media de la elongación de la raíz (cm)	PI
San Juan	40	102%	1,70	- 39
Canimar	36	92,3%	1,32	- 53
Camilito	36	92,3 %	1,40	- 50
Control Positivo	25	64,1%	0,58	- 79
Control Negativo	39		2,83	

* Porcentaje de germinación respecto al control negativo.

Tabla 2. Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga para evaluar aguas subterráneas de fuentes de abasto del municipio San Juan y Martínez, Provincia Pinar del Río.

Fuentes de abasto	Efecto letal		Efecto subletal	
	Número de semillas germinadas	Porcentaje de germinación*	Media de la elongación de la raíz (cm)	PI
Hoyo de Mena	31	88,5%	2,60	-7
Calderón	27	77,1%	1,72	- 38
Vivero	32	91,4%	1,76	- 37
Control Positivo	21	60 %	0,67	- 76
Control Negativo	35		2,80	

* Porcentaje de germinación respecto al control negativo.

hubo mayor inhibición del proceso de germinación con respecto al control negativo y el resto de los grupos experimentales, lo cual le da validez al ensayo. Por tal razón se concluye que no hay toxicidad aguda de las aguas de Matanzas estudiadas, para el biomodelo empleado; en la evaluación del efecto letal de fitotoxicidad.

El efecto subletal en este ensayo de fitotoxicidad se midió por el porcentaje de inhibición (PI) de la elongación de la raíz, calculado como se ha indicado en la metodología.

La Tabla No.1 muestra que hubo mayor crecimiento radicular en el control negativo que en el de los grupos experimentales y una disminución considerable en el crecimiento de la raíz en el control positivo, resultados de controles que validan el ensayo. Entre los grupos en estudio, el menor crecimiento lo reportó la fuente Canimar con 1,32 cm y el mayor crecimiento la fuente de San Juan con 1,70 cm, valores que se diferencian significativamente de los reportados por el control negativo con 2,83 cm y control positivo 0,58 cm. Como se puede observar del cálculo del PI para las tres fuentes de aguas subterráneas (Tabla No1), estos resultan valores negativos en todos los casos reflejando que estas aguas presentan efectos tóxicos de tipo subletal.

Estas tres fuentes de Matanzas fueron caracterizadas para evaluar peligros potenciales de contaminación y se encontraron deficiencias técnicas y sanitarias no compatibles con lo estipulado en las normativas cubanas para el uso y explotación de las mismas (NC: 1021, 2014). Se destacan salideros en la red de distribución para las fuentes de Canimar y Camilito mientras que, en la fuente San Juan se encontraron viviendas a menos de 20 metros con mala disposición de las excretas (letrinas), animales domésticos, vaquerías, zonas de cultivos, así como carencia de cerca perimetral.

En la Tabla 2 se muestran los resultados del ensayo de fitotoxicidad de las fuentes de la provincia de Pinar del Río. Como se observa, solamente la fuente Vivero tuvo más del 90% de germinación con respecto al control negativo y las fuentes Hoyo de Mena y Calderón menos del 90% por lo que estas dos últimas fuentes presentan un efecto letal de toxicidad. El control positivo, como era de esperar, tuvo menor número de semillas germinadas, representando un 60% de las 40

depositadas en las placas. De esta forma, el efecto letal resultó positivo para las fuentes Hoyo de Mena y Calderón y no presentó toxicidad para la fuente Vivero. De igual manera que lo ocurrido en Matanzas, el efecto subletal mostró valores del PI negativos para las tres fuentes o grupos experimentales, por lo que se considera presentan efectos tóxicos de tipo subletal.

En la caracterización de estas fuentes de la provincia de Pinar del Río, para evaluar posibles peligros de contaminación, se encontraron deficiencias técnicas y sanitarias no compatibles con lo estipulado en la NC:1021,2014. Dentro de estas se destacan la falta de cumplimiento de las reglamentaciones de las zonas de protección sanitarias de las fuentes; solo existe la zona de régimen estricto con la protección de las mismas con cercas perimetrales. De igual manera, se evidenció la presencia de animales domésticos y siembra de plantas (plátanos, árboles frutales, etc.) en el área interior y cercanas de la cercas perimetrales de las fuentes; la existencia de viviendas muy cercanas al perímetro de las fuentes de agua (menos de 10 m) con sistemas individuales de disposición de excretas (letrinas, fosas, etc.); la existencia de zonas de cultivo intensivo de tabaco y cultivos varios con fertilización permanente; en las áreas exteriores de la fuente se

observó la presencia de acumulación de agua por roturas de las conductoras, además de otros tipos de desechos sólidos (basura) cercanos a ellas.

Si se realiza una comparación del comportamiento del ensayo entre las dos provincias para el efecto letal, podemos decir que las fuentes de Matanzas no lo presentan mientras que, de las tres fuentes de Pinar del Río, dos presentaron un efecto letal de toxicidad. Por su parte, ambas provincias presentaron efecto subletal de toxicidad en todas las fuentes estudiadas. En este contexto, el estudio de riesgo asociado mostró que estos resultados se corresponden con el incumplimiento de los requerimientos establecidos en las normas cubanas, para el uso y explotación de fuentes de captación de agua subterráneas de consumo.

En ambas tablas se evidencia que la elongación radicular es el parámetro más sensible para la evaluación de los efectos tóxicos de la contaminación, esta condición tiene una estrecha relación con la estructura y función de los vegetales. La raíz es el órgano del aparato vegetativo de las plantas, generalmente subterráneo, que tiene su origen en la radícula del embrión, durante los primeros días de la germinación se produce un proceso de alargamiento de la radícula la cual facilitan la absorción del agua y sales minerales del suelo (Cantero, 2018; González, 2015; Navarro, 2006).

Como todo ser vivo, los vegetales funcionan como un todo único, de modo que la radícula al ser la primera en tener contacto con los contaminantes, es la más afectada, implicando esto una repercusión negativa para el desarrollo saludable de la planta ya que se ven afectados procesos vitales que mantienen un equilibrio en el suministro constantes de nutrientes a las plantas aun cuando éstos tengan concentraciones muy bajas (Martín, 2014). Estos resultados se corresponden a su vez con lo planteado por Dutka (1989) donde refiere que la prolongación de la raíz es inhibida a concentraciones más bajas de las sustancias tóxicas que para el caso de la germinación de las semillas; por lo tanto, puede ser un indicador más sensible de efectos biológicos.

Los efectos subletales tienen una importancia vital en ecotoxicología ya que, aunque no causan mortalidad directamente, afectan las posibilidades de supervivencia del individuo en el medio natural. El desarrollo de diferentes tipos de pruebas que utilizan concentraciones relevantes desde el punto de vista ambiental y seleccionan, mediante estudios más complejos, respuestas subletales más sensibles que la mortalidad, es esencial para determinar el impacto realmente producido por los contaminantes (Cantero, 2018; Hernández, 2014).

Este resultado de toxicidad subletal también tiene repercusión económica sobre todo en la agricultura, pues sería evidente que el riego de cultivos con aguas que presenten estos valores de contaminación, afectaría el desarrollo normal de plantas y frutos. El resultado sería frutos más pequeños, con caracterís-

ticas físicas no favorables, que incumplan con las exigencias comerciales deseadas con una posible devaluación del producto en el mercado, entre otras afectaciones económicas.

CONCLUSIONES

El empleo de la *Lactuca sativa* como biomarcador de contaminación permitió caracterizar la calidad del agua de las fuentes de abasto en los reservorios de Matanzas y Pinar del Río de una forma sencilla, barata, eficiente y viable. Mediante este bioensayo se encontró que las aguas subterráneas estudiadas de la ciudad de Matanzas, así como la fuente Vivero del Municipio San Juan y Martínez, en Pinar del Río, no presentan contaminación para el efecto letal, mientras si lo presentan las fuentes de Hoyo de Mena y Calderón en Pinar del Río. La evaluación del efecto subletal se comportó de igual manera en las seis fuentes estudiadas, arrojando resultados de fitotoxicidad. Por su parte, el estudio de riesgo asociado mostró que estos resultados se corresponden con el incumplimiento de los requerimientos establecidos en las normas cubanas para el uso y explotación de fuentes de captación de agua subterráneas de consumo.

BIBLIOGRAFÍA

- Arambasic MB., Bjelic S. & Subakov G. Acute toxicity of heavy metals (copper, lead, zinc), phenol and sodium on *Allium cepa* L., *Lepidium sativum* L., and *Daphnia magna* St., comparative investigations and the practical applications. *Wat. Res.* 1995.29: 497-503.
- Aranda D. Entrevista al Dr. en Ciencias Naturales y Profesor Titular de Ecotoxicología en la Universidad Nacional del Litoral (UNL) de Argentina, Rafael Lajmanovich. "Rehenes de un modelo productivo poco sustentable". *SerTox.* Online 2010.
- Cantero Barroso D, Pérez García L, Pérez Castillo A, Del Puerto Rodríguez AM. Evaluación ecotóxica de aguas subterráneas utilizadas para el consumo humano en Cuba. *Hig. Sanid. Ambient.* 2018. 18 (1): 1597-1603
- Del Puerto Rodríguez A. M, Suárez Tamayo S, Solano Suárez R, Cuellar Luna L, Maldonado Cantillo G, Cantero Barroso D. Factores ambientales y contaminación de fuentes de abasto de agua por nitratos en una zona rural. *Hig. Sanid. Ambient.* 2018. 18 (1): 1579-1587
- Dutka BJ. Short-Term Root Elongation Toxicity Bioassay Methods for Microbiological and Toxicological. Analysis of Waters Wastewaters and Sediments. Burlington, Ontario: Rivers Research Institute. NWRI; 1989.
- Environmental Protection Agency, EPA. Ecological effects test guidelines OPPTS Fish acute toxicity test, freshwater and marine .1996.850.1075.

- González M. Calidad físico-química del agua en fuentes subterráneas para consumo de la población en tiempo de sequía. Municipio las Tunas, Tesis de diplomado de Toxicología Ambiental, Microbiología y Química Sanitaria. INHEM. 2010.
- Hernandez L. Trabajo de diploma. Evaluación ecotoxicológica en diferentes bioindicadores ambientales del bioplaguicida Tricosave-34. 2014.
- Martín F. Incorporación de nuevos parámetros subletales para la evaluación de las consecuencias ambientales de contaminantes orgánicos persistentes y emergentes en las emisiones ligadas a la gestión de residuos. República de Honduras Ministerio de Salud. Norma Técnica para la calidad del Agua Potable, 1995. 2014.
- Navarro A.R., Arrieta R.G. y Maldonado M.C. Determinaciones de efectos de diferentes compuestos a través de ensayos de fitotoxicidad usando semillas de lechuga escarola y achicoria. *Revista de Toxicología*, 23, 125-129. 2006.
- NC 827:2012. Agua potable. Requisitos sanitarios. La Habana: ONN; 2012.
- NC 1021:2014. Higiene Comunal. Fuentes de abastecimiento de agua. Calidad sanitaria y protección sanitaria. La Habana: ONN; 2014.
- OECD No 208.1984 (Organization for Economic Cooperation and Development) Terrestrial Plants: Growth Test. Guideline for Testing of Chemicals. Paris, France. 1984.
- Romero M y Del Puerto A. Nitratos y nitritos en fuentes de aguas subterráneas y su impacto sobre la salud en tres provincias del occidente del país. 2011 – 2013. Programa Ramal Calidad de Vida. Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología. 2013.
- Sobrero MC y Ronco A. Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L). 2004.
- Walsh, G.E., D.E. Weber, T.L. Simon & L.K. Brashers. Toxicity test of effluents with marsh plants in water and sediments. *Environ. Toxicol. Chem.* 10: 517. 1991.
- Wang, W. Literature review on higher plants for toxicity testing. *Water, Air and Soil Pollution* 59: 381-400. 1991.