

Higiene y Sanidad Ambiental, 12 (1): 839-845 (2012)

Aplicación de un bioensayo ecotoxicológico en la evaluación de una mezcla compleja ambiental

APPLICATION OF ECOTOXICOLOGIC BIOASSAY IN THE EVALUATION OF AN ENVIRONMENTAL COMPLEX MIXTURE

Yuleidis GONZÁLEZ PÉREZ,¹ Eberts MARCOS ALBEAR,¹ Neyda PÉREZ GARRIDO,² Dayana MARIN SÁNCHEZ,² George ARGOTA PÉREZ.¹

Laboratorio de Ecotoxicología¹ y Laboratorio de Química Ambiental². Centro de Toxicología y Biomedicina (TOXIMED). Universidad de Ciencias Médicas Santiago de Cuba. Autopista Nacional Km 1½. Código Postal 90400. Apartado Postal 4033. Santiago de Cuba. Correo-e: gonzalez@toxi.scu.sld.cu

RESUMEN

El creciente desarrollo industrial y urbano ha traído consigo la aparición de una cantidad apreciable de sustancias químicas y mezclas complejas tóxicas, las cuales afectan tanto la salud humana como la ambiental. Un instrumento alternativo para la determinación de la toxicidad de muestras ambientales es la utilización de bioensayos sencillos y económicos, que son muy empleados en evaluaciones iniciales. En este estudio se evaluó la toxicidad aguda de una mezcla compleja ambiental en el Laboratorio de Ecotoxicología del Centro de Toxicología y Biomedicina de la provincia de Santiago de Cuba empleando un ensayo ecotoxicológico con semillas de *Lactuca sativa L.* (lechuga). Las semillas fueron expuestas a la muestra pura (100 %) y a tres diluciones de ésta (0.1, 1 y 10 %). Se obtuvieron los valores de CI_{g50}: 52,7 %; CI_{r50}: 6,89 %; CI_{h50}: 43,0 % de la germinación, la longitud radicular y del hipocótilo respectivamente, que fueron los puntos finales medidos en el ensayo. Además, se calculó la unidad de toxicidad letal (UTL) para la germinación, y el porcentaje de semillas germinadas para cada tratamiento incluyendo el grupo control. Se determinó la Inhibición de la Elongación de la raíz e hipocótilo (EIr), (EIh) como parámetros de crecimiento; siendo el más sensible la longitud radicular. Las anomalías morfológicas más notables encontradas en el sistema apical fueron: hipocótilo corto y grueso, curvado y retorcido; y en el radicular: raíces raquílicas y ausentes, siendo directamente proporcionales al aumento de la concentración de la mezcla en estudio. Con estos resultados se clasificó la muestra ambiental evaluada como tóxica para el biomodelo empleado.

Palabras clave: Mezcla compleja, muestras ambientales, bioensayos ecotoxicológicos, *Lactuca sativa L.*

ABSTRACT

The growing industrial and urban development has brought I get the appearance of an appreciable quantity of chemical substances and toxic complex mixtures, which affect as much the human health as the environmental one. An alternative instrument for the determination of the toxicity of environmental samples is the use of bioassays that they are very employees in initial evaluations. In this study the sharp toxicity of an environmental complex mixture was evaluated in the Laboratory of Ecotoxicology of the Center of Toxicology and Biomedicine of Santiago from Cuba city using an ecotoxicologic assays with *Lactuca sativa L.* seeds (lettuce). The seeds were exposed to the pure sample (100%) and to three dilutions of this (0.1, 1 and 10%). the values of CI_{g50} were obtained: 52,7%; CI_{r50}: 6,89%; CI_{h50}: 43,0% of the germination, the longitude radicular and of the hipocotil respectively that were the final points measured in the rehearsal. Also, the unit of lethal toxicity was calculated (UTL), and the percent of seeds germinated for each treatment including the group control. It was determined the Inhibition of the Elongation of the

root and hipocótilo (Elr), (Elh) as parameters of growth; being the most sensitive the longitude radicular. The most remarkable morphological anomalies found in the system apical were: short and thick, curved and gnarled hipocótilo; and in the radicular: rickety and absent roots, being directly proportional to the increase of the concentration of the mixture in study. The environmental sample was classified evaluated as toxic for the biomodel used.

Key words: mixes complex, environmental mixes, ecotoxicológicos bioassays, *Lactuca sativa L.*

INTRODUCCIÓN

La preocupación por preservar el medioambiente se ha mantenido a lo largo de la historia a golpe de dramáticos accidentes por el uso y abuso de la utilización de diversas sustancias químicas.¹ Éstos y otros problemas que aún se suceden en el mundo civilizado, penosamente han sido el pretexto para el desarrollo de investigaciones con el objetivo de incrementar el control y evaluación toxicológica de productos y desechos, así como de su interacción con el medio. De esta manera surgieron la Toxicología Ambiental y la Ecotoxicología.²

La Ecotoxicología es la ciencia que estudia los efectos de las sustancias químicas sobre la estructura y función de los ecosistemas, estudiando un amplio rango de temas como: la distribución de los contaminantes, su transporte, bioacumulación, degradación y efectos biológicos y ecológicos asociados a ellos.³

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.^{4, 5} Indiscutiblemente, a pesar de sus obstáculos y sus limitaciones, los bioensayos ecotoxicológicos son métodos de elección, pues pueden ayudar a determinar si un efluente, o una sustancia vertida a un ecosistema representa un potencial riesgo tóxico para la flora y fauna, e incluso para el hombre.⁶

Las plantas superiores son ampliamente utilizadas por ser organismos eucarióticos, y por lo tanto más comparables a la mayoría de las especies de la flora y la fauna superiores, y constituyen una eficiente herramienta de trabajo para medir alarma de peligro ambiental por ser más sensibles que otros sistemas de ensayos disponibles, son de fácil manipulación, almacenaje y bajo costo, además de presentar buena correlación con otros sistemas de pruebas.^{7, 8, 9}

En América Latina son numerosos los países que utilizan los sistemas de plantas para la evaluación toxicológica de muestras ambientales.⁵⁻²⁰ Una de las semillas más comúnmente utilizadas para estos fines son las semillas de *Lactuca sativa L.*⁷

Una de las aplicaciones más extendidas del monitoreo de efectos biológicos con ensayos de toxicidad, ha sido la evaluación de descargas líquidas o efluentes, aguas servidas de origen doméstico, municipal o industrial descargadas de manera puntual

sobre cuerpos receptores,²¹ en el marco de programas de control ambiental.

En el Centro de Toxicología y Biomedicina de la provincia de Santiago de Cuba se han llevado a cabo investigaciones relacionadas con la evaluación de muestras ambientales utilizando bioensayos ecotoxicológicos de gran aplicación,²²⁻²⁴ por lo que se decidió evaluar la toxicidad de una mezcla ambiental aplicando un bioensayo ecotoxicológico con semillas de *Lactuca sativa L.*, para esto se trazaron los siguientes objetivos: evaluar la toxicidad de una mezcla ambiental empleando un bioensayo ecotoxicológico; determinar las concentraciones efectivas a las cuales se produjeron inhibiciones de la germinación, la elongación de la radícula e hipocótilo al 50 %, respecto al grupo control (CIg₅₀), (CIr₅₀) y CIh₅₀ respectivamente; evaluar los efectos subletales de la mezcla compleja en semillas de *Lactuca sativa L.*; calcular la Unidad de Toxicidad Letal (UTL) y el porcentaje de inhibición de la germinación, la elongación de la raíz e hipocótilo.

MATERIAL Y MÉTODOS

El bioensayo de toxicidad se realizó en el Laboratorio de Ecotoxicología del Centro de Toxicología y Biomedicina (TOXIMED) durante el período comprendido entre enero y abril de 2010.

Es un ensayo estático de toxicidad aguda (120 h de exposición) en el que se evaluaron los efectos fitotóxicos de una muestra residual líquida en el proceso de germinación de semillas de lechuga (*Lactuca sativa L.*) y en el desarrollo de las plántulas durante los primeros días de crecimiento.⁷

Las semillas de lechuga variedad BSS utilizadas, fueron suministradas por la Empresa de Semillas de Santiago de Cuba, y almacenadas previamente en ambiente seco y a 4°C. Para la ejecución del ensayo se seleccionaron cuidadosamente por su forma y tamaño más frecuente. Se sembraron un total de 20 semillas en placas de petri de 90 mm de diámetro cubiertas con un papel de filtro Whatman de igual diámetro, dejando suficiente espacio entre ellas para su adecuado crecimiento. Se probaron un control (agua destilada) y 4 concentraciones de la mezcla residual: 0.1, 1, 10, 100 % (tratamientos), usando como disolvente agua destilada, con 3 réplicas cada uno, 3 mL de volumen de aplicación, y una temperatura mantenida de 22 ± 2°C en la oscuridad. Como puntas finales para la evaluación de los efectos, se

determinó la CI_{g50} (concentración efectiva a la cual se produjo inhibición de la germinación al 50%, respecto al grupo control); la CI_{r50} (concentración efectiva a la cual se produjo inhibición en la elongación de la radícula al 50 %, respecto al grupo control) y la CI_{h50} (concentración a la cual se produjo inhibición en la elongación del hipocótilo al 50 %, respecto al grupo control).

Cada punto final se evaluó comparando el efecto generado en los organismos expuestos a las muestras con respecto a la respuesta en los organismos del control negativo sujetos a las mismas condiciones de ensayo, excepto por la ausencia de muestra.

Terminado el período de exposición, se cuantificó el efecto en la germinación, en la elongación de la radícula y del hipocótilo. Como criterio de germinación se consideró la aparición visible de la radícula.

Para el análisis de la presencia de anomalías en las plántulas tratadas, se siguió la metodología referida en el Manual para la Evaluación de Plántulas en los Ensayos de Germinación.²⁵

Se determinó la unidad de toxicidad letal (UTL) para el parámetro de germinación, obtenida por el cociente entre la concentración verdadera medida de un tóxico o sustancia en particular, dividida por la CI_{g50} de dicha sustancia, en este caso esta relación se calcula con referencia a la concentración inicial del efluente (la concentración real equivale al 100% del mismo), y se calculó mediante la siguiente expresión:

$$UTL = 100 \% / CI_{g50}$$

Se tuvo en cuenta que las relaciones menores a 1 indican niveles no letales y mayores a 1 muy letales según lo referido por Castillo.²⁶

Además, se determinaron otros indicadores que aportan elementos para la clasificación de la mezcla residual;²⁷ en cuanto a la germinación se consideraron no tóxicas a las muestras en las cuales germinaron más del 90% respecto del control con agua destilada, tóxicas a las que presentaban valores comprendidos entre 75% y 90%, y muy tóxicas a las que tenían menos del 75% de germinación respecto del

control.

De igual modo para los parámetros de crecimiento se determinó la inhibición de la elongación de la raíz e hipocótilo (Elr o EIh) mediante la fórmula.²⁷

$$\text{Inhibición (Elr y EIh\%)} = \frac{\text{Muestra} - \text{Control}}{\text{Control}} \times 10$$

Donde:

Muestra: Promedio de la longitud de la raíz o hipocótilo, según sea en cada caso, teniendo en cuenta que n= 20 para cada concentración donde se presente crecimiento, expresada en mm.

Control: Promedio de la longitud de la raíz o hipocótilo, según sea en cada caso, teniendo en cuenta que n= 20 para el grupo control, expresada en mm.

Los resultados se clasifican de la siguiente forma: EI negativa: Tóxica (inhibición de la prolongación de la raíz o hipocótilo según el parámetro medido); EI positiva: Se consideró estimulación del crecimiento; EI = 0: No tóxica.

Para el cálculo de los valores medios, porcentuales y las concentraciones efectivas CI_{g50} , CI_{r50} , y CI_{h50} para cada punto final medido se empleó el programa Microsoft Excel 2003. Éstas últimas se calcularon a partir del estadígrafo Pronóstico, el cual calcula o predice un valor futuro en una tendencia lineal usando valores existentes.

RESULTADOS

Al finalizar el ensayo, se obtuvo un porcentaje de germinación mayor del 90 % de las semillas plantadas, con crecimiento normal y libre de malformaciones, así como también coeficiente de variación de la longitud radicular y del hipocótilo menor del 30 % (CV= 23.15 %), considerándose válido el ensayo.^{7, 20}

Los resultados de letalidad para este bioensayo, referido al porcentaje de germinación se muestran en la Tabla 1, donde la germinación disminuyó al

Tabla 1. Resultados del porcentaje de germinación.

Concentración (%)	Cantidad de semillas			T	Tg	Ig	G	Clasificación
	Placa 1	Placa 2	Placa 3					
Control	19	20	20	60	59	-	98.3	-
0,1	17	19	19	60	55	8.3	91.7	NT
1	17	20	18	60	55	8.3	91.7	NT
10	18	18	15	60	51	15	85	T
100	0	0	0	60	0	100	0	MT

Leyenda: T: total de semillas expuestas; Tg: total de semillas germinadas; G: porcentaje de germinación; Ig: porcentaje de inhibición de la germinación con respecto al grupo control; NT: No tóxica; T: Tóxica; MT: Muy Tóxica

Tabla 2. Resultados de los parámetros de crecimiento de las radículas e hipocótilos de plántulas de lechuga.

Concentración (%)	Promedio de longitud del órgano(mm) (\pm DE)	
	Radícula	Hipocótilo
Control	29.20 \pm 1.76	17.37 \pm 2.11
0.1	27.35 \pm 2.75	15.67 \pm 2.20
1	19.15 \pm 2.48	15.57 \pm 2.37
10	8 \pm 2.31	13.98 \pm 3.10

Tabla 3. Resultados del porcentaje de inhibición de la elongación de la radícula, hipocótilo con respecto al control negativo de plántulas de lechuga.

Concentración (%)	EIr	EIh
0,1	- 6.34	- 9.79
1	- 34.42	- 10.36
10	- 72.6	- 19.52
100	-	-

Leyenda: EIr: porcentaje de inhibición de la elongación de la raíz; EIh: porcentaje de inhibición de la elongación del hipocótilo; (-): Efecto Inhibitorio

aumentar la concentración del residual. En la dilución del 10 % se observó disminución marcada del 85 % hasta llegar al máximo efecto (0 % de germinación) en la concentración del 100 % del residual evaluado, mostrando que estos elementos se corresponden con el análisis sobre la clasificación del residual, referido a letalidad, ya que éstas concentraciones clasifican como tóxica y muy tóxica respectivamente. De igual modo la UTL obtenida es de 1.90, clasificando la muestra como muy letal por tener valores por encima de la unidad.

Los resultados del promedio y desviación típica de la elongación de la radícula y el hipocótilo se representan en la Tabla 2.

Los valores elevados de desviación típica pueden deberse a la variabilidad y capacidad de respuesta particular de los diferentes embriones, coincidiendo con lo observado en otros estudios reportados.²⁸

Al analizar el comportamiento de los parámetros de crecimiento referidos a la longitud de radícula e hipocótilo, se observó que el mínimo crecimiento estuvo en la dilución del 10 %, siendo la radicular el más afectado con valor promedio de 8 mm con respecto al control negativo (29.20 mm); y en el caso del hipocótilo fue de 13.98 mm con respecto al

máximo crecimiento presentado por el grupo control (17.37 mm). Esto manifiesta que la evaluación del efecto en la elongación de la radícula y del hipocótilo de las plántulas, permite ponderar el efecto tóxico de compuestos complejos presentes en niveles de concentración bajos, que no son suficientes para inhibir la germinación; sin embargo, pueden retardar o inhibir completamente los procesos de elongación de la radícula y/o del hipocótilo, dependiendo del modo y sitio de acción del compuesto (mezcla), por lo que constituyen indicadores subletales y representativos para determinar la capacidad de establecimiento y desarrollo de la planta.²⁰

Los resultados del porcentaje de inhibición de la elongación de la radícula, hipocótilo con respecto al control negativo se resumen en la tabla 3, donde se observa que el efecto del residual a través de los tres puntos finales medidos aumenta.

Los efectos subletales encontrados a partir de la concentración del 0,1 % hasta el 10 %, pudieran estar referidos a la presencia de determinados componentes de la mezcla o de la interacción entre ellos que están presentes en concentraciones tan bajas, que actúan inhibiendo el desarrollo normal de las estructuras de crecimiento de las plántulas expuestas, aún cuando ha ocurrido inicialmente el proceso de germinación de las semillas.

Al analizar los porcentajes de inhibición para cada punto final medido, se corresponde con lo observado en la germinación, pues a medida que se incrementa la concentración del residual, aumenta el efecto inhibitorio para los parámetros de crecimiento, siendo el más sensible la inhibición radicular, coincidiendo con lo reportado por Navarro en un estudio similar de evaluación de efluentes.²⁹

Al comparar estos parámetros con los similares obtenidos en el control negativo, fue la concentración del 10 % donde se observó el mayor efecto inhibitorio (longitud de radícula con un 72,6 % y longitud de hipocótilo con un 19,52 %) y en cuanto a la germinación, el máximo efecto inhibitorio se encontró al 100 %.

En los gráficos 1, 2, 3 se representan los valores de concentraciones inhibitorias medios para cada punto final medido, observándose que la elongación radicular es el parámetro más sensible, la cual tiene una estrecha relación con la estructura y función de este órgano en los vegetales.³⁰

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 donde se aprecian diferentes zonas: en el extremo inferior se encuentra la cofia o pilorriza de forma cónica en el extremo de la raíz, presenta un color un poco más oscuro que el resto y está recubierta por la cutina respondiendo a su función de abrirse paso a través del suelo; a continuación una zona corta, lisa y de color claro, llamada zona de crecimiento; seguido, muy cercana

Gráfico 1. Comportamiento del porcentaje de inhibición de la germinación con respecto a las concentraciones del residual.

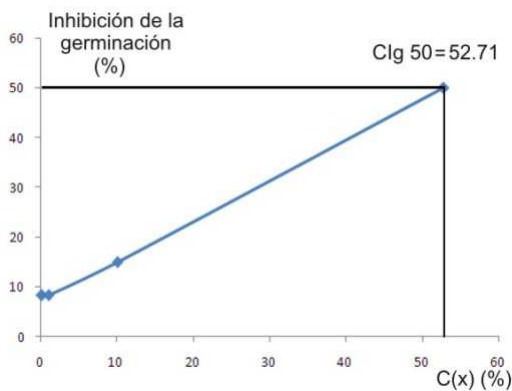


Gráfico 2. Comportamiento del porcentaje de inhibición de la longitud de la radícula con respecto a las concentraciones del residual.

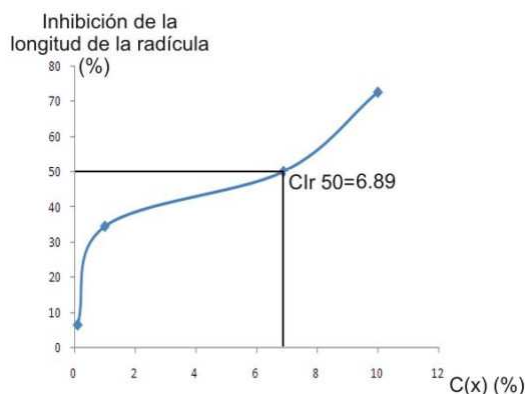
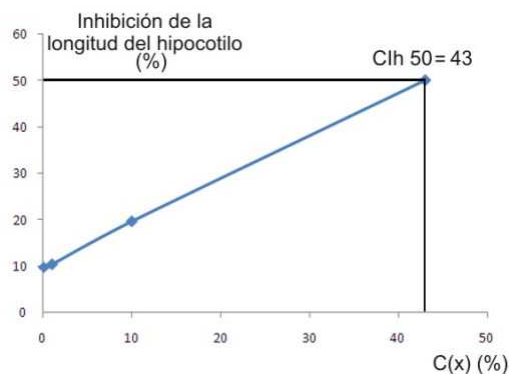


Gráfico 3. Comportamiento del porcentaje de inhibición de la longitud del hipocótilo con respecto a las concentraciones del residual.



al ápice radical, la zona de los pelos absorbentes (radicales), éstos son evaginaciones tubulosas de las células, de membrana muy tenue que aumentan

considerablemente la superficie de la raíz, facilitan la absorción del agua y sales minerales del suelo.³¹

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 aún cuando éstos tengan concentraciones muy bajas. Correspondiéndose a su vez con lo planteado por Dutka,⁷ 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.

Como resultado de la evaluación de las plántulas en las concentraciones donde hubo crecimiento se observaron alteraciones morfológicas en los órganos medidos. Las anomalías en el sistema radicular y apical se presentaron en orden creciente en relación a la concentración de la mezcla residual (gráfico 4).

Las principales anomalías observadas en el sistema radicular fueron: raíces raquílicas y raíces atrofiadas o ausentes.

Y las presentadas en el sistema apical fueron: hipocótilo corto y grueso; hipocótilo curvado formando un lazo e hipocótilo retorcido formando un espiral.

Es importante destacar que estas anomalías corroboran los resultados obtenidos en el experimento, notándose claramente la diferencia entre el crecimiento del grupo control y los tratamientos donde hubo crecimiento.

DISCUSIÓN

La toxicidad de una muestra residual, no solamente depende de los efectos adversos de uno de sus componentes sino también de las posibles interacciones entre ellos, aún cuando originalmente no sean potencialmente tóxicos. Es por ello, que los efectos letales y subletales (incluyendo las anomalías) encontrados, pudieran estar dados por la acción de las diferentes sustancias químicas que componen el efluente evaluado y sus interacciones, partiendo de sus propiedades físico-químicas, y analizando los posibles efectos que pueden ser aditivos o sinérgicos; antagónicos; de potenciación o inhibición; hecho reportado en la literatura y que no fue determinado en el estudio.²

El bioensayo con semillas de lechuga ha sido recomendado y aplicado por diferentes organismos de protección ambiental para la evaluación ecotoxicológica de muestras ambientales,^{32,33} ya que mide los procesos fisiológicos que ocurren durante el periodo de germinación y los primeros días de desarrollo de la plántula, siendo estos generales para la gran mayoría de las semillas. De igual modo existen múltiples estudios realizados que apoyan esta hipótesis;^{27,29,34,35,36} demostrando la sensibilidad que

presenta esta especie comparada con otras especies de plantas frente a los contaminantes ambientales, así

3. Repetto M, Sanz P. Fundamentos de Ecotoxicología. En: Repetto M. Toxicología Avanzada.

Gráfico 4. Anomalías en el sistema radicular y apical a la concentración de 0.1, 1, 10 y 100 % del residual líquido y comparación con el control.



como su importancia desde el punto de vista hortícola, su rápida germinación, su fácil mantenimiento en el laboratorio, su amplia aplicación en muestras de diferentes características y orígenes, la sencillez, corta duración del bioensayo, así como su buena correlación con otros sistemas de prueba.^{7,20}

CONCLUSIONES

1. Se evaluó la toxicidad de una mezcla ambiental empleando un bioensayo ecotoxicológico, clasificando como tóxica para el biomodelo empleado.

2. Los valores de CI_{50} : 52,7 %; CI_{r50} : 6,89 %; CI_{h50} : 43,0 % de la germinación, la longitud radicular y del hipocótilo respectivamente.

3. Las anomalías morfológicas como efectos subletales más notables que se encontraron en las plántulas de lechuga, fueron: raíces raquílicas y atrofiadas para el sistema radicular; y para el sistema apical, hipocótilo corto y grueso, e hipocótilo curvado o retorcido.

4. El valor de la Unidad de Toxicidad Letal (UTL) obtenido se considera muy letal para la germinación de las semillas de lechuga.

5. El porcentaje de inhibición para la elongación de la radícula e hipocótilo presentó valores negativos, de lo que se infiere que en todas las concentraciones del residual evaluado donde hubo crecimiento se produjo un efecto inhibitorio.

BIBLIOGRAFÍA

1. Organización Mundial de la Salud (OMS); Organización Internacional del Trabajo (OIT), Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA). El programa Internacional de Seguridad de Sustancias Químicas (IPCS); 1998.
2. Albert L. Introducción a la Toxicología Ambiental. Metepec: Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud. ECO/OPS/OMS; 1997.

- Madrid: Díaz De Santos; 1995. p. 147-203.
4. Butler GC. Principles of Ecotoxicology. New York: John Wiley and Sons; 1978.
5. Ronco A, Díaz-Báez MC, Granados Y. Conceptos Generales. En: Castillo MG. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de las aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. Canadá: IDRC; 2004. p. 17-22.
6. Aportela P. Parte II Ecotoxicología. En: Domínguez A. Tóxicos y contaminantes ambientales. Un enfoque multidisciplinario. La Habana: Editorial Academia; 2006. p. 181-273.
7. Dutka BJ. Methods for microbiological and toxicological analysis of waters, wastewaters and sediments. National Water Research Institute (NWRI). Canada: Burlington; 1989.
8. Fiskesjö G. The Allium test in wastewater monitoring. *Environm Toxicol Water Qual.* 1993; (8):291-298.
9. Gopalan HNB. Ecosystem health and human well being: the mission of the international programme plant bioassays. *Mutat Res.* 1999; (426):99-102.
10. Bartell SM, Gardner RH, O'Neill RV. Ecological Risk Estimation. Boca Raton: Lewis Publishers; 1992.
11. Dutka BJ. Methods for microbiological and toxicological analysis of waters, wastewaters and sediments. National Water Research Institute (NWRI). Canada: Burlington; 1989.
12. Fiskesjö G. The Allium test in wastewater monitoring. *Environm Toxicol Water Qual.* 1993; (8):291-298.
13. Gopalan HNB. Ecosystem health and human well being: the mission of the international programme plant bioassays. *Mutat Res.* 1999; (426):99-102.
14. Ronco A, Sobrero C, Grassi V, Kaminski L, Massolo L, Min L. WaterTox bioassay intercalibration network: Results from Argentina. *Environ Toxicol.* 2000; (15): 287-296.

15. Forget G, Ganon P, Sánchez WA, Dutka BJ. Overview of methods and results of the eight country International Development Research Center (IDRC) WaterTox project. *Environm Toxicol.* 2000; (15):264-276.
16. Fochtman P, Raszka A, Nierzedzka E. The use of conventional bioassays microbiotests and some "rapid" methods in the selection of an optimal test battery for the assessment of pesticides toxicity. *Environm Toxicol.* 2000; (15):376-384.
17. Arkhipchuk VV, Romanenko VD, Malinovskaya MV, Kipnis LS. Toxicity assessment of water samples with a set of animal and plant bioassays: Experience of the Ukrainian participation in the watertox program. *Environmental Toxicology.* 2000; (15):277-286.
18. Castillo G, Vila IC, Neild N. Ecotoxicity assessment of metals and wastewater using multitrophic assays. *Environmental Toxicology.* 2000; (5): 370-375.
19. Díaz-Báez MC, Pérez JB. Intralaboratory experience with a battery of bioassays: Colombia Experience. *Environmental Toxicology.* 2000; (15): 297-303.
20. Sobrero MC, Ronco A. Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga (*Lactuca sativa L.*). En: Castillo MG. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de las aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. Canadá: IDRC; 2004. p. 71-79.
21. Ronco A, Díaz-Báez MC. Interpretación y Manejo de Resultados. En: Castillo MG. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de las aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. Canadá: IDRC; 2004.
22. González Y, Marcos E (Universidad de Ciencias Médicas, Centro de Toxicología y Biomedicina, Santiago de Cuba, Cuba). Evaluación de la fitotoxicidad aguda del tomatocid en semillas de *Lactuca sativa L.* Informe Técnico. Santiago de Cuba: Centro de Toxicología y Biomedicina, Laboratorio de Ecotoxicología Terrestre; 2009 Oct. Reporte No.: 091111.
23. González Y, Aportela P, Marcos E (Universidad de Ciencias Médicas, Centro de Toxicología y Biomedicina, Santiago de Cuba, Cuba). Evaluación de la toxicidad de un lodo anaerobio en Plantas Terrestres. Informe Técnico. Santiago de Cuba: Centro de Toxicología y Biomedicina, Laboratorio de Ecotoxicología Terrestre; 2005 Mar. Reporte No.: 050203.
24. Aportela P, González Y, Domínguez A, Grasset F (Universidad de Ciencias Médicas, Centro de Toxicología y Biomedicina, Santiago de Cuba, Cuba). Evaluación de 4 muestras residuales de la empresa de envases corrugados en *Allium cepa* y *Artemia sp.* Informe Técnico. Santiago de Cuba: Centro de Toxicología y Biomedicina, Laboratorio de Ecotoxicología Terrestre; 2004 Oct. Reporte No.: 011005.
25. Instituto Nacional de Semillas y Plantas de Vivero. Manual para la Evaluación de Plántulas en Análisis de Germinación. Madrid; 1978.
26. Castillo MG. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de las aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. Canadá: IDRC; 2004.
27. Poi de Neiff A, Ramos A. [Sitio de Internet] 2001. [Citado 12 de Enero del 2005]: [1p]. Utilización de bioensayos para el estudio ecotoxicológico de los ríos Salado y Negro (Chaco, Argentina). Disponible en URL: <http://www.UNNE.edu.ar/cyt/2001/6-Biologicas/B-019.pdf>
28. Bowers N, Pratt JR, Beeson D, Lewis M. "Comparative Evaluation of Soil Toxicity using Lettuce Seeds and Soil Ciliates". *Environmental Toxicology and Chemistry.* 1997; 16 (2): 207-213.
29. Navarro AR, Arrieta RG, Maldonado MC. Determinaciones de efectos de diferentes compuestos a través de ensayos de fitotoxicidad usando semillas de lechuga escarola y achicoria. *Rev. Toxicol.* 2006; (23):125-129.
30. González S. Botánica 1. Ciudad de La Habana: Editorial Pueblo y Educación; 1987.
31. Strasburger E, Noll F, Schimper AF. Tratado de Botánica. Barcelona: Editorial Marin; 1974.
32. Organization for Economical Cooperation and Development (OECD). "Guidelines for testing of chemicals". *Terrestrial Plants, Growth Test* 208. Paris: OECD; 1984.
33. US Environmental Protection Agency (EPA). Ecological Effects Test Guidelines OPPTS 850.4225 Seedling Emergence, Tier II. EPA 712-C-96-363. Abril, 1996.
34. Torres MT. Empleo de los ensayos con plantas en el control de contaminantes tóxicos ambientales. *Rev Cubana Hig Epidemiol.* 2003; (41): 2-3.
35. Torres MT, Rodríguez M, García Melián NM, Hernández Perera M, Fernández Novo. Toxicidad aguda de lixiviados acuosos mediante un ensayo con *Lactuca sativa L.* *Hig. Sanid. Ambient.* 2006; (6): 170-172.
36. Iannacone J, Alvareño L. Efecto ecotoxicológico de tres metales pesados sobre el crecimiento radicular de cuatro plantas vasculares. *Agricultura Técnica.* 2004; (26):198-203.