

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA

Tesina presentada para obtener  
el grado académico de  
Licenciatura en Química

“EVALUACION ECOTOXICOLOGICA DE EFLUENTES RESIDUALES”

Autora: LUCIA ELIZABETH BORTHIRY

Director: SILVIA FANELLI

Co-director: GUIDO MASTRANTONIO

SANTA ROSA (LA PAMPA)

ARGENTINA

2015

# **PREFACIO**

Esta Tesina es presentada como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Licenciado en Química de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Nacional de La Pampa y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad ni en otra Institución Académica. Se llevó a cabo en Santa Rosa, La Pampa, durante el periodo comprendido entre el 29 de Junio del 2012 y 25 de diciembre de 2014, bajo la dirección de la Dra. Silvia Laura Fanelli y la codirección del Dr. Guido Mastrantonio.

.....  
Lucía Borthiry

Departamento de Química.  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.  
Universidad Nacional de la Pampa.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi directora y co-director de la tesis, Dra Silvia Fanelli y Dr Guido Mastrantonio respectivamente. Muchas gracias por haberme aceptado en este proyecto tan interesante e importante y por todo el esfuerzo y dedicación que realizaron para llevarlo a cabo, a pesar de la distancia, estuvieron siempre ayudando y guiándome, muchas gracias.

Quiero agradecer a Laura Bartel por tu dedicación y orientación cuando surgían dudas y la colaboración de Violeta Poggio y Mariela Mariamé en las tareas desarrolladas en el INTA.

A Gustavo Bulus por su buena predisposición a recibirnos en el instituto CIMA, La Plata donde realizan las técnicas de bioensayos y ayudarme frente a cualquier duda que me surgía.

También al EEA INTA- Anguil. "Ing. Agr. Guillermo Covas", por abrirme sus puertas y dejarme realizar mis ensayos en sus laboratorios.

Agradezco a Laura Wisner por su apoyo y colaboración.

A mi familia por su apoyo y preocupación en estos años y por haberme brindado todo para lograr mi objetivo.

A los docentes del Pabellón de Química, gracias por todo, me llevo muy lindos recuerdos.

A mis amigos que estuvieron dándome fuerzas en cada momento, algunos mas difíciles.

A mis compañeros de curso, gracias por todos los momentos vividos, me llevo muchas anécdotas y hermosos recuerdos.

Agradezco a cada miembro de la Facultad de Exactas y Naturales que siempre me brindaron una solución cuando la necesité y me recibieron amablemente, gracias a todos por ser parte de esto. Principalmente a Silvina Casadei, al Dr. Peluffo.

## RESUMEN

En la provincia de La Pampa existe una gran vacancia respecto de herramientas para la evaluación control toxicológico de efluentes. Los bioensayos, como herramientas de laboratorio relativamente sencillas y económicamente accesibles, son una alternativa que es importante explorar. En este trabajo se implementan bioensayos estándar con semillas de trigo (*Triticum aestivum*) y se aplican en desagües pluviales y otros cuerpos ambientales, como modelos para la identificación de problemáticas particulares.

Se determinó el porcentaje de semillas de trigo germinadas, el porcentaje de inhibición del crecimiento de radícula e hipocótilo. Se utiliza como testigo positivo y para la realización de la curva de calibración el  $Zn^{2+}$ . Al aplicar el bioensayo para evaluar la toxicidad en distintos tipos de muestras, se observó que las muestras de la laguna Don Tomás no presentaron inhibición en el crecimiento mientras que las de las muestras tomadas en la estación de servicio mostró una diferencia significativa con respecto al control (18,48 y 17,17 % de inhibición para radícula e hipocótilo respectivamente).

Debido a la sensibilidad de la especie utilizada, al reducido tiempo de exposición de la prueba con semillas, a los bajos costos asociados y que no requiere equipamiento sofisticado, este bioensayo resultó ser un método versátil, sencillo y de bajo costo, recomendable para la evaluación de la toxicidad de efluentes o el monitoreo de procesos de detoxificación, saneamiento, control de efluentes o reutilización de biosólidos.

**Palabras clave:** Bioensayos, semillas, efluentes, toxicidad

## **Abstract en Ingles**

Our province has an important vacancy in relation to tools of evaluation and toxicological control of effluent. The implementation of relatively simple and economically accessible tools of laboratory such as bioassays is an important alternative.

It will be worked on the implementation of standard bioassays with wheat seeds (*Triticum aestivum*) to be used in rain drains and other environmental bodies that give an account for particular problems.

It was determined the percentage of germinate wheat seeds, the percentage of inhibition of radicle and hypocotyl growth. The  $Zn^{2+}$  is used as a positive witness and for the production of the calibration curve. Using the bioassay to evaluate the toxicity of different types of samples, it was observed that the samples taken from Don Tomas lagoon did not present growth inhibition, meanwhile, the samples taken from the gas station showed a significant difference in relation to the control (18,48 and 17,17% of radicle and hypocotyl inhibition respectively).

Due to the sensitivity of the species when exposed to the test with seeds in a reduced time, the low associated costs and the fact that it does not require sophisticated equipment, this bioassay resulted in a versatile, simple and low cost method, recommended for the evaluation of the toxicity of effluent or the monitoring of processes of detoxification, sanitation, effluent control or reuse of biosolids.

**Keywords:** Bioassays, seeds, effluent, toxicity.

# **INDICE GENERAL**

# **Página**

Prefacio	
Agradecimientos	
Resumen	
1. Introducción	1
1.1 Bioensayos con semillas	4
1.2 Efluentes	6
1.3 Área de estudio	7
1.3.1 Laguna Don Tomás	7
1.3.2 Agua de escorrentía	9
2. Objetivo	11
3. Materiales y Métodos	11
3.1 Equipo de laboratorio y materiales de laboratorio	11
3.2 Reactivos	11
3.3 Materiales Biológicos	12
3.3.1 Obtención, control y conservación de la semilla	12
3.4 Bioensayos de toxicidad aguda con semillas de trigo ( <i>Triticum aestivum</i> )	12
3.4.1 Preparación de las diluciones	12
3.4.2 Procedimientos realizados en el ensayo de toxicidad	13
3.4.3 Medida de los puntos finales de evaluación de la fitotoxicidad	15
3.4.3.1 Efectos en la germinación	16
3.4.3.2 Efectos en la elongación de la radícula e Hipocótilo	16
3.4.3.3 Control de la calidad de la prueba	18
3.5 Muestreo	18
3.6 Metodología Probit para el cálculo de CE <sub>50</sub>	19
3.7 Análisis estadístico de los datos	20
4 Resultados y Discusión	21
4.1 Efectos en la germinación	21
Determinación de CL <sub>50</sub> del tóxico de referencia: Zn <sup>2+</sup>	21

4.2 Determinación de la $CI_{50}$ del toxico de referencia: $Zn^{2+}$	22
4.3 Evaluación de la toxicidad de las muestras de agua de la Laguna Don Tomás	27
4.4 Evaluación de la toxicidad de las muestras de agua de una estación de servicio	28
5 Conclusiones	30
6 Bibliografía	31
7 Anexos	36

## 1. Introducción

Los acelerados procesos de contaminación que aquejan a la humanidad están, sin dudas, ligados al crecimiento de la población mundial y al aumento y diversificación de las actividades del hombre. Una de las formas básicas de prevenir los problemas derivados de la contaminación es el control periódico de la calidad del agua, es decir, conocer qué sustancias tiene disueltas o suspendidas. Para esto se debe hacer un análisis específico por cada una de las sustancias que se desee investigar, o en qué concentración se encuentran. Existen infinidad de organismos patógenos, que adicionalmente pueden afectar la salud de la población. Debido a la complejidad de las muestras y/o número posible de sustancias presentes, este análisis resulta difícil y muy caro. (1)

La toxicología es una ciencia que identifica, estudia y describe, la dosis, la naturaleza, la incidencia, la severidad, la reversibilidad y, generalmente, los mecanismos de los efectos tóxicos que producen los xenobióticos que dañan el organismo. La toxicología también estudia los efectos nocivos de los agentes químicos, biológicos y de los agentes físicos en los sistemas biológicos y establece, además, la magnitud del daño en función de la exposición de los organismos vivos a sustancias tóxicas, buscando a su vez identificar, prevenir y tratar las enfermedades derivadas de dichos efectos.

La disciplina que permite valorar el riesgo de las poblaciones de organismos nativos cuando son expuestas a un estrés ambiental, tal como la presencia de un contaminante a niveles críticos o potencialmente tóxicos, es la *Ecotoxicología*. La ecotoxicología y la valoración del riesgo ecológico para las sustancias tóxicas se encuentran en un estado de desarrollo, particularmente para los ecosistemas terrestres. Se requiere todavía de varios estudios para estandarizar las pruebas, validar los métodos e incrementar las bases de datos. Una de las principales metas de la ecotoxicología es producir datos que puedan usarse para predecir la respuesta probable de un estrés ambiental. (3)

La tendencia en Ecotoxicología es el ensayo sobre una batería de organismos a partir de diferentes niveles tróficos: descomponedores (microorganismos), productores primarios (algas y plantas), productores secundarios y consumidores (invertebrados y vertebrados). Esta consideración es particularmente útil para valorar contaminantes desconocidos, mezclas complejas y residuos peligrosos, debido a que alguno de sus componentes puede afectar solamente a un nivel trófico o



puede biomagnificarse (3). Además, a menudo, las sustancias potencialmente tóxicas pueden encontrarse en concentraciones tan bajas, o en condiciones ambientales tales, que son indetectables con los métodos químicos convencionales. La prevención, y más aún la corrección, de los efectos negativos de la contaminación es muy costosa. Países como Estados Unidos, Japón y los europeos, han incorporado a su rigurosa legislación de control de calidad del ambiente criterios que surgen de los bioensayos. (1)

Se entiende por bioensayo, un ensayo en que un tejido, organismo o grupo de organismos vivos se usan como sistema reactivo para determinar la potencia de cualquier sustancia o mezcla de sustancias fisiológicamente activa cuya actividad se desconoce. Los bioensayos, o pruebas de toxicidad, son estudios que miden el efecto de uno o más contaminantes en una o más especies, permiten evaluar el grado de toxicidad de una sustancia química, un efluente, un cuerpo de agua, etcétera, empleando organismos vivos. Puede determinarse la influencia relativa de cada factor sobre los parámetros biológicos estudiados. Los rangos de variación de los factores considerados pueden ser mayores que los existentes en el ambiente natural, lo que muchas veces facilita el estudio de su modo de acción. También pueden estudiarse combinaciones de dos o más factores, lo que permite revelar la existencia de antagonismos o sinergismos entre ellos. La posibilidad de controlar muchas de las variables hace posible la eliminación de las fluctuaciones propias de las condiciones naturales, que generalmente impiden o interfieren con la finalidad principal del estudio llevado a cabo. (4)

Para proteger el medio acuático es necesario fijar límites superiores a las descargas de contaminantes perjudiciales químicos y físicos, además de vigilar y regular las descargas que se realicen posteriormente. Los límites superiores de las descargas se derivan de la consideración de los criterios apropiados de calidad de agua formulados a partir de datos de respuestas para sistemas biológicos (bioensayos crónicos o agudos). (4)

Las pruebas pueden durar distintos periodos de tiempo, pero las de 96 horas son las más comunes. Los individuos son expuestos a concentraciones crecientes del tóxico para determinar cambios en el organismo. En general la muerte es el criterio más utilizado en la prueba de 96 horas. Uno o más controles son utilizados en organismos expuestos a similares condiciones excepto cuando existe falta de disponibilidad del tóxico. (4)

Los bioensayos toxicológicos tienen por finalidad determinar las concentraciones de un tóxico dado que ocasionen efectos dañinos o nocivos en un organismo modelo. Estos efectos pueden incluirse en las siguientes categorías:

- Afectación del término de vida
- Alteración de la tasa de crecimiento
- Cambios de los parámetros reproductivos (4)

La diversidad de organismos que se encuentran en la naturaleza se refleja en la variedad de procesos metabólicos y compuestos químicos de los cuales depende la vida en sus diferentes niveles de expresión, desde bacterias a plantas y animales superiores. Una sustancia con propiedades tóxicas puede serlo para un tipo de organismo pero no para otro, dependiendo con que compuestos de la célula interactúa. Por ello, se considera que tres es el mínimo de especies con las cuales se debe evaluar la toxicidad de una muestra, incluyendo representantes de organismos fotosintéticos y animales de dos niveles de complejidad. Una batería estándar incluye entonces a especies como el trigo o la lechuga), un invertebrado como el crustáceo (pulga de agua) *Daphnia* sp. y un vertebrado, normalmente peces.

En términos de toxicidad deberá evaluarse la toxicidad aguda y la toxicidad crónica. La primera se entiende como, aquellos efectos tóxicos que se manifiestan en un período breve de tiempo, generalmente medido en días. Existen en la actualidad protocolos internacionales para cuantificar esta toxicidad, los cuales plantean la necesidad de trabajar con una batería de especies que representen a los distintos niveles tróficos del sistema bajo estudio. Estos protocolos pueden adaptarse para trabajar con especies nativas o presentes en el sistema bajo estudio o monitoreo.

De la misma manera, se puede evaluar la toxicidad de muestras de efluentes líquidos antes de su descarga, en términos de toxicidad crónica. Estos bioensayos intentan obtener información, a partir de la determinación de variables que se vean afectadas por una exposición prolongada a concentraciones o diluciones (volumen/volumen) relativamente bajas, de manera que produzcan efectos sub-letales.

En ambos casos se definirán índices de toxicidad obtenidos mediante el análisis estadístico de los resultados de los bioensayos. Estos incluirán los siguientes:

- CE<sub>50</sub>-t: concentración de agente tóxico que causa inhibición del 50 % en un determinado parámetro, en relación a un tiempo de exposición (t).
- CI<sub>50</sub>: Concentración de un compuesto necesaria para inhibir el crecimiento del 50 % de la población expuesta.
- NOEC: concentración más alta de agente tóxico usada en el ensayo donde no se observan efectos adversos en la población expuesta.
- LOEC: concentración más baja del agente tóxico a la cual se registran efectos adversos en un determinado parámetro. (5)

## 1.1. Bioensayo con semillas

La necesidad de un tamizaje rápido de la toxicidad de sustancias químicas presentes en muestras ambientales, condujo al desarrollo de diferentes bioensayos a corto plazo para la determinación de toxicidad aguda, entre los que se encuentran los ensayos con plantas. Las pruebas de toxicidad a corto plazo de la inhibición de la germinación y la prolongación de la raíz de un vegetal se relacionan principalmente con los eventos de desarrollo temprano en el crecimiento y supervivencia de las plantas. Estos bioensayos pueden ser ejecutados con muchas especies económicamente importantes, fácilmente disponibles y que germinan y crecen rápidamente. La lechuga (*Lactuca sativa* L.) probablemente sea la especie más utilizada en la evaluación toxicológica de muestras ambientales, ya que muestra sensibilidad a estrés ambiental y cumple los requisitos necesarios como especie de prueba. (21)

Sin embargo, existen otras especies de plantas superiores que pueden utilizarse en estos ensayos, como por ejemplo: *Allium cepa*, *Glycine soja*, *Hordeum vulgare*, *Avena sativa*, *Zea mays*, *Lepidium sativum*, *Amarantus hipochondriatus*, *Phaseolus sp.*, *Triticum aestivum* y *Carthamus tinctorius*. Este bioensayo de toxicidad ha sido recomendado y aplicado por diferentes organismos de protección ambiental para la evaluación ecotoxicológica de muestras ambientales y compuestos puros, además de la evaluación del efecto fitotóxico de pesticidas sobre especies no blanco necesario para el registro de pesticidas. (22-26, 42)

En los bioensayos de toxicidad con semillas se evalúan los efectos adversos de los contaminantes en el proceso de germinación y en el desarrollo de las plántulas durante los primeros días de crecimiento. Se asume que una semilla ha germinado cuando la radícula protruye a través de su

cubierta exterior. Por lo tanto incluye numerosos eventos, por ejemplo, hidratación de proteínas, cambios de estructuras subcelulares, respiración, síntesis de macromoléculas y alargamiento de células, ninguno de los cuales por sí mismo determina la germinación. Pero sus efectos combinados transforman un embrión en reposo y deshidratado, con metabolismo apenas detectable, en uno que tiene un metabolismo vigoroso que culmina en el crecimiento. La germinación no incluye el crecimiento de la plántula el cual comienza cuando la germinación finaliza. Es importante destacar que durante la germinación y los primeros días de desarrollo ocurren numerosos procesos fisiológicos en los que la presencia de un compuesto tóxico puede interferir y alterar la supervivencia y el desarrollo normal de las plántulas. La división celular de los ápices radiculares puede afectarse, retardando el proceso de mitosis o alterando el proceso de alargamiento radicular, por lo que la fitotoxicidad de un compuesto puede ser determinada a través de la medición de dichas respuestas. (6,7) El bioensayo con semillas tiene la ventaja de permitir evaluar de manera directa la fitotoxicidad de muestras coloreadas o con elevada turbiedad y sin necesidad de filtración previa, reduciéndose así las interferencias debidas al pretratamiento además de simplificar el procedimiento de ensayo. (13)

Las semillas de trigo (*Triticum aestivum*) han sido utilizadas para evaluar la toxicidad tanto en muestras de suelo como en agua (30-32), en muestras contaminadas con hidrocarburos (33), en efluentes industriales y aguas residuales domésticas (34,35,38,39), en estudios de toxicidad de antibióticos, antiinflamatorios, herbicidas y metales (Hg, Cd, Co, Cu y Zn) (29, 36, 37,40, 41). Así, el bioensayo estándar de toxicidad con semillas de *T. aestivum* se implementa como una prueba estática de toxicidad aguda (120 h de exposición) en la que se pueden evaluar los efectos fitotóxicos de compuestos puros o de mezclas complejas en el proceso de germinación de las semillas y en el desarrollo de las plántulas durante los primeros días de crecimiento. Como puntos finales para la evaluación de los efectos fitotóxicos, se determina la inhibición en la germinación y la inhibición en la elongación de las radículas y del hipocótilo. (9, 27,28)

A diferencia de la prueba tradicional de germinación de semillas, la evaluación del efecto en la elongación de la radícula y del hipocótilo permiten evaluar el efecto tóxico de compuestos solubles presentes en concentraciones tan bajas que no son suficientes para inhibir la germinación, pero que sí pueden retardar o inhibir completamente los procesos de elongación de la radícula o del hipocótilo, dependiendo esto del modo y sitio de acción de los contaminantes. De esta manera, la inhibición en la elongación de la radícula e hipocótilo constituyen indicadores subletales muy

sensibles para la evaluación de efectos biológicos en vegetales aportando información complementaria a la proporcionada al estudiar los efectos en la germinación. (13)

La cantidad total de agua y/o solutos tomada durante la inhibición es generalmente baja y en general no excede las tres veces el peso seco de la semilla. La inhibición depende de varios factores como el movimiento del agua hacia la semilla, en donde el potencial de agua y la permeabilidad de la cubierta de la semilla son factores de mayor importancia. (7) En la incorporación de esta prueba en una batería de bioensayos, es importante considerar el reducido tiempo de exposición de la prueba con semillas, los bajos costos asociados y que no requiere equipamiento sofisticado, en particular en la aplicación a muestras ambientales o en el monitoreo de procesos de detoxificación, saneamiento, control de efluentes o reúso de biosólidos. (9)

## **1.2. Efluentes**

Según Mara (1976): “Las aguas residuales pueden definirse como las aguas que provienen del sistema de abastecimiento de agua de una población, después de haber sido modificadas por diversos usos en actividades domésticas, industriales y comunitarias.” (8)

Según su origen, las aguas residuales resultan de la combinación de líquidos y residuos sólidos transportados por el agua que proviene de residencias, oficinas, edificios comerciales e instituciones, junto con los residuos de las industrias y de actividades agrícolas, así como de las aguas subterráneas, superficiales o de precipitación que también pueden agregarse eventualmente al agua residual.

Las aguas residuales domésticas son aquellas utilizadas con fines higiénicos (baños, cocinas, lavanderías, etc.). Consisten básicamente en residuos humanos que llegan a las redes de alcantarillado por medio de descargas de instalaciones hidráulicas de la edificación, también en residuos originados en establecimientos comerciales, públicos y similares) están constituidas en un elevado porcentaje (en peso) por agua, cerca de 99,9 % y apenas 0,1 % de sólidos suspendidos, coloidales y disueltos. Esta pequeña fracción de sólidos es la que presenta los mayores problemas en el tratamiento y su disposición. El agua es apenas el medio de transporte de los sólidos.

El agua residual está compuesta de componentes físicos, químicos y biológicos. Es una mezcla de materiales orgánicos e inorgánicos, suspendidos o disueltos en el agua. La mayor parte de la materia orgánica consiste en residuos alimenticios, heces, material vegetal, sales minerales, materiales orgánicos y materiales diversos como jabones y detergentes sintéticos. (8)

Los residuos líquidos en las estaciones de servicio, se generan en las siguientes operaciones:

Actividades de la Estación de Servicio:

- Lavado de pisos;
- Derrames y pérdidas de gasolina, solventes, aceites y grasas;
- Mantenimiento de vehículos;
- Aguas lluvia.

Servicio de Lavado de Automóviles

- Lavado automático de automóviles, y lavado manual de carrocería, chasis y motores.

Los residuos contienen principalmente sólidos suspendidos (barro), aceites y grasas, solventes halogenados y restos de combustibles. En los casos de contar las estaciones de servicio con lavado de vehículos, contienen además desengrasantes, detergentes y ceras especiales. Los otros residuos líquidos que se generan en las estaciones de servicio, son las aguas domésticas provenientes de los baños, duchas y centros de expendio de alimentos. (19)

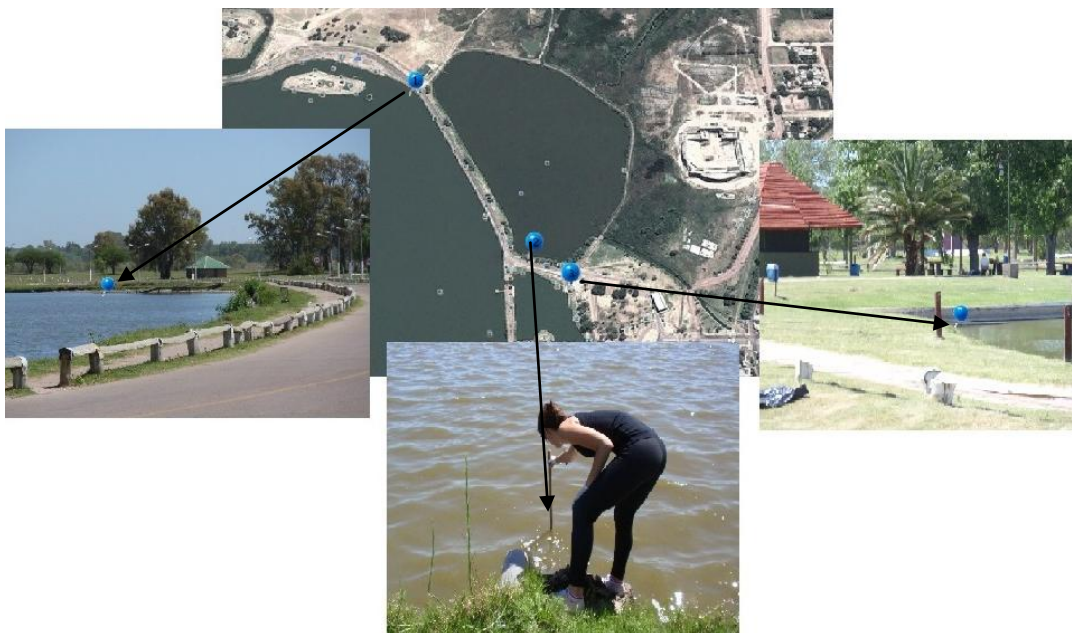
## **1.3. Área de Estudio**

### **1.3.1. Laguna Don Tomás**

La Laguna Don Tomás, situada en la región occidental de la ciudad de Santa Rosa, capital de la Provincia de La Pampa, Argentina, pertenece al grupo de las lagunas de la región fisiográfica oriental de la provincia y posee una superficie aproximada de 200-220 ha, con una profundidad media que oscila entre 2,5 y 3 metros. Según datos del Servicio Meteorológico Nacional, la temperatura media anual para la ciudad de Santa Rosa es de 15°C y la Precipitación Media Anual de 600 mm. (15)

La Laguna Don Tomás, está conformada por 3 cuencos principales, (Fig.1) (el cuenco mayor, el de canotaje y la denominada Isla Chica) y lagunas estacionales. La principal función del espejo de agua es funcionar como receptor de la escorrentía urbana. (16) Reviste un interés particular, ya que

por estar ubicada en un parque público tiene un importante uso recreativo, tanto por su interés paisajístico como porque en ella se desarrolla pesca deportiva. A efectos de evitar inundaciones en las zonas bajas de la ciudad, posee un sistema de bombas, que se pone en funcionamiento cuando existe riesgo de desbordes y envía el agua excedente a un cuenco situado al sur de la ciudad. El análisis del contenido iónico realizado en una muestra de agua tomada en noviembre del 2006 mostró que Don Tomás es una laguna bicarbonatada sódica. Las concentraciones de nutrientes registradas durante el período estudiado, fueron altas. (10)



**Fig. 1:** Toma de muestras en La Laguna Don Tomás.

La laguna Don Tomás puede ser categorizada como turbia. La escasa transparencia está dada por la alta cantidad de materiales sólidos en suspensión. La cantidad de sólidos suspendidos de origen inorgánico fue siempre reducida, indicando que la proporción de sedimentos en suspensión es baja. En cambio la fracción sestónica de origen orgánico fue siempre mayor. El estado turbio de Don Tomás se ve favorecido no sólo por las características antrópicas de la laguna y su estrecha relación con la ciudad, que hacen que reciba cantidades altas de nutrientes sino también por el efecto producido por la presencia de pejerreyes. (10)

El informe físico químico y microbiológico resulta que el agua es de muy buena calidad para diversos usos como son las actividades náuticas, pesca y recreación en general con la excepción de que no es apta para consumo humano. En la columna de agua y fracción barros los metales pesados que han sido investigados se encuentran muy diluidos y en bajas concentraciones en el

compartimento ambiental agua. Por el contrario se encuentran en mayores concentraciones en sedimentos-barros dentro del compartimento ambiental suelo del humedal, observándose una mayor proporción de Zinc. Ambos valores (agua y barros) contrastados con normas canadienses (CCME) arrojaron resultados aceptables para la protección de la vida acuática. (11)

El fósforo y el nitrógeno son dos elementos químicos fundamentales para los seres vivos, al punto de ser considerados nutrientes esenciales, ya que forman parte de sustancias de elevada importancia biológica como ácidos nucleicos y proteínas. En los ecosistemas acuáticos, estos nutrientes son tomados por los productores primarios, directamente desde el agua en el caso del fitoplancton o macrófitas flotantes y desde los sedimentos en el de algas bentónicas o macrófitas arraigadas, desde donde pasan al resto de la trama trófica. (12)

Por otro lado, la concentración de nutrientes en el agua, en particular del fósforo, es uno de los factores responsables del estado trófico de un ambiente. Cantidades pequeñas determinan ambientes oligotróficos, poco productivos y de alta transparencia del agua y a la inversa, cantidades grandes están presentes en ambientes eutróficos, en los que la elevada productividad biológica resulta en reducida transparencia del agua. La eutrofización se puede definir como un abastecimiento excesivo de nutrientes como el nitrógeno y el fósforo a los cuerpos de agua. (12)

### **1.3.2. Agua de escorrentía**

El primer aluvión de líquido torrencial urbano puede ser extremadamente sucio. El agua de tormenta posiblemente se contamine cuando baja por los caminos asfaltados u otras superficies impermeable, o a partir de químicos del césped disueltos en el líquido torrencial, antes de ingresar en el drenaje.

El agua que llega corriendo de estas superficies impermeables tiende a recoger gasolina, aceite lubricante, metales pesados, basura y otros contaminantes procedentes de caminos y playas de estacionamiento (zonas de aparcamiento), como así también fertilizantes y plaguicidas procedentes de céspedes. Los caminos y playas de estacionamiento son fuentes importantes de níquel, cobre, zinc, cadmio, plomo e hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), que aparecen como productos derivados de la combustión de gasolina y otros combustibles fósiles. El líquido torrencial de las azoteas contribuye con altos niveles de compuestos orgánicos sintéticos y zinc (procedente de





## 2. Objetivos

- Puesta a punto y estandarización de la técnica de bioensayos con semillas
- Determinación de toxicidad de efluentes mediante el uso de bioensayos con semillas

## 3. Materiales y Métodos

### 3.1. Equipos de Laboratorio y Material de laboratorio

pHímetro DEVER INSTRUMENT ultraBASIC	Cápsula de Petri 90 mm de diámetro
Balanza analítica Adventurer™ OHAUS	Caja de cartón
Cámara oscura termostatzada ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ )	Varilla de vidrio
Pipeta volumétricas de 5ml, 10ml	Regla u otro elemento de medición
Matraces aforados de 100, 50 y 25 ml	Pinzas
Bureta de 250ml	Toallas de papel
Espátula	Guantes
Vasos de precipitado de 100 ml	Papel de filtro Whatman núm. 3 (o equivalente), 90 mm de diámetro.
Pro-pipetas	

El papel de filtro que se seleccione como sustrato de germinación debe tener las siguientes características:

- Trama amplia y porosa que asegure una buena capacidad de retención de líquido.
- Resistencia de la fibra del papel para que las radículas crezcan por su superficie sin atravesarlo, situación que dificultaría la remoción de las plántulas sin dañarlas.
- Ausencia de residuos tóxicos (ej. blanqueadores).
- Que no promueva el desarrollo de hongos (no asociados a las semillas)

### 3.2. Reactivos

Todos los reactivos utilizados en este trabajo fueron de calidad p.a.

Sulfato de magnesio ( $MgSO_4$ )	Cloruro de potasio (KCl)
Bicarbonato de sodio ( $Na_2CO_3$ )	Cloruro de zinc ( $ZnCl_2$ )
Sulfato de calcio di hidratado ( $CaSO_4 \cdot 2H_2O$ )	Ácido clorhídrico (HCl)

### 3.3. Material biológico

#### 3.3.1. Obtención, control y conservación de las semillas

En este ensayo se utilizaron semillas de *T. aestivum*, producidas en la EEA INTA- Anguil. "Ing. Agr. Guillermo Covas" cosecha 2012. Las semillas seleccionadas se almacenaron fraccionadas a 4°C, en oscuridad y en ambiente seco. Conservadas en estas condiciones mantienen su vigor al menos durante dos años. Un indicador de la reducción de la vitalidad y envejecimiento de las semillas es la reducción en el poder germinativo y el aumento en la variabilidad de las medidas de elongación de radícula e hipocótilo en el control negativo. En este caso se realizan las pruebas de toxicidad utilizando un nuevo lote de semillas. (9)

### 3.4. Bioensayo de toxicidad aguda con semillas de *T. aestivum*

#### 3.4.1. Preparación de las diluciones

Para realizar una curva dosis-respuesta se prepararon diluciones de la muestra o compuesto a estudiar, (Fig. 3), de manera que se obtengan valores de toxicidad intermedios entre el 100 y 0%. Para la curva de calibración se recomienda el uso de un factor de dilución de 0,1 - 0,25 o 0,5 para la preparación de la serie de diferentes concentraciones. El uso de un factor de 0,25 permite evaluar la toxicidad considerando el intervalo entre el 80 y 0,01g/l de la muestra realizando seis diluciones (80, 20, 5, 1,25 0,31 y 0,01g/l). Al aplicar un factor de dilución de 0,5, se obtienen los puntos (0,63 y 0,16 g/l) empezando de la concentración 1,25%. Y con el factor de dilución de 10% y arrancando de la concentración de 5 g/l, obtenemos el punto 0,5.



**Fig. 3:** *Curva de calibración.*

Como compuesto tóxico de referencia (control positivo del ensayo) se utilizó  $ZnCl_2$ . El  $Zn^{2+}$  reduce los porcentajes de germinación de las semillas de *T. aestivum* e inhiben el crecimiento de las raíces de las plantas. Las concentraciones no letales de  $Zn^{2+}$  ejercen un efecto inhibitorio sobre la división celular en las puntas de las raíces de las plantas y provocan una disminución en sus valores de índice mitótico. Este efecto es más evidente en raíces de *T. aestivum* que en las de *L. sativa*.

La inhibición de la germinación de las semillas y el retraso en el crecimiento de la raíz y crecimiento de las plántulas se relacionan con la toxicidad de los iones metálicos ( $Zn^{2+}$ ) debido a la alteración de los procesos fisiológicos y la inducción de aberraciones cromosómicas que conducen a la detención mitótica y muerte celular o pueden ser el resultado de la fijación de  $Zn^{2+}$  por los tejidos de las plantas. También pueden ser debido a la perturbación de la relación osmótica que a su vez afecta a algunos parámetros metabólicos durante la fase temprana de la germinación (18, 39, 40, 43, 44-46).

### **3.4.2. Procedimiento realizado en el ensayo de toxicidad**

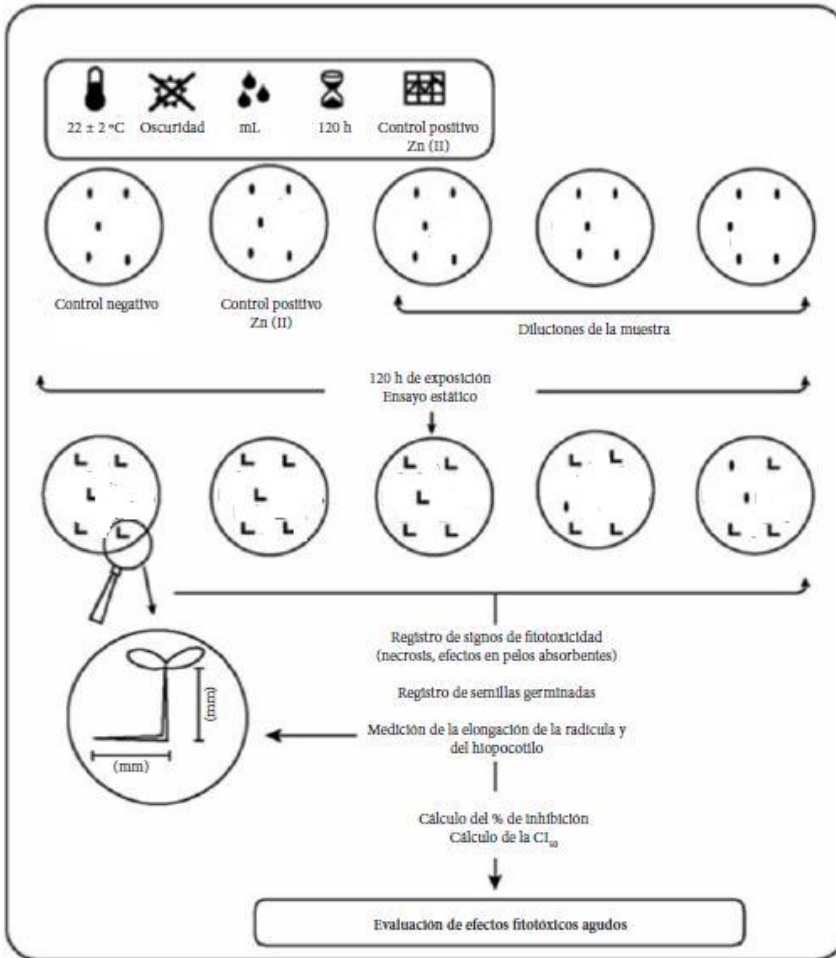
Las condiciones recomendadas para el ensayo de toxicidad se resumen en la **Tabla 1** (9). El procedimiento realizado para de la prueba de toxicidad en semillas de trigo se esquematiza en la Fig. 4.

- En cada cápsula de Petri se colocó un disco de papel de filtro.

- Se saturó el papel de filtro con 3,5 ml de la dilución muestra, evitando la formación de bolsas de aire.
- Se colocaron cuidadosamente 5 semillas, dejando espacio suficiente entre ellas para permitir la elongación de las raíces.
- Se taparon las cápsulas y se colocaron en una caja para evitar la pérdida de humedad. Dado que algunas variedades de semillas de trigo requieren oscuridad para que se produzca la germinación (semillas fotoblásticas negativas), las cajas de Petri se cubrieron de la luz inmediatamente después de colocarlas en las semillas y durante el periodo de ensayo. Se incubaron durante 120 h (cinco días) a una temperatura de  $22 \pm 2$  °C. Se realizó por triplicado cada dilución ensayada.

**TABLA 1:** condiciones de las pruebas las pruebas de toxicidad con *T. aestivum*, adaptadas desde los ensayos propuestos para *L. sativa*.

1	Tipo de ensayo	Estático
2	Temperatura	$22 \pm 2$ °C
3	Calidad de luz	Oscuridad
4	Volumen de solución de prueba	3,5 mL
5	Agua de dilución	
6	Número de semillas por réplica	5
7	Número de réplicas	Tres
8	Duración de la prueba	120 h
9	Efecto medido	Inhibición en elongación de la radícula e hipocótilo. Inhibición en la germinación
10	Resultado final	CE <sub>50</sub> o CI <sub>50</sub> % inhibición
11	Aceptabilidad de los resultados	Germinación > 90% Control positivo y negativo de acuerdo con los valores: admitidos en las cartas control.
12	Control positivo	Zn <sup>2+</sup>



**Fig. 4:** Esquema general del procedimiento de la prueba de toxicidad en semillas de trigo (adaptado de (9))

### **3.4.3. Medida de los puntos finales de evaluación de la fitotoxicidad**

Cada punto final se evalúa comparando el efecto generado en los organismos expuestos a la muestra con respecto a la respuesta en los organismos del control negativo, como se ilustra en Fig. 5, sujetos a las mismas condiciones de ensayo, excepto por la ausencia de muestra.



**Fig. 5:** Placa de Petri con control negativo.

Terminado el periodo de exposición (120 h), se procedió a cuantificar el efecto en la germinación y en la elongación de la radícula y del hipocótilo. (26, 27)

#### 3.4.3.1. Efecto en la germinación

Se registró el número de semillas que germinaron normalmente, considerando como criterio de germinación la aparición visible de la radícula. Luego se determinó el porcentaje de semillas no germinadas y utilizando la metodología probit se calculó la  $CL_{50}$  correspondiente. (26, 27)

#### 3.4.3.2. Efecto en la elongación de la radícula e hipocótilo

La planta de trigo tiene entre 3, 4 y 5 radículas, (Fig. 6) a diferencia de la planta de lechuga que tiene una sola raíz, para estandarizar el método se utilizó la medida de la raíz más larga.

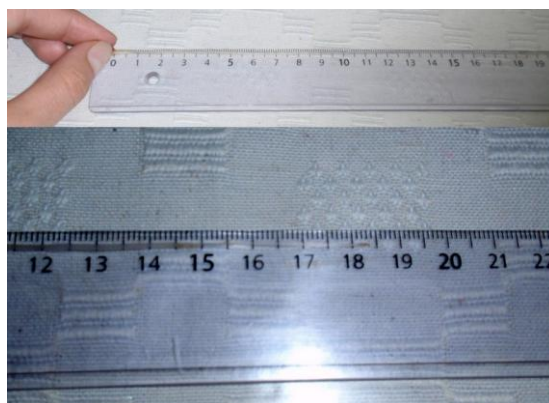


**Fig. 6:** Radículas de la planta de trigo.

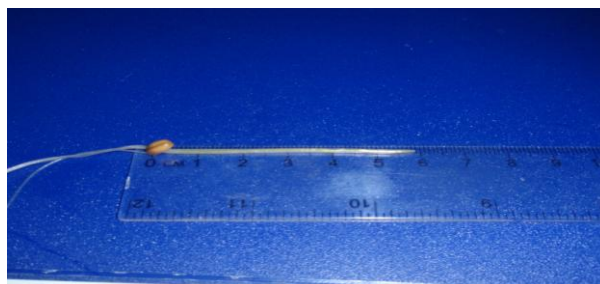
Para facilitar la medición de la radícula e hipocótilo, se congelaron las cápsulas de Petri correspondientes a todos los tratamientos y fueron descongeladas a medida que se fueron midiendo (no se conservó el material luego de ser descongelado). De esta manera, las plántulas descongeladas adquieren una consistencia blanda, favoreciendo la medición. Si se procede a evaluar el efecto sobre las plantas descongeladas es importante proceder de igual manera con todas las réplicas de la prueba. Este procedimiento reduce la variabilidad en las medidas, principalmente cuando el crecimiento de las radículas es ensortijado o no es parejo. La observación general de efectos fitotóxicos en las plantas vivas al finalizar el periodo de exposición, se realiza previo al congelamiento del material.

Utilizando una regla (30 cm de rango, sensibilidad 1 mm), se midió cuidadosamente la longitud de la radícula y del hipocótilo de cada una de las plántulas correspondientes a cada concentración de tóxico o dilución de muestra y a los controles.

La medida de elongación de la radícula se consideró desde el nudo, (región más engrosada de transición entre la radícula y el hipocótilo) hasta el ápice radicular (Fig. 7). La medida de elongación del hipocótilo se consideró desde el nudo hasta el sitio de inserción de los dos cotiledones. (Fig. 8)



**Fig. 7:** *medición de la radícula.*



**Fig. 8:** *Medición del hipocotilo.*

Antes de retirar las plántulas de las cápsulas de Petri para evaluar el efecto en los puntos finales anteriormente mencionados, se realizó una observación detallada del estado general de las mismas y del crecimiento de la radícula sobre el papel de filtro. Se tuvo en cuenta cualquier indicador de fitotoxicidad o de crecimiento anormal en las plántulas tratadas y en los controles (ápices radiculares con necrosis, pelos absorbentes poco desarrollados, radículas con crecimiento ensortijado, necrosis en los cotiledones, etcétera). La necrosis (presencia de tejido muerto) se evidencia como manchas localizadas de coloración parda, blanca o marrón. Al evaluar el efecto en la germinación, se consignan además aquellas semillas con germinación anormal (emergencia de



cotiledones o cotiledones e hipocótilo solamente, pero sin emergencia de la radícula) o con desarrollo de hongos.

### 3.4.3.3. Control de calidad de la prueba

Es importante establecer cuáles son los valores de elongación en el control negativo, así como la sensibilidad de las semillas frente al compuesto tóxico de referencia (control positivo), determinando para cada lote de semillas utilizado el valor de  $CE_{50}$ . (14)

Se realizaron cartas control para evaluar el crecimiento en los controles negativos (promedio  $\pm \sigma$  de la elongación de la radícula) y de la sensibilidad frente al compuesto tóxico de referencia (promedio  $\pm \sigma$  de la  $CE_{50}$  para el  $Zn^{2+}$  preparado a partir de cloruro de zinc). (14)

Para que los resultados obtenidos sean aceptados, los valores de los Controles positivo y negativos deben concordar con los valores admitidos en las cartas control:

El ensayo se repite en caso de que los controles presenten:

En el control negativo:

- Porcentaje de germinación inferior al 90%.
- Alta variabilidad en la elongación de la radícula ( $CV > 30\%$ ).

En el control positivo:

- Porcentaje de germinación inferior al 90%.
- Variación de la sensibilidad de las semillas fuera de lo permitido por las cartas control.

## 3.5. Muestreo

Los muestreos se hicieron en la Laguna Don Tomás y en la estación de servicio Petrobras de la calle 9 de julio. Las muestras de la laguna se tomaron con un bidón de 5 litros y de ahí se sellaron botellas de 500 cm<sup>3</sup>. Se tomaron de las 3 lagunas que tiene el predio, las muestras se recogieron de 1 m de profundidad y 1 m de ancho. Las muestras fueron 4 ya que una de ellas se extrajo por duplicado y ese duplicado pasó por un proceso de aireación. (Fig. 1)

Las muestras de la estación de servicio se recogieron del cordón de la vereda de la estación de servicio con una jeringa, teniendo cuidado de extraer la mayor cantidad de residuos de nafta y aceite que quedan en la superficie de los charcos luego de una lluvia. (Fig. 9 A) Todas las muestras se conservaron congeladas hasta el día del ensayo.



**Fig. 9;** A: *Muestra de la estación de servicio.* B: *bioensayo correspondiente.*

### **3.6. Metodología Probit para el cálculo de $CE_{50}$**

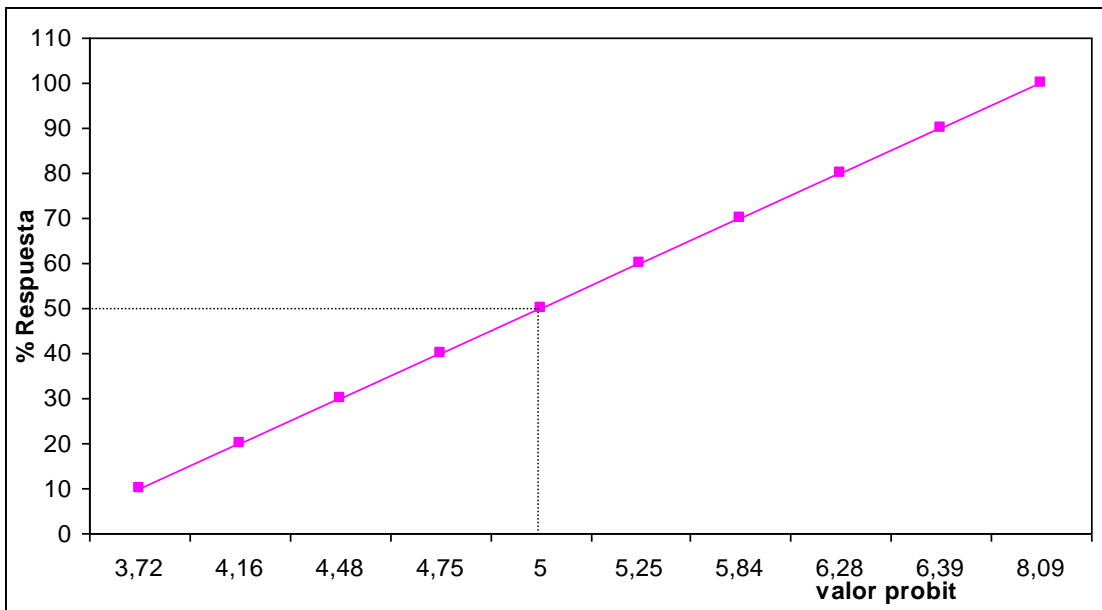
Para el cálculo de la  $CE_{50}$  y sus respectivos límites de confianza al 95% se utilizó el método Probit. (2, 17) Este método permite estimar la  $CE_{50}$ , ajustando los datos para estimar valores que siguen una distribución logarítmica. El porcentaje de inhibición de la plántula por la acción tóxica de una sustancia se transforma a unidades Probit. Esta transformación permite el ajuste a una línea de regresión, en la cual la concentración perteneciente al Probit 5; corresponderá a la cantidad de sustancia capaz de generar el efecto estudiado en la mitad de la población (Tabla 2 y Gráfico 1)

Una de las restricciones del método es que para el cálculo de la  $CE_{50}$  deben obtenerse valores intermedios entre 0 y 100% de mortalidad.

La aceptabilidad de los resultados depende de:

- La mortalidad en el control negativo no debe exceder el 10%.
- La  $CE_{50}$  para el tóxico de referencia deberá estar dentro de los límites de confianza preestablecidos en la carta control (9).

**Grafico 1:** *Trasformación del % de respuesta a unidades probit.*



**Tabla 2:** *Equivalencia entre valores probit y porcentaje de población afectada. (20)*

Pr	%	Pr	%	Pr	%	Pr	%	Pr	%	Pr	%	Pr	%	Pr	%	Pr	%	Pr	%	Pr	%
0	0	3,72	10	4,16	20	4,48	30	4,75	40	5,00	50	5,25	60	5,52	70	5,84	80	6,28	90	7,33	99,0
2,67	1	3,77	11	4,19	21	4,50	31	4,77	41	5,03	51	5,28	61	5,55	71	5,88	81	6,34	91	7,37	99,1
2,95	2	3,82	12	4,23	22	4,53	32	4,80	42	5,05	52	5,31	62	5,58	72	5,92	82	6,41	92	7,41	99,2
3,12	3	3,87	13	4,26	23	4,56	33	4,82	43	5,08	53	5,33	63	5,61	73	5,96	83	6,48	93	7,46	99,3
3,25	4	3,92	14	4,29	24	4,59	34	4,85	44	5,10	54	5,36	64	5,64	74	5,99	84	6,55	94	7,51	99,4
3,36	5	3,96	15	4,33	25	4,61	35	4,87	45	5,13	55	5,39	65	5,67	75	6,04	85	6,64	95	7,58	99,5
3,45	6	4,01	16	4,36	26	4,64	36	4,90	46	5,15	56	5,41	66	5,71	76	6,08	86	6,75	96	7,65	99,6
3,52	7	4,05	17	4,39	27	4,67	37	4,92	47	5,18	57	5,44	67	5,74	77	6,13	87	6,88	97	7,75	99,7
3,59	8	4,08	18	4,42	28	4,69	38	4,95	48	5,20	58	5,47	68	5,77	78	6,18	88	7,05	98	7,88	99,8
3,66	9	4,12	19	4,45	29	4,72	39	4,97	49	5,23	59	5,50	69	5,81	79	6,23	89	7,33	99	8,09	99,9

### 3.7. Análisis estadístico de los datos

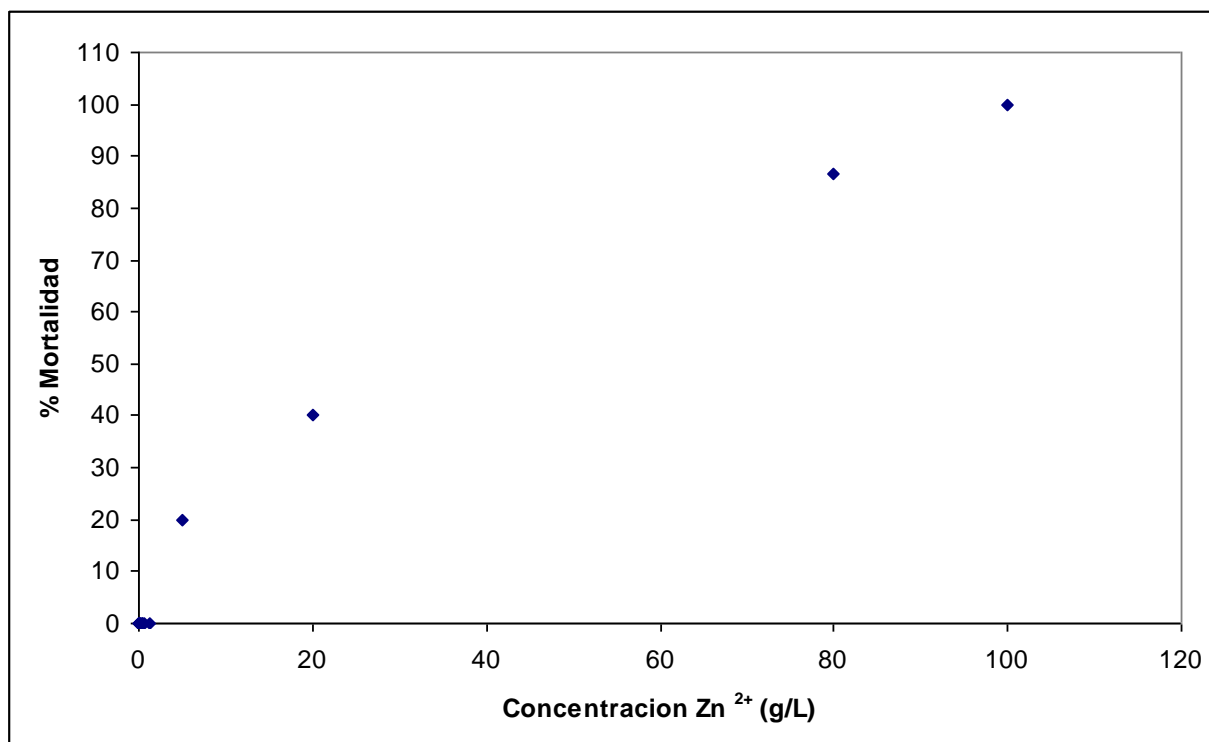
Para comparar la respuesta de las semillas de trigo en las distintas muestras analizadas, se utilizó el test de  $t$  no apareado, test de Manwhitney (en caso de datos no paramétricos) y test de Welch (para muestras con desviaciones estándar distintas). Este análisis estadístico de datos se realizó con el programa GraphPad InStat 3.10 (GraphPad Software Inc, 2009).

## 4. RESULTADOS y DISCUSIÓN

### 4.1. Efecto en la germinación. Determinación de la $CL_{50}$ del tóxico de referencia: $Zn^{2+}$

A cada concentración del tóxico de referencia se contabilizó la cantidad de semillas germinadas y no germinadas, y se determinó el % de mortalidad en cada punto. Como se puede observar, el comportamiento de la germinación es inversamente proporcional a la concentración, es decir, que al aumentar la concentración del agente tóxico, la germinación se hace más vulnerable, disminuyendo el número de semillas expuestas germinadas. En el gráfico 2 se muestra el porcentaje de mortalidad de las semillas, es decir, el porcentaje de semillas que no germinaron durante las pruebas de sensibilidad a las diferentes concentraciones del tóxico de referencia ( $ZnCl_2$ ).

**Gráfico 2:** *Porcentaje de mortalidad de las semillas.*



El % de mortalidad comienza a aumentar a partir de 1,25 g/L y a 80 g/L ya alcanza un valor de 86,7% de mortalidad.

Utilizando el programa Probit (EPA, versión 1.5) se determinó la  $CL_{50}$  18, 647 g/L (11,245-29,229) (Fig 10)

**Fig. 10:** Cálculo del  $CL_{50}$  utilizando el programa Probit

Estimated LC/EC Values and Confidence Limits			
Point	Exposure Conc.	95% Confidence Limits Lower	Upper
LC/EC 1.00	1.337	0.252	3.088
LC/EC 5.00	2.893	0.814	5.621
LC/EC 10.00	4.366	1.507	7.809
LC/EC 15.00	5.764	2.268	9.809
LC/EC 50.00	18.647	11.245	29.229
LC/EC 85.00	60.324	37.486	129.532
LC/EC 90.00	79.638	47.609	192.860
LC/EC 95.00	120.185	66.844	353.041
LC/EC 99.00	260.064	122.962	1127.246

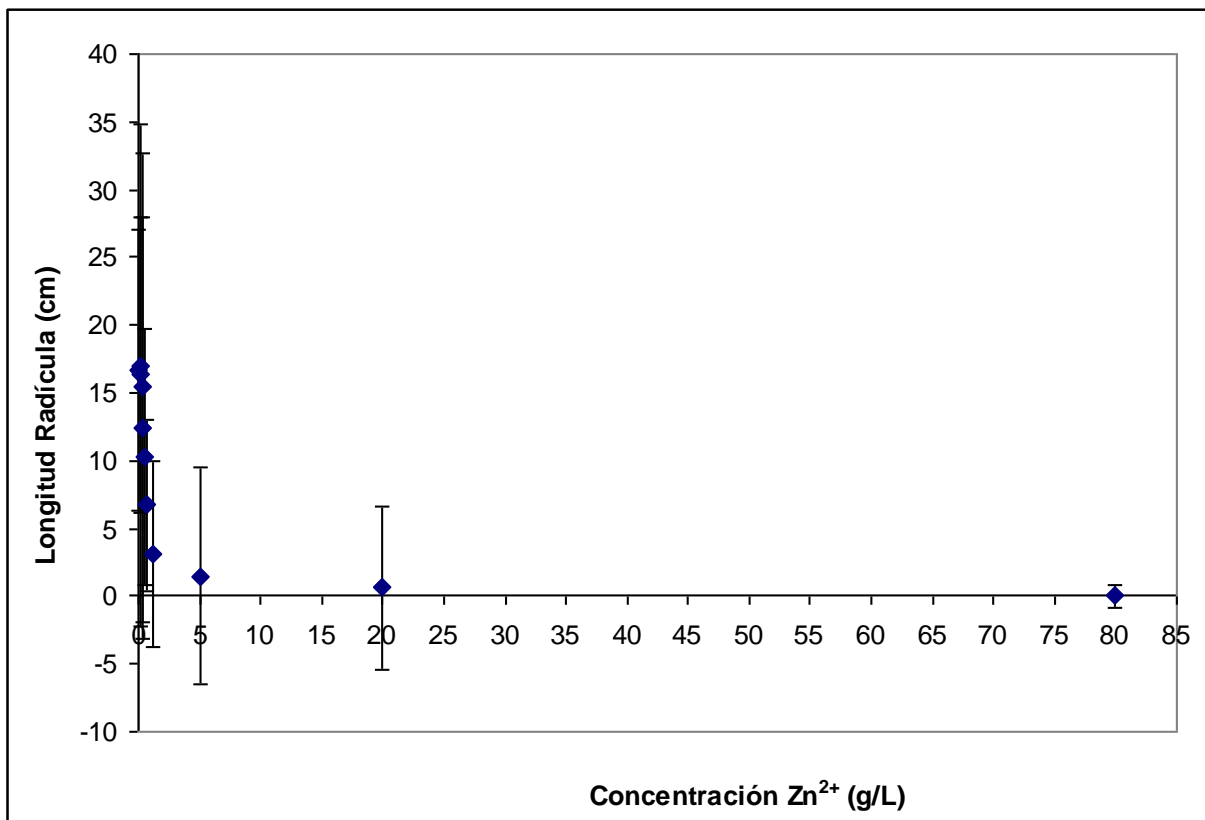
#### 4.2. Determinación de la $CI_{50}$ del tóxico de referencia: $Zn^{2+}$

##### Radícula:

Los bioensayos de toxicidad aguda en semillas de trigo utilizando como tóxico de referencia al  $Zn^{2+}$ , preparado a partir de distintas diluciones de  $ZnCl_2$ . Se puede observar que la longitud de la radícula va disminuyendo al aumentar la concentración del  $Zn^{2+}$ . (Grafico 3)

En el gráfico 3, se muestra la curva de Dosis-Respuesta para radícula de semillas de *T. aestivum*, donde se puede observar que la disminución se vuelve particularmente acentuada cuando la concentración de  $Zn^{2+}$  es mayor a 1 g/L.

**Gráfico 3:** Curva Dosis-Respuesta para radícula de semillas de Trigo (*Triticum aestivum*)

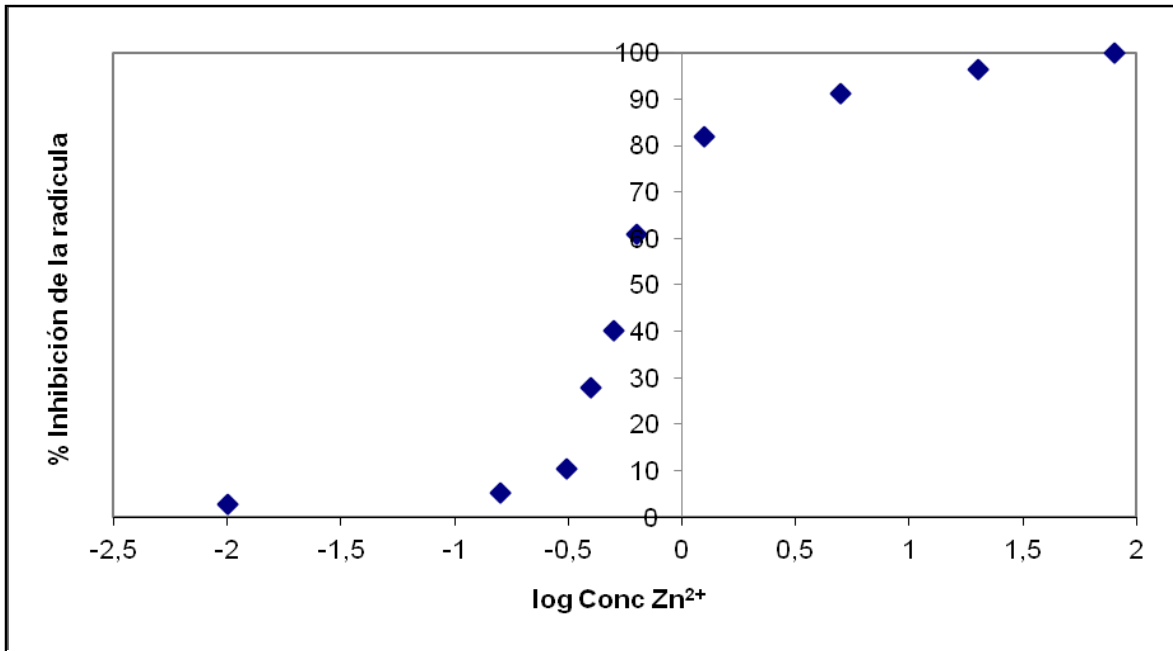


El crecimiento promedio, tanto de radícula como del hipocótilo de las semillas de trigo, se establece como porcentaje en relación al control, el cual se asume como 100 %. Posteriormente, se consideran solo los efectos negativos, que se obtienen calculando la disminución del porcentaje de crecimiento de los tratamientos con respecto al control. Con estos datos se construye la curva dosis-respuesta y se calcula la  $CI_{50}$  (17). Se calculó el porcentaje de inhibición de crecimiento de la radícula (R) con la fórmula siguiente:

$$\% \text{ Inhibición} = 100 \left( \frac{\text{Longitud } R_{\text{Control}} - \text{Longitud } R_M}{\text{Longitud } R_{\text{Control}}} \right)$$

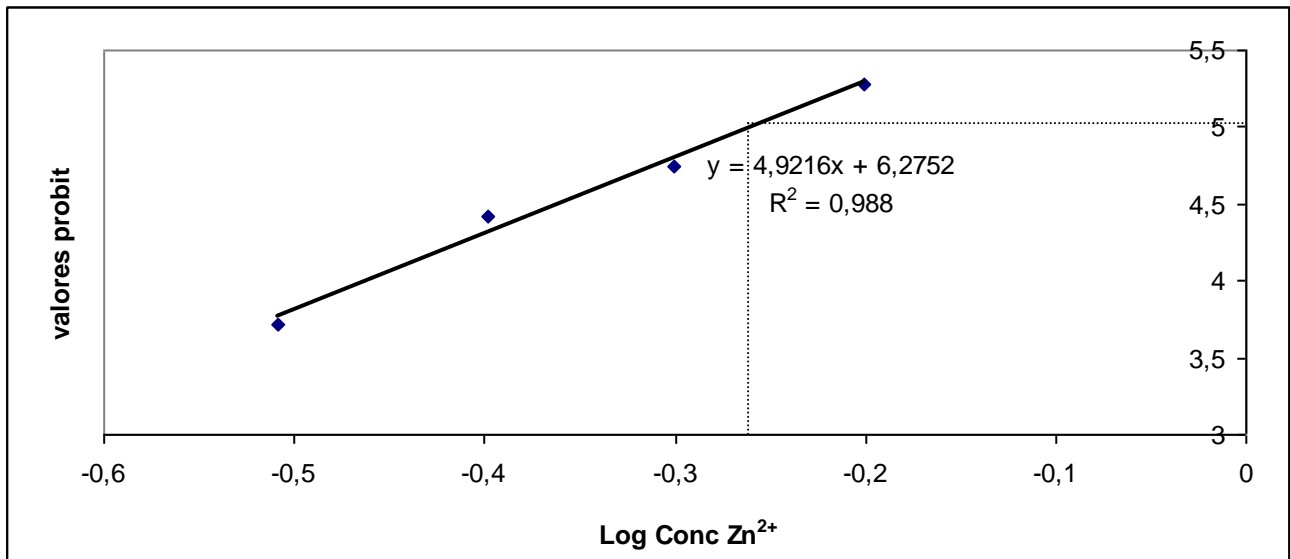
A partir de los datos de % de inhibición se obtiene la curva de dosis respuesta que se muestra en el gráfico 4. Se observa como a medida que aumenta la concentración del tóxico el crecimiento de la radícula se inhibe.

**Gráfico 4:** Curva Dosis-Respuesta de *T. aestivum* (% de inhibición vs Log C).



Para obtener la  $CI_{50}$ , se determina el valor probit para cada concentración (Gráfico 5). El transformar los datos de % de inhibición en valores probit, permite linealizar la curva de Dosis-Respuesta y facilitar el cálculo matemático de la  $CI_{50}$ .

**Gráfico 5:** Curva Dosis-Respuesta *T. aestivum* (Valores probit vs Log C).



A partir de la Ecuación de la recta en la zona lineal de la curva de Dosis-Respuesta se calcula la  $CI_{50}$ , la cual corresponde al valor de probit 5 (50% de respuesta):

$$y = 4,9216x + 6,2752$$

$$5 = 4,9216x + 6,2752$$

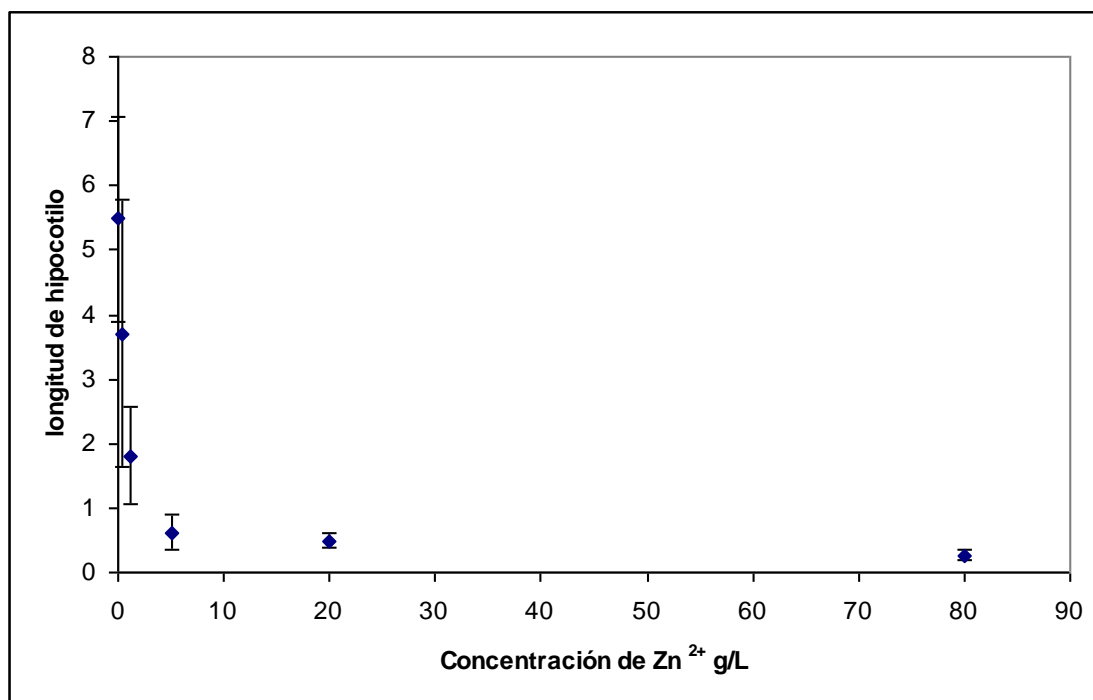
$$\rightarrow x = (5 - 6,2752) / 4,9216 = -0,25910273$$

$$\rightarrow CI_{50} = \text{antilog } -0,25910273 \rightarrow CI_{50} = 0,55 \text{ g/L}$$

### Hipocótilo:

Los bioensayos de toxicidad aguda en semillas de trigo utilizando como tóxico de referencia al  $Zn^{2+}$ , preparado a partir de distintas diluciones de  $ZnCl_2$ , dieron lugar a los resultados expresados en gráfico 6. A valores tan bajos como 0,31 g Zn/L se puede observar casi un 50 % de inhibición del crecimiento del hipocótilo.

**Gráfico 6:** Curva Dosis-Respuesta para hipocótilo de semillas de *T. aestivum*



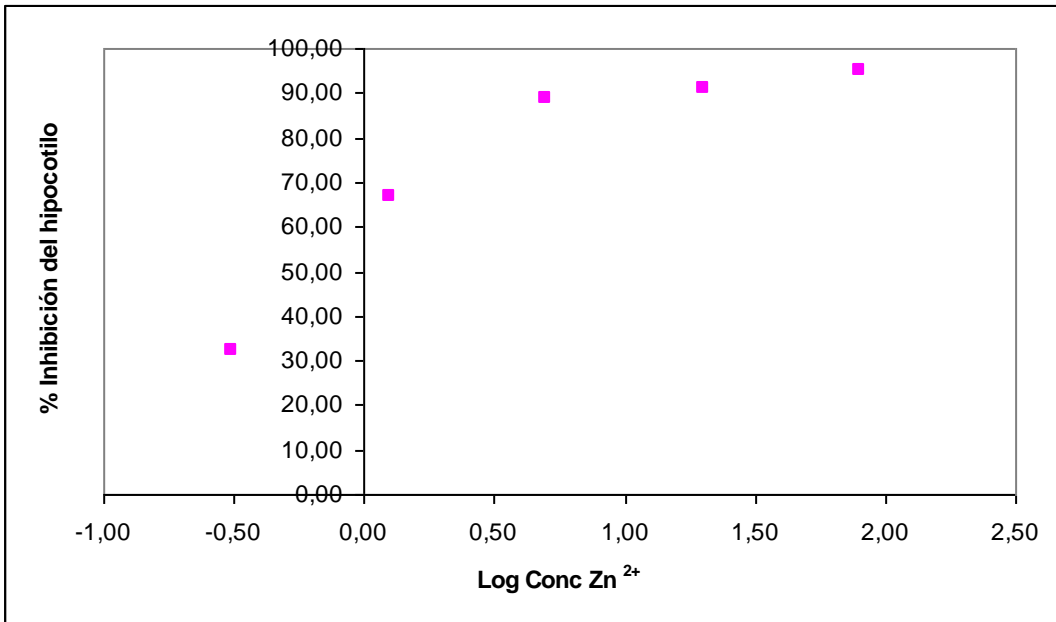
Para obtener la  $CI_{50}$ , se determina el valor probit para cada concentración (Gráfico 7).

Se calculó el porcentaje de inhibición de crecimiento del hipocótilo (H) con la fórmula siguiente:

$$\% \text{ Inhibición} = 100 (\text{Longitud } H_{\text{Control}} - \text{Longitud } H_M / (\text{Longitud } H_{\text{Control}}))$$

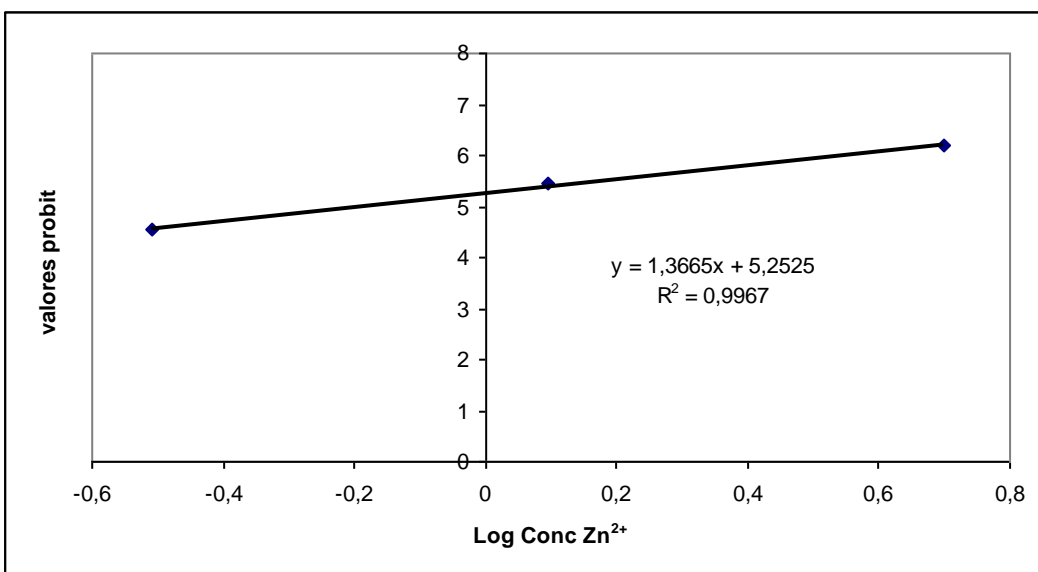
**Gráfico 7:** Curva Dosis-Respuesta *T. aestivum* (% de Inhibición vs Log C).





Se observa como a medida que aumenta la concentración del tóxico el crecimiento del hipocótilo empieza a inhibirse.

**Gráfico 8:** Curva Dosis-Respuesta hipocótilo de *T. aestivum* (Valores probit vs Log C)



A partir de la ecuación de la recta en la zona lineal de la curva de Dosis-Respuesta se calcula la  $CI_{50}$  para hipocótilo la cual corresponde al valor de probit 5 (50% de respuesta) (Gráfico 8)

$$y = 1,3665x + 5,2525$$

$$5 = 1,3665x + 5,2525$$

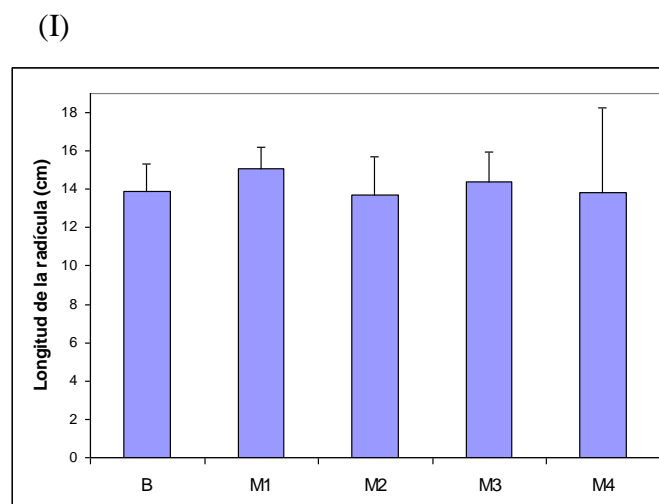
$$\rightarrow x = (5-5,2525)/1,3665 = -0,18477863$$

$$\rightarrow CI_{50} = \text{antilog } -0,18477863 \rightarrow CI_{50} = 0,65 \text{ g/L para hipocótilo}$$

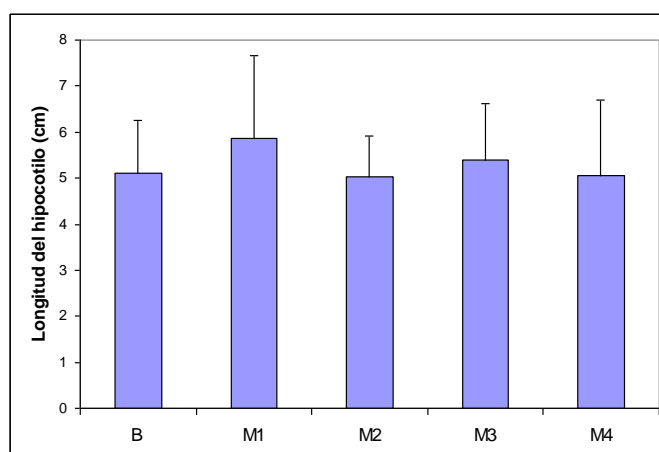
### 4.3. Evaluación de la toxicidad de las muestras de agua de la laguna

Al aplicar el bioensayo de semillas de trigo a muestras de la Laguna se obtuvieron los resultados que se muestran en el Gráfico 9. Se observó que no hubo inhibición de crecimiento, lo que nos demuestra que es un agua que no contiene compuestos que inhiban el crecimiento de la radícula. Al contrario, otros estudios nos indican que contiene alto contenido de nutrientes y tanto los datos físicoquímicos y microbiológicos demuestran que el agua es de buena calidad para diversas actividades, entre ellas la pesca y otras actividades agropecuarias. (Dirección de Agua y Saneamiento, Área Control de calidad de agua potable y efluentes de la municipalidad de Santa Rosa)

**Grafico 9:** Efecto de las muestras de la laguna sobre la longitud de la radícula (I) y del hipocótilo (II)



(II)



\*P > 0,05: B vs M1, M2, M3, M4

B: blanco; Muestras de la laguna: M1: cuenca principal; M2: caño del desagüe; M3: cuenca chica; y M4: cuenca chica aireada.

#### 4.4. Evaluación de la toxicidad de las muestras de agua en una estación de servicio

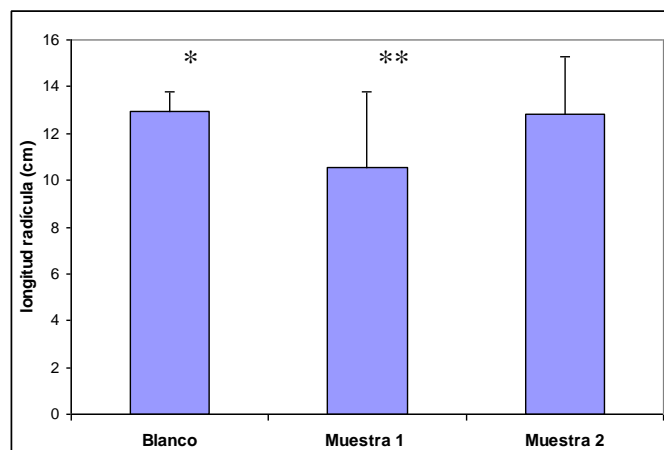
Se aplicó el bioensayo en semillas de trigo para muestras de efluentes de una estación de servicio. El porcentaje de inhibición de crecimiento tanto de radícula como de hipocótilo se calculó aplicando la fórmula siguiente:

$$\% \text{ Inhibición} = 100 \left( \frac{\text{Longitud}_{\text{Control}} - \text{Longitud}_{\text{M}}}{\text{Longitud}_{\text{Control}}} \right)$$

El % de inhibición para la muestra M1 fue de 18,48 y 17,17 %, para radícula e hipocótilo respectivamente. En cambio para el caso de la muestra M2 sólo fue de 0,93 y 0,85% para radícula e hipocótilo respectivamente.

Los resultados de elongación de radícula e hipocótilo respecto al control se comparan en los gráficos 10 y 11 respectivamente.

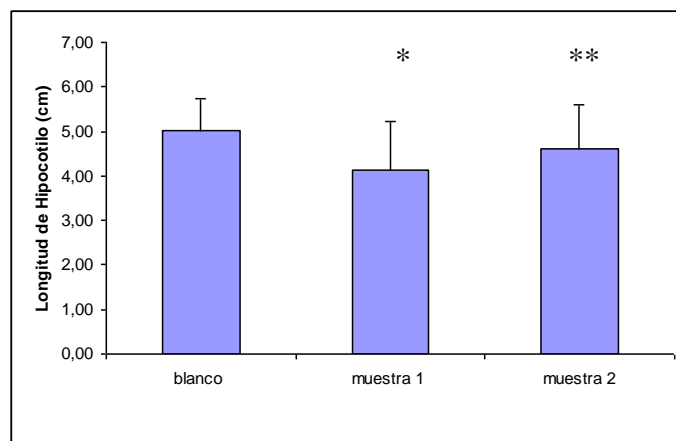
**Grafico 10:** Efecto de las muestras de estación de servicio sobre la longitud de la radícula de las semillas de trigo.



\*B vs M1  $p < 0,0001$ , B vs M2  $p > 0,05$ ; \*\* M1 vs M2  $p < 0,005$

B: blanco; Muestras de la estación de servicio: M1: dentro de la estación de servicio; M2: En el cordón de la calle de la estación de servicio.

**Grafico 11:** Efecto de las muestras de estación de servicio sobre la longitud del hipocótilo de las semillas de trigo.



\* Blanco vs M1  $p < 0,0001$  significativo; \*\* Blanco vs M2  $p < 0,05$  significativo, M1 vs M2  $p > 0,05$

B: blanco; Muestras de la estación de servicio: M1: dentro de la estación de servicio; M2: En el cordón de la calle de la estación de servicio.

Analizando el crecimiento tanto de las radículas como de los hipocótilos en las muestras de la estación de servicio se observa que la muestra M1 tiene una mayor diferencia respecto al control,

comparada con la muestra M2. Observemos que la M1 se tomó dentro de la estación, donde se supone que los contaminantes presentes estarían en mayor concentración. La muestra M2 fue tomada en el cordón, donde probablemente se encuentra más diluida.

## 5. CONCLUSIONES

Como alternativa al uso de *L. sativa* -la especie más utilizada para el desarrollo de bioensayos ambientales- en este trabajo se optó por la puesta a punto de ensayos *T. aestivum*. Esta elección se realiza por dos razones: por un lado esta segunda especie forma parte de aquellas usualmente aceptadas por los protocolos estándar. (22-26, 42) Por otro lado, *T. aestivum* es de frecuente cultivo en la región desde donde se obtuvieron las muestras testeadas, entendiéndose entonces como centinela para la evaluación del impacto de tóxicos en la actividad agropecuaria.

Los ensayos desarrollados, permitieron una adecuada puesta a punto del bioensayo con semillas de trigo, obteniéndose una respuesta lineal al aumentar la concentración del tóxico de referencia ( $ZnCl_2$ ). Al aplicar el bioensayo a muestras de la laguna no se observó una inhibición en el crecimiento de las radículas, probablemente debido a la concentración de nutrientes que favorece el crecimiento de las semillas. Cuando se evalúa la toxicidad en muestras de estación de servicio, puede distinguirse las muestras respecto a su procedencia. Las correspondientes a los puntos más cercanos a las fuentes de emisión de contaminantes, presentan una mayor inhibición de crecimiento.

Como consecuencia, el modelo vegetal utilizado resultaría útil para realizar la evaluación de efluentes. Sin embargo, para una evaluación más integral, estos estudios deben complementarse con indicadores de niveles tróficos superiores, como es usual en la evaluación ecotoxicológica de muestras ambientales.

Finalmente, en este trabajo se pudo verificar que el uso de semillas de trigo para determinar toxicidad resulta ser recomendable, porque ofrece varias ventajas al reducir los costos, el tiempo de los ensayos y el espacio requerido para su experimentación. Estos bioensayos son versátiles, ya que se podrían establecer como punto de referencia para realizar ensayos de toxicidad de efluentes, monitoreo de procesos de detoxificación, saneamiento, y reutilización de biosólidos.

## 6. Bibliografía

1. *Daphnia magna*: El “Canario” de las aguas. <http://goo.gl/fiEXKs> (Acceso abril 2012)
2. Probit Analysis Program, Software ver. 1.5. United States Environmental Protection Agency (USEPA). 1999.
3. Estudio de ecotoxicología de un suelo contaminado con hidrocarburos. E Escalante Espinosa. Tesis para optar por el título de Maestro en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana. México. 2000. <http://148.206.53.231/UAMI10492.PDF> (2012)
4. Determinación de la concentración letal media (CL50-48) del herbicida roundup 747 sobre ecosistemas acuáticos mediante pruebas toxicológicas con daphnia magna. C M Gamez Rojas, E J Ramirez Riveros. <http://nubr.co/Glieay> (2008)
5. Programa de monitoreo eco toxicológico de los efluentes industriales en el río Cruces, provincia de Valdivia, Chile. Universidad De Concepción Centro Eula-Chile. Capítulo 2. Evaluación de la toxicidad aguda y crónica. 2007. <http://goo.gl/pP3fFx> (2012)
6. Métodos ecotoxicológicos para la evaluación de suelos contaminados con hidrocarburos. MC Cuevas Díaz, G. Espinosa Reyes, C. A Ilizaliturri Hernández, A. Mendoza Cantú. Secretaría de Medioambiente y Recursos Naturales (SEMANART) Instituto Nacional de Ecología (NE), UNiversidad Veracruzana (2013). Capítulo 3: Evaluación de la toxicidad de los suelos mediante bioensayos con semillas. MC Cuevas Díaz, J De La Luz, R Santiago, J López Luna, 87-103. <http://goo.gl/OwpNmS>
7. Efecto de iones y otros factores físicos sobre la germinación de semillas. R Palacios. Journal of the Mexican Chemical Society, 44 (3), 233-236. 2000. Sociedad Química de México. <http://goo.gl/1LS01Q> (2013).
8. Aguas Residuales y Tratamiento de Efluentes Cloacales. Facultad Regional Bahía Blanca GEIA - Grupo de Estudio de Ingeniería Ambiental. Universidad Tecnológica Nacional – U.T.N. Argentina. Editorial de la Universidad Tecnológica Nacional – edUTecNe. <http://goo.gl/SJaZII> (2013)
9. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. G Castillo Morales. (ed.). Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales Instituto Nacional de Ecología. México: IMTA, 2004. <http://web.idrc.ca/openebooks/147-7/> (2012)

10. El zooplanton de un lago somero hipereutrófico de la región central de Argentina: cambios después de una década. SA Echaniz, AM Vignatti & PC Bunino. *Biota Neotrop.* 8 (4), 063-071. 2008. doi: 10.1590/S1676-06032008000400005
11. Monitoreo hídrico y ecobiológico de la laguna “Don Tomás”, “Bajo Guiliani” conexiones hídricas. Secretaría de Recursos Hídricos, Gobierno de La Pampa. <http://goo.gl/cxuQcp> (2014)
12. Los nutrientes en los sedimentos de lagunas de La Pampa. Relación con la granulometría y uso de la tierra. Santiago A. Echaniz, Alicia M. Vignatti, Susana B. José de Paggi y Juan C. Paggi. Páginas: 23-31. 3° Congreso Pampeano del Agua. MG Dalmaso; CM Camiletti; RH. 1° ed. Santa Rosa, 2010.1-380 <http://goo.gl/hI38HH> (2014)
13. Estudio de la fitotoxicidad de metales pesados y del herbicida glifosato en ambientes acuáticos. Bioensayos con plantas vasculares como organismos diagnósticos. MC Sobrero. Tesis presentada para optar por el título de Doctor en Ciencias Naturales. Universidad Nacional de La Plata. Facultad de Ciencias Naturales y Museo. 2010. <http://goo.gl/5sufx4> (2013)
14. “Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. La experiencia en México”. P Ramírez Romero y A Mendoza Cantú. Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales Instituto Nacional de Ecología. México 2008. <http://goo.gl/I2MRZP> (2014)
15. Diversidad fitoplanctónica en los cuencos principal y norte de la laguna Don Tomás (La Pampa. Argentina). SB Alvarez, GI Bazan y JN Bernardos. *Limnetica*, 28 (2), 253-260. 2009. <http://goo.gl/ib6EwO> (2014)
16. Evaluación de Impacto Ambiental: Reubicación de la Planta de Tratamientos de Residuos Patológicos–Municipalidad de Santa Rosa, Provincia de La Pampa. M Irribarra, F Di Pietro, 1-117. [http://santarosa.gov.ar/portal/images/pdf/eia\\_1.pdf](http://santarosa.gov.ar/portal/images/pdf/eia_1.pdf) (2014)
17. Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas. Estandarización, Intercalibración, Resultados y Aplicaciones. Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo, Instituto Mexicano de Tecnología del Agua. México. MC Díaz-Baez, GD Bulus-Rossini, Y Pica-Granados. 2004. Métodos estadísticos para el análisis de resultados de toxicidad.
18. Toxic effects of heavy metals on early growth and tolerance of cereal crops. T Mahmood<sup>1</sup>, KR ISLAM<sup>2</sup> and. Muhammad. *Pak. J. Bot.*, 39(2), 451-462. 2007.
19. Guía para el control y prevención de la contaminación industrial. Comisión Nacional del Medio Ambiente. Región Metropolitana. Santiago Chile. 1998. <http://goo.gl/NUXSao> (2014)
20. Modelos de vulnerabilidad de las personas por accidentes mayores: método Probit. Ministerio de trabajo y asuntos sociales. España. Instituto Nacional de seguridad y accidentes de trabajo. ET Sierra. NTP 291. (1991)

21. Determinación toxicológica en aguas de río mediante el empleo de un bioensayo con plantas. *Hig. Sanid. Ambient.* 9, 505-509. MT Torres Rodriguez, NM Hernández Perera. 2009
22. “Pruebas biológicas para la evaluación ecotoxicológica de sustancias químicas”. La Universidad Autónoma Metropolitana y el Instituto Nacional de Ecología.7. Listados de especies de ambientes, 137. México. 2005
23. Terrestrial plants: growth test. Guideline for testing of chemicals 208. Organization for Economic Cooperation and Development, 1984. OECD Publications Service, Paris.
24. Protocols for short term toxicity screening of hazardous waste sites. USEPA, 1989. US Environmental Protection Agency. 600/3-88/029, Corvallis.
25. Root elongation method for toxicity testing of organic an inorganic pollutants. W Wang. *Environmental Toxicology & Chemistry* 6, 409-414.1987.
26. “Seed germination/root elongation toxicity test. Ecological effects test guidelines USEPA-OPPTS850.4200. US EPA .1996.
27. Standard methods for the examination of water and wastewater, 20th Ed., American Public Health Association, Washington, DC, 8020–8220. Clesceri, L. S., Greenberg, A. E., and Eaton, A. D. 1998.
28. Rice Germination as a Bioassay to Test the Phytotoxicity of MSWI Bottom Ash Recycling Wastewater. EB Rivera1, O Varela Milla; W Huang; Y Ho; J Chiu; and H Chang. *Journal of hazardous, toxic, and radioactive waste* © ASCE. 17,40-145. 2013.
29. Effects of Metals on Seed Germination, Root Elongation, and Coleoptile and Hypocotyl Growth in *Triticum aestivum* and *Cucumis sativus*. O Munzuroglu, H Geckil. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology.* 43 (2), 203-213. 2001.
30. Ecotoxicity Assessment of Weathered Waste Oil in a Mexican Wetland. R Uribe-Hernández, MA Montes de Oca-García, MA Amezcua-Allieri, JA Zermeño- Eguía Lis, VE Martínez–Martínez. *Journal of Petroleum Science Research (JPSR).* 1(2), 26-31. 2012. <http://www.jpssr.org> © American V-King Scientific Publishing.
31. Soil Quality- Determination of the Effects of Pollutants on Soil Flora. Part 2 Effects of Chemicals on the Emergence and Growth of Higher Plants, ISO 11269: USA. 67. 2003.
32. Empleo de los ensayos con plantas en el control de contaminantes tóxicos ambientales. MT Torres Rodríguez. *Rev Cubana Hig Epidemiol* 41,2-3. 2003. Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología.



33. Evaluación de la toxicidad de los suelos mediante bioensayos con semillas. MC Cuevas Díaz, J De La Luz, R Santiago, J López Luna. 86-105. En Métodos ecotoxicológicos para la evaluación de suelos contaminados con hidrocarburos. 2012. Instituto Nacional de Ecología in México, DF
34. Plant bioassays to assess toxicity of textile sludge compost. AS Ferreira Araújo; RT Rosim Monteiro. Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.), 62 (3), 286-290. 2005.
35. Ecotoxicological effects of typical personal care products on seed germination and seedling development of wheat (*Triticum aestivum* L.) J An, Q Zhou, Y Sun , Z Xu. Chemosphere 76, 1428–1434. 2009.
36. Effects of six selected antibiotics on plant growth and soil microbial and enzymatic activities. .F Liu , GG Ying, R Tao , LL Zhao, JF Yang, LF Zhao. Environ Pollut 157,1636 -1642. 2009.
37. Ecotoxicological effects of paracetamol on seed germination and seedling development of wheat (*Triticum aestivum* L.) A Jing, Z Qixing, S Fuhong, Z Lei. Journal of Hazardous Materials 169, 751–757. 2009.
38. Germination and growth of six plant species on contaminated soil with spent oil. M Sharifi, Y Sadeghi, M Akbarpour . Int. J. Environ. Sci. Tech., 4 (4), 463-470. 2007.
39. Quantitative analyses of relationships between ecotoxicological effects and combined pollution. Q Zho, Y Cheng, Q Zhang, J Liang. Science in China Series C: Life Sciences. 47( 4),332-339. 2004.
40. Phytotoxic effects of Heavy metals (Cr, Cd, Mn and Zn) on Wheat (*Triticum aestivum* L.) Seed Germination and Seedlings growth in Black Cotton Soil of Nanded, India. I Rajjak Shaikh, P Rajjak Shaikh, R Ahmed Shaikh and A Shaikh. Research Journal of Chemical Sciences. 3(6), 14-23. 2013. International Science Congress Association 14.
41. Determinación de reducción del crecimiento radical (CE50) por una formulación de glifosato utilizando lechuga y trigo como especies bioindicadoras. MC Lallana MN Foti, VH Lallana, JH Elizalde, CE Billard. Rev. FCA UNCUYO. 45(1), 143-151. 2013 ANNEX
42. . List of species historically used in plant testing. OECD/OCDE 227.2006. 12-21.OECD Guideline for the testing of chemicals. Terrestrial Plant Test: Vegetative Vigour Test.
43. Evaluation of cytological effects of Zn<sup>2+</sup> in relation to germination and root growth of *Nigella sativa* L. and *Triticum aestivum* L. AA El-Ghamery, MA El-Kholy, MA Abou El-Yousser. Mutation Research 537, 29–41. 2003.
44. Combined effect of iron and zinc on micronutrient levels in wheat (*Triticum aestivum* L.). Z Ai-Qing, B Qiong-Li, T Xiao. J. Environ. Biol. 32, 235-239.2011.

45. Effects of metals on seed germination, root elongation and coleoptiles and hypocotyls growth in *Triticum aestivum* and *Cucunus sativus*. O Munzuroglu H Geckil. *Environmental Contamination and Toxicology* 42,203-213. 2002.
46. Toxic effects of heavy metals on crop plants. GO Eshagberi. *Multidisciplinary journal of empirical research*. 10(1). 1-10. 2012.

## 7. Anexos

### 7.1. Índice de tablas, imágenes y gráficos

#### 7.1.1. Tablas

#### Página

Tabla 1: Resumen de las condiciones recomendadas para las pruebas de toxicidad Con Trigo ( <i>Triticum aestivum</i> ).	14
Tabla 2: equivalencia entre valores probit y porcentaje de población afectada.	20

#### 7.1.2. Figura

Figura 1: Toma de muestras en La Laguna Don Tomás.	8
Figura 2: Ubicación de donde se extrajo la muestra de la estación de servicio.	10
Figura 3: Curva de calibración.	13
Figura 4: Esquema general del procedimiento de la prueba de toxicidad en semillas de trigo.	15
Figura 5: Placa de Petri con control negativo	15
Figura 6: Radículas de la planta de trigo.	16
Figura 7: medición de la radícula.	17
Figura 8: Medición del hipocotílo.	17
Figura 9: A: Muestra de la estación de servicio. B: bioensayo correspondiente.	19
Figura 10: Cálculo del CL50 utilizando el programa Probit.	22

#### 7.1.3. Gráficos

#### Página

Grafico 1: grafica de valores probit.	20
Grafico 2: Porcentaje de mortalidad de las semillas.	21
Gráfico 3: Curva Dosis-Respuesta para radícula de semillas de Trigo ( <i>Triticum aestivum</i> ).	23
Gráfico 4: Curva Dosis- Respuesta Trigo ( <i>Triticum aestivum</i> ) (% de Inhibición vs Log C).	24

Gráfico 5: Curva Dosis-Respuesta Trigo ( <i>Triticum aestivum</i> ) (Valores probit vs Log C).	24
Gráfico 6: Curva Dosis-Respuesta para hipocótilo de semillas de Trigo ( <i>Triticum aestivum</i> ).	25
Gráfico 7: Curva Dosis-Respuesta Trigo ( <i>Triticum aestivum</i> ) ( % de Inhibición vs Log C).	26
Gráfico 8 : Curva Dosis-Respuesta hipocótilo de Trigo ( <i>Triticum aestivum</i> ) (Valores probit vs Log C).	26
Grafico 9: Efecto de la muestras de la laguna sobre la longitud de la radícula y el hipocótilo	27
Grafico 10: Efecto de las muestras de estación de servicio sobre la longitud de la radícula de las semillas de trigo.	29
Grafico 11: Efecto de las muestras de estación de servicio sobre la longitud Del hipocótilo de las semillas de trigo	29