

APLICACIÓN DE BIOENSAYOS EN LA MEDICIÓN DE TOXICIDAD POR METALES PESADOS EN FUENTES SUPERFICIALES DE AGUA PARA CONSUMO HUMANO

Responsible : MSc. César Julio Cáceda Quiroz
 Miembro : Mblgo. Anacelly Valera Lopez

RESUMEN

Se evaluó el efecto tóxico potencial de metales pesados de una muestra de agua del río Santa sobre el crecimiento de la raíz de *Allium cepa* y *Lactuca sativa*. De acuerdo con los resultados obtenidos la aplicación de bioensayos con *Allium cepa* fue más sensible a la presencia de metales de plomo y cromo con respecto a *Lactuca sativa*.

ABSTRACT

It evaluated the potential toxic effect of heavy metals a sample water from Santa river, about the root growth *Allium cepa* and *Lactuca sativa*. In accordance with obtained results the biotesting application with *Allium cepa*, it was more sensible to the lead and chrome metals presence with respect to the *Lactuca sativa*.

I. INTRODUCCIÓN

Muchos países de América Latina cuentan con reglamentaciones sobre protección de los recursos naturales, como el agua. Se ha puesto énfasis en la contaminación orgánica y de organismos patógenos, mientras que la problemática de la descarga de compuestos tóxicos y manejo de residuos peligrosos recién comienza a ser considerada. Una de las causas de esta falencia se relaciona con la falta de infraestructura y experiencias necesarias para la detección de contaminantes tóxicos complejos que, de una u otra forma, generan riesgos para la salud humana y los ecosistemas naturales.

Un agua clara y potable es una necesidad humana básica, pero el acceso a ella continúa siendo una gran dificultad para algunas ciudades en países en desarrollo como el nuestro. En la actualidad se reconoce que la caracterización y medición de los tóxicos o componentes de los residuos peligrosos por separado no es suficiente para asegurar la ausencia de efectos indeseables, puesto que tanto la mezcla de los residuos como posibles transformaciones en el ambiente pueden modificar su efecto nocivo. De ahí que el uso de ensayos biológicos está siendo considerado cada vez con mayor intensidad para la evaluación de la toxicidad global de estos contaminantes.

El propósito del trabajo fue poner en consideración de los profesionales que trabajan en el control de calidad, área de laboratorio de microbiología de las EPS la aplicación de bioensayos que permitan evaluar el efecto tóxico potencial de los contaminantes y sea considerado una prueba de alerta en los programas de monitoreo en la calidad de las fuentes de agua, teniendo en cuenta la implementación de un equipamiento básico con insumos mínimos.

II. OBJETIVO

Evaluar el efecto tóxico potencial de metales pesados de muestras de aguas del río Santa sobre el crecimiento de la

raíz de *Allium cepa* y *Lactuca sativa*.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1) Materiales:

Muestra de agua del río Santa. Bulbos de *Allium cepa*, de aprox. 2,5 cm de diámetro, secos y sin formación de hojas y/o raíz. Medio de crecimiento, de pH 7,0. Semillas de *Lactuca sativa*. Agua dura reconstituida (APHA, 1992). Los de uso común en laboratorio.

2) Ensayo de Toxicidad Aguda con *Allium cepa* mediante la Evaluación de la Inhibición del Crecimiento Promedio de Raíces de Cebolla.

Se utilizaron bulbos de 2,5 cm de diámetro, los que fueron adquiridos 3 días antes de la realización de las pruebas y almacenados en un ambiente seco.

Se empleó una serie de 5 concentraciones de la muestra y un control negativo, cada uno con doce réplicas, el cual permitió establecer el intervalo de concentración conveniente para la determinación inhibitoria media (CI_{50}). El ensayo se inició con el llenado de los vasos con cada una de las muestras de agua. Se colocaron los bulbos limpios sobre la boca de los vasos, cuidando que la zona radicular quede inmersa en el líquido. Las muestras se colocaron sobre una mesa estable que no presentase vibraciones y se mantuvieron a una temperatura ambiente (20°C) por un periodo de 72 horas, evitándose la iluminación directa. Al término del periodo de exposición se registró la longitud promedio de las raíces, con ayuda de una regla. Se realizó la siguiente operación: $(\text{longitud del control} - \text{longitud de la muestra}) \times 100 / \text{longitud del control}$. Con estos valores se construyó una gráfica de concentración en función del porcentaje de inhibición y se calculó la CI_{50} .

3) Ensayo de la Toxicidad Aguda con Semillas de *Lactuca sativa*.

Es una prueba estática de toxicidad aguda (120 horas de exposición) en la que se evalúan los efectos citotóxicos de compuestos puros o de mezclas complejas en el proceso de germinación de las semillas y en el desarrollo de plántulas durante los primeros días de crecimiento.

Las semillas de *L. sativa* certificadas fueron adquiridas en una semillera local, las cuales se almacenaron a 4°C, en oscuridad y en ambiente seco.

Para la realización de la curva dosis-respuesta se prepararon cinco diluciones de la muestra y un control negativo, realizándose 5 repeticiones para cada dilución.

Se colocó en cada placa Petri un disco de papel de filtro. Se saturó el papel de filtro con 4 ó 5 mL de la dilución, evitando la formación de bolsas de aire. Con una pinza se colocaron cuidadosamente 20 semillas, dejando espacio suficiente entre ellas para permitir la elongación de las raíces.

Se taparon las placas y se colocaron en bolsas plásticas para evitar la pérdida de humedad. Se incubó durante 120 horas (5 días) a una temperatura de 22 ± 2 °C.

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

Se registró el número de semillas que germinaron normalmente, teniendo como criterio de germinación la aparición visible de la radícula.

Utilizando una regla o papel milimetrado 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 hasta el ápice radicular. La medida de elongación del hipocótilo se consideró desde el nudo hasta el sitio de inserción de los dos cotiledones.

Los resultados se expresaron de acuerdo con los siguientes cálculos:

- Promedio de la elongación de la radícula y del hipocótilo de las plántulas de cada repetición.
- Porcentaje de inhibición del crecimiento de la radícula y del hipocótilo, con el promedio de elongación para cada dilución respecto del promedio de elongación del control negativo.
- Porcentaje de inhibición en la germinación.
- Cálculo del gráfico dosis respuesta y Ci_{50} .

IV. RESULTADOS

Cuadro N° 01: Resultados de la prueba de toxicidad del plomo utilizando *Allium cepa*.

MUESTRA	CONCENTRACIÓN mg/l	Longitud de la raíz en cm					DS	PROMEDIO	% INHIBICIÓN	INDICE MITOTICO
		Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 4	Réplica 5				
Control Negativo	0,00	3,8	2,5	2,9	2,7	3,3	1,32	3,04	0,00	100
1	0,01	1,8	1,4	1,6	2,0	1,8	0,73	1,72	43,42	76
2	0,06	0,8	0,6	0,8	0,9	0,9	0,32	0,80	73,68	42
3	0,11	0,4	0,5	0,2	0,6	0,4	0,18	0,42	86,18	29
4	0,16	0,3	0,0	0,2	0,3	0,2	0,11	0,20	93,42	18
5	0,21	0,1	0,0	0,2	0,0	0,1	0,09	0,08	97,37	5

Cuadro 02: Resultados de la Prueba de Toxicidad del Cromo Utilizando *Allium Cepa*

MUESTRA	CONCENTRACIÓN mg/l	Longitud de la raíz en cm					DS	PROMEDIO	% INHIBICIÓN	INDICE MITOTICO
		Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 4	Réplica 5				
Control Negativo	0,0	5,6	3,4	4,3	5,2	4,9	2,06	4,68	0,00	150
1	0,5	4,2	4,2	5,1	4,5	4,1	1,64	4,42	5,56	150
2	1,0	3,3	3,0	3,6	3,5	3,2	0,97	3,32	29,06	98
3	1,5	3,1	2,5	2,2	2,9	2,5	0,56	2,64	43,59	97
4	2,0	2,0	2,2	2,5	2,0	2,0	0,20	2,14	54,27	82
5	2,5	2,0	1,9	2,1	1,7	2,2	0,27	1,98	57,69	70

Cuadro 03: Resultados de la Prueba de Toxicidad del Plomo Utilizando *Lactuca Sativa* Inhibición de la Germinación

MUESTRA	CONCENTRACIÓN mg/l	N PROMEDIO DE SEMILLAS GERMINADAS	% SEMILLAS GERMINADAS	% SEMILLAS GERMINAC. INHIBIDA
Control Negativo	0,00	20	100	0
1	0,01	20	100	0
2	0,06	20	100	0
3	0,11	20	100	0
4	0,16	18	90	10
5	0,21	15	75	25

Cuadro N° 04: Resultado de la prueba de toxicidad del plomo utilizando *lactuca siva* Inhibición de la germinación

MUESTRA	CONCENTRACIÓN mg/l	N° PROMEDIO DE SEMILLAS GERMINADAS	% SEMILLAS GERMINADAS	% SEMILLAS GERMINAC. INHIBIDA
Control Negativo	0	20	100	0
1	0,5	20	100	0
2	1	19	95	5
3	1,5	17	85	15
4	2	15	75	25
5	2,5	13	65	35

Cuadro N° 5: Resultados de la prueba de toxicidad del plomo utilizando *lactuca sativa* Inhibición del crecimiento de la raíz

MUESTRA	CONCENTRACIÓN mg/l	LONGITUD EN CM DE LA RAÍZ (PROMEDIO)	% CRECIMIENTO	% INHIBICION
Control Negativo	0,00	2,9	100,00	0,00
1	0,01	2,6	89,66	10,34
2	0,06	2,1	72,41	27,59
3	0,11	1,9	65,52	34,48
4	0,16	1,8	62,07	37,93
5	0,21	1,6	55,17	44,83

Cuadro N° 6: Resultados de la prueba de toxicidad del cromo utilizando *lactuca sativa* Inhibición del crecimiento de la raíz

MUESTRA	CONCENTRACIÓN mg/l	LONGITUD EN CM DE LA RAÍZ (PROMEDIO)	% CRECIMIENTO	% INHIBICION
Control Negativo	0,0	2,9	100,00	0,00
1	0,5	2,6	89,66	10,34
2	1,0	2,1	72,41	27,59
3	1,5	1,9	65,52	34,48
4	2,0	1,8	62,07	37,93
5	2,5	1,6	55,17	44,83

V. DISCUSIÓN

De acuerdo con los resultados obtenidos, la aplicación de bioensayos con *Allium cepa* fue más sensible a la presencia de metales de plomo (Pb) y cromo (Cr) con respecto a *Lactuca sativa*, esto se demuestra en los resultados obtenidos. En las pruebas con *A. cepa* con respecto al Pb, el porcentaje de inhibición de las raíces se obtuvo a una concentración de 0,21 mg/L, mientras que con Cr se obtuvo a una concentración de 2,5 mg/L, esto nos indica que a concentraciones menores de Pb existe un menor crecimiento de la raíz en *A. Cepa*.

Es decir, que su efecto es más letal a concentraciones bajas (ver cuadros 1 y 2). Así mismo el menor índice mitótico se obtuvo en presencia de Pb.

Si aplicamos estos resultados con los valores de los puntos de muestreo a lo largo del río Santa, nos damos cuenta de que en 8 de estos puntos existen valores por encima de 0,1 mg/L, lo que indica la presencia de este metal con efectos ecotóxicos, lo que no sucede con el cromo, ya que en condiciones normales de los valores de este último metal a lo largo del río Santa no representa un riesgo toxicológico; por lo tanto, no representa un riesgo a la salud. Con respecto a *L. sativa* en las pruebas de inhibición de la germinación (ver cuadros 3 y 4) tanto el Cr como el Pb a las condiciones trabajadas no afectan significativamente la germinación de *L. sativa*. Así mismo la concentración que inhibió al 50 % el crecimiento de la raíz se obtuvo entre 0,16 a 0,21 mg/L en el caso del Pb, mientras que con el Cr se necesita valores mayores a 2,5 mg/L para poder inhibir el crecimiento de la raíz a un 50%.

Los resultados obtenidos en este trabajo deben ser una voz de alerta para las autoridades e instituciones que vigilan la calidad del río Santa, ya que esta considerada como fuente de río de clase II, es decir fuente para abastecimiento de agua

para consumo humano y el riego de especies agrícolas de consumo humano, de tal manera que se puedan controlar estos valores y que no representen niveles de toxicidad que afecten la salud humana, ya que si estos valores persisten en el agua de consumo humano una vez realizado el tratamiento sería necesario plantear posibilidades de buscar otras fuentes para este propósito. Estos resultados a pesar de ser preliminares y quizás insuficientes, son una buena base para conocer los niveles de toxicidad presentes a lo largo del recorrido del río Santa. Con un muestreo en campo y más amplio de la zona se podrían llevar estos resultados para establecer un seguimiento de los puntos de vertido y de las medidas que se deben tomar para controlar las fuentes de contaminación.

VI. CONCLUSIONES

1. El cromo en concentraciones mayores a 1,5 mg/L inhibe el 50% el crecimiento de la raíz (IC_{50}), y a concentraciones mayores de 2,5% disminuye las mitosis de las células meristemáticas de *A. cepa*.
2. El plomo en concentraciones mayores a 0,06 mg/L inhibe en 50% (IC_{50}) el crecimiento de la raíz y el 50% de las mitosis de las células meristemáticas de *A. cepa*.
3. El Cr y el Pb, a las concentraciones trabajadas no influyen en la germinación de *L. sativa*.
4. El plomo es el metal más sensible en los bioensayos trabajados.
5. La aplicación de bioensayos son útiles como una prueba de alerta en los programas de monitoreo de la calidad de las fuentes de agua.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Aquatox". Mayo 2003".** *Aquatox: juventud, ciencia, salud y medio ambiente*. Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo (CIID/IDRC), de Canadá. Programa "Enfoques Ecosistémicos para la Salud (Ecosalud).
- APHA, 1998.** *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 20th ed., American Public Health Association, Washington, D.C.
- Aurazo Margarita.2003.** *Bioindicadores Biológicos de calidad de Fuentes y bioensayos de toxicidad*. Trujillo-Perú.
- Butler, G.C., 1978.** *Principles of Ecotoxicology*, SCOPE 12, John Wiley and Sons, New York.
- Cheung, Y. H., M. H., Wong y N. F. Y., Tam. 1989.** "Root and Shoot Elongation as an Assessment of Heavy Metal Toxicity" and "Zn Equivalent Value' of Edible Crops", *Hydrobiologia*
- Díaz-Báez, M.C., Cruz, L.E., Rodríguez, D., Pérez, J. & Vargas, C.M., 2000,** "Evaluation of Three Water Concentration Techniques as a Prior Step to Test Acute Toxicity", *Environ. Toxicol.*
- Dutka, B.J., 1996,** *Bioassays: a Historical Summary of those Used and Developed in our Laboratories at NWRI*. National Water Research Institute, Environment Canada, Burlington

Fiskesjö, G. 1997. "Allium Test for Screening Chemicals; Evaluation of Cytological Parameters", in: *Plants for Environmental Studies*, Wancheng, W.; J. W. Gorsuch, J. S. Hughes eds., CRC Press, Florida.

Instituto Mexicano de Tecnología del agua. 2004 "Ensayos toxicológicos y Métodos de Evaluación de la calidad del agua". México

IB- Red Interinstitucional de Bioensayos 2002. Mayo a Setiembre de 2002. "Los bioensayos como herramienta de evaluación de la toxicidad de los efluentes industriales en Uruguay". Trabajo financiado por el CIID/IDRC de Canadá,

conjuntamente con DINAMA, LATU, IMM y F. CIENCIAS.

OMS. 1985. "Guía para la calidad del agua potable. Washington. EUA.

Rojas, Ricardo. 2003. "Vigilancia y control de la calidad del agua para consumo humano". Lima.

Steel, R.G.D. y Torrie, J.H., 1985, *Bioestadística, principios y procedimientos*, 2da ed., Editorial McGraw Hill, Bogotá.

UNAM. 1986. *Biología celular: Manual de prácticas.* Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México.