

IMPLEMENTACIÓN DE LA PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA CON  
SEMILLAS DE LECHUGA (*Lactuca sativa L*) EN EL LABORATORIO DE  
INGENIERÍA AMBIENTAL Y SANITARIA Y SU APLICACIÓN PARA LA  
DETERMINACIÓN DEL IMPACTO TOXICOLÓGICO DE LOS RESIDUOS DE  
LAS TITULACIONES ACIDO – BASE CON FENOLFTALEINA Y METIL  
NARANJA

RICHARD CLEYDER OJEDA GOMEZ

UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE INGENIERIA CIVIL  
PROGRAMA DE INGENIERIA AMBIENTAL  
POPAYÁN  
2007

IMPLEMENTACIÓN DE LA PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA CON  
SEMILLAS DE LECHUGA (*Lactuca sativa L*) EN EL LABORATORIO DE  
INGENIERÍA AMBIENTAL Y SANITARIA Y SU APLICACIÓN PARA LA  
DETERMINACIÓN DEL IMPACTO TOXICOLÓGICO DE LOS RESIDUOS DE  
LAS TITULACIONES ACIDO – BASE CON FENOLFTALEINA Y METIL  
NARANJA

RICHARD CLEYDER OJEDA GOMEZ

Trabajo de grado en investigación para optar al título de Ingeniero Ambiental

Director  
Paulo Mauricio Espinosa Echeverri  
Ingeniero Químico, Msc

UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE INGENIERIA CIVIL  
PROGRAMA DE INGENIERIA AMBIENTAL  
POPAYÁN  
2007

## NOTA DE ACEPTACIÓN

---

---

---

---

Mg.  
Paulo Mauricio Espinosa E  
Director

---

Mg. Carlos César Cabezas  
Jurado

---

Mg. Silvio Carvajal Varona  
Jurado

Popayán, noviembre 14 de 2007

## ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN .....	7
2. OBJETIVOS .....	9
2.1. OBJETIVO GENERAL.....	9
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	9
3. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO .....	10
4. MARCO TEÓRICO .....	11
4.1. TOXICOLOGÍA.....	12
4.1.1 Toxicidad y efectos sobre la salud humana y el ambiente de la fenolftaleína .....	13
4.1.2. Tratamiento fotocatalítico de residuos con fenolftaleína .....	14
4.1.3. Toxicidad y efectos sobre la salud humana y el ambiente del metil naranja.....	15
4.1.4. Tratamiento fotocatalítico de residuos con metil naranja .....	15
4.1.5. Toxicidad y efectos en el ambiente del sulfato de sodio, carbonato de sodio y carbonato de calcio. ....	16
4.2. PRINCIPIO TEÓRICO DEL BIOENSAYO TOXICOLÓGICO CON SEMILLAS DE LECHUGA ( <i>Lactuca sativa</i> ) .....	17
4.3. MUESTRAS .....	19
4.3.1. Fenolftaleína .....	20
4.3.2. Metil Naranja.....	21
5. METODOLOGÍA .....	22
5.1. GENERALIDADES .....	22
5.1.1 Reactivos y materiales.....	22
5.1.2 Procedimiento para el desarrollo de la prueba .....	22
5.1.3 Expresión de los resultados.....	25
5.1.4 Interpretación de los resultados .....	25
5.2. MUESTREO .....	26
5.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS .....	27
5.3.1 Análisis de regresión y análisis Probit.....	28
6. RESULTADOS Y ANÁLISIS .....	30
6.1. PRELIMINARES.....	30
6.1.1. Análisis del agua reconstituida.....	30
6.1.2. Evaluación dosis-respuesta frente al tóxico de referencia .....	31
6.2. EVALUACIÓN TOXICOLÓGICA DE LOS RESIDUOS TIPO 1 .....	34
6.2.1. Evaluación dosis respuesta frente a las muestras del residuo 1A ...	34
6.2.2. Evaluación dosis respuesta frente a las muestras del residuo 1B ..	37
6.3. EVALUACIÓN TOXICOLÓGICA DE LOS RESIDUOS TIPO 2 .....	38
6.3.1. Evaluación dosis-respuesta frente a las muestras de residuos 2A ..	38
6.3.2. Evaluación dosis-respuesta frente a las muestras de residuos 2B ..	39
7. CONCLUSIONES .....	43
8. RECOMENDACIONES .....	44
9. BIBLIOGRAFÍA .....	45
10. ANEXOS .....	47

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Propiedades físicas y químicas de la Fenolftaleína .....	20
Tabla 2. Propiedades físicas y químicas del naranja de metilo.....	21
Tabla 3. Resumen de las condiciones recomendadas para las pruebas de toxicidad con <i>Lactuca sativa</i> ( <a href="http://www.idrc.com">www.idrc.com</a> ).....	23
Tabla 4. Características fisicoquímicas del agua de dilución (agua dura reconstituida) .....	30
Tabla 5. Variabilidad de la elongación de la radícula .....	33
Tabla 6. Resumen de los resultados del bioensayo para los residuos 1A .....	34
Tabla 7. Resumen de los resultados del bioensayo para residuos 1A. Segundo experimento .....	35
Tabla 8. Resumen de los resultados del bioensayo para residuos 1B.....	37
Tabla 9. Resumen de los resultados del bioensayo para los residuos B1 .....	38
Tabla 10. Resumen de los resultados del bioensayo para los residuos B2 .....	40

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Morfología de la semilla y la plántula de lechuga.....	18
Figura 2. Estructura molecular de la Fenolftaleína.....	20
Figura 3. Estructura del naranja de metilo a pH superior a 4.4 .....	21
Figura 4. Estructura del naranja de metilo a pH inferior a 3.1. ....	21
Figura 5. Esquema general del procedimiento de prueba de toxicidad con semillas ( <a href="http://www.idrc.com">www.idrc.com</a> ). ....	23
Figura 6. Esquema de plántula de <i>L. sativa</i> al finalizar el periodo de exposición .....	24
Figura 7. Estadios por los que atraviesa la semilla durante el ensayo de.....	24
Figura 8. Esquema del muestreo para cada experimento.....	27
Figura 9. Curva concentración respuesta para el dodecil sulfato de sodio .....	31
Figura 10. $CI_{50}$ de Hipocotilo para dodecil sulfato de sodio .....	32
Figura 11. $CI_{50}$ de Radícula para dodecil sulfato.....	32
Figura 12. Variación en la elongación de la radícula a lo largo de los experimentos montados.....	33
Figura 13. Curva de concentración respuesta para los residuos 1A.....	35
Figura 14. Curva de concentración respuesta para los residuos 1A. Segundo experimento .....	36
Figura 15. Curva de concentración respuesta para residuos 1B .....	37
Figura 16. Curva de concentración respuesta para los 1B .....	38
Figura 17. $CI_{50}$ de Radícula para residuos 1B .....	39
Figura 18. Curva de concentración respuesta para los residuos 2B.....	40
Figura 19. $CI_{50}$ de Radícula para los residuos 2B.....	41

## 1. INTRODUCCIÓN

Los ecosistemas naturales están en función de su autorregulación, pero algunas sustancias químicas alteran esa armonía, y medir el grado de esas alteraciones es la razón por la cual se han desarrollado los tradicionales métodos fisicoquímicos de análisis; ya que éstos compuestos externos originan en los organismos vivos efectos, que aunque no siempre ocasionan la muerte, sí perturban la capacidad para sobrevivir en condiciones ecológicas alteradas.

Los métodos fisicoquímicos convencionales determinan características específicas, que están relacionadas con algún efecto tóxico sobre la biota acuática y por ello las normas se han basado en éstos parámetros para controlar posibles efectos contaminantes en el medio ambiente, fijando valores límite permisibles a cumplir por parte de los actores contaminantes, pero la complejidad y costos de los métodos tradicionales ha hecho muy difícil en algunos casos realizar las mediciones de los parámetros y por ende la norma no puede hacerse efectiva.

En el laboratorio de Ingeniería Ambiental y Sanitaria de la Universidad del Cauca se han venido segregando los residuos que se generan con las prácticas académicas, con el fin de encontrar una forma de tratarlos y disminuir el impacto que sobre el ambiente se pueda generar.

Los residuos que corresponden a las prácticas de estandarización de hidróxido de sodio y ácido sulfúrico en donde se usa fenolftaleína y metil naranja como indicadores respectivamente, se han tratado mediante fotocátalisis, proceso que lleva a cabo el Grupo de Investigación de Residuos Peligrosos GIRP de la misma universidad, quienes han planteado las condiciones para llevar a cabo el tratamiento. Estos residuos presentan básicamente características ácidas o básicas sumadas a la presencia de sustancias orgánicas como los indicadores que se usan.

La mineralización de las muestras sometidas a fotocátalisis se verificó por espectrofotometría basándose en el cambio de la intensidad del color que presentaban, es decir, se asumió que la medida de la degradación de los componentes, se lograba midiendo la disminución del indicador que contenga. Se hizo de esta manera, ya que otros métodos fisicoquímicos para realizar el seguimiento de la degradación de los componentes de la mezcla, no estaban al alcance de los medios, no aplicaban o se presentaban interferencias como en el caso de la DQO para la cual se explicó la interferencia en la investigación realizada *por Castro y Huetio 2006*.

Los bioensayos son herramientas de diagnóstico para determinar el efecto de agentes físicos y químicos sobre organismos únicos o ecosistemas de prueba bajo condiciones experimentales específicas y controladas. Ya que estos

permiten magnificar un determinado efecto, pueden ser sustitutos, en determinados casos, de las pruebas fisicoquímicas convencionales con el propósito de determinar un posible impacto en un ecosistema acuático.

Este trabajo se encaminó a la aplicación del bioensayo toxicológico con semillas de lechuga a los residuos descritos, mostrando la facilidad con que se lleva a cabo, ya que, los reactivos y materiales que se emplean son de fácil acceso y no se requiere personal especializado para realizarlo.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GENERAL

- Implementar la prueba de toxicidad aguda con semillas de lechuga (*Lactuca sativa*) en el Laboratorio de Ingeniería Ambiental y Sanitaria y aplicarla a los residuos líquidos procedentes de las titulaciones ácido – base con indicadores de fenolftaleína y metil naranja para determinar su potencial toxicológico.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar los ensayos preliminares para determinar las concentraciones y las variables influyentes en la implementación de ésta prueba.
- Aplicar el protocolo de toxicidad aguda con semillas de lechuga (*Lactuca sativa*) sobre los residuos líquidos procedentes de las titulaciones ácido – base con indicadores de fenolftaleína y metil naranja del Laboratorio de Ingeniería Ambiental y Sanitaria antes y después de ser sometidos al proceso de fotocatalisis, teniendo en cuenta las variables establecidas en el inciso anterior.
- Determinar el impacto toxicológico de los residuos de las titulaciones ácido – base con fenolftaleína y metil naranja.

### 3. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

Con este proyecto se pretendió mostrar una manera fácil y sobre todo económica de medir los efectos tóxicos de los residuos químicos generados en el Laboratorio de Ingeniería Ambiental y Sanitaria de la Facultad de Ingeniería Civil de la Universidad del Cauca, en particular los provenientes de las titulaciones ácido – base con indicadores de fenolftaleína y metil naranja; mediante el bioensayo toxicológico con semillas de lechuga (*Lactuca sativa*).

El objetivo principal fue implementar el bioensayo de toxicidad con semillas de lechuga *Lactuca sativa* según lo describe la literatura (*Díaz-Báez et al; 2004*) y aplicarlo a los residuos mencionados, antes y después de ser tratados, mediante el proceso de fotocátalisis bajo los protocolos establecidos por el Grupo de Investigación en Residuos Peligrosos GIRP de la Universidad del Cauca (*Castro-Huetio 2006*), y posteriormente evidenciar en términos toxicológicos la eficiencia del proceso sobre los residuos en cuestión.

El bioensayo toxicológico con semillas de lechuga se basa en la medición de la elongación de la radícula y del hipocotilo. Las semillas se siembran en grupos de veinte en cajas petri a distintas concentraciones para luego de cinco días de incubación compararse con un blanco negativo (Semillas sembradas en óptimas condiciones para que su germinación sea adecuada), y mediante medidas estadísticas determinar cual es el grado de inhibición sobre la elongación.

Ya que el grupo de investigación GIRP verificó la eficiencia del tratamiento fotocatalítico mediante espectrofotometría y no con DQO, por presentarse interferencias en el método (*Castro-Huetio 2006*), lo que deja cierta duda de que los residuos hayan disminuido el impacto toxicológico, esta investigación plantea que mediante el bioensayo toxicológico con semillas de lechuga se puede medir, en términos toxicológicos, el impacto de los residuos en cuestión, tanto tratados como sin tratar con fotocátalisis de una manera fácil, económica y con un mayor control de interferencias.

#### 4. MARCO TEÓRICO

Los ecosistemas naturales están en función de su autorregulación, pero pueden ser afectados por sustancias químicas que alteran esa armonía, razón por la cual se han desarrollado métodos para determinar el grado de esas alteraciones ya que éstos compuestos químicos originan en los organismos vivos ciertos efectos que aunque no necesariamente terminan con la muerte, sí perturban la capacidad para sobrevivir en condiciones ecológicas alteradas.

Los métodos fisicoquímicos convencionales muestran características específicas, que están relacionadas con algún efecto tóxico sobre la biota acuática y por ello las normas ambientales se han basado en dichos parámetros para controlar posibles efectos contaminantes en el medio ambiente, fijando valores permisibles, pero la complejidad y costos de los métodos tradicionales ha hecho muy difícil en algunos casos realizar las mediciones de los parámetros y por ende la norma no puede hacerse efectiva.

En consecuencia a lo anterior, se considera de gran importancia la implementación de un bioensayo que permita de una manera más sencilla y económica la determinación directa de los efectos tóxicos de un efluente sobre un ecosistema acuático.

Los ensayos biológicos (bioensayos) son herramientas de diagnóstico adecuadas para determinar el efecto de agentes físicos y químicos sobre organismos de prueba bajo condiciones experimentales específicas y controladas. Estos efectos pueden ser tanto de inhibición como de magnificación, evaluados por la reacción de los organismos, tales como muerte, crecimiento, proliferación, multiplicación, cambios morfológicos, fisiológicos o histológicos (Díaz-Báez *et al*; 2004).

El bioensayo de toxicidad con semillas de lechuga (*Lactuca sativa*) es 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 (Díaz-Báez *et al*; 2004).

El bioensayo se basa en la observación y medición del desarrollo del hipocotilo y la radícula de la plántula de lechuga expuesta a una serie de diluciones de las muestras de los residuos, para luego realizar una curva de concentración respuesta con el apoyo de un control positivo y otro negativo, para verificar la concordancia en los resultados. El control positivo consiste en un tóxico de referencia que se escoge según se requiera, al cual se exponen los individuos para llevar un control estadístico de la reacción de las semillas con el fin de comprobar que estas reacciones están en un nivel tolerable de variabilidad.

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, necesarios para el registro de pesticidas ([www.idrc.com](http://www.idrc.com)).

Teniendo en cuenta lo anterior y que a diferencia de las otras pruebas de toxicidad, la que se hace con semillas de lechuga permite hacer la evaluación con muestras coloreadas y turbias, siendo idónea para realizarse con los desechos del Laboratorio de Ingeniería Ambiental y Sanitaria, especialmente con los residuos de las titulaciones ácido – base con presencia de fenolftaleína y metil naranja como indicadores.

#### 4.1. TOXICOLOGÍA

La toxicidad de una sustancia es la capacidad potencial de causar algún efecto letal o subletal en un organismo y se puede diferenciar entre aguda cuando sus efectos son dados por la exposición a una concentración relativamente alta en un periodo de tiempo corto o crónica cuando el efecto es derivado de una exposición por largo plazo a una concentración relativamente baja. Para cada tipo de toxicidad existe una manera diferente de medir su magnitud con un tipo de bioensayo diseñado para tal fin.

El concepto de bioensayo deriva de la toxicología clásica, el cual ha sido adaptado y aplicado al diagnóstico ambiental, considerándose como un complemento a la caracterización físico-química convencional. Las pruebas de toxicidad constituyen una herramienta eficaz para la predicción de niveles de concentración de compuestos tóxicos, en los que mediante la analítica clásica no se logra obtener efectos observables, extendiéndose estas evaluaciones al ámbito de poblaciones, comunidades o ecosistemas para la identificación de elementos biológicos en riesgo (*Díaz-Báez et al;2004*).

La toxicidad de una sustancia se suele expresar en los siguientes términos:

- **CE<sub>50</sub>/CI<sub>50</sub>:** Concentración efectiva o de inhibición media. Concentración del material que se estima afecta al 50% de los organismos de ensayo.
- **CL<sub>50</sub>:** Concentración letal media. Concentración del material que se estima letal para el 50% de los organismos de ensayo.
- **LOEC:** Concentración más baja a la cual se observa efecto.
- **NOEC:** Concentración a la cual no se observa efecto.

#### **4.1.1 Toxicidad y efectos sobre la salud humana y el ambiente de la fenolftaleína**

La fenolftaleína se ha utilizado comúnmente como laxante por más de 20 años. Sin embargo, su uso en laxantes decreció desde 1997 cuando la administración de alimentos y drogas de los Estados Unidos (FDA) propuso retractarse de su clasificación como un medicamento de venta sin preinscripción por considerarse como posible agente carcinógeno humano; es por ello que ha sido evaluada en estudios de carcinogénesis por el programa nacional de toxicología (*Castro- Huetio; 2006*).

Se debe destacar que las rutas mas importantes de exposición humana a la fenolftaleína son por ingestión, contacto dérmico e inhalación de aire contaminado por procesos de producción de este compuesto (*Castro- Huetio; 2006*).

La Fenolftaleína fue reportada como un potencial cancerígeno, multiespecies y multisitios, por el programa nacional de toxicología de la Agencia Estadounidense EHP (Environmental Health Perspectives – Perspectivas ambientales de la Salud), en un estudio realizado a roedores para evaluar los riesgos potenciales en seres humanos por la ingestión de este químico (*Castro-Huetio; 2006*).

En los estudios, las ratas y los ratones fueron alimentados con fenolftaleína durante dos años en dosis de: 12.000, 25.000, y 50.000 partes por millón (ppm) a las ratas; y 3.000, 6.000, y 12.000 ppm a los ratones. Los roedores entonces fueron examinados para la presencia de la patología cancerosa y no cancerosa (*Castro-Huetio; 2006*).

Entre los resultados encontrados en el estudio, se evidencia la clara actividad carcinógena en las ratas masculinas y femeninas, basada en incidencias crecientes de neoplasmas benignos de la médula suprarrenal y de neoplasmas benignos y malignos de los riñones. Además en las ratas femeninas tumores malignos en los ovarios. Según lo anterior, la fenolftaleína puede causar alteraciones celulares en animales como daños cromosómicos. Sin embargo, la agencia afirma que es difícil asemejar estos riesgos de animales en humanos (*Castro-Huetio; 2006*).

Un estudio reciente, evaluó los posibles efectos cancerígenos utilizando ratones machos y hembras, los cuales fueron expuestos a ingestión de fenolftaleína al 97 % de pureza en comida por 27 semanas. Los estudios toxicológicos no evidenciaron actividad carcinogénica de fenolftaleína en ratones machos y hembras expuestos a 200, 375, 750, 3000 y 12000 ppm; sin embargo, la fenolftaleína induce a hiperplasia atípica, lesión preneoplásica del timo, proliferación de células hematopoiéticas en el bazo, en ratones machos y hembras; y toxicidad del riñón y sistema reproductor en los ratones machos (*Castro- Huetio; 2006*).

Considerando lo anterior, la fenolftaleína no podría ser dañina para las personas, sin embargo, los resultados de las investigaciones, proporcionan una bandera roja de precaución (*Castro-Huetio; 2006*).

Informaciones adicionales sobre toxicidad (Citadas por *Castro-Huetio; 2006*):

*Inhalación:* Puede causar tos y estornudos.

*Ingestión:* en grandes cantidades puede causar náuseas, vómito, molestias gastrointestinales, fiebre, efectos sobre el sistema cardiovascular, efectos sobre el sistema nervioso central. En pequeñas cantidades (30 – 100 mg), puede causar purgación, colapso y descenso en la presión sanguínea.

*Contacto en la piel:* No es considerado muy peligroso, pero si es absorbido por la piel causa los mismos efectos que ingerido.

*Contacto con ojos:* Poco irritante (Ficha de seguridad, Fenolftaleína)

La ficha de datos de seguridad según directiva 2001/58/CE, ([www.panreac.com](http://www.panreac.com)) para la fenolftaleína proporciona la siguiente información en cuanto al ambiente:

Prevenir la contaminación del suelo, aguas y desagües.

Ecotoxicidad: *Daphnias* CE<sub>0</sub>: 7800 mg/l; Peces CL<sub>50</sub> >10000 mg/l.

Degradabilidad: Producto biodegradable.

No deben esperarse interferencias en depuradoras si se usa adecuadamente. Manteniendo las condiciones adecuadas de manejo no cabe esperar problemas ecológicos.

#### **4.1.2. Tratamiento fotocatalítico de residuos con fenolftaleína**

Los residuos con fenolftaleína fueron tratados con 500 ppm de TiO<sub>2</sub> y 2 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a un pH de 9.2 durante 8 horas de exposición a luz ultravioleta, tras el tratamiento se centrifugaron para eliminar las nanopartículas de TiO<sub>2</sub> y poder medir por espectrofotometría la concentración de la fenolftaleína.

La ecuación que describe la concentración de fenolftaleína respecto a la absorbancia es la siguiente:

$$[\text{fenolftaleína}] = \frac{\text{Abs} + 0,0134}{0,0315}$$

La medida en el espectrofotómetro se hizo a 550 nm a un pH de 9.2. El residuo sin tratar registró una absorbancia de 0.215 que según la ecuación anterior equivale a 7.25 ppm y el residuo tratado presentó una absorbancia de 0.025, correspondiente a una concentración de 1.22 ppm.

#### 4.1.3. Toxicidad y efectos sobre la salud humana y el ambiente del metil naranja

Los colorantes azoicos se han cuestionado reiteradamente, debido a que muchos colorantes de esta familia (no los autorizados para uso alimentario) han demostrado ser cancerígenos en experimentos con animales. Una diferencia fundamental es que los colorantes cancerígenos son poco polares, solubles en grasas, y atraviesan con cierta facilidad la barrera intestinal, incorporándose al organismo. En cambio, los colorantes autorizados, que son muy polares y solubles en agua, no son absorbidos (*Castro-Huetio; 2006*).

Los datos con que se dispone en la actualidad, no son suficientes para una correcta valoración toxicológica. Con base en las propiedades fisicoquímicas, las características peligrosas más probables son: por contacto ocular, irritaciones y riesgo de ceguera (lesión irreversible del nervio óptico). Los colorantes azoicos con un componente arilamínico se clasifican como potencialmente cancerígenos, aunque no se descartan otras características peligrosas (*Castro-Huetio; 2006*). La DL<sub>50</sub> oral en ratas es 60 mg/Kg (*www.chemdat.com*). Se considera como contaminante del agua y una sustancia combustible muy tóxica (*www.chemdat.com*).

#### 4.1.4. Tratamiento fotocatalítico de residuos con metil naranja

Los residuos con metil naranja se trataron con 300 ppm de TiO<sub>2</sub> y 0,3 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a un pH de 4.5 durante 2 horas de exposición a luz ultravioleta e igualmente tras el tratamiento se centrifugaron para eliminar las nanopartículas de TiO<sub>2</sub> y poder medir por espectrofotometría la concentración del metil naranja.

La ecuación que describe la concentración de metil naranja respecto a la absorbancia es la siguiente:

$$[\text{metil} - \text{naranja}] = \frac{\text{Abs} - 0,076}{0,06023}$$

La medida en el espectrofotómetro se efectuó a 460 nm a un pH de 4.5. El residuo sin tratar registró una absorbancia de 0.192 que según la ecuación anterior equivale a 1.926 ppm y el residuo tratado registró una absorbancia de 0.096, correspondiente a una concentración de 0.332 ppm.

#### 4.1.5. Toxicidad y efectos en el ambiente del sulfato de sodio, carbonato de sodio y carbonato de calcio.

En los humanos el límite recomendado en agua potable del ión sulfato es 250 mg/L (*Sawyer et al; 2000*), pero por lo general las sales como sulfato de sodio, son consideradas inocuas en el ambiente siempre y cuando las cantidades sean pocas (Entre 4 y 10 mg/L de  $\text{SO}_4^-$  en agua dulce, según Palacio, 1990); pero ya que los residuos se diluyeron en agua dura reconstituida (agua de dilución), para efectos de realizar el experimento, se presumió que las concentraciones de estas sales eran elevadas debido a que, se suman las cantidades que tienen el agua dura reconstituida y la de los residuos. Aún así, según *Ville et al; 1998*, el impacto ambiental de estas sustancias está mas ligado al efecto sinérgico y la generación de otras, que a un efecto propio excepto el de un exceso de salinidad. En este caso es de importancia revisar que posibles efectos pueda generar sobre la lechuga la excesiva salinidad.

Cantidades excesivas de sales en la tierra impiden la absorción de agua por la planta, cambian la absorción de nutrientes y también a veces resulta una toxicidad por elementos de sales individuales en el suelo.

La lechuga suele tener resistencia medio baja a la salinidad en suelos. ([www.salfarm.com](http://www.salfarm.com)).

Los efectos de la salinidad para las plantas se podrían agrupar bajo tres aspectos diferentes: Relaciones hídricas, balance de energía y nutrición ([www.edafologia.ugr.es](http://www.edafologia.ugr.es)) como sigue:

**Relaciones hídricas.** La concentración de sales solubles eleva la presión osmótica de la solución del suelo. Si tenemos en cuenta que el agua tiende a pasar de las soluciones menos concentradas a las más concentradas, con objeto de diluir éstas últimas e igualar las presiones osmóticas de ambas, se comprende que cuando la concentración salina de la solución del suelo es superior a la del jugo celular de las plantas, el agua tenderá a salir de éstas últimas hacia la solución del suelo. Este efecto llevó a Shimper (1903) a plantear la teoría de la sequedad fisiológica, en la que se postula que en medios salinos, aunque exista una humedad elevada, las plantas sufren estrés hídrico, se secan y acaban muriendo. ([www.edafologia.ugr.es](http://www.edafologia.ugr.es)).

**Balance energético.** No obstante, esta teoría no describe completamente todos los efectos perjudiciales de la salinidad, ya que en ocasiones las plantas no sufren estrés hídrico sino que disminuyen considerablemente su altura. Para explicar este efecto, Bernstein (1961) desarrolló la teoría del ajuste osmótico, la cual propone que las plantas, al aumentar la presión osmótica de la solución del suelo, se ven obligadas a una adaptación osmótica de sus células para poder seguir absorbiendo agua; adaptación que requiere un consumo de energía que se hace a costa de un menor crecimiento. Aceves (1979) propone la teoría de la división y el crecimiento celular, en la cual la disminución del

crecimiento se atribuye a que las sales afectan la división celular, producen un engrosamiento prematuro de las paredes celulares y limitan el crecimiento de forma irreversible. ([www.edafologia.ugr.es](http://www.edafologia.ugr.es)).

**Nutrición.** En el aspecto nutricional, se produce una serie de importantes modificaciones, debido, por un lado, a las variaciones de pH que afectan a la disponibilidad de los nutrientes, y por otro, a las interacciones ocasionadas por la presencia en exceso de determinados elementos. Tal sucede con los cloruros, nitratos y fosfatos, el calcio y el sodio o los del potasio y sodio. La dominancia de **calcio** provoca antagonismos, entre otros, sobre el potasio, magnesio, hierro, boro y zinc. Sin embargo, existen relaciones de sinergismo entre potasio e hierro y entre magnesio y fósforo.

Igualmente la presencia en exceso de ciertos iones puede provocar toxicidad, debido a su acumulación en distintas partes de las plantas, como pueden ser las semillas, los tallos y las hojas. Los más significativos, en este aspecto, son los cloruros, **el sodio** y el boro, afectando con mayor incidencia a los cultivos plurianuales. ([www.edafologia.ugr.es](http://www.edafologia.ugr.es)).

#### **4.2. PRINCIPIO TEÓRICO DEL BIOENSAYO TOXICOLÓGICO CON SEMILLAS DE LECHUGA (*Lactuca sativa*)**

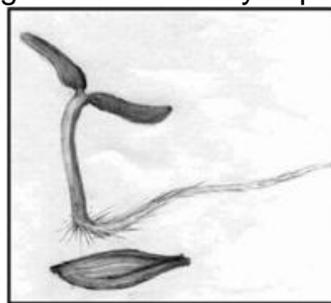
El bioensayo de toxicidad con semillas de lechuga (*Lactuca sativa*) es una prueba estática de toxicidad aguda (120 h de exposición) en la que se pueden evaluar los efectos fitotóxicos de compuestos puros o de mezclas complejas en el proceso de germinación de las semillas y en el desarrollo de las plántulas (Figura 1) durante los primeros días de crecimiento.

Como puntos finales para la evaluación de los efectos fitotóxicos, se determinan la inhibición en la germinación y la inhibición en la elongación de la radícula y del hipocotilo. Es importante destacar que durante el periodo de germinación y los primeros días de desarrollo de la plántula ocurren numerosos procesos fisiológicos en los que la presencia de una sustancia tóxica puede interferir alterando la supervivencia y el desarrollo normal de la planta, siendo por lo tanto una etapa de gran sensibilidad frente a factores externos adversos.

Por otra parte, muchas de las reacciones y procesos involucrados son generales para la gran mayoría de las semillas, por lo que la respuesta de esta especie y los datos obtenidos a partir de la aplicación de esta prueba son en gran medida representativos de los efectos en semillas o plántulas en general.

El éxito o aptitud de una plántula para establecerse en un ambiente determinado es relevante para garantizar la supervivencia de la especie. La evaluación del desarrollo de la radícula y del hipocotilo constituye un indicador representativo para determinar la capacidad de establecimiento y desarrollo de la planta (*Díaz-Báez et al; 2004*).

Figura 1. Morfología de la semilla y la plántula de lechuga.



Fuente: [www.idrc.com](http://www.idrc.com)

A diferencia de la prueba tradicional de germinación de semillas, la evaluación del efecto en la elongación de la radícula y del hipocotilo de las plántulas permite ponderar el efecto tóxico de compuestos solubles presentes en niveles de concentración tan bajos que no son suficientes para inhibir la germinación, pero que sin embargo pueden retardar o inhibir completamente los procesos de elongación de la radícula o del hipocotilo, dependiendo ello del modo y sitio de acción del compuesto. De esta manera, la inhibición en la elongación de la radícula e hipocotilo constituyen indicadores subletales muy sensibles para la evaluación de efectos biológicos en vegetales, aportando información complementaria a la proporcionada al estudiar el efecto en la germinación.

Este ensayo puede ser aplicado para la evaluación de la toxicidad de compuestos puros solubles, de aguas superficiales (lagos, ríos), aguas subterráneas, aguas para consumo humano, aguas residuales domésticas e industriales, además de lixiviados de suelos, sedimentos, lodos u otras matrices sólidas. A diferencia de otras pruebas en las que se consideran algas o plantas acuáticas sumergidas como organismo diagnóstico, el bioensayo con semillas permite evaluar la fitotoxicidad de muestras coloreadas o con elevada turbiedad de manera directa y sin necesidad de filtración previa, reduciéndose así las interferencias debidas al pretratamiento, además de simplificar el procedimiento de prueba ([www.idrc.com](http://www.idrc.com)).

Si bien *L. sativa* no es una especie representativa de ecosistemas acuáticos, la información generada a partir de esta prueba de toxicidad proporciona datos acerca del posible efecto de los contaminantes en las comunidades vegetales cercanas a las márgenes de cuerpos de agua contaminados, siendo también una especie interesante de considerar por su importancia desde el punto de vista hortícola. Por otra parte, es de fácil y rápida germinación, por lo que es posible desarrollar la prueba en pocos días ([www.idrc.com](http://www.idrc.com)).

En la incorporación de esta prueba en una batería de bioensayos es importante considerar el compromiso entre la sensibilidad de la especie *L. sativa*, 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 reuso de biosólidos ([www.idrc.com](http://www.idrc.com)).

### 4.3. MUESTRAS

Las muestras estudiadas fueron los residuos que se generan en las prácticas académicas del Laboratorio de Ingeniería Ambiental y Sanitaria que emplean metil naranja y fenolftaleína como indicadores en titulaciones ácido base; en éste caso, provenientes de la estandarización de las soluciones de ácido sulfúrico e hidróxido de sodio. Los dos residuos se analizaron antes y después de ser tratados mediante fotocátalisis.

Estos residuos se vierten generalmente neutralizados y diluidos al máximo a la red de alcantarillado, dejando la llave del agua potable abierta mientras se realiza la descarga.

Cabe mencionar que los residuos no tienen concentraciones altas de fenolftaleína o metil naranja, pues, en este tipo de experimentos solo se usan unas cuantas gotas de estos indicadores por cada prueba, y que sus mayores componentes son, además de fenolftaleína y metilnaranja,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , o  $\text{CaCO}_3$ , y agua, ya que, los ácidos y bases son neutralizados al verterse los residuos. Estas concentraciones varían al someterse a fotocátalisis, a la dilución que se realiza en el bioensayo y a los procesos de equilibrio químico de los iones presentes.

Por conveniencia se nombraron los residuos de la siguiente manera:

- Residuo 1A: Residuo de las estandarizaciones de hidróxido de sodio con fenolftaleína sin ser tratado por fotocátalisis.
- Residuo 1B: Residuo de las estandarizaciones de hidróxido de sodio con fenolftaleína después de ser tratado por fotocátalisis.
- Residuo 2A: Residuo de las estandarizaciones de ácido sulfúrico con metil naranja sin ser tratado por fotocátalisis.
- Residuo 2B: Residuo de las estandarizaciones de ácido sulfúrico con metil naranja después de ser tratado por fotocátalisis.

Se determinó que los residuos tipo 1 tienen una concentración de fenolftaleína, en el caso sin tratamiento, de 7,25 ppm y de 1,22 ppm, después del tratamiento. En los residuos tipo 2 se encontró que la concentración del metil naranja es de 1,926 ppm antes del tratamiento y 0,327 ppm después de él. La medida de éstas concentraciones se realizó de acuerdo a los métodos seguidos por el grupo de investigación GIRP.

En la estandarización de ácido sulfúrico se suele pesar 75 mg de carbonato de sodio o calcio y diluirlo en 50 mL de agua destilada lo que corresponde a una concentración de 1,5 mg/L y se titula con unos pocos mililitros de ácido así que, ésta es la concentración de carbonatos aproximada de los residuos tipo 1.

El hidróxido de sodio, por lo general 0,1N, se titula con ácido sulfúrico y por tanto la concentración del  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  resultante debe estar cerca de 0,05N.

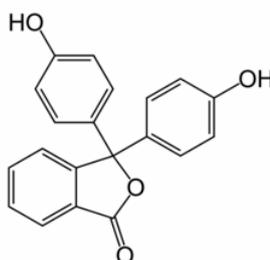
Se debe tener en cuenta que las concentraciones de sulfatos y carbonatos en los residuos es sólo una estimación ya que, en el mismo recipiente de recolección de los residuos se pueden verter distintas soluciones provenientes de estandarizaciones de los mismos ácidos o bases pero de diferente concentración.

A continuación se describen las características de los indicadores que contienen los residuos que por ser las moléculas más complejas contenidas en los residuos, se supone podrían ser las de mayor toxicidad.

#### 4.3.1. Fenolftaleína

La fenolftaleína (Figura 2) es un indicador de pH que en soluciones ácidas permanece incoloro, pero en presencia de bases se torna rosa o violeta. Es un poliacido, que absorbe en el visible (553 nm) cuando se encuentra en su forma básica (Castro-Huetio; 2006).

Figura 2. Estructura molecular de la Fenolftaleína



Fuente: Castro-Huetio; 2006

Es un sólido blanco inodoro que se forma principalmente por reacción del fenol, anhídrido ftálmico y ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ); sus cristales son incoloros. No es soluble en agua, por lo que normalmente se disuelve en alcohol para su uso en experimentos. La fenolftaleína es un ácido débil que pierde cationes  $\text{H}^+$  en solución. La molécula de fenolftaleína es incolora, en cambio el anión derivado de la fenolftaleína es de color rosa. Cuando se agrega una base, la fenolftaleína (siendo ésta inicialmente incolora) pierde  $\text{H}^+$  formándose el anión y haciendo que tome coloración rosa (Castro-Huetio; 2006).

Tabla 1. Propiedades físicas y químicas de la Fenolftaleína

Fórmula Molecular	$\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{O}_4$
Masa molar	318.33g/mol
Densidad	0.89 g/cc (20°C)
Punto de fusión	261-263 °C

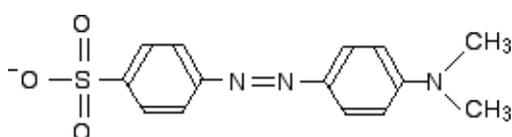
### 4.3.2. Metil Naranja

El Naranja de metilo o heliantina, es un colorante azoderivado, muy utilizado desde 1878 como indicador en volumetrías ácido – base.

Según el pH el naranja de metilo puede tener el grupo azo protonado o no, presentando de esta forma diferentes colores según el pH. La estructura presenta cambio del color rojo a naranja-amarillo entre pH 3.1 y 4.4.

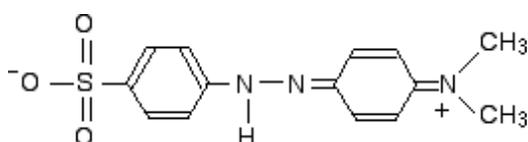
La estructura de este indicador a pH por encima de 4.4 (naranja-amarillo), se presenta en la Figura 3. La Figura 4 muestra la estructura química del naranja de metilo a pH inferior de 3.1 (rojo) (*Castro-Huetio; 2006*).

Figura 3. Estructura del naranja de metilo a pH superior a 4.4



Fuente: *Castro-Huetio; 2006*

Figura 4. Estructura del naranja de metilo a pH inferior a 3.1.



Fuente: *Castro-Huetio; 2006*

Las dos modificaciones estructurales que sufre el naranja de metilo presentan absorción en el espectro UV-visible, la forma amarilla en el visible presenta un máximo de absorción alrededor de 440 nm y la forma naranja absorbe a 520 nm, presenta un pico a 276 nm (amarilla) y 343 nm (rojo) en la región UV (*Castro-Huetio; 2006*).

Tabla 2. Propiedades físicas y químicas del naranja de metilo.

Fórmula Molecular	C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> N <sub>3</sub> NaO <sub>3</sub> S
Masa molar	327.34 g/mol
Densidad	1.00 g/cc (20°C)

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1. GENERALIDADES

#### 5.1.1 Reactivos y materiales ([www.idrc.com](http://www.idrc.com)).

- Semillas de lechuga (*Lactuca sativa var Simpson*).
- Agua dura reconstituida (APHA, 1992). Para su preparación se utiliza reactivos Grado ACS y agua destilada en *Millipore Supera Q*.
- Cajas de Petri de 200 mm de diámetro.
- Papel de filtro.
- Matraces aforados de 100 mL.
- Pipetas volumétricas de 0.1, 5 y 10 mL.
- Regla.
- Pinzas.
- Toallas de papel.
- Papel de envoltura.
- Cámara oscura termostaticada ( $22 \pm 2$  °C).

#### 5.1.2 Procedimiento para el desarrollo de la prueba ([www.idrc.com](http://www.idrc.com)).

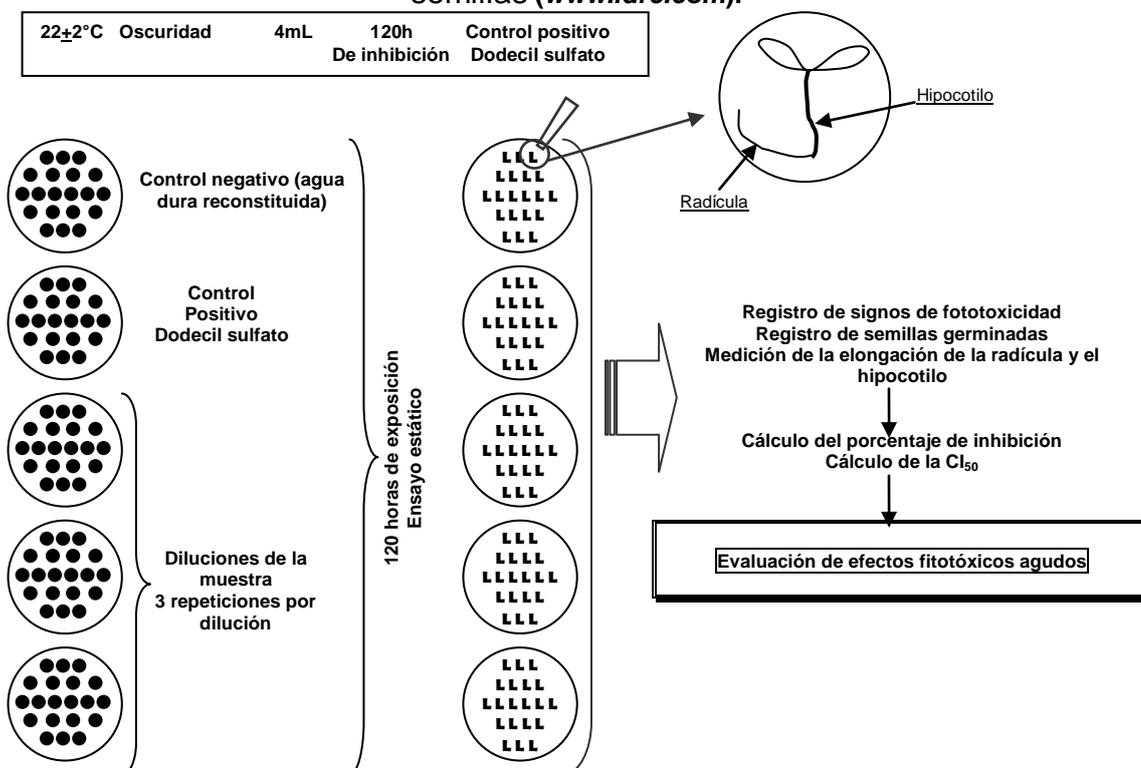
Para el caso de las muestras cuya toxicidad es desconocida, se sugiere hacer una prueba utilizando diluciones logarítmicas (100; 10; 1; 0,1; 0,01) que permitan establecer el intervalo de concentración conveniente para obtener valores de efecto entre el 100 y 0 % necesarios para calcular la  $CI_{50}$  ([www.idrc.com](http://www.idrc.com)).

Con el fin de controlar la sensibilidad de las semillas, simultáneamente a la evaluación de la toxicidad de una muestra debe realizarse un control positivo, en este caso se usó dodecil sulfato de sodio como tóxico de referencia. La concentración de prueba de este control es la correspondiente a la  $CI_{50}$  para el lote de semillas en uso ([www.idrc.com](http://www.idrc.com)).

En la Figura 5 y Tabla 3 se resume el procedimiento del ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga:

- Se coloca en cada caja de petri un disco de papel de filtro.
- Saturar el papel de filtro con 4 o 5 mL de la dilución evitando que se formen bolsas de aire.
- Con la ayuda de una pinza, se colocan cuidadosamente veinte semillas
- Se incuban durante 120 h (cinco días) a una temperatura de  $22 \pm 2$  °C.

Figura 5. Esquema general del procedimiento de prueba de toxicidad con semillas ([www.idrc.com](http://www.idrc.com)).



Cada punto final se evalúa comparando la inhibición del crecimiento de la radícula y el hipocotilo en los organismos expuestos a la muestra con respecto a la respuesta en los organismos del control negativo sujetos a las mismas condiciones de ensayo, pero en ausencia del residuo presuntamente tóxico.

Terminado el periodo de exposición (120 h), se procede a cuantificar el efecto.

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

Se mide cuidadosamente la longitud de la radícula y del hipocotilo de cada una de las plántulas correspondientes a cada dilución de muestra y a los controles. La medida de elongación de la radícula se considera desde el nudo (región más engrosada de transición entre la radícula y el hipocotilo) hasta el ápice radicular. La medida de elongación del hipocotilo se considera desde el nudo hasta el sitio de inserción de los dos cotiledones (Figura 6).

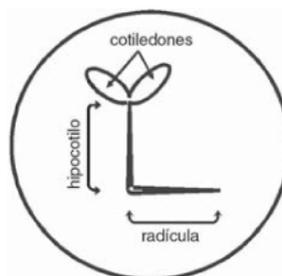
Tabla 3. Resumen de las condiciones recomendadas para las pruebas de toxicidad con *Lactuca sativa* ([www.idrc.com](http://www.idrc.com)).

1	Tipo de ensayo	Estático
2	Temperatura	$22 \pm 2^\circ\text{C}$
3	Calidad de luz	Oscuridad
4	Volumen de solución de prueba	4 mL

5	Agua de dilución	Agua dura reconstituida
6	Número de semillas por réplica	Veinte
7	Número de réplicas	Tres
8	Duración de la prueba	120 h
9	Efecto medido	Inhibición en elongación de la radícula e hipocotilo. 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	Dodecil sulfato de sodio

La Figura 7 muestra los distintos estadios de la semilla durante la prueba de germinación y elongación.

Figura 6. Esquema de plántula de *L. sativa* al finalizar el periodo de exposición



Fuente: [www.idrc.com](http://www.idrc.com)

Figura 7. Estadios por los que atraviesa la semilla durante el ensayo de germinación y elongación



Fuente: [www.idrc.com](http://www.idrc.com)

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%.

### **5.1.3 Expresión de los resultados** (*www.idrc.com*).

Se realizan los siguientes cálculos:

- Promedio y desviación estándar de la elongación de la radícula y del hipocotilo de las plántulas de cada repetición.
- Porcentaje de inhibición del crecimiento de la radícula y del hipocotilo, con el promedio de elongación para cada dilución respecto al promedio de elongación del control negativo.
- Porcentaje de inhibición en la germinación.

Luego se elaboró la gráfica dosis – respuesta colocando en la ordenada el porcentaje de inhibición y en la abscisa, la concentración. Mediante un método gráfico o el uso de métodos estadísticos, se calculó la concentración que produce el 50% de inhibición ( $CI_{50}/CE_{50}$ ) para cada punto final evaluado.

### **5.1.4 Interpretación de los resultados** (*www.idrc.com*).

El punto final del experimento cuantifica la inhibición en la elongación de la radícula y el hipocotilo, es decir, que determina los efectos subletales, y no necesariamente si los residuos llevan a la muerte a los organismos. La inhibición en la germinación podría considerarse como un efecto letal, siempre y cuando se pueda comprobar que después de los cinco días de exposición, las semillas no germinaron, y que no es solamente un retraso en el proceso de germinación, o sea, que la viabilidad de la semilla se mantenga.

No obstante esto, la inhibición en la germinación registrada al finalizar la prueba, se considera fitotoxicidad, aunque el efecto en la germinación sea reversible.

Otro aspecto a considerar es el mayor desarrollo en la elongación de la radícula o el hipocotilo en algunas muestras con respecto al control. La exaltación en un punto final u hormesis no debe ser interpretada como un efecto favorable o estimulante. Si bien es posible que muchos compuestos (ej.: Cu, Zn) a bajas concentraciones produzcan exaltación por ser micronutrientes vegetales, esta respuesta debe ser evaluada de manera conjunta con los efectos registrados en otras pruebas.

En la aplicación de la prueba con semillas a muestras ambientales, conjuntamente con otros organismos como parte de una batería, se ha detectado en diferentes ocasiones que la exaltación en la respuesta en el

hipocotilo y/o radícula tiene correspondencia con la toxicidad frente a otros ensayos de la batería.

Previo a la implementación de la prueba se verifica que cada lote nuevo de semillas que se utilice tenga un porcentaje de germinación superior al 90 %, sincronización en la germinación y baja variabilidad de la elongación de la radícula e hipocotilo ( $CV < 30 \%$ ).

Con el fin de reducir la variabilidad en los resultados para el caso de semillas no seleccionadas y que presenten gran heterogeneidad en el tamaño, es conveniente realizar una selección previa descartando las fracciones de mayor y menor tamaño y utilizando solamente la fracción más numerosa y de tamaño intermedio. La fracción de menor tamaño puede presentar un alto porcentaje de semillas vanas, mientras que las semillas de mayor tamaño pueden ser más vigorosas, variando la sensibilidad frente a los tóxicos.

Si no es posible obtener lotes de semillas con poder germinativo  $\geq$  al 90%, se debe aumentar el número de semillas por caja para obtener un número mínimo de 18 semillas germinadas. Por otra parte, si se desea aumentar la confiabilidad de los resultados, o en caso de contar con semillas que posean una alta variabilidad en la elongación de la radícula de los controles negativos, aún habiéndolas seleccionado de tamaño uniforme, se recomienda aumentar el número de réplicas por tratamiento.

Es importante establecer cuáles son los valores de elongación en el control negativo, así como la sensibilidad de las semillas frente al tóxico de referencia (control positivo), determinando para cada lote de semillas el valor de  $CE_{50}$ . Se realizan cartas de control para evaluar el crecimiento en los controles negativos (promedio  $\pm 2\sigma$  de la elongación de la radícula) y de la sensibilidad frente al tóxico de referencia (promedio  $\pm 2\sigma$  de la  $CE_{50}$  para el Dodecil sulfato).

La reducción en el poder germinativo ( $< 90 \%$ ) y el aumento en la variabilidad de las medidas de elongación de radícula e hipocotilo en el control negativo a lo largo del tiempo, son indicadores de la reducción de la vitalidad y envejecimiento de las semillas. En este caso se recomienda utilizar un nuevo lote de semillas.

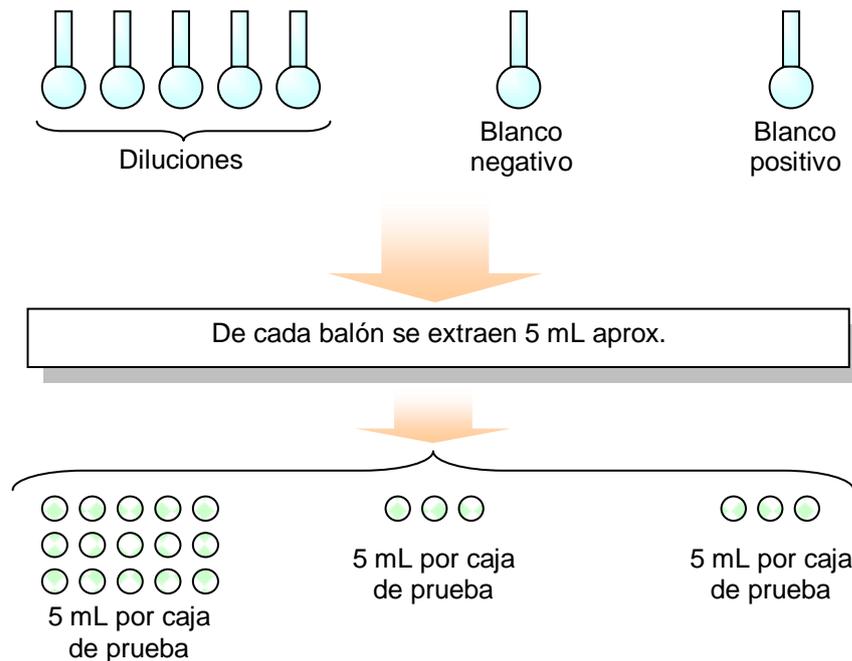
## **5.2. MUESTREO**

De cada residuo se prepararon 5 diluciones conforme a una distribución logarítmica, es decir, 100, 10, 1, 0.1 y 0.01 por ciento almacenadas en balones de 100 mL.

De cada dilución se extrajo 5 mL aproximadamente para cada caja petri de prueba completando tres repeticiones por dilución y por control.

La Figura 8 muestra esquemáticamente el proceso de muestreo.

Figura 8. Esquema del muestreo para cada experimento



### 5.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

La selección del método a utilizar para estimar los valores de  $CL_{50}/CE_{50}/CI_{50}$  de este tipo de pruebas de toxicidad aguda con múltiples concentraciones depende de la forma de la distribución de tolerancias y que tan bien las concentraciones o dosis seleccionadas la caracterizan (por ejemplo, el número de mortalidades parciales).

En general, se recomiendan los siguientes cuatro métodos para la estimación de  $CL_{50}/CE_{50}/CI_{50}$ :

1. Método Probit (paramétrico).
2. Método de Litchfield-Wilcoxon (gráfico).
3. Método de Sperman-Karber (no paramétrico).
4. Método gráfico.

Según *Díaz Báez et al* el protocolo de toxicidad establecido para las semillas de lechuga, el cálculo de la  $CI_{50}$  se realiza mediante el análisis probit. Por lo anterior en este capítulo solo se desarrolla dicho método y los demás solo se enuncian.

### 5.3.1 Análisis de regresión y análisis Probit

Para el cálculo de los  $CL_{50}/CE_{50}/CI_{50}$  generalmente se usa el análisis Probit. En un experimento típico de pruebas de toxicidad aguda se tiene la siguiente situación:

- Concentración de la sustancia o dosis ( $d$ ).
- Número de individuos ( $n$ ).
- Número de organismos muertos o afectados ( $r$ ).
- Porcentaje de efecto ( $p$ ).

$$p = \left(\frac{r}{n}\right) * 100$$

La representación gráfica de  $p$  vs.  $d$ , o relación dosis – respuesta, genera una curva parabólica que muchas veces presenta dificultades en la construcción de un modelo lineal. Una forma de abordar este problema es transformando  $d$  a una escala logarítmica ( $X = \log_{10}(d)$ ), lo cual mostrará una relación dosis-respuesta de forma S o sigmoidea normal, de esta manera la distribución de  $p$  vs.  $X$  será de tipo normal.

Posteriormente, mediante las tablas de Probit se transforma  $p$  (porcentaje de efecto) a unidades probit (buscando en una tabla de distribución normal el valor de  $z$  correspondiente a una probabilidad acumulada igual a  $p$  y sumándole a continuación cinco unidades), se obtiene una distribución de puntos en un sistema bivariado de tipo lineal, los cuales se procesan según un análisis de regresión típico. Vale la pena enfatizar que el Probit es una transformación sobre la tasa de efecto ( $p$ ), y la ecuación generada es de la forma:

$$y = a + bx$$

Donde:

$$y(\text{expresado en unidades probit}) = z + 5$$

$$z = (\text{variable normal estándar} = z_0 \text{ tal que la Prob}(z \leq z_0) = p$$

*ay b son los estimadores de los parámetros de la recta de regresión*

*Así cuando  $p = 50\%$  entonces  $y = 5$ , por lo tanto:*

$$x_5 = \log_{10} CL_{50}, \text{ entonces } CL_{50} = 10^{x_5}$$

En el Anexo 1 se presenta una tabla que relaciona el porcentaje de inhibición y las unidades probit para el cálculo de la  $CL_{50}/CE_{50}/CI_{50}$ . El procedimiento Probit permite encontrar estimadores  $m$ -verosímiles de parámetros de regresión y de

tasas naturales (por ejemplo, tasas de mortalidad) de respuesta para ensayos biológicos cuantales, analizando porcentajes de efecto vs dosis dentro del marco de la regresión. Adicionalmente, hacen dos pruebas de bondad de ajuste: Pearson y Log-Likelihood Ratio. Estas pruebas son importantes, porque si los datos no se ajustan a la línea recta generada, es necesario llevar a cabo un análisis Probit ponderado o aplicar métodos no paramétricos o gráficos para poder determinar la  $CL_{50}/CE_{50}/CI_{50}$ .

## 6. RESULTADOS Y ANÁLISIS

### 6.1. PRELIMINARES

El protocolo estima los aspectos en cuanto al control de calidad analítica de las pruebas de toxicidad, las cuales se tuvieron en cuenta en este experimento, como lo fue lo referente al tóxico de referencia, la preservación de las muestras, el control de sensibilidad, el control de los organismos de prueba, parámetros fisicoquímicos relevantes y la preparación de las soluciones de prueba.

Para el control de sensibilidad se siguió el comportamiento de la elongación de la radícula en los blancos negativos de todos los montajes que se realizaron en la investigación, y el blanco positivo se comparó al inicio y al final de la investigación ya que por la corta duración se asumió que las semillas conservarían su vitalidad y por tanto, no habrían variaciones significativas. En ambos casos, las pruebas con los blancos mostraron que los datos eran confiables según lo establecido por *Díaz-Báez et al*; 2004. Ver la sección Evaluación dosis-respuesta frente al tóxico de referencia (Numeral 6.1.2).

#### 6.1.1. Análisis del agua reconstituida

El agua dura reconstituida o agua de dilución empleada debe cumplir con ciertas características nutricionales y fisicoquímicas que permitan que el desarrollo del bioensayo se concrete exitosamente.

Los parámetros fisicoquímicos del agua reconstituida empleada son los siguientes:

Tabla 4. Características fisicoquímicas del agua de dilución (agua dura reconstituida)

Parámetro	Valor
pH	7.67
OD	7.7 mg/L
Conductividad	1436 $\mu$ s
Dureza Total	1415 mg/L CaCO <sub>3</sub>
Alcalinidad	177 mg/L CaCO <sub>3</sub>

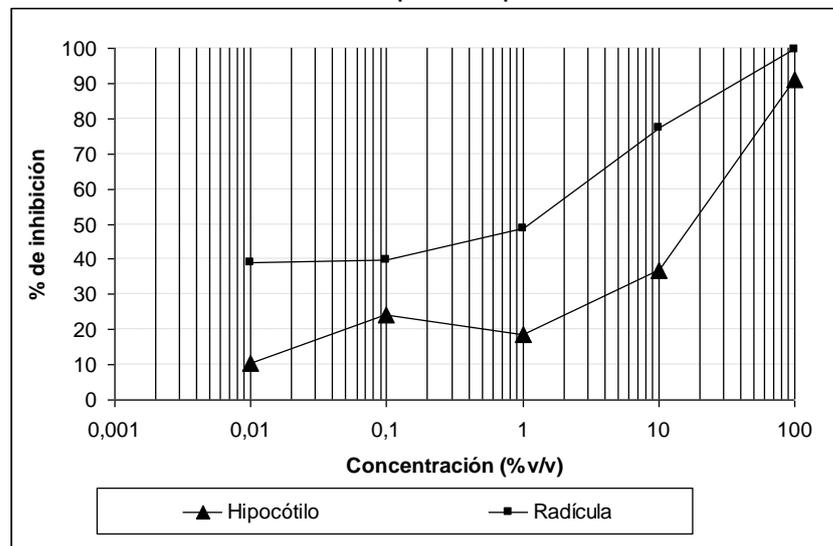
Al mezclarse el agua reconstituida con los desechos el pH se mantuvo cerca de 7 ya que el residuo se neutralizó para la prueba, además, los altos valores de dureza y alcalinidad garantizaban que se tuvieran los nutrientes suficientes para la germinación, y la conductividad y el oxígeno disuelto también fueron los recomendados por *Díaz Báez et al*; 2004.

### 6.1.2. Evaluación dosis-respuesta frente al tóxico de referencia

El tóxico de referencia que se usó fue Dodecil sulfato de sodio a una concentración de 1 g/L, al cual se le determinó la  $CI_{50}$  para usar esa concentración en el control del bioensayo como blanco positivo. El blanco positivo sirve como punto de referencia para determinar que las semillas no cambian su modo de respuesta con el tiempo y por ende dar confiabilidad en los resultados obtenidos.

A continuación se presenta la Figura 9 que muestra, de acuerdo al protocolo mencionado, el barrido logarítmico de concentraciones y su respectivo efecto sobre las semillas de lechuga. Los datos recolectados a lo largo de toda la investigación se encuentran en el Anexo 2.

Figura 9. Curva concentración respuesta para el dodecil sulfato de sodio



Teniendo en cuenta el Anexo 1 se determinaron los valores probit empíricos para los resultados anteriores y se estableció la  $CI_{50}$  de acuerdo al protocolo. A continuación se muestra gráficamente el cálculo de la  $CI_{50}$ .

Figura 10. CI<sub>50</sub> de Hipocotilo para dodecil sulfato de sodio

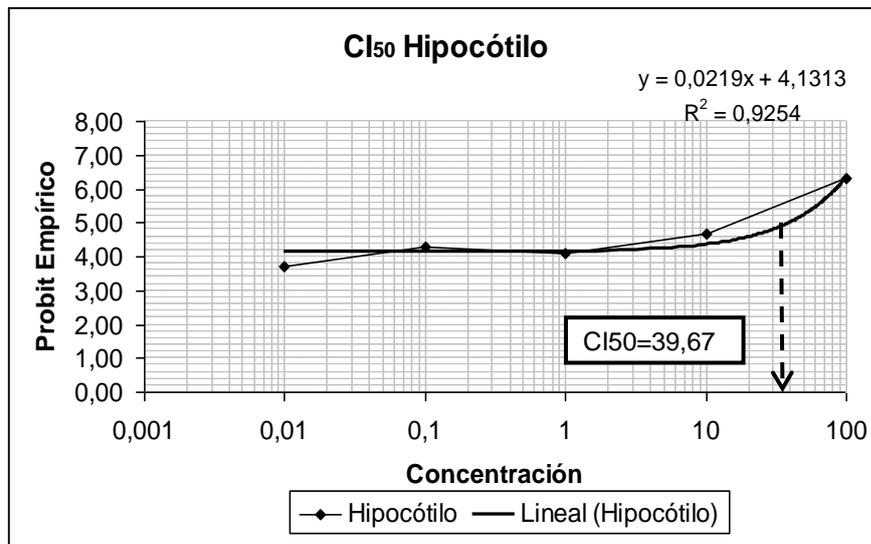
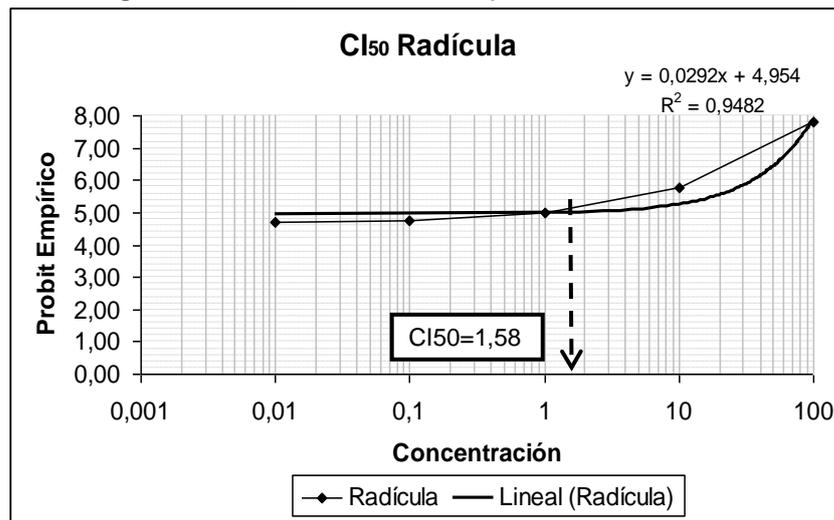


Figura 11. CI<sub>50</sub> de Radícula para dodecil sulfato



Como se ve la CI<sub>50</sub> para el hipocotilo es 39,67% y para la radícula es 1,58% lo que equivale a unas concentraciones de 396,7 ppm y 15,8 ppm de dodecil sulfato de sodio respectivamente.

El protocolo recomienda que antes de empezar un bioensayo se realicen al menos 5 pruebas de CI<sub>50</sub> para el tóxico de referencia y que de ahí en adelante se sigan aumentando los datos, hasta por lo menos veinte repeticiones, para verificar que las semillas no hayan variado su respuesta al tensor con el paso del tiempo, es decir, que el promedio de las CI<sub>50</sub> encontradas están en el rango del promedio  $\pm 2$  veces la desviación estándar; pero debido a la escasez de cajas petri en el laboratorio, y a que el tiempo que duró el experimento fue de unos meses, y que *Díaz-Báez et al* mencionan que las semillas guardadas herméticamente a 4 °C conservan su vigor durante dos años (que es como se guardaron las semillas usadas), se consideró que verificando su vigor al

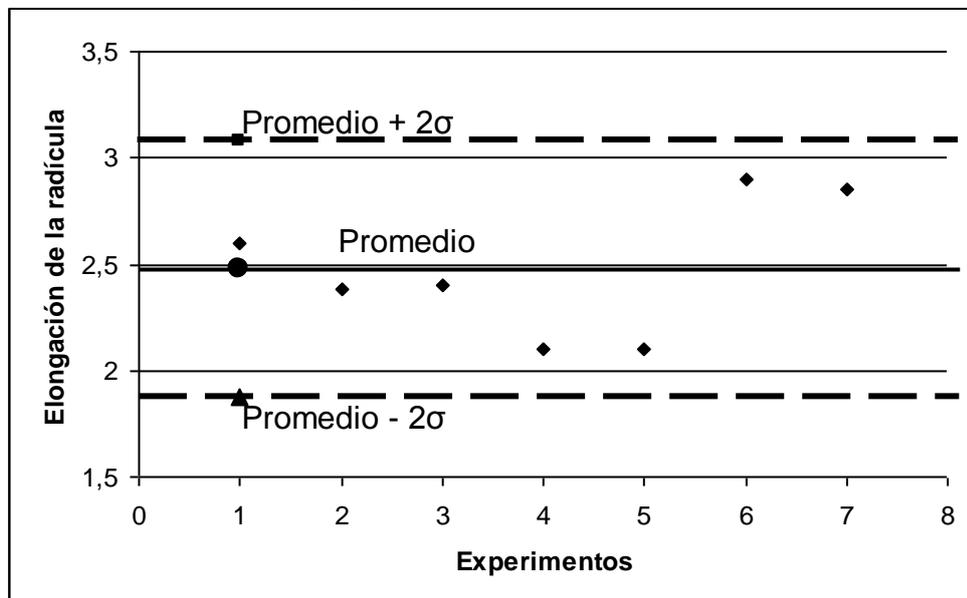
comienzo y final del experimento mediante los controles positivos sería suficiente para asegurarse de que los resultados tienen validez. Ver Anexo 2 (Blancos positivos).

Además continuamente se puede verificar la variabilidad en la respuesta de las semillas con el control negativo asegurándose de que la elongación de la radícula esté entre el promedio  $\pm 2$  veces la desviación estándar como se muestra que ocurre en éste caso en la Figura 12 respecto a la Tabla 5. Con esto se comprueba que la variación en la germinación de las semillas es aceptable y que los resultados son confiables.

Tabla 5. Variabilidad de la elongación de la radícula en los blancos negativos.

Experimento	Elongación Radícula
1	2,60
2	2,38
3	2,40
4	2,10
5	2,10
6	2,90
7	2,85
Promedio	2,48
Desviación	0,30

Figura 12. Variación en la elongación de la radícula a lo largo de los experimentos montados



## 6.2. EVALUACIÓN TOXICOLÓGICA DE LOS RESIDUOS TIPO 1

Usando el agua dura reconstituida y las  $Cl_{50}$  encontradas para control positivo se procede a efectuar el bioensayo con las muestras de los residuos tipo 1 y tipo 2 siguiendo el protocolo establecido.

### 6.2.1. Evaluación dosis – respuesta frente a las muestras del residuo 1A

En la Tabla 6 se resumen los resultados y cálculos efectuados para determinar la respuesta de las semillas en función de la concentración de la muestra, como lo expresa la Figura 13.

Tabla 6. Resumen de los resultados del bioensayo para los residuos 1A

Concentración (%)	$\overline{EH}$	$\overline{ER}$	Blanco Negativo		Inhibición H (%)	Inhibición R (%)
			$\overline{EH}$	$\overline{ER}$		
0,01	1.58	2.50	1.68	2.38	6,02	-5,26
0,1	1.62	2.44			3,67	-2,36
1	1.59	2.45			5,26	-3,14
10	1.80	1.98			-7,17	16,76
100	1.12	0.34			33,13	85,61

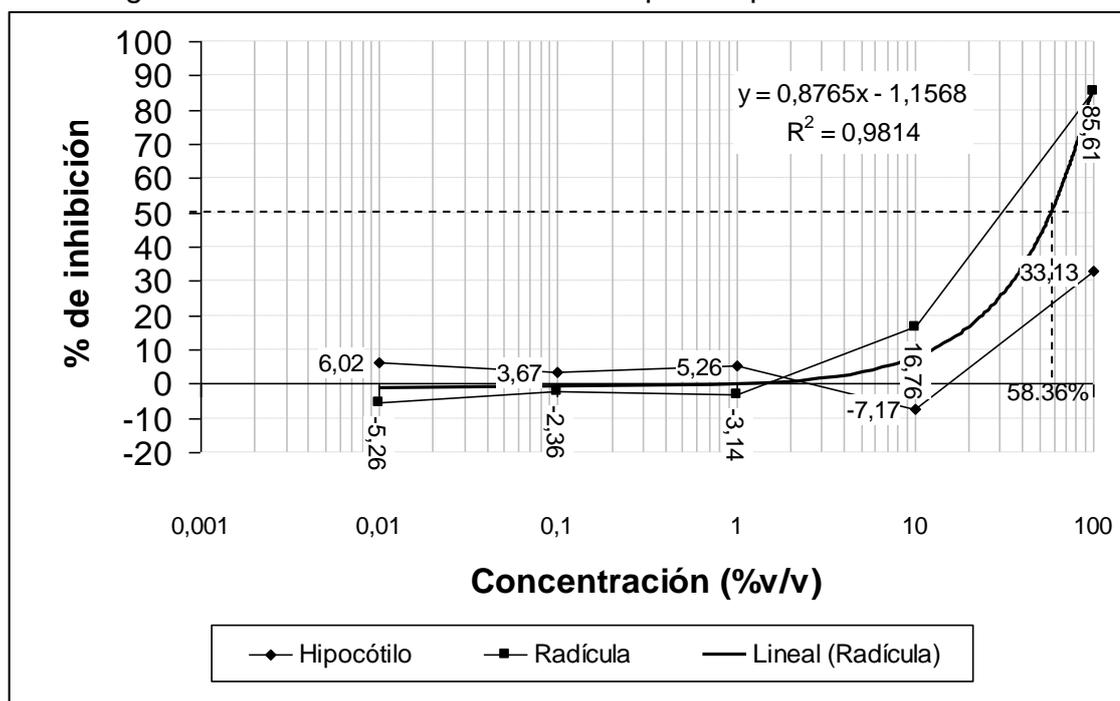
$\overline{EH}$  : Promedio de la elongación del hipocotilo de tres repeticiones

$\overline{ER}$  : Promedio de la elongación de la radícula de tres repeticiones

H: Hipocotilo

R : Radícula

Figura 13. Curva de concentración respuesta para los residuos 1A



Como se observa en la gráfica anterior, para el hipocotilo se presentó un valor de inhibición negativo y para la radícula tres valores, lo que sugiere que a estas concentraciones podría producirse estimulación al crecimiento lo que impediría calcular la  $CI_{50}$  ya que en el método estadístico no se consideran valores negativos. Sin embargo, gráficamente se pudo deducir que la  $CI_{50}$  es 58,36 %, equivalente a 4,231 ppm de fenoltaleína. Esta equivalencia se estableció con base en la concentración de fenoltaleína de la muestra original.

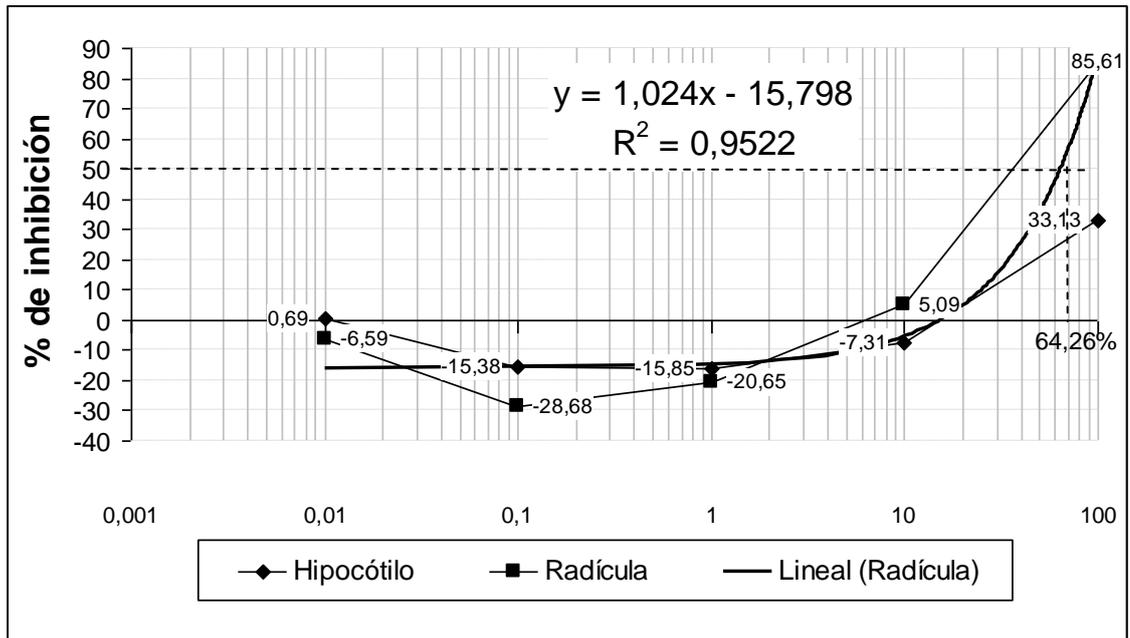
Para efecto de corroborar, en este caso, que los datos no se han afectado por algún tipo de interferencia se procedió a realizar el ensayo nuevamente con las mismas repeticiones y demás condiciones.

La Tabla 7 muestra los datos de la repetición del experimento con los que se elaboró la Figura 14.

Tabla 7. Resumen de los resultados del bioensayo para residuos 1A. Segundo experimento

Concentración (%)	$\overline{EH}$	$\overline{ER}$	Blanco Negativo		Inhibición H (%)	Inhibición R (%)
			$\overline{EH}$	$\overline{ER}$		
0,01	1.67	2.54	1.68	2.38	0,69	-6,59
0,1	1.94	3.06			-15,38	-28,68
1	1.94	2.87			-15,85	-20,65
10	1.80	2.26			-7,31	5,09
100	1.12	0.34			33,13	85,61

Figura 14. Curva de concentración respuesta para los residuos 1A. Segundo experimento



Los anteriores datos están acordes a los hallados en el primer experimento y hacen suponer que a concentraciones por debajo del 10% se podría generar estimulación en el crecimiento, mas no, inhibición; y teniendo en cuenta que el desecho se agrega a la red de alcantarillado de manera diluida, los efectos serían, como lo muestran las Figuras 13 y 14, cercanos al cero por ciento y no mayor al diez por ciento.

Además, si se observa en éstas gráficas la inhibición sobre el hipocotilo, resalta el hecho de que éste necesita un residuo más concentrado para llegar a inhibir el 50%, pues su inhibición llega máximo hasta el 33.13% con el residuo sin diluir, es decir, que el residuo tiene una concentración mas baja de la que se necesita para inhibir el 50% de la elongación del hipocotilo. Pero también hay que tener en cuenta que la radícula reacciona de una manera más notable y que la  $CI_{50}$  estaría a una concentración entre el 10 y el 100%, y gráficamente se puede ver que ésta, esta alrededor del 64.26%, correspondiendo a 4,659 ppm de fenoltaleína.

El valor más aceptable es el del primer experimento ya que el factor de correlación es más alto. Hacer esta aproximación es suficiente ya que como se ha mencionado, los residuos se vierten a la red de alcantarillado, neutralizados y diluidos, y por ende la concentración sería inferior a la  $CI_{50}$ . Este método de aproximación es conocido como el método gráfico recomendado por Hubert, 1985 ([www.idrc.com](http://www.idrc.com)) y se utiliza cuando no se ha conseguido un ajuste adecuado de los datos y por tanto es menos preciso.

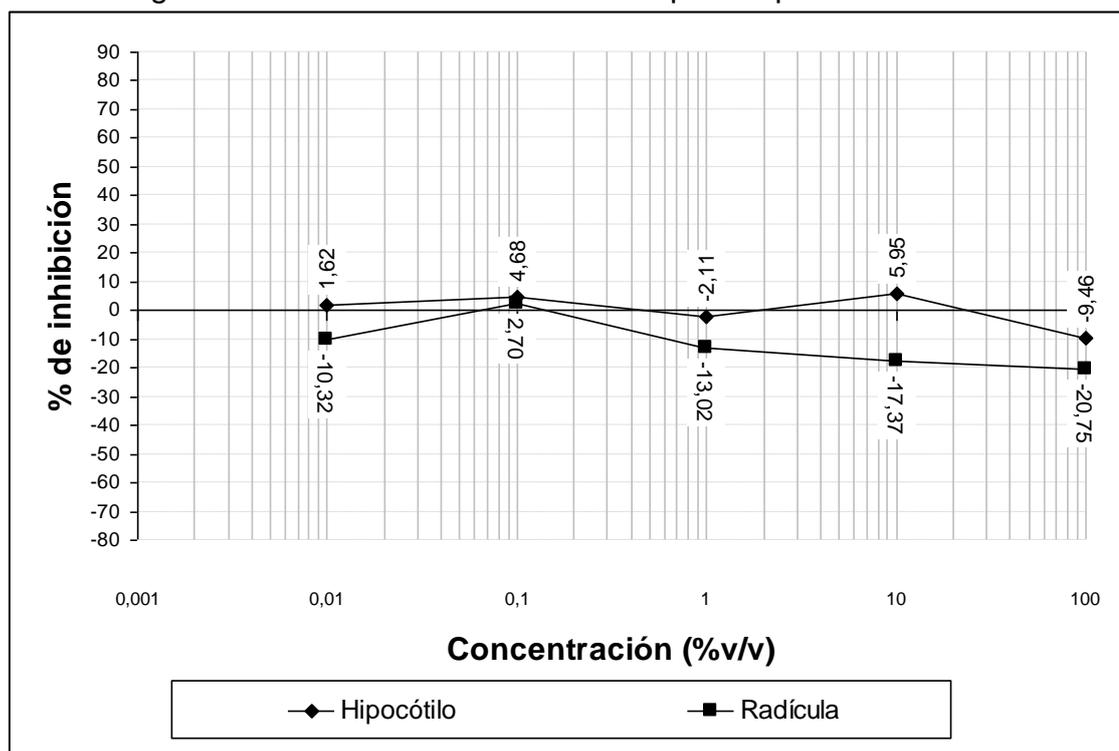
### 6.2.2. Evaluación dosis – respuesta frente a las muestras del residuo 1B

En la Tabla 8 se resumen los resultados y cálculos efectuados para determinar la respuesta de las semillas en función de la concentración de la muestra, como lo expresa la Figura 15.

Tabla 8. Resumen de los resultados del bioensayo para residuos 1B

Concentración (%)	$\overline{EH}$	$\overline{ER}$	Blanco Negativo		Inhibición H (%)	Inhibición R (%)
			$\overline{EH}$	$\overline{ER}$		
0,01	1.81	2.32	1.84	2.10	1,62	-10,32
0,1	1.75	2.04			4,68	2,70
1	1.87	2.37			-2,11	-13,02
10	1.73	2.47			5,95	-17,37
100	2.01	2.54			-9,46	-20,75

Figura 15. Curva de concentración respuesta para residuos 1B



Los datos esta vez muestran que en casi todas las concentraciones se produce estimulación en el crecimiento, más no inhibición; pero de todos modos no se alejan mucho del 0%. Esta situación es predecible ya que el residuo tiene muy baja concentración de fenoltaleína y demás compuestos susceptibles a la fotocatalisis. Los remanentes no oxidados presentes en el residuo, podrían estar generando la poca estimulación que se presenta. Vale la pena mencionar

que la estimulación no se debe considerar un efecto positivo como se menciona en la sección de interpretación de los resultados (numeral 4.2.5).

### 6.3. EVALUACIÓN TOXICOLÓGICA DE LOS RESIDUOS TIPO 2

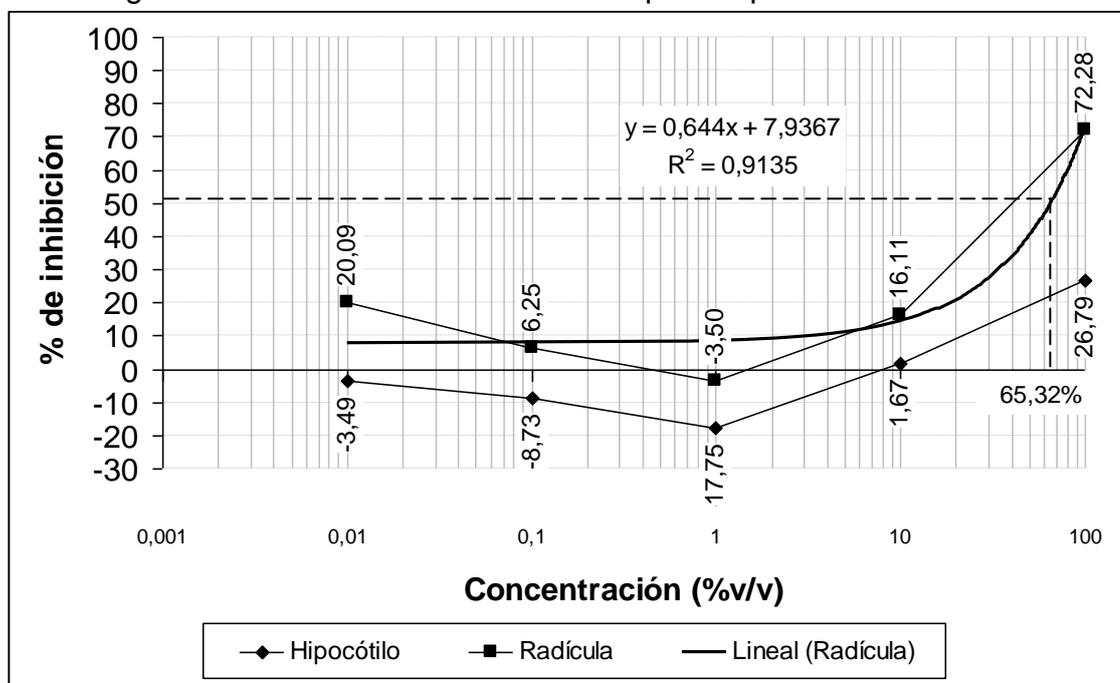
#### 6.3.1. Evaluación dosis-respuesta frente a las muestras de residuos 2A

En la Tabla 9 y Figura 16 se resumen los resultados y cálculos efectuados para determinar la respuesta de las semillas en función de la concentración de la muestra.

Tabla 9. Resumen de los resultados del bioensayo para los residuos 2A

Concentración (%)	$\overline{EH}$	$\overline{ER}$	Blanco Negativo		Inhibición H (%)	Inhibición R (%)
			$\overline{EH}$	$\overline{ER}$		
0,01	180	2.28	1.74	2.85	-3,49	20,09
0,1	189	2.67			-8,73	6,25
1	2.05	2.95			-17,75	-3,50
10	1.71	2.39			1,67	16,11
100	1.27	0.79			26,79	72,28

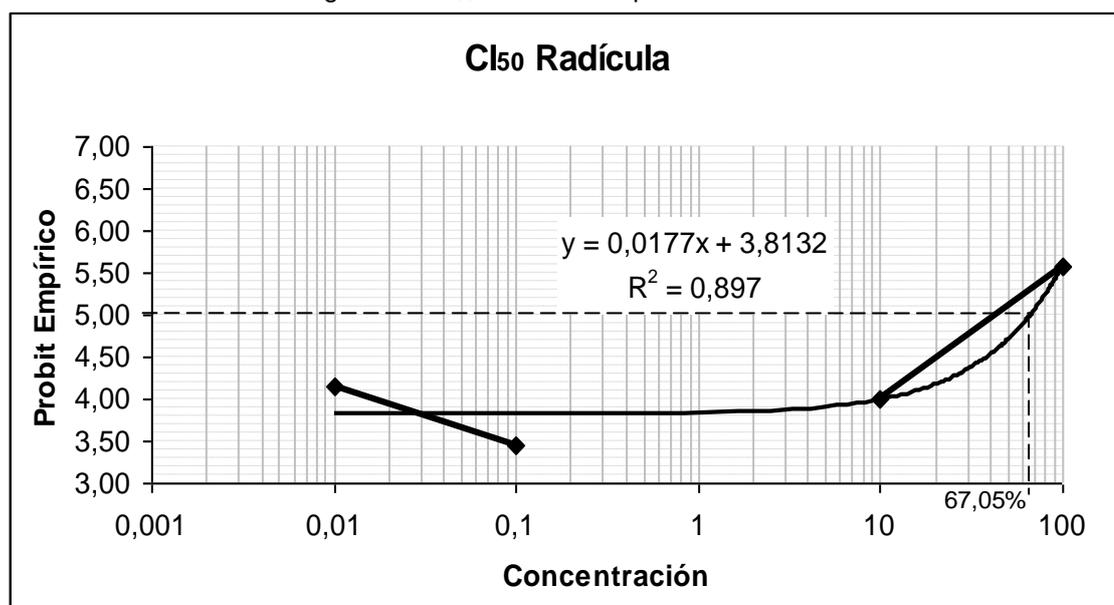
Figura 16. Curva de concentración respuesta para los residuos 2A



Con el método gráfico para la radícula se calcula la  $CI_{50}$  en 65,32 %, equivalente a 1,258 ppm de metil naranja y nuevamente la  $CI_{50}$  para el hipocotilo sobrepasa la concentración del residuo.

Ignorando el valor negativo correspondiente a la concentración de 1 % se pudo hacer una aproximación con el método Probit como se expresa a continuación en la Figura 17.

Figura 17.  $CI_{50}$  de Radícula para residuos 2A



Bajo esta condición la  $CI_{50}$  es 67.05 %, equivalente a 1,291 ppm de metil naranja. Este valor es el más aceptable en comparación al hallado por el método gráfico, ya que es calculado con el método Probit que provee una mayor aproximación.

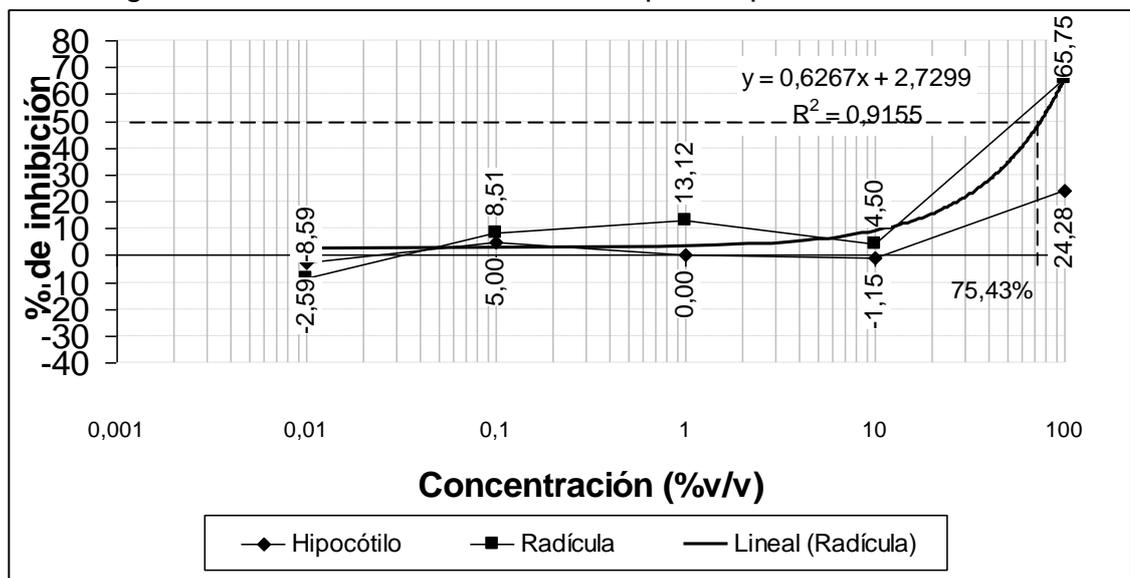
### 6.3.2. Evaluación dosis-respuesta frente a las muestras de residuos 2B

En la Tabla 10 se resumen los datos y cálculos realizados y estos se grafican como se ve en la Figura 18.

Tabla 10. Resumen de los resultados del bioensayo para los residuos 2B

Concentración (%)	$\overline{EH}$	$\overline{ER}$	Blanco Negativo		Inhibición H (%)	Inhibición R (%)
			$\overline{EH}$	$\overline{ER}$		
0,01	1.91	3.15	1.86	2.90	-2,59	-8,59
0,1	1.77	2.65			5,00	8,51
1	1.86	2.52			0,00	13,12
10	1.88	2.77			-1,15	4,50
100	1.41	0.99			24,28	65,75

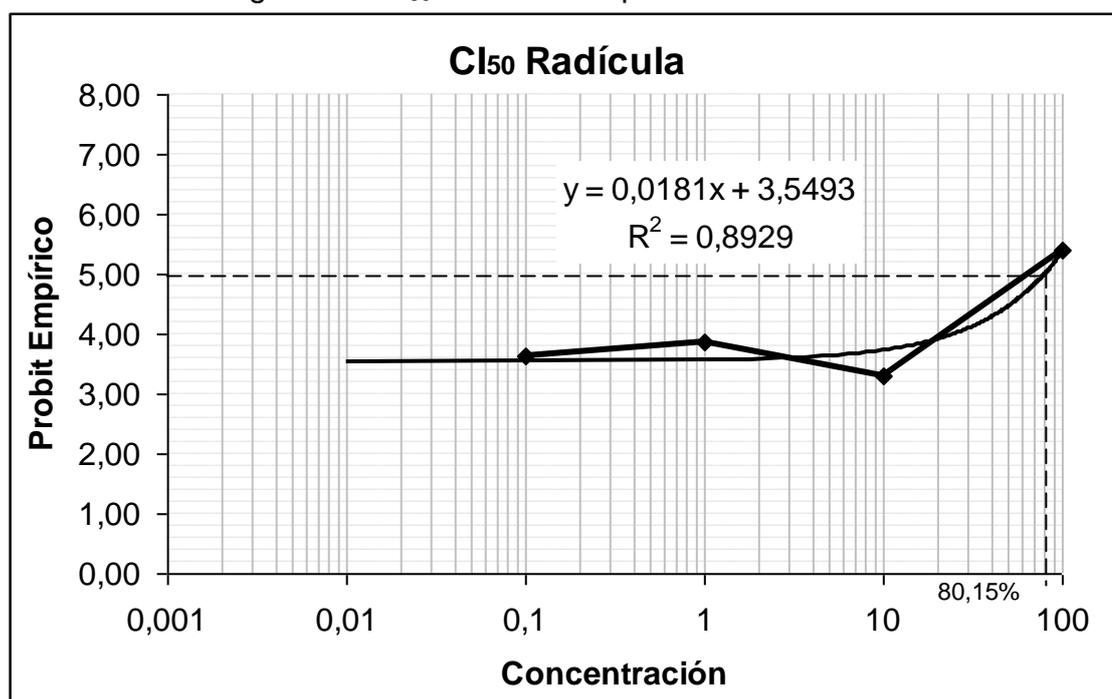
Figura 18. Curva de concentración respuesta para los residuos 2B



Con el método gráfico para la radícula se calculó la CI<sub>50</sub> en 75,43 %, equivalente a 0,247 ppm de metil naranja y para el hipocotilo sobrepasa la concentración de la muestra.

Ignorando el valor negativo correspondiente a la concentración de 0,01 % se puede hacer una aproximación con el método Probit como en el caso anterior. El cálculo se muestra a continuación en la Figura 19.

Figura 19.  $CI_{50}$  de Radícula para los residuos 2B



Así la  $CI_{50}$  es 80,15%, equivalente a 0,262 ppm de metil naranja. Este cálculo es más representativo que el del método gráfico.

El objetivo del tratamiento fotocatalítico es, en principio, oxidar los indicadores, que son los compuestos identificados como los agentes contaminantes principales en los residuos, cosa que se comprueba con las lecturas espectrofotométricas que muestran que las concentraciones disminuyen considerablemente (*Castro-Huetio; 2006*). Al disminuir las concentraciones se asume que los residuos deberían disminuir la toxicidad y efectivamente se ha comprobado que la toxicidad disminuye y por ende el tratamiento es efectivo en ese aspecto.

Ahora bien, es claro que los residuos además de los indicadores, contienen otras sustancias que podrían agregar toxicidad pero, que también pueden ser susceptibles a la fotocatalisis e inhibirse con el tratamiento; pero, en los residuos con metil naranja la toxicidad solo pasó de 67,05% a 80,15%, apenas una diferencia de 13,1%, mientras que en los de fenoltaleína que han sido tratados, la toxicidad es muy poca alejándose bastante de la  $CI_{50}$ . Es decir, en el caso de los residuos con fenoltaleína la toxicidad se reduce considerablemente mientras que los que contienen metil naranja siguen siendo considerablemente tóxicos, pues aun es posible en ellos determinar su  $CI_{50}$ ; lo que nos dirige a pensar que los residuos tratados posiblemente presenten otros componentes derivados de la oxidación fotocatalítica que causen toxicidad, lo que sugiere que los residuos deben someterse a mayor tratamiento antes de verse, hasta procurar que los compuestos derivados por la fotocatalisis desaparezcan.

Una causa de que estos compuestos derivados persistan y no se mineralicen, podría ser que el tiempo de exposición a la luz ultravioleta, que es más corto que en el caso de los residuos con fenolftaleína, es suficiente para descomponer el metil naranja pero no sus derivados y por tanto la coloración de las muestras desaparece pero estos derivados siguen representando un peligro ambiental potencial.

Una prueba de que hay derivados es que la concentración de metil naranja en los residuos tratados, 0,327 ppm, es mucho menor, incluso que la que corresponde a la  $Cl_{50}$  para los residuos sin tratar que es de 1,291 ppm; el que sean diferentes y que la primera sea menor, indica que se tratan de residuos con compuestos diferentes y no simplemente del residuo original con diferente concentración de metil naranja, pues de lo contrario no se habría podido determinar un valor de  $Cl_{50}$  para los residuos de metil naranja tratados, ya que, la concentración de metil naranja en éstos, es aproximadamente del 17% de los residuos sin tratar y como se ve en la Figura 16 y la Figura 17, este porcentaje está muy por debajo de causar el 50% de efecto.

## 7. CONCLUSIONES

- El método probit no aplica en el caso de los bioensayos con los residuos tipo 1 ya que en estos experimentos se presentan varios valores de inhibición negativos que tal método estadístico no considera para el cálculo de la  $CI_{50}$  y fue necesario recurrir a un método gráfico de menor precisión.
- Los valores de inhibición de los hipocotilos para todos los residuos sin tratamiento están por debajo del 50% lo que impide determinar con esta anatomía la  $CI_{50}$ .
- Mediante una extrapolación gráfica se puede aproximar la  $CI_{50}$  con la radícula en 58.36% para el residuo 1A. En el caso del residuo 1B no se pudo determinar la  $CI_{50}$  ya que los valores de inhibición estuvieron muy por debajo del 50%.
- El residuo 1B no representa mayor peligro toxicológico al tener valores tan bajos de impacto, llegando como máximo a -20.75%, sin considerar que la estimulación en el crecimiento sea beneficiosa o un efecto positivo.
- Para el residuo 2A se calculó la  $CI_{50}$  con el método probit en 67.05%, equivalente a 1,291 ppm de metil naranja.
- Para el residuo 2B se calculó la  $CI_{50}$  con el método probit en 80.15% equivalente a 0,262 ppm.
- La diferencia de la toxicidad entre los residuos 2B y 2A es de 13.1%, este valor no se considera como una buena reducción en la toxicidad y lo mas posible es que pueda deberse a la generación de compuestos derivados de la oxidación fotocatalítica que después de la degradación del metil naranja y demás componentes, siguen generando toxicidad, pues si no fuera así no se hubiese encontrado una  $CI_{50}$  en los residuos 2B.

En definitiva, se pudo concluir que el método se puede aplicar a las circunstancias expuestas usando la radícula como punto de partida de la medición, al demostrar ser mas sensible que el hipocotilo, y que el tratamiento por fotocatalisis disminuye drásticamente el potencial toxicológico en los residuos tipo 1, pero no en los tipo 2, pues la diferencia de la toxicidad entre el residuo tratado y el crudo es de apenas 13.1%.

Se sugiere que para mejorar esto se debería estudiar las posibles formas de mineralizar más eficientemente el residuo como lo podría ser prolongar el tiempo de exposición a la luz ultravioleta del fotorreactor.

## 8. RECOMENDACIONES

Para definir que la estimulación del crecimiento producida por los residuos con fenolftaleína es o no positiva, puede realizarse el ensayo con otro indicador biológico como lo puede ser *Daphnia magna*, *Hydra attenuata*, *Selenastrum capricornutum*, etc. (Díaz-Báez et al; 2004)

En futuros bioensayos toxicológicos con lechuga se recomienda tener de antemano bien establecido el tipo y cantidad de materiales que se requerirán por montaje e incluso tener reservas de estos para evitar retrasos y complicaciones.

Las semillas se deben almacenar bien refrigeradas y que permanezcan el menor tiempo posible al aire libre ya que son muy propensas a contaminarse con hongos.

Una regla milimetrada impresa en un papel amplio y laminado ayuda a medir más fácilmente las semillas que una regla común.

Cajas petri de mayor diámetro ayudan mas al libre crecimiento y la extracción de las semillas pero se debe tener en cuenta que se requerirán más de 5 mL de muestra por caja.

Se debe procurar trabajar con un papel filtro que sea lo más inocuo posible ya que algunas pueden tener restos de cloro u otros blanqueadores que afecten la germinación o el crecimiento de las semillas.

En un próximo experimento se deberían realizar pruebas paralelas con muestras que contengan concentraciones conocidas de sulfato de calcio, carbonato de calcio y carbonato de sodio para establecer su influencia en la toxicidad de las muestras, lo mismo que con muestras que contengan solo los indicadores en cuestión.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. CAPÓ M. Miguel (Madrid 2002). Principios Básicos de Ecotoxicología; Diagnóstico, Gestión y Tratamiento del Medio Ambiente. Universidad Complutense de Madrid.
2. CASTRO G. Brenda, HUETIO V. Viviana (Popayán 2006). Fotocatálisis Heterogénea para el Tratamiento de Desechos Líquidos con Presencia de Fenoltaleína Generados en los Laboratorios de Análisis Químico de la Universidad del Cauca. Universidad del Cauca.
3. DÍAZ-BÁEZ María, BUSTOS LÓPEZ Martha, ESPINOSA RAMIREZ Adriana (Bogotá, Julio de 2004). Pruebas de toxicidad acuática: Fundamentos y métodos. Universidad Nacional de Colombia.
4. Organization for Economic Cooperation and Development, 1984, *Terrestrial Plants: Growth Test. Guideline for Testing of Chemicals* N° 208, OECD Publications Service, Paris.
5. PALACIO BAENA Jaime (Medellín, 1990). Los macroinvertebrados bénticos y la contaminación acuática. Universidad de Antioquia.
6. ROLDÁN PEREZ Gabriel (Medellín, Junio de 2003). Bioindicación de la calidad del agua en Colombia. Universidad de Antioquia.
7. SAWYER Clair (Bogotá, 2001). Química Para Ingeniería Ambiental. Mc. Graw Hill.
8. SOLOMON, BERG, MARTIN, VILLE (México 1998). Biología de Ville. Mc Graw Hill.
9. US EPA, 1989, *Protocols for Short Term Toxicity Screening of Hazardous Waste Sites*, US Environmental Protection Agency, 600/3-88/029, Corvallis.
10. Wang, W., 1987, "Root Elongation Method for Toxicity Testing of Organic and Inorganic Pollutants", *Environmental Toxicology & Chemistry* 6, 409-414.
11. Wesley W (2002). Industrial Water Pollution Control. McGraw Hill 2002.
12. [www.chemdat.com](http://www.chemdat.com)
13. [www.edafologia.ugr.es](http://www.edafologia.ugr.es)
14. [www.idrc.ca/en/ev-66572-201-1-DO\\_TOPIC.html](http://www.idrc.ca/en/ev-66572-201-1-DO_TOPIC.html)
15. [www.panreac.com](http://www.panreac.com)

16. [www.salfarm.com](http://www.salfarm.com)

## 10. ANEXOS

Anexo 1. Relación entre el Probit empírico y el porcentaje de mortalidad.

%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	-	2,67	2,95	3,12	3,25	3,36	3,45	3,52	3,59	3,66
10	3,72	3,77	3,82	3,87	3,92	3,96	4,01	4,05	4,08	4,12
20	4,16	4,19	4,23	4,26	4,29	4,33	4,36	4,39	4,42	4,45
30	4,48	4,50	4,53	4,56	4,59	4,61	4,64	4,67	4,69	4,72
40	4,75	4,77	4,80	4,82	4,85	4,87	4,90	4,92	4,95	4,97
50	5,00	5,03	5,05	5,08	5,10	5,13	5,15	5,18	5,20	5,23
60	5,25	5,28	5,31	5,33	5,36	5,39	5,41	5,44	5,47	5,50
70	5,52	5,55	5,58	5,61	5,64	5,67	5,71	5,74	5,77	5,81
80	5,84	5,88	5,92	5,95	5,99	6,04	6,08	6,13	6,18	6,23
90	6,28	6,34	6,41	6,48	6,55	6,64	6,75	6,88	7,05	7,33
%	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9
99 <sup>a</sup>	7,33	7,37	7,41	7,46	7,51	7,58	7,65	7,75	7,88	9,09

<sup>a</sup> Valores entre 99,0 y 99,9.

A partir de estos datos se elabora una gráfica en papel cuadrículado, colocando en el eje x el logaritmo de las concentraciones y en el eje Y el Probit empírico y se ajusta la recta a través de estos puntos. En el gráfico se traza una línea a partir del Probit 5,0 hasta cortar la línea trazada; el valor correspondiente en el eje x se denomina  $m$  y el antilogaritmo de este valor corresponderá a la  $CE_{50}$  o  $CL_{50}$ .

Anexo 2. Datos obtenidos al largo del estudio.

Evaluación dosis-respuesta frente al tóxico de referencia - Dodecil sulfato.

	D,01						D,10						1,00						10,00						100,00								
	1		2		3		1		2		3		1		2		3		1		2		3		1		2		3				
	H	R	H	R	H	R	H	R	H	R	H	R	H	R	H	R	H	R	H	R	H	R	H	R	H	R	H	R	H	R			
1	1,9	2	2	1,9	1,9	1,7	2	1,9	2	2,4	2	2	2	2,1	2,1	1,7	2	1,8	1,7	1,2	1,8	0,9	1,5	1	0,2	0	0,2	0	0,2	0			
2	1,3	1,3	1,8	2	2,2	1,5	1,9	1,9	1,9	2	1,8	1,7	2	1,9	1,7	2	1,8	1,5	1,5	1,3	1,8	1	0,6	0,3	0,2	0	0,2	0	0,2	0			
3	2	2,3	2,2	1,5	1,5	1,5	2	1,7	2,1	2,4	1,9	1,9	2,4	1,9	2,1	2,3	0,3	0	1,7	1,4	1,5	0,6	0,6	0,2	0,3	0,1	0,2	0	0,3	0,1			
4	2,1	1,8	1,9	1,3	1,9	1,9	1,8	1,5	2,2	3	1,8	2	0,3	0	1,8	1,5	2,2	1,8	1,4	0,7	1,3	0,6	0,4	0,2	0,2	0	0,2	0	0,2	0			
5	1,5	1,7	2	1,3	1,9	0,9	2	2,3	1,7	2,1	1,8	2,3	0,4	0	2	1,1	2,3	2	1,1	0,8	1,8	0,7	0,7	0,3	0,1	0	0,2	0	0,1	0			
6	1,4	1,8	1,7	2	2	2,2	1,9	1,4	1,5	1,8	1,4	1,9	1,4	1,1	2	2,1	2	0,8	1,8	1	1,7	1	1,3	0,6	0,2	0	0,1	0	0,1	0			
7	1,5	1,8	2,2	1,5	1,7	2,5	2	1,3	1,5	1,7	1,5	1,7	1,5	1,9	2	2,4	1,8	2,3	1,4	0,7	1,1	0,4	1,2	0,6	0,1	0	0,1	0	0,1	0			
8	1,4	2,2	1,7	1,8	2	2,3	1,7	1,9	1,3	1,3	1,4	2	0,2	0,3	0,3	0,2	1,7	2,4	1,4	0,5	1,8	0,5	0,8	0,5	0,1	0	0,1	0	0,3	0			
9	1,7	1,9	1,4	1,7	1,8	2,1	1,9	1,8	1,9	2,1	1,7	1,5	1	0,7	0,8	0	2	2,2	1,5	1,8	1,5	0,5	1,5	0,6	0,1	0	0,2	0	0,2	0			
10	2	1,8	1,8	1,2	1,9	1,7	2,3	1,5	1,5	1,4	1,4	2,3	0,3	1	2,2	0,7	1,2	1,8	0,9	0,3	1,3	0,7	1,9	0,4	0,1	0	0,1	0	0,1	0			
11	1,6	1,5	2	1,9	1,5	1,9	1,9	1,8	1,8	1,4	1,9	2,1	2,3	1,8	2	1,7	1	0,7	0,3	0	1,1	0,7	1	0,5				0,1	0				
12	2	1,4	2	1,5	2,2	1,4	1,9	1,9	1,7	2,1	1,4	2,2	1,7	1,5	1,5	1,7	2	1,9	0,3	0,3	1	0,2	0,7	0,3									
13	2,1	1,4	1,3	1,4	0,8	0,7	1,3	1,2	1,5	2,3	1,5	1,8	2,4	2	1,7	2,4	1,7	1,2			1,5	0,5	0,2	0									
14	1,3	1,5	0,4	0,3	0,7	0,8	0,4	0,4	1,8	2,2	0,8	0,7	1,8	1,8	1,8	1,4	1,5	2			1,2	0,2											
15	1,7	1,8	0,2	0,3			0,5	0	1	0,8	1	1,2	0,5	0,3	1,5	0,6	2	1,8				1,2	0,4										
16			0,2	0				0,2	2	0,6	1,5	1,5	1,8			0,4	0	2	1,5			0,8	0,5										
17								0,2	0	0,7	0,7	0,2	0,5			1,1	1	0,5	0			0,8	0										
18								0,2	0	0,3	0,7	0,2	0			0,4	0	1,8	1,5			0,3	0,1										
19										0,3	0,5	0,2	0,1																				
20																																	
Prm	1,78	1,71	1,55	1,35	1,71	1,64	1,45	1,38	1,42	1,71	1,33	1,54	1,35	1,21	1,58	1,27	1,64	1,47	1,25	0,88	1,28	0,53	0,95	0,42	0,16	0,04	0,16	0,00	0,17	0,04			
Desv	0,30	0,29	0,68	0,63	0,46	0,59	0,76	0,75	0,58	0,69	0,58	0,72	0,83	0,77	0,65	0,65	0,56	0,72	0,51	0,50	0,39	0,29	0,50	0,25	0,07	0,03	0,05	0,00	0,08	0,03			
CV	17,4%	17,2%	44,1%	46,5%	26,8%	35,8%	52,5%	54,9%	40,8%	40,3%	43,8%	46,0%	61,4%	63,9%	43,4%	67,2%	33,8%	48,9%	40,7%	62,4%	30,7%	54,3%	52,0%	59,6%	43,7%	31,6,2%	32,3%	-	45,5%	331,7%			
Prm[R]			1,85								1,40					1,50					1,16												
Prm[R]			1,56								1,54					1,51					0,58												
Zm[R]			10,23								24,19					18,58					38,91												
Zm[R]			39,04								39,86					48,04					77,25												

Blanco negativo para Dodecil

	1		2		3	
	H	R	H	R	H	R
1	1,9	2,3	2,1	3,0	1,9	2,4
2	1,8	3,2	1,2	2,0	2,0	2,3
3	1,7	2,4	1,9	2,3	2,0	2,6
4	1,8	2,4	1,9	3,5	2,3	2,6
5	1,7	2,9	2,0	2,5	1,7	1,8
6	2,1	3,1	1,7	3,1	1,7	3,0
7	1,9	2,9	2,0	3,4	1,7	2,7
8	2,0	2,2	1,9	3,8	2,0	2,8
9	2,0	2,7	1,9	2,6	2,3	2,3
10	1,7	3,5	1,7	2,3	2,1	2,4
11	1,6	2,8	1,7	2,6	2,1	2,5
12	1,9	2,7	2,0	2,6	2,0	2,0
13	2,1	2,4	1,3	3,0	2,0	1,8
14	2,1	3,5	1,9	3,2	2,0	2,5
15	1,5	1,2	1,6	2,8	0,6	0,4
16	1,7	2,5	1,8	2,4		
17	1,7	2,1	0,5	0,0		
18	1,8	2,8				
19						
20						
Prom	1,8	2,6	1,7	2,7	2,0	2,4
Desv	0,2	0,5	0,4	0,8	0,4	0,6
CV	9,7%	20,6%	23,1%	31,5%	20,3%	25,8%
GERMINADAS	18,0		17,0		15,0	
% GERMIN	90%		85%		75%	

	Prom	prom total
Hipocótilo	1	1,8
	2	1,7
	3	2,0
Radículo	1	2,6
	2	2,7
	3	2,4
<b>%Germinación</b>		<b>83,30%</b>

Evaluación dosis-respuesta frente a los residuos 1A del primer experimento.

	D,01						D,10						1,00						10,00						100,00						
	1		2		3		1		2		3		1		2		3		1		2		3		1		2		3		
	H	R	H	R	H	R	H	R	H	R	H	R	H	R	H	R	H	R	H	R	H	R	H	R	H	R	H	R	H	R	
1	1,7	2,6	2	1,8	2	3,7	1,9	3,6	1,6	3,1	1,6	2,1	2,1	3,1	2	2,7	1,7	2,7	2,5	2	2,4	2	1,2	1	1	0,2	1,3	0,2	1,5	0,1	
2	1,5	1,1	1,7	3	1,5	3,4	2,1	2,1	1,6	3,4	1,6	2	2,1	3,1	1,2	2,3	1,6	2,9	2,1	1,6	2,2	2,1	2,4	2,6	1,5	0,5	1,5	0,3	1,1	0,4	
3	1,5	2,1	3	2,5	2	3,6	1,6	2	1,9	2,5	1,9	2,3	1,6	2,5	2,2	2,9	1,6	3,6	0,9	0,7	1,6	2,1	2,2	2,5	1,4	0,3	1,5	0,4	1,5	0,3	
4	1,6	3,7	2,2	3,1	1,6	2,9	1,6	1,9	1,5	2,6	2	3	1,6	2,3	1,7	2,3	1,6	2	2,3	2,1	2,5	2,7	1,9	2,1	1,5	0,5	0,7	0	1,5	0,5	
5	1,2	2,7	2,1	3,3	1,6	3,7	2	2,4	1,9	2,6	1,6	3	1,5	2,1	1,9	2,5	1,9	2,6	2,2	1,6	2,3	2,5	2,4	2,1	1,2	0,5	1,2	0,5	1,2	0,2	
6	1,6	2,6	2	2,5	1,9	3,4	1,5	2,5	2,6	3	1,7	2,4	1,6	2,6	1,6	2	2,1	3,1	2,1	2,4	1,7	2,1	2,2	2,6	1,5	0,4	1,2	0,4	1,6	0,3	
7	2	2,9	2,1	3,2	2	3,3	1,4	2,5	1,5	2,5	1,7	3,1	2,5	4	1,5	2,6	1,6	2,5	2,3	2,6	2,5	3,5	2	2,3	1,5	0,5	1,2	0,3	1,5	0,5	
8	1,6	2,2	1,6	3,4	1,5	3,5	1,5	1,6	2	2,5	1,4	2,6	1,67	3,6	1,5	2,2	1,7	3	2,3	2,1	2	2,4	2,5	2,1	1,5	0,5	1,3	0,6	1,3	0,4	
9	1,4	2,5	1,9	2,9	1,9	3,2	2,5	2	1,7	2,6	1,6	2,3	2	3,5	2,1	3,1	1,7	2,2	2,3	1,9	1,5	2,7	2,1	2,4	1,3	0,4	0,6	0,4	1,2	0,5	
10	1,7	3,6	2,1	2,5	0,6	2,2	2	3,3	1,6	2,3	1,5	3	1,4	2,6	1,7	3,6	2	2,9	2,1	2,9	1,7	2,4	2,5	2,5	1,1	0,3	0,6	0,3	1,3	0,5	
11	1,6	1,6	2	2	1,6	2,6	1,5	3	1,5	3,1	1,6	3	2	3,6	1,7	3,6	1,7	3	2,1	2,2	2,3	3,1	2,3	3,2	1,1	0,4	1	0,4	1,3	0,5	
12	1,7	3,2	1,9	2,4	1,2	1,3	1,7	2,2	1,6	2,6	1,6	2,7	1,4	2,5	1,9	3	2,2	2,2	2	3,2	2,3	2,5	0,9	0	0,5	0	1	0,2	1,4	0,7	
13	1,6	3,6	1,6	3	1,4	2,9	1,9	2,5	1,9	2,6	1,6	2,4	1,6	3,2	1,6	3,1	1,5	1,2	1,9	2,2	1,7	2,5	0	0,2	0,5	0,1	1,1	0,6	0,6	0,5	
14	1,4	3,4	1,6	3,5	0,6	0,3	1,2	1,7	1,9	3,1	0,6	0,2	0,2	0,6	2,1	3,6	1,5	2,3	1,7	2,7	1,5	2,5	2,2	2,6	0,5	0	1,5	0,4	1	0,3	
15	1,4	2,7	1,6	2,2	0,6	0	1,3	2,9	1,5	2,6	1,6	2,4	0,3	0	2	3	1,9	2,3	0,7	0	2,9	2,4	0,4	0	0,5	0,1	1,2	0,6	0,4	0	
16	1,6	2,6	1	1,9	0,2	0,1	1,2	1,6	1,5	3,5	0,2	0	0,2	0,5	1,6	2,6	2	3,1	0,4	0,5	1,5	1,7	0,2	0	0,3	0	1,3	0,4	1,3	0,2	
17	1,7	2,6	0,6	0,1	0,3	0,4	1,4	2,4	1,5	3,1				1,5	2,5	0,2	0,7	0,5	0,6						1,1	0,5	1		0,4		
18	1,4	2,5	1	0,3					1,3	1,6				1,6	2,3	0,2	0	0,2	0,7									0,3	0,1		
19	1,4	3							0,3	0				1	0	0,2	0	0,4	0									0,3	0		
20	1,5	2,6																													
Mean	1,60	2,71	1,80	2,42	1,54	2,36	1,66	2,56	1,65	2,64	1,53	2,29	1,54	2,50	1,72	2,64	1,54	2,25	1,63	1,71	2,05	2,45	1,71	1,79	1,06	0,54	1,06	0,35	1,24	0,57	
Desv	0,20	0,65	0,53	0,96	0,61	1,39	0,36	0,56	0,46	0,75	0,47	0,95	0,70	1,16	0,31	0,60	0,63	1,04	0,61	0,99	0,43	0,43	0,67	1,14	0,43	0,20	0,55	0,20	0,31	0,16	
CV	12,5%	23,9%	29,6%	39,6%	45,6%	58,2%	21,2%	23,7%	27,9%	26,6%	30,6%	40,4%	46,2%	46,5%	16,0%	30,3%	40,6%	46,5%	49,5%	56,3%	21,1%	17,6%	50,9%	63,6%	40,9%	64,6%	33,4%	57,0%	24,7%	49,2%	
PrmedR	1,56						1,62						1,59						1,80						1,12						
PrmedR	2,50						2,44						2,45						1,96						0,54						
ZmedR	6,82						5,67						5,76						-7,17						33,15						
ZmedR	-5,26						-2,36						-3,14						16,76						65,64						

Blanco negativo para residuos 1A del primer experimento

BLANCO (-)

	1		2		3	
	H	R	H	R	H	R
1	1,9	3,2	2,3	3,1	1,9	1,7
2	1,6	2,2	1,7	3,0	2,1	2,2
3	2,1	3,7	1,8	2,4	2,1	2,4
4	1,6	2,8	1,8	2,3	1,8	2,4
5	2,1	2,3	1,7	2,8	1,9	1,8
6	2,0	3,0	1,7	2,8	1,7	4,1
7	2,1	2,5	1,8	3,0	2,1	3,5
8	1,8	3,4	1,7	2,5	2,1	3,2
9	1,5	3,0	1,7	2,8	1,9	3,1
10	2,2	2,8	1,9	2,2	1,7	2,3
11	1,8	1,8	1,7	2,9	1,8	4,0
12	1,4	2,0	2,0	2,7	1,5	2,6
13	1,8	2,6	1,8	2,3	1,7	3,3
14	2,2	2,6	1,9	2,0	1,5	2,8
15	1,0	0,9	1,3	1,7	1,0	1,4
16	1,3	0,0	1,3	0,0	2,1	3,5
17	0,3	0,0	0,3	0,0	1,6	2,6
18	1,5	1,0	1,0	1,7	0,5	1,6
19						
20						
21						
22						
23						
24						
25						
26						
27						
28						
29						
30						
Prom	1,7	2,2	1,6	2,2	1,7	2,7
Desv	0,5	1,1	0,4	0,9	0,4	0,8
CV	28,7%	49,2%	26,8%	41,0%	24,2%	29,9%
GERMINADAS	18,0		18,0		18,0	
% GERMIN	90%		90%		90%	

	Prom	prom total
Hipocótilo	1,7	
	1,6	1,68
	1,7	
Radícula	2,2	
	2,2	2,38
	2,7	
<b>%Germinación</b>		<b>90,00%</b>



Evaluación dosis-respuesta frente a los residuos 1B.

	0,01						0,10						1,00						10,00						100,00						
	1		2		3		1		2		3		1		2		3		1		2		3		1		2		3		
	H	R	H	R	H	R	H	R	H	R	H	R	H	R	H	R	H	R	H	R	H	R	H	R	H	R	H	R	H	R	
1	1,6	2,4																													
2	1,7	1,5	2,1	2,3	2,1	2,1	2,4	2,6	1,7	1	2,1	2,6																			
3	2	2,5	2	1,6	2	2,1	2,3	2,1	2,1	1,5	2	2	2	2,5	2,1	3,6	1,6	2,9	2,1	3,4	2	2,6	1,2	1,6	3,2	4,2	0,6	0,5	2,9	2,9	
4	1,7	3	2,1	2,2	1,6	2,2	1,6	2,6	1,5	2,5	2,5	2,5	1,9	3	2,4	2,5	2,2	3,4	1,5	2,2	2	3,2	1,3	2,7	1,6	3,2	1,4	2,5	2,5	3,4	
5	2	2,1	2	2,5	1,5	2,9	2,1	3,5	1,4	1,1	2,1	2,6	2	2,3	2,2	3,1	2,2	2,9	2,3	3,1	2	2	1,3	2,1	1,6	2,7	2,6	3	2	2,9	
6	2,1	2,5	1,9	2	2,3	2,3	2,1	2,3	0,7	0,5	2,1	2,7	2	3	1,9	1,7	2,2	3	2,3	3,1	2	3	1	2	3	4,2	2	2	1,9	2,6	
7	2	2,6	2	1,7	2	2,2	2	2,1	2,4	2,5	2,2	2																			
8	1,6	2,6	1,7	2,3	2,2	3,2	2,2	3	2,1	2,4	2	2,6	2,2	2,5	2,2	2,7	2,1	3,1	2	2,5	1,6	3,3	1,2	2,5	2,3	2,6	2	2,3	2,6	3,5	
9	1,6	2,5	1,6	2	2,2	2,6	1,9	3,5	2,2	2,6	1,7	2,4	1,7	1,1	2,1	2,2	1,6	3,4	1,7	2,4	2	2,2	1,5	2,4	2,5	3,6	1,5	2,1	2	3,4	
10	1,9	2,6	1,9	2,6	2	3,6	1,6	3,7	1,6	2,2	1,5	2,3	2,6	3,3	2,1	2,5	1,7	3,5	2,2	2,9	2,6	2,3	1,4	2,4	2,5	2,6	1,6	2,1	2,7	3	
11	1,9	2,2	1,6	1,6	1,7	2,7	2,1	2,6	2	1,6	2	2	2,2	2,3	1,9	1,6	1,6	2,2	2,2	3	2	2,5	1,4	2,6	2,9	2,3	1,5	2,5	2,4	2,5	
12	1,6	2,5	2,5	2,6	2,1	3	1,9	2,1	1,6	2,2	2	2,5	1,9	3,4	2,4	2,4	1,2	3,4	2,1	3,3	1,9	3,6	1,4	2,2	2,1	2,6	1,6	2,3	3	3,5	
13	1,6	2,6	2,6	3,1	1,5	2,7	2	2,6	2	2,2	1,6	2,7	1,5	2,2	2	1,9	1,7	2,7	2,1	3,4	2,2	3,6	1,2	1,4	2,6	4,1	0,1	0	2,5	2,5	
14	1,7	2,2	1,6	2,7	1,6	1,6	2,2	2,9	1,5	3,5	2,3	2,9	1,5	2,5	1,2	3	1,3	1,4	1,6	2,9	2	3	0,4	0,6	2,1	3,6	1,7	2,5	2,7	4,2	
15	1,6	2	2,1	2,7	1,9	2,6	2,1	1,7	1,7	2,6	2,1	1,7	2,3	2,5	1,6	2,5	2	2,2	2,1	2,3	1	0,5	1,3	2	1,1	2,2	2	1,5	2,4	3,5	
16	1,7	3,2	1,9	2,6	1,3	1,7	0,6	0,4	2	2,1	2	2	0,2	0	2,2	2,6	1,7	2	2,3	3,1	1	0,5	1,3	2,1	1,6	1,4	0,5	0,7	2,4	2,3	
17	1,7	3	0,6	1,1	2	3,1	0,3	0	1,5	2,5	1	0,6	0,2	0	2,1	2,3															
18	1,6	2,5	2,3	1,7	1,5	1,6			0,5	0,3	0,5	0,5			1,6	2,2															
19	0,6	0,3	0,9	1,3	0,3	0			0,4	0	1,3	1,5			1	0,1															
20									0,2	0,1	0,7	0,1																			
Primo	1,74	2,57	1,66	2,17	1,79	2,01	1,66	2,35	1,57	1,76	1,60	2,04	1,76	2,16	1,96	2,25	1,65	2,69	2,06	2,69	1,65	2,44	1,22	2,07	2,14	2,70	1,66	1,79	2,43	3,17	
Desv	0,26	0,63	0,49	0,54	0,46	0,79	0,33	1,00	0,63	0,97	0,54	0,60	0,65	1,01	0,35	0,76	0,32	0,62	0,24	0,39	0,62	1,00	0,24	0,32	0,72	1,15	0,67	0,92	0,31	0,45	
DV	15,96	26,78	26,38	24,68	25,78	32,78	26,48	42,68	40,48	54,68	29,78	39,98	36,78	46,38	16,08	34,78	16,68	22,98	11,68	13,58	32,98	41,18	19,48	25,38	33,78	42,68	46,08	51,58	12,98	15,78	
Primo[R]	1,64						1,75						1,67						1,73						2,04						
Primo[R]	2,32						2,04						2,37						2,47						2,54						
Zin[R]	1,62						4,68						-2,11						5,95						-9,46						
Zin[R]	-10,32						2,70						-13,02						-17,37						-20,75						

Blanco negativo para residuos 1B.

BLANCO (-)

	1		2		3	
	H	R	H	R	H	R
1	2,3	2,0	2,1	1,5	1,7	2,8
2	1,7	2,2	2,4	3,1	2,2	2,5
3	1,7	2,2	2,0	2,1	2,0	2,2
4	1,9	1,6	2,3	2,5	1,7	2,7
5	1,8	2,2	2,1	2,2	2,1	2,1
6	2,1	3,0	2,5	2,0	2,0	2,8
7	1,5	3,4	1,4	2,4	2,0	2,3
8	1,6	2,2	2,0	2,5	2,1	3,6
9	1,4	1,3	2,0	3,0	1,8	1,7
10	1,6	2,2	2,0	1,9	2,0	2,0
11	2,1	2,1	2,1	2,4	1,9	2,1
12	2,2	2,0	1,9	2,4	1,8	2,5
13	1,8	2,4	1,4	2,1	1,8	2,1
14	1,7	4,0	1,6	2,5	1,3	1,8
15	1,4	1,8	1,9	2,6	2,0	1,9
16	1,5	2,4	2,0	2,4	2,0	2,5
17	1,8	2,9	2,0	2,7	1,6	2,8
18	1,4	3,2	1,9	1,9	1,7	2,7
19	1,8	2,1	1,9	2,9	1,7	3,6
20	0,8	0,1	1,5	2,6	2,8	3,0
21	2,0	1,0	1,8	2,9	1,8	0,0
22	0,1	1,2	1,4	1,6	1,8	2,5
23	0,4	0,6	2,2	2,3	2,0	2,3
24	0,3	0,0	2,0	1,6	1,5	3,2
25			1,4	2,5	1,8	2,9
26			0,9	0,0	1,9	1,7
27			0,7	0,0	1,8	2,4
28			0,3	0,3	1,4	3,0
29			0,5	0,3	0,2	0,0
30					0,7	0,0
Prom	2,0	2,0	1,7	2,0	1,8	2,3
Desv	0,6	1,0	0,5	0,9	0,5	0,9
CV	29,2%	48,4%	31,7%	42,6%	25,6%	40,3%
GERMINADAS	27,0		29,0		30,0	
% GERMIN	90%		97%		100%	

	Prom	prom total
Hipocótilo	1	2,0
	2	1,7
	3	1,8
Radícula	1	2,0
	2	2,0
	3	2,3
<b>%Germinación</b>		<b>95,56%</b>

Evaluación dosis-respuesta frente a los residuos 2A.

	0,01					0,10					1,00					10,00					100,00											
	1		2		3	1		2		3	1		2		3	1		2		3	1		2		3							
	i	e	i	e	i	e	i	e	i	e	i	e	i	e	i	e	i	e	i	e	i	e	i	e	i	e						
1	2	1,9	2,5	2,5	2,5	5	2	5	2,1	5,2	2,5	5	2,2	5	1,5	0,5	2,2	2,7	2	5	1,7	1,7	1,2	1	1,5	0,4	1,1	0,4	0,2	0,1		
2	2,2	2,1	2,1	2,5	2,5	2,1	2,1	5,2	2,6	5,2	2,5	2,9	2	2,6	5	4,4	1,0	5,4	2,2	5	1,5	1,9	2,4	2,0	1,7	0,4	2	1,4	0,6	0,4		
3	2	5,1	1,7	2	2	5,2	2	5,1	2,4	5,5	2,1	2,7	1,6	5,5	1,7	2,4	2,2	5,6	2,5	2,5	1	1,9	2,2	2,5	1,7	0,6	1,4	0,5	0,5	0,5		
4	1,7	5,1	2,1	2	2	2,1	1,9	5,5	2,5	5,1	2	2,7	2	2,0	2,5	2,7	2,2	2,9	2	5	2,1	5,1	1,9	2,1	1,0	0,5	2	1,5	0,0	0,5		
5	1,0	5	1,9	5	5	2,0	2,4	2,1	2,1	2,5	2,2	5,1	2,1	2,9	2	5,4	1,9	2,6	2,2	5,2	1,4	5,5	2,4	2,1	1,0	0,9	2	1,7	0,5	0,2		
6	1,0	2,2	2,4	2,1	2,1	2,1	2,6	5,1	1,7	1,1	2,1	5,5	2,1	2,5	1,0	5,1	2,1	5,1	2,1	5,2	1,7	5,5	2,2	2,0	1	0,5	1,9	1,7	1	0,5		
7	1,9	5,1	1,5	1,7	1,7	2,0	2	2,7	2,2	5	1,7	4,2	1,9	5,1	2,5	5,5	1,6	2,5	1,6	1,5	2,5	5,2	2	2,5	1,5	1	1,9	0,9	0,5	0,5		
8	2,2	2,5	1,7	2	2	5,4	2,1	2,2	2,2	2,0	1,9	5,0	1,9	5,2	2,4	5,2	1,7	5,5	2,4	2,5	1,5	5,5	2,5	2,1	1,7	0,0	2	0,0	0,9	0,4		
9	2,5	2,1	2,2	2	2	2,9	1,6	5,9	1,2	2,9	1,6	5,5	1,7	2,1	2,5	2,5	2,5	2,2	1,9	5,2	1,6	5,5	2,1	2,8	1,5	0,7	1,5	1,9	1,7	0,5		
10	2,9	5	1,7	2,2	2,2	2,2	1,9	2,6	1,7	5	1	1	2,4	5	2,2	5,5	2	2,9	2,5	2,6	1,5	5	2,5	2,5	1,5	0,6	1,5	1,5	0,5	0,5		
11	2,6	5	2,2	2	2	2,2	1,5	1,0	2,2	2,0	2,1	2	2,4	5,7	2	2,7	2,2	5	1,4	2,5	1,6	1,5	2,5	5,2	1,7	0,5	1	0,4	1	0,5		
12	2	1,9	1,4	2	2	2,5	2,1	2,4	2,2	5,5	1,6	2,6	2	5	2,2	5,1	2,5	2,2	1,5	2,0	1,0	5,9	0,9	0	1,2	0,4	1,4	2	1,4	0,7		
13	2,1	2,5	1	1,6	1,6	0,2	1,6	4	2,4	5,1	2,4	2,6	2,2	5,5	1,0	5	1,5	2,9	1,5	2,2	1,9	5	1,5	2,4	1,4	1,1	1,5	1	0,0	0,5		
14	2	5,4	1	1,0	1,0	4,5	2,2	2,7	2	2,0	2	1,6	1,0	2,1	2	5,0	1,5	2,5	1,5	2,2	1,5	4	2,2	2,6	0,0	0,4	1,2	0,0	1,5	0,5		
15	1,9	2,5	1	2,1	2,1	2,6	1,2	5,2	1,6	2,0	2,6	5,2	2,2	5,2	2	5,5	1,9	5,4	1,0	2,4	1,0	4,2	0,4	0,5	0,9	0,4	2	2,5	1,0	0,0		
16	1,0	5	0,5	1,5	1,5	5,2	1,4	4	2,5	5,1	1,5	2,7	2,2	2,7	2,5	5,5	2	5,1	0,1	1	2,1	5	0,2	1	1,4	1,5	1,9	2,1	1,7	0,2		
17	2	5	0,2	1,1	1,1	1	0	0,5	1,5	0,9	1,7	1,5	2	5,7	2,5	2,0	2,2	1,5	0,5	0,2	2,4	5	1,0	2,9	1,2	0,5	1	0,6	1,0	0,0		
18	0,5	0,7	0,1	0,7	0,7	0	0	0,5			1,1	0,4	1,5	2	2	2,0	2	5,0			0,2	0			0,9	0,6	0,5	1,5	1,0	0,7		
19											2,2	2			1,9	5,4	2,2	5,5			0,5	0				0,0	1,2	0,1	0,6	0	0,6	
20																																
From	1,00	2,55	1,50	1,01	1,01	2,57	1,70	2,60	2,00	2,70	1,95	2,57	2,01	2,92	2,15	5,02	2,00	2,90	1,74	2,92	1,50	2,67	1,01	2,07	1,57	0,67	1,05	1,25	1,00	0,66		
From	0,47	0,55	0,75	0,69	0,69	1,10	0,71	1,04	0,41	0,70	0,44	0,56	0,25	0,52	0,50	0,02	0,20	0,59	0,40	0,45	0,57	1,21	0,72	0,90	0,55	0,55	0,55	0,55	0,59	0,20		
CV	25,90	26,10	50,20	25,00	25,00	46,50	41,70	50,90	19,90	25,20	22,70	57,50	12,40	17,90	17,70	27,00	15,90	20,20	59,10	54,10	56,00	45,10	40,00	45,50	25,50	40,70	50,10	51,40	50,70	45,50		
FromE		1,00						1,00						2,05							1,71						1,77					
FromE		2,70						2,57						2,95							2,59						0,79					
SimE		-5,49						-0,75						-17,75							1,67						26,79					
SimE		20,09						6,25						-5,50							16,11						77,70					

Blanco negativo para residuos 2A.

BLANCO (-)

	1		2		3	
	H	R	H	R	H	R
1	2,5	2,5	1,3	1,3	1,8	2,6
2	2,4	2,1	1,8	2,7	1,9	4,3
3	1,9	3,5	1,9	2,4	1,5	3,2
4	1,1	1,3	1,6	2,9	1,5	3,0
5	2,7	2,2	1,6	2,9	2,2	2,5
6	1,6	2,6	1,7	2,0	1,5	2,0
7	1,7	2,7	1,7	2,5	1,6	3,3
8	2,2	2,6	2,3	2,5	1,6	2,4
9	1,8	2,2	1,6	3,3	1,9	3,1
10	2,6	2,5	2,0	2,7	1,5	3,7
11	1,7	3,1	1,9	3,7	2,0	4,3
12	1,5	2,9	1,9	2,6	2,0	2,8
13	1,7	3,2	1,4	2,6	1,5	3,2
14	1,3	2,5	1,5	3,5	1,1	1,7
15	1,9	3,5	1,5	3,5	1,6	3,0
16	1,8	3,2	1,8	4,0	1,3	4,0
17	1,8	2,0	1,6	3,1	1,5	3,6
18	1,7	3,6	1,8	2,6	1,1	1,7
19	1,8	3,1				
20						
21						
22						
23						
24						
25						
26						
27						
28						
29						
30						
Prom	1,9	2,7	1,7	2,8	1,6	3,0
Desv	0,4	0,6	0,2	0,6	0,3	0,8
CV	22,7%	22,1%	13,9%	22,7%	18,6%	26,1%
GERMINADAS	19,0		18,0		18,0	
% GERMIN	95%		90%		90%	

	Prom	prom total
Hipocótilo	1	1,9
	2	1,7
	3	1,6
Radícula	1	2,7
	2	2,8
	3	3,0
<b>%Germinación</b>		<b>91,67%</b>

Evaluación dosis-respuesta frente a los residuos 2B.

	0,01						0,10						1,00						10,00						100,00						
	1		2		5		1		2		5		1		2		5		1		2		5		1		2		5		
	h	c	h	c	h	c	h	c	h	c	h	c	h	c	h	c	h	c	h	c	h	c	h	c	h	c	h	c	h	c	
1	2,5	5,5	2,2	5	2,5	5	2,5	5,5	2,5	5,2	2,5	5,5	2,6	2,9	2,1	5	2,2	4,2	2,1	2,9	2,5	5,9	1,6	5,5	2	0,9	2	1,1	2	1,5	
2	2,2	2,2	2,1	5,2	1,9	2,5	2,1	2,5	2,5	2,7	2,5	5,7	2,1	2,5	2,2	5,2	2,5	5,5	2	5,8	1,6	5,1	2	5,5	1,7	0,7	1,9	1,1	1,0	1,1	
3	2	2,1	1,9	1,4	2	5,1	1,9	5,5	2,1	2,5	2,4	2,7	2,1	2,7	1,7	2,4	1,0	5,8	2,1	5,5	2,5	2,7	2,4	2,5	2,4	1,2	1,5	1	1,6	0,0	
4	1,9	5,7	1,0	5	1,5	2,7	1,0	5	1,6	1,7	1,7	5	1,0	2,4	1,9	2,7	2	2,7	2,1	5	1,7	5,5	2,4	4	2,4	2,1	1,2	1,5	1,6	1	
5	2,5	5	2	2,5	2	5,5	2	5,9	2,1	5	1,9	5,1	2	4	2,4	5,5	2	5,5	1,0	4,4	2,1	5	2,5	2,1	1,6	1,1	2	1,5	1,9	1,4	
6	2	5,5	2	5,1	2,2	5,5	1,9	5,5	1,7	4,2	2	4,1	2,2	2,6	2	4,1	2	5,7	2,2	5,2	2,2	5,6	2	5,5	1,0	0,7	1,5	0,0	1,6	1	
7	2	2,5	2,5	5,5	1,0	1,6	1,6	5,5	1,0	5,5	2,9	2,9	1,5	2,7	2	2,0	2,1	2,9	1,0	5	2,7	5,5	2	5,9	2	1,4	2	1	1,5	1,2	
8	2	2,7	2	2,6	1,6	2,0	2	5,6	1,9	5,4	2,1	2,0	2,1	2,0	1,6	2,5	2,2	5,2	2	5,1	2,1	5,6	1,5	0,5	0,9	0,7	1,1	0,6	1,5	0,0	
9	2,1	5,5	2,1	5	1,9	2,0	1,2	2,5	1,9	4,2	2,1	2,4	2,1	5,1	1,7	2,9	2,4	2,4	1,0	5,1	1,7	5	2,1	5,5	1,0	1,1	1,2	0,0	1,4	1,5	
10	2,1	5,5	2,2	2,5	2	2,7	1,0	5,6	2,1	5	1,6	5,5	2	2,0	1,0	1,7	2	2,5	1,9	5,6	2,1	5,1	1,5	1,9	1,5	0,5	1,2	1	1,5	1,2	
11	1,7	5	2,5	1,0	2,1	5,5	1,9	2,2	1,5	2,9	1,6	2,7	2	2,6	2	5,5	2	2	1,7	5,0	2,2	4	2	2,5	1,0	1	1,6	0,9	1,5	1,4	
12	1,0	5	2	2,5	2,1	5,2	1,9	4,1	1,0	2,5	1,0	5,5	1,0	5,5	2,5	2,0	2	1,7	1,6	4,2	2,5	5,1	2	2,6	1,7	1,5	1	1	1,7	0,0	
13	2	5,2	2,2	2,0	1,7	2,5	2,5	2,5	1,6	5,1	1,5	2,2	2,2	5,6	2,4	5,4	2,5	2,5	2	5,5	1,0	5,6	2,5	2,0	0,0	1	1,0	1,7	0,7	1,1	
14	1,0	5,2	2	2,6	2,1	2,7	2,1	5	2,2	5,2	0,5	0,6	1,6	2,7	2,1	2,6	1,9	5,9	2,2	2,0	2,1	5,4	1,0	5,7	1	0,7	1,1	1,1	1,2	0,0	
15	1,5	5,5	2,1	5,2	2	2,1	1,4	2,2	1,5	5	0,5	0,6	2	1,6	2,2	5,5	2	5,1	0,4	1	2,5	5,2	2	5	0,6	0,5	1	0,7	0,5	0,1	
16	1,0	5	2	1,6	1,7	5,5	0,7	1,5	2	2,5	0,6	0	1,6	1,5	2	4,1	1,0	4	2,2	1,4	2	5,5	1,0	0,9	0,7	0,6	0,9	0,9	1,2	0,7	
17	1,0	5,4	0,0	0,5	2,5	5,5	0	1,4	1,4	2,5	0,5	0	1,1	0,1	1,4	0,7	1,5	1,4	0,7	0	2	2,9	1,5	0	1	0,7	0,0	1,1	0,7	0,5	
18	1,4	5,5	0,5	0,5	2	1	5	1,4	1,5	1			0,7	0	0	0,5	1,1	0	0,7	0,4	1,2	1,1	2,5	5,4	0,0	0,0	1,2	1			
19	1,0	2,5			0,6	0,4			2,1	5,2				0,9	0			1	0	0,5	0	1,5	2,5	1	0,1			1,5	1,2		
20	1,4	0,1							1,1	0								1,1	0												
From	1,91	2,06	1,95	2,59	1,09	4,19	1,79	2,79	1,05	2,77	1,66	2,62	1,00	2,50	1,00	2,75	1,91	2,51	1,67	2,64	2,04	5,16	1,95	2,51	1,06	0,94	1,50	1,04	1,50	0,99	
Res	0,20	0,79	0,43	0,00	0,41	7,02	0,57	0,35	0,56	0,91	0,77	1,51	0,43	1,16	0,54	1,01	0,45	1,55	0,41	1,57	0,59	0,65	0,41	1,20	0,50	0,59	0,40	0,24	0,42	0,57	
CV	14,7%	27,0%	25,6%	56,7%	20,9%	77,7%	57,6%	50,5%	19,0%	55,6%	46,2%	54,0%	27,2%	50,5%	20,9%	56,7%	22,6%	52,9%	56,4%	52,0%	10,9%	20,5%	21,5%	51,0%	59,0%	41,6%	20,6%	25,0%	50,7%	57,5%	
FromE	1,91						1,77						1,06						1,00												
FromE	5,35						2,55						2,52						2,77												
SimE	-2,59						5,00						0,00						-1,15												
SimE	-0,59						0,51						15,12						4,50												

Blanco negativo para los residuos 2B.

BLANCO (-)

	1		2		3	
	H	R	H	R	H	R
1	1,9	3,3	2,5	2,7	2,0	2,6
2	2,0	3,5	1,5	3,3	2,1	3,6
3	2,0	3,2	1,5	1,7	1,8	4,1
4	1,9	2,1	2,0	3,0	2,2	3,8
5	2,0	3,3	2,0	3,1	2,0	2,6
6	1,8	2,3	2,4	2,6	2,0	2,8
7	1,8	2,0	2,0	3,7	2,1	3,0
8	1,9	3,5	2,0	2,6	2,7	2,4
9	1,8	3,7	2,1	3,2	2,0	3,9
10	2,1	4,0	1,7	3,5	1,8	2,0
11	2,3	2,8	1,8	3,4	2,4	2,8
12	2,0	3,1	1,8	3,4	2,0	3,5
13	1,9	3,9	2,0	3,4	1,8	3,1
14	1,6	2,9	2,0	3,3	1,8	3,1
15	1,5	2,1	1,6	3,4	1,7	2,0
16	1,7	3,2	1,6	3,4	1,7	1,2
17	1,5	2,1	1,7	2,7	1,7	2,1
18	2,1	3,6	1,5	3,3	2,1	2,8
19			0,3	0,1	0,5	0,5
20						
21						
22						
23						
24						
25						
26						
27						
28						
29						
30						
Prom	1,9	3,0	1,8	2,9	1,9	2,7
Desv	0,2	0,7	0,5	0,8	0,4	0,9
CV	11,2%	21,7%	25,7%	28,2%	22,2%	33,4%
GERMINADAS	18,0		19,0		19,0	
% GERMIN	90%		95%		95%	

	Prom	prom total
Hipocótilo	1	1,9
	2	1,8
	3	1,9
Radícula	1	3,0
	2	2,9
	3	2,7
<b>%Germinación</b>		<b>93,33%</b>

Blanco positivo al comienzo del estudio comparado con el blanco negativo del primer experimento.

**BLANCO RADICULA**

	1		2		3	
	H	R	H	R	H	R
1	0,2	1,0	1,5	1,4	1,8	0,6
2	1,1	1,0	0,3	0,7	1,3	1,1
3	1,3	0,2	1,2	1,2	1,7	2,0
4	1,7	2,3	0,4	1,4	0,8	1,0
5	0,9	1,9	0,9	1,4	1,6	1,0
6	0,8	0,9	1,7	1,1	1,5	1,9
7	1,5	0,7	0,9	2,1	1,4	1,0
8	1,8	1,4	1,1	1,7	1,4	2,8
9	1,2	1,0	1,5	2,1	0,3	0,9
10	0,8	0,9	1,6	1,9	0,5	2,8
11	0,2	0,0	0,5	2,0	0,5	3,0
12	1,4	2,0	1,5	1,6	0,8	2,0
13	0,3	0,0	0,5	1,6	0,5	2,2
14	0,3	0,0	1,4	1,0	0,9	2,2
15	1,5	2,1	0,6	1,7	0,3	1,6
16	0,2	0,0	0,5	1,5	0,8	0,9
17	1,6	2,0	1,0	1,2	0,2	0,0
18	0,8	0,9	0,3	0,4		
19	0,2	0,0	0,3	0,2		
20						
21						
22						
23						
24						
25						
26						
27						
28						
29						
30						
Prom	0,9	1,0	0,9	1,4	1,0	1,6
GERMINADAS	19,0		19,0		17,0	
% GERMIN	95%		95%		85%	

	Prom	prom total	%Inhibición
Hipocótilo	1	0,9	43,83
	2	0,9	
	3	1,0	
Radículo	1	1,0	44,94
	2	1,4	
	3	1,6	
<b>%Germinación</b>		<b>91,67%</b>	

Blanco positivo al final del estudio comparado con el blanco negativo del último experimento.

**BLANCO RADÍCULA**

	1		2		3	
	H	R	H	R	H	R
1	0,2	1,0	1,5	1,4	1,8	0,6
2	1,1	1,0	0,3	0,7	1,3	1,1
3	1,3	0,2	1,2	1,2	1,7	2,0
4	1,7	2,3	0,4	1,4	0,8	1,0
5	0,9	1,9	0,9	1,4	1,6	1,0
6	0,8	0,9	1,7	1,1	1,5	1,5
7	1,5	0,7	0,9	2,1	1,4	1,0
8	1,8	1,4	1,1	1,7	1,4	1,2
9	1,2	1,0	1,5	2,1	0,3	0,9
10	1,2	0,9	1,6	1,9	0,5	2,8
11	0,2	0,0	0,5	2,0	0,5	2,0
12	1,4	2,0	1,5	1,6	0,8	1,0
13	0,3	0,0	0,5	1,6	0,5	1,5
14	0,3	0,0	1,4	1,0	0,9	2,2
15	1,5	1,9	0,6	1,7	0,3	1,6
16	0,2	0,5	0,5	1,5	0,8	0,9
17	1,6	2,0	1,0	1,2	0,3	1,5
18	0,8	0,9	0,3	0,4	0,8	0,6
19	0,2	0,1	0,3	0,2	0,2	0,0
20						
21						
22						
23						
24						
25						
26						
27						
28						
29						
30						
Prom	1,0	1,0	0,9	1,4	0,9	1,3
GERMINADAS	19,0		19,0		19,0	
% GERMIN	95%		95%		95%	

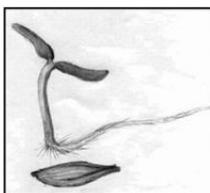
	Prom	prom total	Zimbización
Hipocótilo	1	1,0	49,75
	2	0,9	<b>0,9</b>
	3	0,9	
Radícula	1	1,0	58,08
	2	1,4	<b>1,2</b>
	3	1,3	
<b>% Germinación</b>		<b>95,00%</b>	

Anexo 3. Protocolo Bioensayo con *Lactuca sativa*. (Extraído del capítulo 4 de “Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas” de [www.idrc.com](http://www.idrc.com))

#### 4.4 Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L) María Cecilia Sobrero y Alicia Ronco

##### 4.4.1 Principio

El bioensayo de toxicidad con semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L) es 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 la radícula y del hipocotilo. Es importante destacar que durante el periodo de germinación y los primeros días de desarrollo de la plántula ocurren numerosos procesos fisiológicos en los que la presencia de una sustancia tóxica puede interferir alterando la supervivencia y el desarrollo normal de la planta, siendo por lo tanto una etapa de gran sensibilidad frente a factores externos adversos (figura 4.4.1). Por otra parte, muchas de las reacciones y procesos involucrados son generales para la gran mayoría de las semillas, por lo que la respuesta de esta especie y los datos obtenidos a partir de la aplicación de esta prueba son en gran medida representativos de los efectos en semillas o plántulas en general. El éxito o aptitud de una plántula para establecerse en un ambiente determinado es relevante para garantizar la supervivencia de la especie. La evaluación del desarrollo de la radícula y del hipocotilo constituye indicadores representativos para determinar la capacidad de establecimiento y desarrollo de la planta.



**Figura 4.4.1. Morfología de la semilla y la plántula de lechuga.**

A diferencia de la prueba tradicional de germinación de semillas, la evaluación del efecto en la elongación de la radícula y del hipocotilo de las plántulas permite ponderar el efecto tóxico de compuestos solubles presentes en niveles de concentración tan bajos que no son suficientes para inhibir la germinación, pero que sin embargo pueden retardar o inhibir completamente los procesos de elongación de la radícula o del hipocotilo, dependiendo ello del modo y sitio de acción del compuesto. De esta manera, la inhibición en la elongación de la radícula e hipocotilo constituyen indicadores subletales muy sensibles para la evaluación de efectos biológicos en vegetales, aportando información complementaria a la proporcionada al estudiar el efecto en la germinación. Este ensayo puede ser aplicado para la evaluación de la toxicidad de compuestos puros solubles, de aguas superficiales (lagos, ríos), aguas subterráneas, aguas para consumo humano, aguas residuales domésticas e industriales, además de lixiviados de suelos, sedimentos, lodos u otras matrices sólidas (Bowers *et al.*, 1997; Cheung *et al.*, 1989; Dutka, 1989). A diferencia de otras pruebas en las que se consideran algas o plantas acuáticas sumergidas como organismo diagnóstico, el bioensayo con semillas permite evaluar la fitotoxicidad de muestras coloreadas o con elevada turbiedad de manera directa y sin

necesidad de filtración previa, reduciéndose así las interferencias debidas al pretratamiento, además de simplificar el procedimiento de prueba.

Si bien *L. sativa* no es una especie representativa de ecosistemas acuáticos, la información generada a partir de esta prueba de toxicidad proporciona datos acerca del posible efecto de los contaminantes en las comunidades vegetales cercanas a las márgenes de cuerpos de agua contaminados, siendo también una especie interesante de considerar por su importancia desde el punto de vista hortícola. Por otra parte, es de fácil y rápida germinación, por lo que es posible desarrollar la prueba en pocos días.

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 necesarios para el registro de pesticidas (OECD, 1984; Wang, W. 1987; US EPA, 1989; Boutin *et al.*, 1993).

En la incorporación de esta prueba en una batería de bioensayos es importante considerar el compromiso entre la sensibilidad de la especie *L. sativa*, 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.

#### **4.4.2 Reactivos y materiales**

- Material biológico: semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L var. mantecosa).
- Agua dura reconstituida (APHA, 1992). Para su preparación se recomienda utilizar reactivos Grado ACS y agua destilada en vidrio o *Millipore Supera Q*.
- Cápsulas de Petri de 100 mm de diámetro.
- Papel de filtro Whatman núm. 3 (o equivalente), 90 mm de diámetro. 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).
- Matraces aforados de 50 mL.
- Pipetas volumétricas de 1, 2, 5 y 10 mL.
- Regla u otro elemento de medición.
- Pinzas.
- Toallas de papel.
- Bolsas plásticas.
- Cámara oscura termostatzada ( $22 \pm 2$  °C).

#### **Obtención, control y conservación de las semillas**

La obtención de semillas de lechuga (*L. sativa* L var. mantecosa) se realiza en semilleras locales, procurando que sean semillas sin curar (sin fungicidas o plaguicidas), con buen poder germinativo y baja variabilidad en la elongación de la radícula e hipocotilo. Los criterios de control del material biológico y del desarrollo de la prueba se describen en el capítulo 6 "Aseguramiento y control de calidad de bioensayos".

Las semillas seleccionadas se almacenan 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 hipocotilo en el control negativo (ver también capítulo 6 "Aseguramiento y control de calidad de bioensayos"). En este caso se recomienda realizar las pruebas de toxicidad utilizando un nuevo lote de semillas.

#### **4.4.3 Procedimiento para el desarrollo de la prueba**

##### Preparación de las diluciones

Para realizar una curva dosis-respuesta se recomienda preparar un mínimo de cinco o seis diluciones de la muestra o compuesto a estudiar, de manera que se obtengan valores de toxicidad intermedios entre el 100 y 0%. Para las muestras ambientales se recomienda el uso de un factor de dilución de 0,3 o 0,5 para la preparación de la serie de diferentes concentraciones. El uso de un factor de 0,3 permite evaluar la toxicidad considerando el intervalo entre el 100 y 1% de la muestra realizando cinco diluciones (100, 30, 10, 3 y 1%). Al aplicar un factor de dilución de 0,5, es necesario utilizar mayor número de diluciones para abarcar el mismo intervalo de concentraciones (100, 50, 25, 12, 6, 3 y 1,5%), pero se obtiene mayor precisión en los resultados. Para la preparación de cada dilución se utiliza agua dura reconstituida (es posible el uso de agua mineral dura para consumo humano), realizando el control negativo con el agua de dilución empleada.

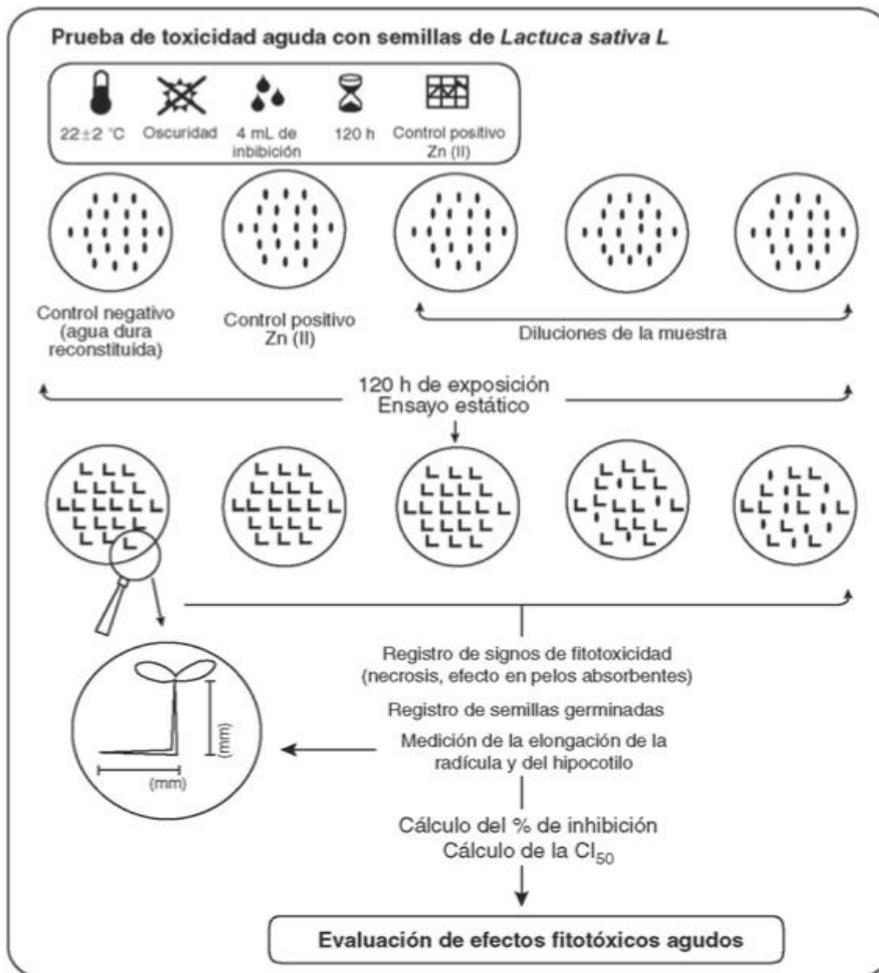
Para el caso de las muestras cuya toxicidad es desconocida, previo a la realización de la prueba definitiva, se sugiere hacer una prueba presuntiva (ensayo preliminar) utilizando diluciones logarítmicas (100; 10; 1; 0,1; 0,01) que permitan establecer el intervalo de concentración conveniente para obtener valores de efecto entre 100 y 0% necesarios para calcular la  $CI_{50}$ .

Con el fin de controlar la sensibilidad de las semillas, simultáneamente a la evaluación de la toxicidad de una muestra debe realizarse un control positivo, utilizando, por ejemplo, una sal de Zn (II) como tóxico de referencia. La concentración de prueba de este control es la correspondiente a la  $CI_{50}$  para el lote de semillas en uso (ver capítulo 6 "Aseguramiento y control de calidad de bioensayos").

##### Protocolo de ensayo

En la figura 4.4.2 y tabla 4.4.1 se resume el procedimiento del ensayo de toxicidad aguda con semillas:

- Colocar en cada cápsula de Petri un disco de papel de filtro.
- Marcar correctamente cada caja con la dilución correspondiente, así como la fecha y hora de inicio y término del bioensayo.
- Saturar el papel de filtro con 4 o 5 mL de la dilución evitando que se formen bolsas de aire.



**Figura 4.4.2. Esquema general del procedimiento de prueba de toxicidad con semillas.**

**Tabla 4.4.1. Resumen de las condiciones recomendadas para las pruebas de toxicidad con *Lactuca sativa* L.**

1	Tipo de ensayo	Eslático
2	Temperatura	22± 2 °C
3	Calidad de luz	Oscuridad
4	Volumen de solución de prueba	4 mL
5	Agua de dilución	Agua dura reconstituida
6	Número de semillas por réplica	Veinte
7	Número de rélicas	Tres
8	Duración de la prueba	120 h
9	Efecto medido	Inhibición en elongación de la radícula e hipocotilo. Inhibición en la germinación
10	Resultado final	$CE_{50}$ o $CI_{50}$ 0% inhibición
11	Aceptabilidad de los resultados	Germinación > 90% Control positivo y negativo de acuerdo con los valores:

admitidos en las cartas  
control  
Zn (II)

## 12 Control positivo

- Con la ayuda de una pinza, colocar cuidadosamente veinte semillas, dejando espacio suficiente entre ellas para permitir la elongación de las raíces.
- Tapar las cápsulas y colocarlas en bolsas plásticas para evitar la pérdida de humedad. Dado que algunas variedades de semillas de lechuga requieren oscuridad para que se produzca la germinación (semillas fotoblásticas negativas), las cajas de Petri deben cubrirse de la luz inmediatamente después de colocarlas en las cápsulas y durante el periodo de ensayo. Incubar durante 120 h (cinco días) a una temperatura de  $22 \pm 2$  °C. Realizar repeticiones para cada dilución ensayada.

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 sujetos a las mismas condiciones de ensayo, excepto por la ausencia de muestra.

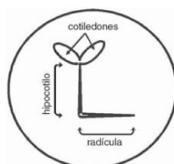
Terminado el periodo de exposición (120 h), se procede a cuantificar el efecto en la germinación y en la elongación de la radícula y del hipocotilo.

Efecto en la germinación

Registrar el número de semillas que germinaron normalmente, considerando como criterio de germinación la aparición visible de la radícula.

Efecto en la elongación de la radícula e hipocotilo

Utilizando una regla o papel milimetrado, medir cuidadosamente la longitud de la radícula y del hipocotilo 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 considera desde el nudo (región más engrosada de transición entre la radícula y el hipocotilo) hasta el ápice radicular. La medida de elongación del hipocotilo se considera desde el nudo hasta el sitio de inserción de los dos cotiledones (figura 4.4.3). La figura 4.4.4 muestra los distintos estadios de la semilla durante la prueba de germinación y elongación.



**Figura 4.4.3. Esquema de plántula de *L. sativa* al finalizar el periodo de exposición.**



**Figura 4.4.4. Estadios por los que atraviesa la semilla durante el ensayo de germinación y elongación.**

Antes de retirar las plántulas de las cápsulas de Petri para evaluar el efecto en los puntos finales anteriormente mencionados, es importante realizar una observación detallada del estado general de las mismas y del crecimiento de la radícula sobre el papel de filtro. Informar 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, consignar además aquellas semillas con germinación anormal (emergencia de cotiledones o cotiledones e hipocotilo solamente, pero sin emergencia de la radícula) o con desarrollo de hongos.

Un procedimiento factible de realizar para facilitar la medición de la radícula e hipocotilo, es proceder a congelar las cápsulas de Petri correspondientes a todos los tratamientos y descongelarlas a medida que se van midiendo (no conservar 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. Por otro lado, antes de congelar el material se debe realizar previamente la observación general de efectos fitotóxicos en las plantas vivas al finalizar el periodo de exposición.

Control de calidad de la prueba

El ensayo deberá repetirse 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 (ver capítulo 6 "Aseguramiento y control de calidad de bioensayos").

Posibles interferencias en el proceso normal de germinación o desarrollo de las plántulas en los controles

- Toxicidad del sustrato: cuando se reemplaza el papel utilizado por otras marcas más económicas o se utiliza papel de filtro cualitativo en planchas, hay que tener en cuenta los posibles efectos tóxicos del papel. Si se han tenido buenos resultados con una marca o calidad determinada de papel, es conveniente no variar el sustrato de ensayo.
- Suciedad de las cápsulas: si no es posible utilizar material descartable, es importante asegurar un enjuague minucioso del material para evitar la presencia de residuos de detergente u otra solución de limpieza.
- Exceso de agua o de muestra utilizada para embeber el papel; esto determina una baja disponibilidad de oxígeno necesario para el normal desarrollo del proceso de germinación. El papel de filtro utilizado como sustrato de germinación de las semillas debe estar bien mojado, con sobrante de líquido para evitar la desecación, pero en ningún caso las semillas deben quedar sumergidas.
- Déficit hídrico durante el periodo de exposición: se recomienda envolver las cápsulas con una bolsa plástica para evitar que el papel de filtro de las mismas pierda agua durante el ensayo. Si se está experimentando con compuestos volátiles, no deben colocarse en una misma bolsa cápsulas que correspondan a diferentes concentraciones de ensayo. También se puede colocar dentro de la cámara de cultivo un recipiente con agua para generar

un ambiente húmedo, reduciendo así la evaporación. Hay que tener en cuenta que la pérdida de humedad de las cápsulas genera una concentración del tóxico cuya toxicidad estamos evaluando y, por lo tanto, las conclusiones a las que arribaremos serán erróneas.

- Exposición a la luz durante el proceso de imbibición: inmediatamente después de colocar las semillas sobre el papel de filtro, se recomienda tapar y envolver las cápsulas de Petri cubriéndolas de la luz (para el caso de semillas fotoblásticas negativas).
- Temperatura de ensayo: las semillas de *L. sativa* expuestas a una temperatura superior (apenas unos grados) a la óptima para la germinación, no germinarán aunque se les coloque posteriormente a temperaturas inferiores (termodormancia o dormancia inducida por la temperatura).

#### **4.4.4 Expresión de los resultados**

Se realizan los siguientes cálculos:

- Promedio y desviación estándar de la elongación de la radícula y del hipocotilo de las plántulas de cada repetición.
- Porcentaje de inhibición del crecimiento de la radícula y del hipocotilo, con el promedio de elongación para cada dilución respecto del promedio de elongación del control negativo.
- Porcentaje de inhibición en la germinación.

Elaborar la gráfica dosis-respuesta colocando en la ordenada el porcentaje de inhibición y en la abscisa, la concentración. Mediante un método gráfico o el uso de programas estadísticos, calcular la concentración que produce el 50% de inhibición ( $CI_{50}/CE_{50}$ ) para cada punto final evaluado. Para el caso de muestras en donde la inhibición es inferior al 50%, o para determinar el valor correspondiente al NOEC o LOEC, se realiza el análisis de comparación de medias (*t Student*, Dunnett) para verificar la significancia estadística en el porcentaje de efecto (ver capítulo 5 "Métodos estadísticos para el análisis de resultados de toxicidad").

#### **4.4.5 Interpretación de los resultados**

Los efectos cuantificados sobre la elongación de la radícula o del hipocotilo son efectos subletales. La inhibición en la germinación podría considerarse como un efecto letal, siempre y cuando podamos corroborar que finalizada la exposición a una muestra las semillas no germinaron por muerte del embrión, y que no existe simplemente un retraso en el proceso de germinación, manteniéndose la viabilidad de la semilla. Al evaluar la fitotoxicidad de muestras ambientales complejas o con compuestos volátiles, en algunos casos se ha observado que al finalizar el periodo de exposición, la inhibición en la germinación es elevada, pero si se extiende el periodo de ensayo, sin renovar la exposición a la muestra, las semillas comienzan a germinar. La vitalidad de las semillas que no han germinado es posible verificarla mediante la prueba de tetrazolium para viabilidad (Ellis *et al.*, 1985), pudiendo de esta manera asignarle con certeza a la inhibición de la germinación, el valor e importancia de un efecto letal. No obstante esto, la inhibición en la germinación registrada al finalizar la prueba, se considera fitotoxicidad, aunque el efecto en la germinación sea reversible.

Otro aspecto a considerar es el mayor desarrollo en la elongación de la radícula o el hipocotilo en algunas muestras con respecto al control. La exaltación en un punto final u hormesis no debe ser interpretada como un

efecto favorable o estimulante. Si bien es posible que muchos compuestos (ej.: Cu, Zn) a bajas concentraciones produzcan exaltación por ser micronutrientes vegetales, esta respuesta debe ser evaluada de manera conjunta con los efectos registrados en otras pruebas. En la aplicación de la prueba con semillas a muestras ambientales, conjuntamente con otros organismos como parte de una batería, se ha detectado en diferentes ocasiones que la exaltación en la respuesta en el hipocotilo y/o radícula se corresponde con toxicidad frente a otros ensayos de la batería.