



**EFFECTOS GENOTÓXICOS DEL CROMO Y DEL CADMIO SOBRE
CELULAS MERISTEMATICAS DE *Allium cepa*, EMPLEANDO
SOLUCIÓN NUTRITIVA Y SUELO SINTÉTICO**

LESLIE BÁRBARA VORRABER

Nº LEGAJO: 3454

PROYECTO FINAL

**Director de Tesis:
Lic. Patricia Rodríguez**

**Uflo
Universidad de Flores
Diciembre de 2006**

*Nunca desistas de un sueño.
Sólo trata de ver las señales que te lleven a él.*

Paulo Coelho

AGRADECIMIENTOS

Quisiera plasmar en el presente apartado mi infinito agradecimiento a todas las personas que acompañaron este proceso de crecimiento personal y profesional, a todos los que soñaron conmigo este día, a quienes con su presencia alentaron y sumaron esfuerzos en este proyecto.

En primer lugar, vaya mi agradecimiento a mi tutora de Tesis, la Lic. Patricia Rodríguez, por comprender y seguir mi entusiasmo, siempre con una mirada paciente e instructiva y por confiar en mí para este proyecto.

Agradezco a la Universidad, en especial a la Bioq. María Handel por brindarme el espacio, tiempo y los recursos necesarios, como así también el apoyo y confianza para la realización del presente trabajo.

Al Dr. Roberto Castro, por poner a disposición su experiencia y conocimientos.

A mi familia, de acá de allá, por compartir mi alegría de llegar a estas instancias en mi carrera y en mi vida, estén donde estén, en especial a mi mamá y a mi papá por brindarme a su modo, su apoyo.

A Mario, por las horas invertidas en charlas sobre temas que poco entendía pero intentaba comprender, y simplemente por ser mi compañero de ruta en este nuevo camino.

A mis colegas, Mariana y Paula, por los segundos, horas y minutos dedicados a la realización de nuestros trabajos, y por sumar su experiencia a mi proyecto.

A mis amigos de la vida, Natalia, Andrea, Maxi, Lau, y a todos los que me acompañan en mi corazón, que son muchos y que saben de su importancia.

A Mariano, por las horas cedidas, invertidas, compartidas, por la confianza y la instrucción desinteresada.

A todos, mi esfuerzo y dedicación por concretar este sueño...

INDICE

⌘ INTRODUCCIÓN ⌘

1. Introducción.....	8
2. Indicadores ambientales.....	9
3. Indicadores biológicos y bioensayos.....	10
4. Ventajas del uso de plantas.....	11
5. Test de Allium.....	12
6. Mitosis.....	13
7. Solución Nutritiva.....	18
8. Metales Pesados.....	19
8.1. Introducción.....	19
8.2 Técnicas de medición de metales.....	20
8.3 Cadmio.....	20
8.3.1. Niveles ambientales, contaminación y comportamiento.....	20
8.3.2. Toxicidad en vegetales.....	21
8.4 Cromo.....	22
8.4.1. Niveles ambientales, contaminación y comportamiento.....	22
8.4.2. Toxicidad en vegetales.....	22

⌘ OBJETIVOS ⌘

Objetivos.....	25
-----------------------	-----------

⌘ MATERIALES Y MÉTODOS ⌘

1. Material biológico	
2. Efectos evaluados en la observación microscópica	
2.1. Efectos genotóxicos.....	28
2.1.1. Efectos genotóxicos reversibles.....	29
2.1.2. Efectos genotóxicos irreversibles.....	31
3. Diseño experimental	
3.1. Metodología empleada.....	31
3.1.2. Materiales, reactivos y equipos.....	41
4. Solución nutritiva.....	44
5. Suelo sintético.....	46
6. Metales pesados.....	47
7. Análisis estadístico.....	47
7.1. Evaluación de toxicidad.....	47
7.2. Análisis de varianza.....	48

⌘ RESULTADOS ⌘

1. Estandarización del bioensayo	
1.1. Siembra I.....	51
1.2. Siembra II.....	53
1.3. Siembra III.....	55
1.4. Siembra IV.....	58
2. Siembra Final Cadmio.....	64
3. Siembra Final Cromo.....	65
4. Gráficos cadmio y cromo	

4.1 Longitud de raíces.....	66
4.2 Número de raíces.....	66
4.3 Porcentaje de mitosis anormales.....	69
4.4 Efecto genotóxico.....	70
5. Análisis Estadístico	
5.1. Metal pesado: cadmio.....	71
5.2. Metal pesado: cromo.....	72
6. Análisis de varianza.....	74

⌘ DISCUSIÓN ⌘

1. Longitud de raíces.....	80
2. Número de raíces.....	80
3. Dureza de raíces.....	82
4. Color de raíces.....	82
5. Porcentaje de mitosis anormales.....	83
6. Efecto genotóxico.....	83
7. Estadística comparada.....	84
8. Soluciones nutritivas y suelos sintéticos.....	84
9. Análisis de varianza.....	85
10. Análisis químicos y bioensayos.....	85

⌘ BIBLIOGRAFÍA ⌘

Bibliografía.....	88
--------------------------	-----------



INTRODUCCION

1. INTRODUCCION

El crecimiento mundial, impulsado por el desarrollo de diversas tecnologías en las últimas décadas, ha estado caracterizado por un incremento en la utilización de sustancias químicas nocivas para el ambiente circundante. Las mismas se encuentran asociadas a diferentes actividades: industrial, urbana, comercial y agrícola.

Entre 1972 y 1992 la población humana ha crecido en 1,7 billones (al pasar de 3,8 billones a 5,5 billones) lo que equivale a la totalidad de la población mundial de comienzos del siglo XX. Esto ha ocurrido conjuntamente con una expansión aún mayor en la utilización de recursos naturales no renovables.

Por lo tanto si se considera, el incremento en el uso de recursos naturales no renovables, y la utilización de sustancias químicas nocivas para el medio ambiente en el presente, se obtiene un importante nivel de degradación del ecosistema que repercute sobre la salud humana.

En los últimos 20 años se han logrado progresos muy significativos para una mejor comprensión y resolución de importantes problemas de contaminación de agua, aire y suelos, especialmente en los países desarrollados.

Algunas zonas devastadas desde el punto de vista ambiental, han sido recuperadas y en muchas otras, el deterioro ha sido detenido.

Junto al perfeccionamiento de los estudios de diagnóstico se han desarrollado criterios y procedimientos orientados a la protección y preservación del ambiente que incluyen, entre otros aspectos, la utilización racional de los recursos naturales, el empleo de tecnologías no nocivas al ambiente, el reciclado, el uso responsable de las sustancias químicas, técnicas adecuadas para la disposición final de residuos y para la limpieza de áreas severamente dañadas, etc.

En su conjunto, la aplicación de estos conocimientos ha representado en los países desarrollados uno de los rubros con mayor crecimiento económico, logro alcanzado a partir de una sostenida integración del sector científico-tecnológico en todas las acciones de gestión ambiental.

Dentro de este contexto, es importante considerar que implementando estos conocimientos dentro de las políticas actuales, podremos tener una oportunidad para asegurar a las generaciones futuras condiciones ambientales compatibles con la vida.

Al considerar los diversos factores responsables del progresivo deterioro ambiental a nivel global, se debe reconocer que es primordial conducir la investigación hacia nuevas técnicas e instrumentos que permitan obtener respuestas sobre la calidad ambiental, en forma inmediata.

En este ámbito, los bioensayos representan un instrumento alternativo que complementa los tradicionales análisis físico-químicos para la determinación de la toxicidad de muestras ambientales.

En las últimas décadas, se han desarrollado bioensayos simples y rápidos, con el empleo de plantas, las que funcionan como buenas herramientas de trabajo para el monitoreo ambiental.

El presente estudio demuestra la aplicabilidad del test de *Allium cepa* como un bioensayo efectivo para la determinación de contaminación ambiental, aún variando las condiciones de suelo y en un medio con solución nutritiva.

2. INDICADORES AMBIENTALES

El estudio de los problemas ambientales ha adquirido en los últimos años, una gran importancia a nivel mundial.

La contaminación ambiental, tiene diversos efectos negativos y tres de las consecuencias importantes que generan (dentro de un amplio espectro) son:

- Reducción de la productividad económica
- Reducción de áreas verdes
- Es nociva para la salud humana y la de otros integrantes del ecosistema

Los indicadores de contaminación evalúan la calidad del ecosistema, o la condición del ambiente natural, a través de información que es monitoreada en cuerpos de agua, cuencas atmosféricas o en suelo, permitiendo identificar, dentro de un marco de calidad, el nivel de deterioro ambiental (Shimkin, 1996) [25].

Para la obtención de la información se destaca la utilización de metodologías y técnicas de medición de variables ambientales, debido que, gracias a ellas es posible realizar adecuadamente una predicción, identificación e interpretación del impacto ambiental en los diferentes componentes del medio ambiente.

Es por esto, que desde hace unos años se está aplicando la utilización de ciertos factores o parámetros ambientales, los cuales tienen como característica presentar un rango de comportamientos en función de sus propiedades intrínsecas, ó en función de las presiones ejercidas por las actividades productivas.

Estos factores y parámetros ambientales son conocidos con el nombre de indicadores ambientales y sus análisis conjuntos se denominan índices ambientales.

Tanto los indicadores como los índices se utilizan para evaluar:

- Sistemas productivos.
- Diagnósticos ambientales y ecológicos.
- Estudios de Impacto ambiental.
- Planes de manejo ambiental.
- Seguimiento y monitoreo ambiental.
- Sistemas de gestión
- Auditorías ambientales.
- Riesgo ecológico.

- Planes de ordenamiento.

La palabra *Indicador* viene del verbo latín *indicare*, que significa mostrar, anunciar, estimar o asignar un valor. Los indicadores son parámetros o en algunos casos valores derivados de los parámetros, que proporcionan información sobre el estado actual de los ecosistemas, así como patrones o cambios en el estado del medio ambiente, y actividades humanas que afectan o están afectadas por el ambiente, o sobre las relaciones entre tales variables.

Para señalar y elegir los indicadores, se requiere de una serie de cuestionamientos que involucren las características del ecosistema a evaluar, para estos casos el indicador debe ser seleccionado, identificado y/o priorizado de acuerdo al papel que desempeña en los ecosistemas, así como su comportamiento ante los tenses ambientales. Para los indicadores se debe analizar el:

- *Contexto Conceptual*: que es lo que se quiere o se trata de medir
- *Contexto Cuantitativo*: es el manejo de datos, aspectos como disponibilidad, calidad, periodicidad, etc.

3. INDICADORES BIOLÓGICOS Y BIOENSAYOS

Los Bioindicadores (ó Indicadores Biológicos) surgen como herramientas necesarias para el análisis y seguimiento de los procesos de desarrollo. Son variables biológicas, ecológicas, especies, o poblaciones que al responder a las variaciones de un gradiente físico-químico muestran un grado de tolerancia, por fuera del cual entra en condiciones de resistencia, estrés, o muerte [26].

Las especies son seleccionadas por su sensibilidad o tolerancia a varias clases de contaminantes o a sus efectos. Los indicadores bióticos tipifican la biota del ecosistema afectado mediante la observación de los cambios estructurales en el tiempo y en el espacio, y evalúan la vulnerabilidad del sistema mediante la tolerancia de las especies a las fluctuaciones naturales u ocasionadas por el proyecto (resistencia), y su capacidad de recolonización (elasticidad).

Si bien una gran cantidad de sustancias químicas han sido encontradas en diversos organismos, la actividad biológica generalmente no ha sido probada por métodos químicos sino biológicos. Los experimentos que investigan el papel de estas sustancias en un contexto biológico, ecológico y/o evolutivo se llaman bioensayos.

Un bioensayo se define como un experimento en el cual un tejido vivo, un organismo o grupos de ellos, es empleado para determinar el potencial tóxico de una sustancia cualquiera, de actividad desconocida.

En las últimas décadas, se han desarrollado bioensayos rápidos con el empleo de plantas como organismos de prueba, las que funcionan como buenas herramientas de trabajo para el monitoreo ambiental. Constituyen una herramienta de fácil disponibilidad para la identificación, monitoreo y control de la introducción de contaminantes tóxicos potenciales en el ambiente.

Estos bioensayos pueden auxiliar en la evaluación de los efectos a la salud (toxicidad humana y animal) y de los efectos ecológicos de millares de sustancias químicas tóxicas que son introducidas en el ambiente.

Sus resultados se refieren, en primer lugar, a los organismos usados en el ensayo y a las condiciones estipuladas en el procedimiento de prueba. Un efecto nocivo evaluado por medio de ensayos biológicos normalizados, puede indicar niveles de peligrosidad trasladable y asimilable a organismos que forman parte de los sistemas naturales y la biocenosis.

En principio, se debe considerar que no existe ningún organismo que pueda ser usado para evaluar todos los efectos posibles sobre el ecosistema bajo las diversas condiciones abióticas y bióticas presentes. En la práctica, solamente unas pocas especies, que representen funciones ecológicas relevantes, pueden ser ensayadas. Además de estas limitaciones fundamentales y prácticas en la selección de organismos de ensayo, la muestra a ser ensayada puede también plantear problemas experimentales para la realización de la prueba.

4. VENTAJAS DEL USO DE PLANTAS

Las plantas superiores son ampliamente utilizadas por ser organismos eucarióticos.

Entre sus ventajas, se pueden enumerar:

- Mayor sensibilidad al estrés ambiental, que otros sistemas de ensayos disponibles.
- Fácil manipulación y almacenaje.
- Bajo costo.
- Buena correlación con otros sistemas de pruebas [29].

Entre las pruebas a corto plazo con plantas que más se han utilizado para la evaluación toxicológica ambiental, se encuentran:

1. Prueba de toxicidad a corto plazo por la germinación de una raíz [6].

La justificación para realizar este bioensayo radica en la importancia de eventos de desarrollo temprano en el crecimiento y supervivencia de las plantas. La prolongación de la raíz es inhibida a concentraciones bajas de las sustancias tóxicas exponiendo sus características como indicador sensible de efectos biológicos.

Este bioensayo puede ser ejecutado con un variado número de especies, las cuales resulten económicamente importantes, sean fácilmente disponibles, germinen y crezcan rápidamente. Una de las semillas más comúnmente utilizadas en esta prueba, son las semillas de *Lactuca sativa* L. [3]

*2. Bioensayo para la estimación de la toxicidad y genotoxicidad, mediante observación macro y microscópica de raíces de cebolla (*Allium cepa* L.).*

Este método es una herramienta fácil y sensible para la medición de la toxicidad total causada por tratamientos de sustancias químicas. Es aplicable a los siguientes tipos de muestras:

- Aguas naturales (lagos, ríos y pozos).
- Agua potable (agua corriente de diferentes tuberías).
- Aguas residuales domésticas e industriales, incluyendo barros y lixiviados.
- Sustancias químicas solubles en agua y con sustancias químicas insolubles en agua y solventes.

También se puede determinar genotoxicidad, mediante observación microscópica de mitosis en células del meristema apical de sus raíces. [8]

5. TEST DE ALLIUM

Los datos obtenidos mediante bioensayos realizados con la especie *Allium cepa L.*, se han utilizado en 1938 (Levan 1938) [19], para estudios de efectos de productos químicos en los cromosomas.

El actual método se ha desarrollado en forma sucesiva, debido a la creciente necesidad de supervisar el impacto cuantitativo de productos químicos en organismos vivos. (Fiskejő 1985, 1988, 1993, 1994, 1995) [11] [12] [13] [14].

El mismo abarca un método sensible para la valoración de los efectos genotóxicos. Los estudios citológicos son relativamente simples de realizar y dan información valiosa de efectos tóxicos producidos sobre los cromosomas, durante la división celular. [10]

El principio de este método demuestra que, al exponer una célula viva, a una sustancia química tóxica, se producen los siguientes efectos:

- *Tóxicos*: retardo en el crecimiento o muerte celular.
- *Genotóxicos*: con daños que pueden transferirse a generaciones siguientes de células.

Cuando un bulbo de cebolla (*Allium cepa L.*) se rehidrata, se produce una estimulación en el crecimiento de las células, lo cual permite la elongación en las raíces de la planta. Sin embargo, cuando la hidratación se lleva a cabo en presencia de sustancias tóxicas, la división celular de los meristemas radiculares puede inhibirse, ya sea retardando el proceso de mitosis o destruyendo las células. Este tipo de alteraciones generalmente impide el crecimiento normal de la raíz y, por tanto, su elongación (Fiskejő, 1985, 1993). [8] [9]

El efecto puede determinarse en forma indirecta, mediante la comparación de la elongación de las raíces de cebollas expuestas al tóxico con las de cebollas no expuestas (control), luego de un periodo de 48 horas de prueba.

Para llevar a cabo dicho test en el presente estudio, bulbos de cebolla fueron cultivados por triplicado, en condiciones ambientales adecuadas para el cultivo (temperatura promedio 25°C, en protección de la incidencia de luz directa) usando crecientes concentraciones de dos metales pesados (cadmio y cromo), con el objeto de estudiar su comportamiento y determinar la toxicidad (mediante la observación de datos macroscópicos –número, longitud, color y dureza de las raíces-), y genotoxicidad (mediante observación microscópica de mitosis en células meristemáticas).

6. MITOSIS

Todos los organismos vivos utilizan la división celular como mecanismo de reproducción, o como mecanismo de crecimiento del individuo. Las nuevas células sólo se obtienen a partir de otras células vivientes por medio del proceso denominado división celular.

En organismos pluricelulares la división celular se convierte en un proceso cíclico destinado a la producción de múltiples células, todas idénticas entre sí, pero que posteriormente pueden derivar en una especialización y diferenciación dentro del individuo.

Las células pertenecientes al meristema apical de *Allium sp.*, conforman un grupo de células con un nivel relativamente alto de actividad mitótica. Deben formarse permanentemente nuevas células mediante división celular que darán lugar al crecimiento longitudinal de la raíz.

La mayor parte del trabajo necesario para la preparación de la división celular se produce durante la fase del ciclo celular que recibe el nombre de interfase. La mayoría de los componentes celulares se forman a lo largo de todo el período interfásico comprendido entre dos divisiones celulares consecutivas. [4]

El cromosoma antes de dividirse, debe pasar a un estado en el que posea dos cromátidas, genéticamente idénticas. La duplicación del material genético debe ser previa a la división celular.

En la interfase del ciclo de división celular podemos distinguir tres períodos:

Fase G1: Es un estadio que se caracteriza por ser genéticamente activo, el ADN se transcribe y se traduce, dando lugar a las proteínas necesarias para mantener la estructura y el funcionamiento celular.

Fase S: Es la fase en la cual se duplica por entero el material genético, el cromosoma pasa de tener una cromátida a tener dos, cada una de ellas compuesta por una doble hélice de ADN producto de la duplicación de la original, las dos dobles hélices hijas serán exactamente iguales, y por tanto las cromátidas hermanas, genéticamente idénticas.

Fase G2: Durante este período se finaliza la preparación de todos los componentes necesarios para la división celular, al final de esta fase, se produce una señal que dispara el proceso de división celular.

La progresión de una célula eucarionte a través del ciclo celular requiere de la integración de un largo número de señales intra y extracelulares. Si las señales apropiadas no están presentes, la célula fallará en la transición de una fase del ciclo celular a la siguiente. Esta transición depende de la finalización de una serie de eventos moleculares.

Las transiciones de G1 a S y de G2 a M, son catalizadas por la fosforilación de sustratos claves mediados por quinasas dependientes de ciclinas (CDKs). Las quinasas son enzimas que catalizan la fosforilación de proteínas, que puede activar o desactivar la proteína modificada, según el caso. [30]

Las ciclinas son un grupo heterogéneo de proteínas, cuya expresión es periódica y altamente regulada a través del ciclo celular por dichas quinasas.

Las CDKs, cumplen un papel fundamental en las transiciones del ciclo celular, son de vida corta y se destruyen luego de separarse de las CDK.

Entre las ciclinas implicadas en la progresión del ciclo celular se pueden mencionar:

Ciclinas D (D1, D2, D3): se sintetizan en G1 temprano, y son responsables de la transición G1/S.

Ciclina E: se sintetizan en G1 tardío, permite la entrada en S.

Ciclina A: se sintetiza al final de G1, es requerida para la progresión normal tanto de la fase S como de la mitosis.

Ciclina B: su síntesis comienza al final de la fase S, se une a Cdk1, formando el factor promotor de la maduración (MPF), la activación de MPF marcará el final de G2 y el comienzo de la mitosis.

Ciclina H: se expresa de modo constante durante todo el ciclo celular



Ciclo Celular

<http://www.ucm.es/info/genetica/grupod/mitosis/mitosis.htm#alteraciones>

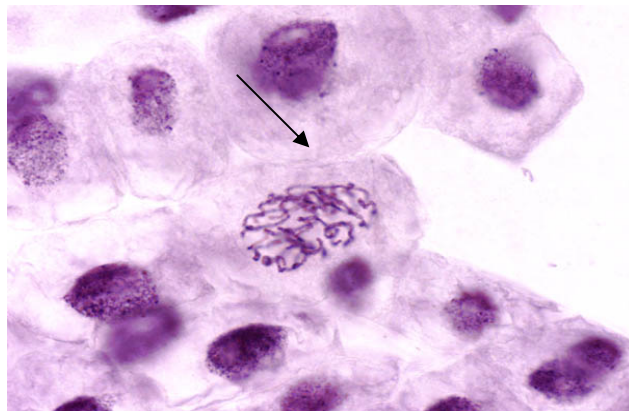
Las etapas a través de las cuales pasa la célula de una división celular a la siguiente, constituyen el ciclo celular. El mismo, se divide en dos fases, fácilmente visibles en el microscopio óptico: la fase M (M = mitosis), y la interfase. El proceso de división celular (fase M) consiste en dos procesos secuenciales: la división nuclear (cariocinesis) y la división citoplasmática (citocinesis).

Si bien la mitosis es un proceso continuo, sin etapas definidas, algunos acontecimientos claves identifican cinco fases dentro de la cariocinesis: profase, prometafase, metafase, anafase, telofase.

Los acontecimientos que se pueden definir dentro de cada fase son:

Profase:

- La cromatina que se halla descondensada en la interfase, en esta etapa, se condensa gradualmente hasta formar los cromosomas bien definidos, y visibles al microscopio óptico como delgados filamentos;
- En esta etapa los cromosomas están constituidos por dos cromátidas (copias idénticas de ADN);
- Las proteínas se adhieren a los centrómeros creando los cinetocoros;
- Los cromosomas comienzan a moverse;
- La membrana nuclear se desorganiza, marcando el comienzo de la prometafase.



Célula en Profase

<http://www.med.uva.es/~biocel/Practicas/Apracticasiocel/Practica12.html>

Prometafase:

- Se inicia con la desorganización de la membrana nuclear en fragmentos.

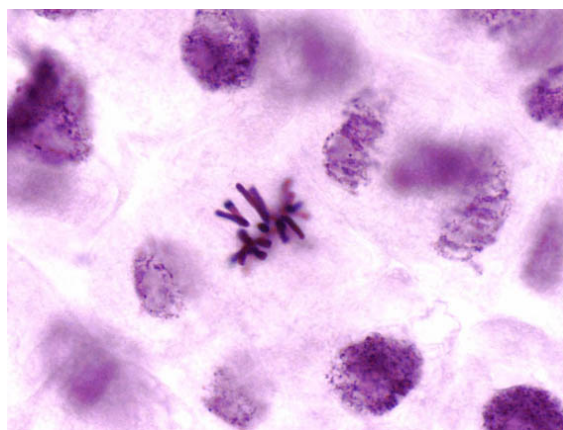


Célula en Prometafase

<http://www.med.uva.es/~biocel/Practicas/Apracticasbiocel/Practica12.html>

Metafase:

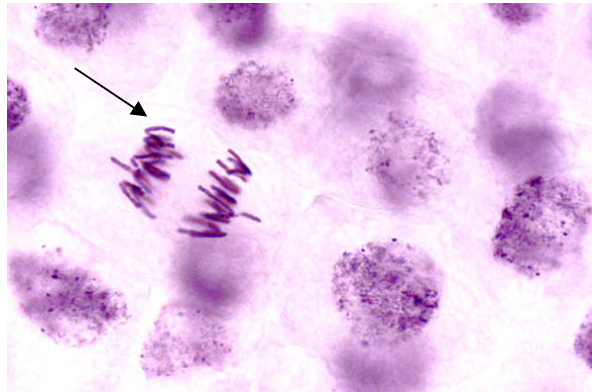
- Los cromosomas han alcanzado su máximo estado de condensación y se encuentran unidos a las fibras del huso acromático a través de los cinetocoros de sus centrómeros.
- Los microtúbulos cinetocóricos traccionan a los cromosomas hasta alinearlos en el plano medio de la célula, denominado plano ecuatorial.
- Esta organización ayuda a asegurar que en la próxima fase, cuando los cromosomas se separen, cada nuevo núcleo recibirá una copia de cada cromosoma.



Célula en Metafase

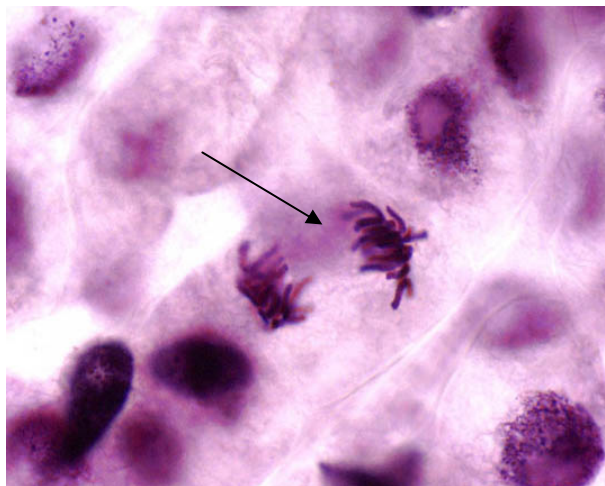
<http://www.med.uva.es/~biocel/Practicas/Apracticasbiocel/Practica12.html>

- Los cinetocoros apareados a cada cromosoma se separan, permitiendo que las dos cromátidas de cada cromosoma duplicado, hasta el momento unidas por el centrómero, también se separen.
- El movimiento resulta de una combinación de movimiento del cinetocoro a lo largo de los microtúbulos del huso y de interacción física de microtúbulos polares.



Célula en Anafase

<http://www.med.uva.es/~biocel/Practicas/Apracticasiocel/Practica12.html>

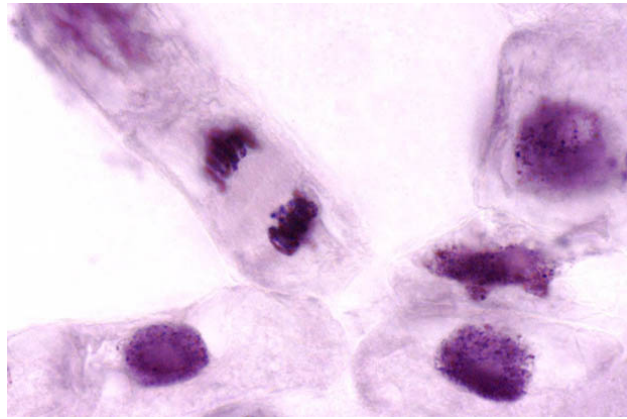


Célula en Anafase Tardía

<http://www.med.uva.es/~biocel/Practicas/Apracticasiocel/Practica12.html>

Telofase:

- Nuevas membranas nucleares se forman alrededor de los cromosomas hijos mientras los cromosomas se descondensan y ya no son más visibles con el microscopio óptico. Aquí culmina la cariocinesis obteniéndose una célula con dos núcleos con idéntica información genética.
- La citocinesis o la partición de la célula comienza durante esta fase.



Célula en Telofase

<http://www.med.uva.es/~biocel/Practicas/Apracticasbiocel/Practica12.html>

7. SOLUCION NUTRITIVA

Las soluciones nutritivas representan un medio excelente para regular la cantidad y proporción relativa de sales minerales suministradas a las plantas en un cultivo de tipo experimental.

Las primeras experiencias sobre el cultivo de plantas en medio artificial son las de Woodward, quien en 1699, cultivó diferentes hortalizas, en aguas de manantial, río, lluvia y destilada, con el objeto de comprobar si era el agua o las partículas sólidas del suelo las que suministraban el alimento a las plantas. A través de dicha experiencia se concluyó que la tierra y no el agua, es la materia que forma los vegetales. [5]

Todas las plantas se nutren de alimentos inorgánicos o minerales. Estas necesitan ácido carbónico, amoníaco, nitratos, ácido fosfórico, ácido sulfúrico, ácido salicílico, cal, magnesio, potasio, y hierro.

Las investigaciones sucesivas, determinaron cuáles eran los elementos verdaderamente indispensables para el crecimiento de las plantas y en cuáles otros su absorción podía considerarse como accidental ó debida a su presencia en el suelo en que la planta se desarrolla.

Desde comienzos del siglo XX, muchos investigadores concentraron sus esfuerzos en la obtención de la mejor solución nutritiva para el crecimiento de plantas en general o al menos de una especie dada. Con el transcurso de las investigaciones se hizo evidente que no existía tal fórmula óptima.

Se demostró que para una misma especie se encontraba que distintas soluciones podían ser las óptimas según la estación del año en que se realizase el experimento, o las condiciones

experimentales de fotoperíodo, temperatura, intensidad de iluminación, humedad, etc. También debe considerarse como un factor importante el pH del suelo.

En general, en la vida de la planta los cultivos toleran mejor la alcalinidad y se considera que los suelos cultivables tienen un pH entre cinco y nueve. [20]

Puede considerarse que el pH del suelo es importante, por cuatro razones:

- por causar deficiencias de algunos elementos en la planta.
- por inducir exceso nocivo de ciertos elementos en la planta.
- por favorecer a ciertos patógenos.
- por producir efectos directos en el desarrollo del vegetal.

El pH del suelo es importante porque los vegetales sólo pueden absorber a los minerales disueltos, y la variación del pH modifica el grado de solubilidad de los minerales. Por ejemplo, el aluminio y el manganeso son más solubles en el agua a un pH bajo y al ser absorbidos por las raíces son tóxicos a ciertas concentraciones. Determinadas sales minerales que son esenciales para el crecimiento vegetal, como el fosfato de calcio, son menos solubles a un pH alto (pH 10 – 12), lo que hace que esté menos disponible para las plantas. [28]

8. METALES PESADOS

8.1 Introducción

La toxicidad general de un contaminante ambiental es un efecto de corto plazo que puede terminar en la muerte de los organismos expuestos. Si la contaminación es local no hay efectos de largo alcance sobre la biosfera. No obstante, si la acción del contaminante es persistente, los organismos sobreviven y el contaminante puede ingresar en las cadenas tróficas. Esto implica que el contaminante puede afectar a otros organismos, incluyendo al ser humano induciendo efectos indeseables de largo plazo. [9]

La expresión metales pesados se usa, para aludir de un modo no muy preciso a ciertos elementos metálicos, y algunos de sus compuestos, a los que se atribuyen determinados efectos de contaminación ambiental, y toxicidad.

Se consideran dentro de este conjunto, aquellos elementos cuya densidad es igual o superior a 5 g/cm^3 cuando está en forma elemental, o cuyo número atómico es superior a 20, excluyendo a los metales alcalino-térreos. Su presencia en la corteza terrestre es inferior a 0,1%.

Algunos elementos que suelen citarse bajo esta denominación, en orden alfabético son: Aluminio, Arsénico, Bario, Berilio, Cadmio, Cobalto, Cobre, Cromo, Estaño, Hierro, Manganeso, Mercurio, Molibdeno, Níquel, Plata, Plomo, Selenio, Talio, Vanadio, Zinc.

Cabe destacar que el Arsénico es un semimetal y el Selenio es un no metal, en tanto que el resto son metales.

8.2 Técnicas de medición de metales

Los metales pesados pueden causar efectos biológicos significativos inclusive cuando están presentes en concentraciones relativamente bajas. Las técnicas gravimétricas o colorimétricas no son útiles para cuantificar estos elementos a estas concentraciones, en su lugar se han utilizado otros métodos más sensibles.

El método más común es la espectrofotometría de absorción atómica, el mismo se basa en la capacidad de los átomos (en su estado elemental) para absorber y/o emitir radiación, ya sea en el espectro visible como en el ultravioleta, en bandas estrechas, y en la posibilidad práctica para la medición de la radiación absorbida y/o emitida. Es una excelente técnica para ciertos elementos cuando se requiere límites de detección instrumentales muy bajos. Presenta la dificultad de la preparación de la muestra para la atomización.

Otro método que identifica y cuantifica los metales pesados es la espectrometría de masas. Esta técnica proporciona la información que permite la determinación, no solamente del metal en interés sino también de la forma de la molécula en que se encuentra (opuesta a la absorción atómica, que cuantifica solamente el metal). Sin embargo, esta técnica es limitada por varios factores: debe haber preparación cuidadosa para asegurar la pureza de la muestra a identificar, el equipo es costoso, más difícil de operar que el de absorción.

También se utiliza para cuantificar elementos particulares, los análisis por activación neutrónica, los cuales dependen de la absorción de neutrones por dichos elementos y la subsecuente emisión de energías de radiación electromagnética. La mayor desventaja de este método es que se necesita una fuente de electrones, como un reactor nuclear y la imposibilidad de distinguir entre formas diferentes de los elementos por dicha técnica. [18]

8.3 CADMIO

8.3.1 Niveles ambientales, contaminación y comportamiento

El cadmio es un metal pesado que produce efectos tóxicos en los organismos vivos, aún en concentraciones muy pequeñas.

Es un elemento que se encuentra de manera natural en la corteza terrestre. El cadmio puro es un metal blando, de un brillo muy parecido al de la plata, pero en esta forma no es muy común encontrarlo en el ambiente. Se encuentra más a menudo combinado con otros elementos (tales como oxígeno, cloro o azufre) formando compuestos. Todos estos compuestos son sólidos estables que no se evaporan (sólo el óxido de cadmio también se encuentra en el aire en forma de pequeñas partículas).

Una gran parte del cadmio utilizado con fines industriales es obtenido como un producto a partir de la fundición de rocas que contienen zinc, plomo o cobre. El cadmio tiene muchas aplicaciones en la industria, pero es utilizado con más frecuencia en la elaboración de pigmentos, pilas eléctricas y plásticos.

Para las personas no expuestas ocupacionalmente, el tabaco constituye la principal fuente de exposición, se consume hasta 20 mg de cadmio por cada 20 cigarrillos consumidos. [2]

El cadmio es más móvil en el ambiente acuático que la mayoría de los otros metales. También es bioacumulativo y persistente en el ambiente ($t^{1/2}$ 10-30 años) (USPHS 1997).

Aunque las formas solubles pueden migrar en el agua, el cadmio en el suelo es relativamente inmóvil en complejos insolubles o adsorbidos en sedimentos.

De manera similar el cadmio, en el suelo puede existir en su forma soluble en agua del suelo, o en complejos insolubles con componentes inorgánicos y orgánicos del suelo.

Cuando está presente en una forma biodisponible, se sabe que los organismos acuáticos y terrestres bioacumulan el cadmio. Su tiempo de vida media en los organismos (especialmente en los mamíferos) es indefinido y puede durar varios años.

8.3.2 Toxicidad en vegetales

El Cadmio no tiene funciones bioquímicas o nutricionales, y es altamente tóxico tanto para plantas como animales.

Los vegetales no tienen mecanismos para excretar el cadmio, y una vez que lo absorbieron, lo retienen en sus tejidos. La acumulación es mayor en las raíces que en la parte aérea de la planta y esto tiende a restringir el movimiento del catión a las cadenas alimentarias. [15]

Aunque los mecanismos de translocación no se han estudiado en profundidad, se sabe que, por lo general, las semillas y los granos tienen concentraciones más bajas que las hojas.

En la actualidad existen fuertes restricciones en el uso del cadmio, tanto para aplicaciones presentes como para tecnologías futuras.

Los efectos perceptibles de la fototoxicidad del cadmio dependen de la especie; algunos de los más comunes son: la clorosis (que incluye una reducción en el contenido de clorofila perceptible por el tono amarillo presente en las hojas), marchitez, y en ocasiones necrosis. Este tipo de efecto se debe principalmente a que las altas concentraciones de cadmio inhiben la fotosíntesis y la fijación del dióxido de carbono. [1]

Algunos vegetales, como arroz y trigo, pueden asimilar cantidades considerables de cadmio a partir de suelos contaminados. Se sabe que en esta asimilación pueden influir una serie de factores como el tipo de suelo, el pH, la concentración de otros minerales, etc., pero la información a este respecto es escasa. [16]

En síntesis, es evidente que grandes cantidades de cadmio, están presentes en el ambiente a través de la actividad industrial del hombre, por lo que se debe prestar atención a estas tendencias y tomar medidas para reducir la presencia de este metal dada su toxicidad y acumulación aún en concentraciones pequeñas.

8.4 CROMO

8.4.1 Niveles ambientales, contaminación y comportamiento

Aunque en el ambiente existen varios estados de oxidación de cromo, sólo las formas trivalente y hexavalente son consideradas como de importancia biológica. En los ambientes acuáticos el cromo_(VI) predomina en una forma soluble. Las formas solubles pueden ser lo suficientemente estables como para experimentar un transporte intramedios, sin embargo el cromo_(VI) en ocasiones será convertido en cromo_(III), a través de especies reductoras como las sustancias orgánicas, sulfuro de hidrógeno, azufre, sulfuro de hierro, amonio y nitrito. [17]

Sin embargo, los cambios en las propiedades químicas y físicas de un ambiente acuático pueden resultar en cambios para el equilibrio Cr_(III) - Cr_(VI). [22]

Los problemas ecológicos con el Cr_(VI) están relacionados con el desarrollo industrial en general y con la industria de cromo en particular. Esta forma del cromo, puede alterar seriamente el equilibrio biológico causando efectos tóxicos tanto en plantas como en animales, ya que es rápidamente absorbido por las membranas biológicas.

Las industrias relacionadas con el cromo (curtiembres, galvanoplastías, metalúrgicas, producción de pigmentos, fertilizantes e incineración de productos industriales como aceites y cueros) son consideradas contaminantes para el suelo y las aguas superficiales.

En los suelos, el cromo (III) y (VI) se acumulan en muchas especies (Richard and Bourg 1991). [22]

8.4.2 Toxicidad en vegetales

El cromo es un elemento natural que se encuentra en rocas, animales, y en plantas en concentraciones detectables por métodos modernos, pero no se conoce si es un nutriente esencial para la vida vegetal. [28]

Los cromatos y bicromatos según evidencias prácticas, aparentemente son de mayor toxicidad para las plantas. Son absorbidos a través de las raíces y las superficies foliares a partir de ambientes con presencia de altas concentraciones del metal. En dichos ambientes se pueden observar algunos patrones de intoxicación como:

-clorosis: similar a la deficiencia de hierro.

-disminución en la incorporación de calcio, potasio, fósforo, hierro y manganeso.

-reducción del peso seco de las hojas.

-variaciones en el metabolismo de los carbohidratos y decrecimiento de la concentración de clorofila de las hojas.

No se identificaron los mecanismos de acción aunque se conoce que varios factores pueden afectar su disponibilidad e influir en la toxicidad, como por ejemplo:

-el pH del suelo.

-las interacciones con otros minerales y compuestos orgánicos quelados.

-las concentraciones de dióxido de carbono y oxígeno. [27]



OBJETIVOS

OBJETIVOS

1. Mostrar los efectos genotóxicos del cromo y del cadmio mediante empleo del Test de *Allium*, desarrollado en solución nutritiva y suelo sintético a través de:

-El desarrollo de la metodología del bioensayo de *Allium* con solución nutritiva y suelo sintético.

-Obtención del CL₅₀.

2. Comparar los resultados obtenidos en el presente estudio con los obtenidos en trabajos anteriores realizados sin el uso de soluciones nutritivas y suelos sintéticos.

MATERIALES Y METODOS

1. MATERIAL BIOLÓGICO

Para este trabajo se seleccionaron bulbos de *Allium cepa* L. (más conocidos como cebollas comerciales), de 6cm de diámetro, sin formación de hojas, ni presencia de hongos, o daños por golpes.

El bulbo está formado por numerosas catáfilas, que realizan funciones de reserva de sustancias nutritivas necesarias para la alimentación de los brotes, las cuales están recubiertas de membranas secas, delgadas y transparentes (catáfilas papiráceas).

El sistema radicular es fasciculado, corto y poco ramificado; siendo las raíces blancas y blandas.

Los requerimientos edafoclimáticos determinan que es una planta de clima templado, y que prefiere suelos sueltos, sanos, y ricos en materia orgánica, de consistencia media y no calcárea. Considerando dichos requerimientos se seleccionó el suelo sintético utilizado, que contempla los porcentajes de turba, caolinita y arena óptimos para el desarrollo del bulbo en condiciones experimentales.

Taxonomía y Morfología

Subdivisión: Angiosperma

Clase: Monocotiledónea

Familia: Liliáceae.

Nombre científico: *Allium cepa* L.

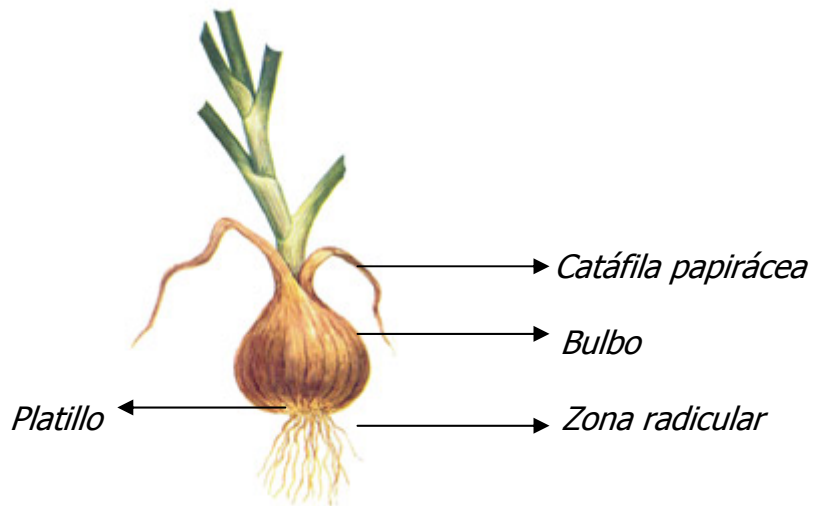
Planta: bienal, en ocasiones de tallo reducido a una plataforma que da lugar por debajo a numerosas raíces y encima a hojas, cuya base carnosa e hinchada constituye el bulbo.

Tallo: el tallo que sostiene la inflorescencia es derecho, de 80 a 150cm de altura, hueco, con inflamamiento ventrudo en su mitad inferior.

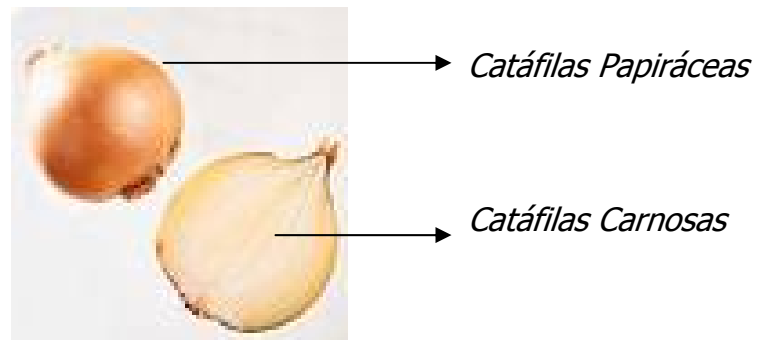
Hojas: envainadoras, alargadas y puntiagudas en su parte libre.

Flores: hermafroditas, pequeñas, verdosas, blancas o violáceas, que se agrupan en umbelas.

Fruto: es una cápsula con tres caras, de ángulos redondeados, que contienen las semillas, las cuales son de color negro, angulosas, aplastadas y de superficie rugosa.



Vista externa de bulbo de *Allium cepa* L.
<http://www.infoagro.com/hortalizas/images/cebolla5.jpg>



Vista Frontal y Corte Lateral de bulbo de *Allium cepa* L.
www.mercadocentral.com.ar

2. EFECTOS EVALUADOS EN LA OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA

2.1. Efectos genotóxicos

Respecto a la determinación de la genotoxicidad de las sustancias químicas, varios parámetros traducidos en dos diferentes tipos de efectos, se sugieren como estándar en la observación microscópica:

-Efectos Reversibles

-Efectos Irreversibles

2.1.1. Efectos genotóxicos reversibles

Dado un efecto reversible, se expresa la posibilidad de la recomposición del cromosoma.

Ejemplo de efectos reversibles son: roturas de cromosomas, cromosomas errantes, cromosomas sticky; micronúcleos.

- *Cromosomas Sticky*: o también llamados cromosomas pegajosos, es un efecto tóxico, en donde no se diferencian cromosomas, ni cromátidas;
- *Cromosomas Errantes*: se observa la fractura de los cromosomas;
- *Puentes Cromosómicos*: efecto genotóxico producido en la anafase, donde los cromosomas, en su desplazamiento hacia los polos, forman una unión entre dos cromosomas y la separación no es completa;
- *Micronúcleos*: efecto genotóxico producido en la interfase, en donde producto de la presencia de fragmentos cromosómicos, se observan uno o más núcleos dispersos;



Cromosoma errante en preparado de *Allium cepa* para observación microscópica

M. Handel Test de Allium Cd $3,3 \cdot 10^{-4}$ M

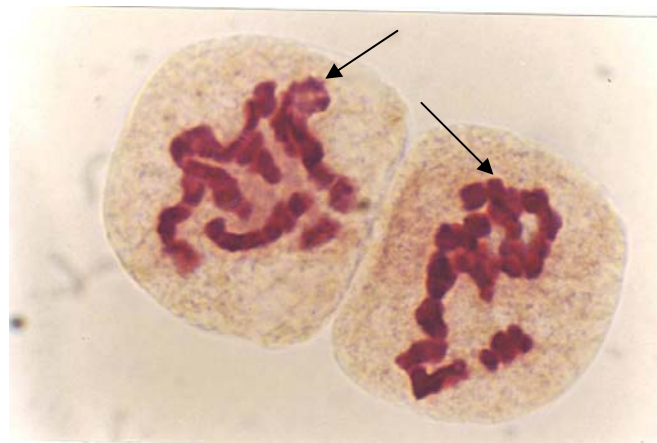


Cromosoma errante en preparado de *Allium cepa* para observación microscópica

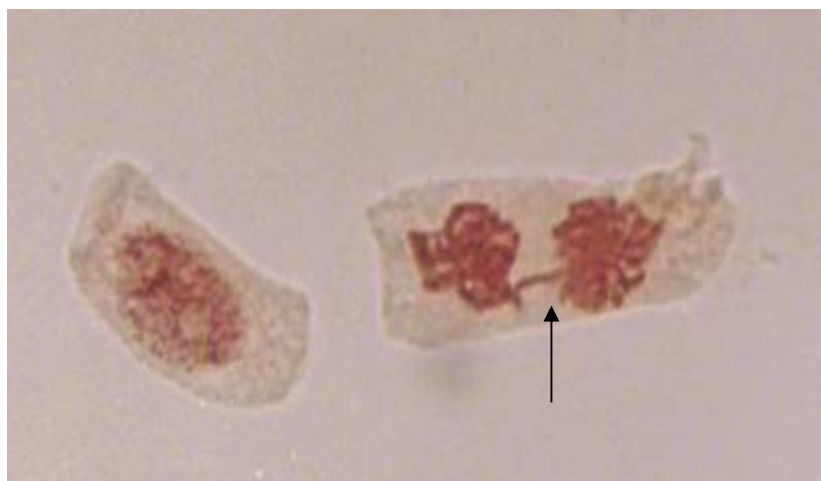
M. Handel; Test de Allium Cd $1 \cdot 10^{-4}$ M



Puente cromosómico en preparado de *Allium cepa*
 Fsikesjö; Institute of Genetics, University of Lund, Sweden
 N-Methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine in the Allium Test



Cromosomas Sticky en preparado de *Allium cepa*
 Handel, M Allium Test



Puente cromosómico en preparado de *Allium cepa*
 Handel, M. Allium Test

2.1.2. Efectos genotóxicos irreversibles

Dado un efecto irreversible se produce un efecto tal que la recomposición de los cromosomas no es viable.

Ejemplos de estos efectos son: pérdida o aumento de los fragmentos del cromosoma, y entre ellos:

- *Anafases tempranas*: los grupos anafásicos no se encuentran completamente separados del huso mitótico
- *C-mitosis*: cromosomas algo contraídos y separados de la zona metafásica, luego de la deformación de la estructura del huso



C-mitosis en preparado de *Allium cepa*

Handel, M. Allium Test

3. DISEÑO EXPERIMENTAL

3.1. METODOLOGIA EMPLEADA

Siembra:

En el presente bioensayo se utilizaron bulbos de cebolla sanos. A los mismos se les quitó las catáfilas papiráceas usando un bisturí.

Con una tijera de disección se cortaron las raíces secas ubicadas en la zona del platillo, cuidando de no dañar las raíces primordiales.

Los bulbos fueron colocados en frascos de vidrio de 300 ml. debidamente rotulados (rótulo: metal a analizar, fecha de siembra, número de bulbo). Cada frasco fue preparado con el suelo sintético y la solución nutritiva, previo a la siembra. Para cada frasco, se utilizó 250 ml de Solución Nutritiva (diluida en la proporción 1:10) y 50 gramos de Suelo Sintético.

Se prepararon varias concentraciones de los metales pesados cadmio y cromo los cuales fueron diluidos en la Solución Nutritiva 1:10.

Las concentraciones de los metales pesados utilizadas fueron seleccionadas, a partir de los datos obtenidos en anteriores estudios realizados con los mismos metales. [23] A los fines de obtener resultados que puedan ser factibles de comparar con el presente estudio, las concentraciones seleccionadas fueron:

Cromo	1.10^{-2} M, 1.10^{-3} M, 3.10^{-4} M, 3.10^{-5} M, 1.10^{-5} M, 3.10^{-6} M, 1.10^{-6} M
Cadmio	1.10^{-2} M, 3.10^{-3} M, 1.10^{-3} M, 3.10^{-4} M, 1.10^{-4} M, 3.10^{-5} M, 1.10^{-5} M, 3.10^{-6} M

Como control de la batería de ensayos realizados se utilizó solución nutritiva Hoagland & Arnon, diluida 1:10 y suelo sintético, según las proporciones indicadas en materiales y métodos.

Condiciones de siembra:

- ◆ siembra en zona al resguardo de la luz directa
- ◆ temperatura de siembra: 25°C promedio
- ◆ tiempo de siembra: 48 horas
- ◆ tipo de ensayo: estático (sin renovación de solución nutritiva durante la siembra)

El ensayo se realizó en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad de Flores, en el mes de Junio acondicionado con temperatura controlada.



Materiales utilizados durante la siembra



Frascos utilizados para la siembra conteniendo suelo sintético



Preparación de bulbos para la siembra



Preparación de bulbos para la siembra

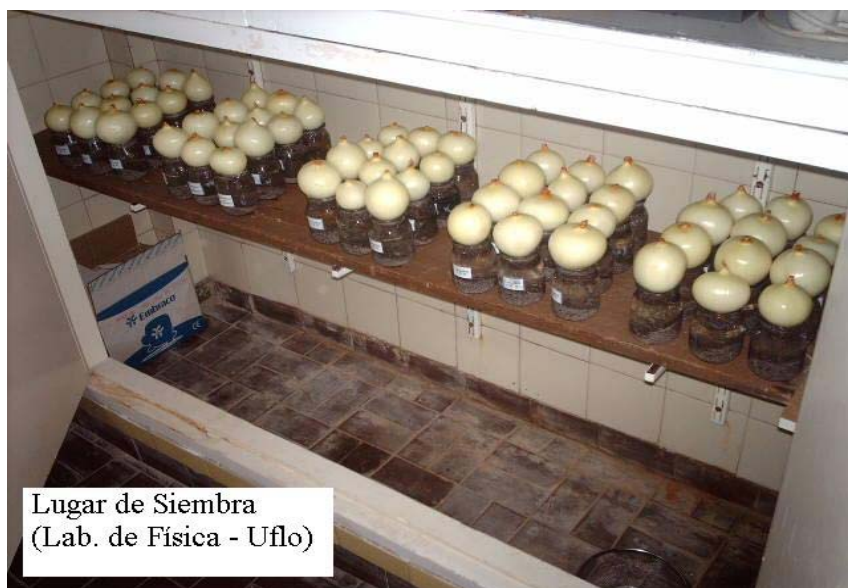


**Bulbo de *Allium cepa*
acondicionado para la siembra**

Cosecha:

Transcurridas las 48 horas:

- ◆ Se evaluaron cambios macroscópicos en las raíces por bulbo (número, longitud, color, dureza)
- ◆ Se cortaron las raíces enteras cuando tenían un largo de 0,5 a 1 cm., es decir, mientras las células meristemáticas del ápice se hallan en crecimiento activo.
- ◆ Las raíces fueron colocadas en solución de fijación (3 partes de alcohol absoluto - Etanol- y 1 parte de Ac. Acético Glacial concentrado).
- ◆ Fueron conservadas en heladera a 4 °C
- ◆ Se realizaron preparados histológicos utilizando la técnica de aplastamiento para determinar el porcentaje de mitosis alteradas.



Lugar de Siembra, acondicionado a 25°C al resguardo de luz directa



Cosecha y Fijación de raíces de bulbos

Preparación para cosecha de raíces de *Allium cepa*



Metal: Cd
Concentración: 1.10-4 M
Día de Siembra: 17/07/06
Día de Cosecha: 19/07/06

Bulbos de *Allium cepa* preparados para la siembra



Bulbo de *Allium cepa* sembrado con solución nutritiva 1:5



Bulbos de *Allium cepa*, $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ $3 \cdot 10^{-6}$ M



Bulbos de *Allium cepa*, CdCl₂.1H₂O

Observación Microscópica:

Para hidrólisis se colocaron las raicillas en un tubo conteniendo 3 ml de solución de hidrólisis (9 partes de Acido Acético Glacial 45% y 1 parte de Acido Clorhídrico -p.a.- 1 N).

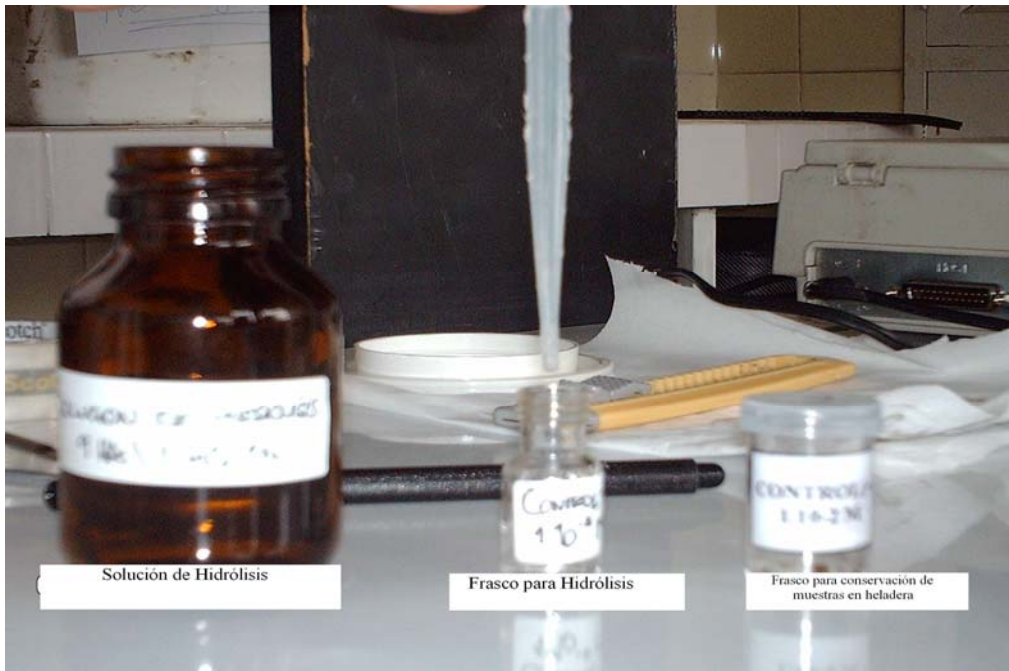
Los tubos se colocaron en un baño termostático a 60° C durante 5 minutos. El calor y el ácido clorhídrico ayudan a disolver el cemento péptico.

Se coloca sobre un portaobjetos debidamente rotulado (según concentración a analizar), tres raíces hidrolizadas. Se corta con el bisturí los últimos 2mm de cada raíz, de modo de preparar para observación sólo la zona meristemática de la misma.

A continuación, por medio de la técnica del "squash" se trituro y aplasto la muestra, de modo de no destruir el tejido vegetal, con el bisturí. Luego se agrego 1 o 2 gotas de el colorante orceína acética, dejando 2 minutos en contacto con el mismo, y se continuó triturando para su mejor absorción.

Se elimino el exceso de colorante y se coloco el cubreobjeto sobre el preparado.

La observación al microscopio óptico se inicio con el menor aumento para la ubicación del campo, y continuo con el barrido del preparado a 40X, para la contabilización de las mitosis presentes en el mismo.



Solución, frasco de hidrólisis y frasco plástico para conservación de muestras en heladera

Técnica para realizar el preparado:

- 1. Se hidrolizan los ápices radiculares en baño termostático*



2. Se coloca 3 ápices de raíces sobre portaobjetos



3. Utilizando el bisturí se procede a realizar la técnica de aplastamiento o "squash"



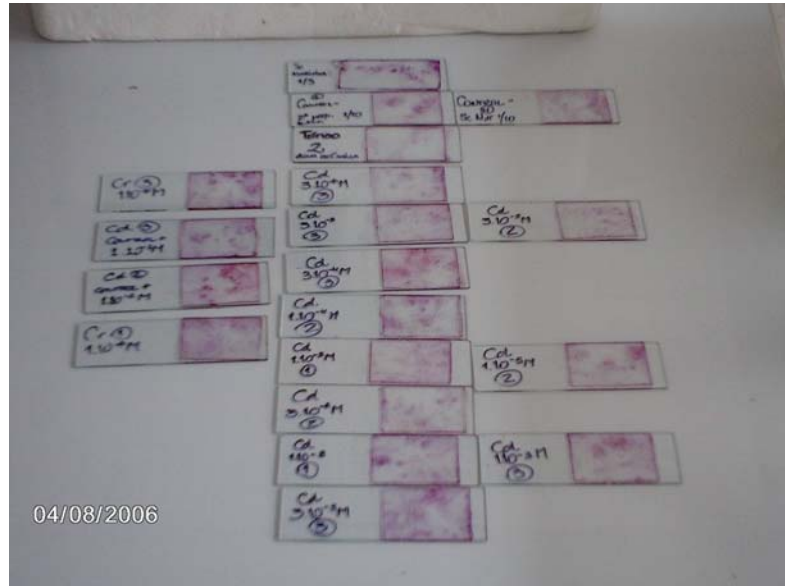
4. Sobre las raíces se coloca dos gotas de orceína acética



5. Se deja actuar 2 ó 3 minutos el colorante y luego se procede a colocar el cubreobjetos sobre el preparado



6. Montaje de los preparados realizados



6. Preparado listo para la observación microscópica



3.1.2. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS

➤ **Materiales** (ver imágenes al final)

- Bulbos comerciales de *Allium cepa* L. (diámetro 6 cm.)
- Frascos de vidrio de boca ancha 200 ml (para siembra)
- Frascos plásticos 20 ml (para conservación de muestra)
- Frascos de vidrio 10 ml (para hidrólisis)
- Tijera de disección
- Pinzas metálicas
- Bisturí
- Guantes de látex
- Matraces y erlenmeyer
- Regla
- Cronómetro
- Pipetas Pasteur
- Marcadores indelebles
- Planillas de datos
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Aceite de inmersión
- Xilol
- Papel de arroz



Bulbos comerciales de *Allium cepa*



Frascos plásticos 20 ml (para conservación de muestra)



Matraz y erlenmeyer para preparación de soluciones

➤ **Reactivos**

- Solución Nutritiva de Hoagland y Arnon (en dilución 1/10)
- Suelo Sintético
- $\text{CdCl}_2 \cdot 1\text{H}_2\text{O}$ (marca de droga: Anedra, p.a.)
- $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (marca de droga: Mallincrodt, p.a.)

- Solución de fijación

Preparación: 3 partes de alcohol absoluto p.a. y 1 parte de ácido acético glacial concentrado

- Solución de hidrólisis

Preparación: partes de ácido acético 45% y 1 parte de ácido clorhídrico 1N

- Colorante Orceína Acética

Preparación de la Orceína Acética:

- calentar 50 ml. de Ácido Acético en un vaso de precipitados de 250 ml
- agregar 1,7 g de orceína
- calentar otra vez (sin permitir que hierva)
- apagar y mantener 2 ó 3 días cubierto de la luz a temperatura ambiente
- a los 3 días agregar agua destilada
- filtrar la solución
- envasar en frasco oscuro
- mantener a temperatura ambiente

➤ Equipos

- Baño termostático;
- Heladera
- Freezer (-18°C a -20°C)
- Microscopio óptico binocular (con objetivos 16X, 40X y 100X);



Baño Termostático



Microscopio Óptico Binocular (con objetivos 16X, 40X, 100X)



Observación microscópica de un preparado

4. SOLUCION NUTRITIVA

En el presente estudio se utilizó la solución nutritiva de Hoagland y Arnon (1950), conformada por dos soluciones: solución de macronutrientes, y solución de micronutrientes.

Las sales utilizadas como su concentración en la solución de Hoagland y Arnon (H&A) se detallan en el siguiente cuadro:

	Sal	Concentración en Solución H&A
Macronutrientes	Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	1.10 ⁻³ M
	KNO ₃	2.10 ⁻³ M
	MgSO ₄ .7H ₂ O	1.10 ⁻³ M
	KH ₂ PO ₄	1.10 ⁻³ M
	Fe.EDTA.3H ₂ O	2.10 ⁻⁴ M
Micronutrientes	MnSO ₄	3,64 ⁻⁶ M
	CuCl ₂	4,80 ⁻⁷ M
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	7,80 ⁻⁹ M
	ZnSO ₄	4,20 ⁻⁹ M
	H ₃ BO ₃	3,70 ⁻⁶ M

Tabla 1. Macro y Micronutrientes de Solución Hoagland y Arnon

Se puede observar que en la composición de la solución se suministran tres macronutrientes en forma de cationes: potasio, calcio y magnesio (K, Ca, Mg). Otros aparecen en forma aniónica: nitrato, fosfato y sulfato (NO₃, PO₄, SO₄).

Los micronutrientes, comprenden los elementos que la planta necesita en menor concentración como Hierro (Fe), Manganeseo (Mn), Boro (B), Zinc (Zn), Cobre (Cu), Molibdeno (Mo), Cobalto (Co) y Cloro (Cl).

Cada elemento es vital en la nutrición de la planta, la falta de uno solo limitará su desarrollo, porque la acción de cada uno es específica y ningún elemento puede ser reemplazado por otro. Todos estos elementos le sirven a la planta para la formación de los tejidos vegetales.

Es necesario aclarar que no existe una fórmula única para nutrir los cultivos, la multiplicidad de factores que condicionan la absorción de nutrientes minerales, hace que la obtención de una fórmula ideal para cada especie o variedad en cada situación, sea algo no fácil de lograr y que se requieran ajustes a su formulación. [21]

5. SUELO SINTETICO

Composición de suelo sintético utilizado:

Composición Utilizada
Turba 10%
Caolinita 20%
Arena 70%
CaCO ₃ 0,5-1%

Tabla 2. Según ISO 11628-1: 1993

Para el presente bioensayo, se utilizó un sustrato artificial, con el fin de otorgarle una mayor representatividad respecto a las condiciones naturales de cultivo del organismo de prueba.

El manejo de la nutrición de los bulbos en el presente estudio, tiene como objetivo proporcionar los nutrientes esenciales en tiempo y forma teniendo en cuenta el período durante el cual se desarrolla el ensayo.

El suelo sintético utilizado brinda las condiciones acordes al tipo de cultivo, como son:

- suelo blando y ligero
- pH óptimo: se verificó que el pH de cada frasco de cultivo, fuera ligeramente ácido (pH óptimo para los bulbos 6,5 upH). (Figueroa, INTA, 1998) [7]

Respecto de los componentes del sustrato seleccionado, se destaca que:

- la *turba* proporciona la porción de materia orgánica dispensable para el desarrollo de los bulbos, procedente de los aportes de restos orgánicos de la descomposición de factores bióticos.
- La *caolinita* es un mineral que suele estar presente en las arcillas. La arcilla comprende toda la parte coloidal mineral del suelo, y representa la fracción más activa, tanto desde el punto de vista físico como del químico, participando en el intercambio iónico con el medio.
- La *arena* representa la parte inerte del suelo, por lo que tiene funciones mecánicas que constituyen el armazón interno sobre las cuales se apoyan las otras fracciones finas del suelo, facilitando la circulación del agua en el ensayo.

El sustrato seleccionado, también es utilizado para determinar el efecto de los contaminantes sobre lombrices de tierra (*Eisenia foetida*) y esta reglamentado por la norma ISO 11628-1: 1993.

6. METALES PESADOS

Los metales pesados seleccionados para las pruebas realizadas, fueron cadmio y cromo, en forma de sales de cloruro ($\text{CdCl}_2 \cdot 1\text{H}_2\text{O}$, $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$).

Dichos metales, fueron ensayados anteriormente, mediante el test de *Allium*, por lo que representan un material fundamental para la comparación y fundamentación de los objetivos del presente estudio.

7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

"La estadística es una técnica especial apta para el estudio cuantitativo de los fenómenos de masa o colectivo, cuya mediación requiere una masa de observaciones de otros fenómenos más simples llamados individuales o particulares". (Gini, 1953)

La estimación de la toxicidad de un ensayo de laboratorio está determinada por las especies y condiciones particulares bajo las cuales son llevados a cabo y pueden utilizarse para predecir el efecto nocivo de un tóxico.

Uno de los aspectos importantes en toxicología y ecotoxicología es la relación entre la concentración de un compuesto químico a la cual se expone un organismo y el efecto que le produce. Esta relación, conocida como la relación dosis-respuesta, constituye la base para la evaluación del peligro y el riesgo generado por las sustancias químicas en el medio ambiente. Existen muchas formas de determinar la toxicidad, y aunque los efectos bioquímicos, fisiológicos, reproductivos y de comportamiento son de gran utilidad, el indicador comúnmente más utilizado es la muerte del organismo de prueba. La mayoría de las pruebas de toxicidad suministran una estimación de la dosis (o concentración en el alimento, aire o agua) que produce una respuesta tóxica a un nivel del 50%. Por ejemplo, la dosis letal media es la dosis o concentración que mata al 50% de la población (CL_{50}).

En el presente estudio, el ensayo de toxicidad efectuado involucra un *agente* o *estímulo* (los metales pesados: cadmio y cromo), el cual se aplica a un organismo de prueba (bulbos comerciales de *Allium cepa*), sobre el que se evalúa una cierta *respuesta*. La magnitud del estímulo o *dosis* se midió como concentración.

Allium cepa posee varias características que han facilitado su uso en estudios de toxicología como son, su facilidad de manejo, disponibilidad, y cultivo. Estas características coinciden con algunas de las recomendaciones hechas en la selección de organismos para test de toxicidad.

7.1. Evaluación de toxicidad

Para la evaluación de la toxicidad del cadmio y cromo en *Allium cepa*, se utilizó el Benchmark Dose Software (BMDS) versión 1.3.2, programa recomendado por la USEPA, y el modelo estadístico seleccionado es el Probit. Dicho modelo cuenta con un 95% de nivel confiabilidad.

El objetivo del uso de este programa estadístico es la obtención de la curva de Fracción afectada/dosis, y la dosis letal media (CL_{50}) expresada a partir de la BMD (Benchmark Dose).

7.2. Análisis de varianza

El análisis de varianza (ANOVA), se utilizó para comparar si los valores correspondientes de un conjunto de datos numéricos (concentraciones utilizadas en ambos metales) son significativamente distintos a los valores de otro conjunto (testigo de siembra).

El procedimiento para comparar estos valores esta basado en la varianza global observada en los grupos de datos numéricos a comparar.

El análisis se utilizó para asociar una probabilidad a la conclusión de que la media de los valores obtenidos por tratamiento, es distinta de la media del testigo realizado.



RESULTADOS

RESULTADOS

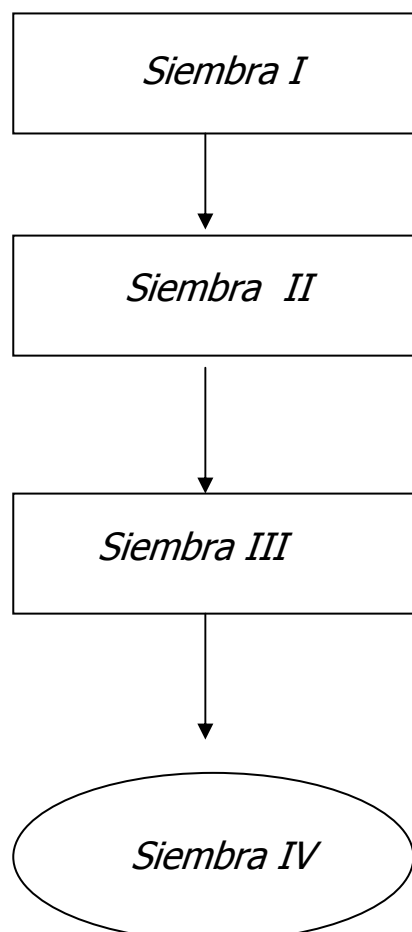
1. ESTANDARIZACION DEL BIOENSAYO

En una etapa previa a la siembra final (Siembra IV), se observó, el comportamiento del organismo de prueba frente a las condiciones de ensayo, con el objeto de determinar la formulación adecuada para repetir en la batería de ensayos posteriores.

Los factores a determinar fueron:

- proporciones de la solución nutritiva y suelo sintético a utilizar (SN/SS);
- respuesta en el crecimiento de las raíces sembradas con solución nutritiva de Hogland y Arnon;
- condiciones óptimas de siembra;
- características adecuadas del bulbo para el cultivo (diámetro, calidad);

A continuación se resumen los pasos efectuados hasta la siembra final (Siembra N°IV):



1.1 SIEMBRA I

Características de Siembra:

Día de Siembra Miércoles 18 de Mayo de 2006 (17 hs.)

Día de Cosecha Viernes 20 de Mayo de 2006 (17 hs.)

Lugar de Siembra Laboratorio de Microbiología de la Universidad de Flores (Uflo)

Temperatura Promedio Laboratorio de Microbiología: 15 °C
Estufa de Cultivo: 25 °C

Controles Realizados

Experiencia n°1: 50% SS; 50% SN

Experiencia n°2: 75% SS; 25 % SN

Experiencia n°3: 25% SS; 75% SN

Experiencia n°4: 100% SN

Control Siembra I: 100% Agua Destilada

Experiencia n°6: 75% SS; 25 % SN (en estufa de cultivo)

Diámetro de bulbos utilizados 6 cm. (promedio)

Cantidad de bulbos utilizados 12 bulbos (6 controles por duplicado)

Resultados:

El siguiente cuadro expresa la relación SS/SN utilizada en cada experiencia, y las longitudes promedio de las raíces sembradas.

Siembra I	Relación SS/SN	Bulbo N°	Masa de SN Utilizada (g)	Volumen de SN Utilizada (ml)	Número de Raíces	Long. Promedio (cm.)
Exp. n°1	50/50	1	82	150	22	2
		2			20	
Exp. n°2	75/25	1	130	110	24	1,2
		2			8	
Exp. n°3	25/75	1	40	175	26	1,5
		2			27	
Exp. n°4	0/100	1	0	100	15	1
		2			10	
Exp. n°5	100% Agua Destilada	1	0	0	20	1,6
		2			25	
Exp. n°6	75/25	1	130	110	6	0,2
		2			0 ^(*)	

(*) El bulbo presentaba su platillo deteriorado por lo que no se considerará el mismo en las conclusiones.

Tabla 3. Datos macroscópicos Siembra I

- La temperatura es un factor a considerar, se observa un escaso crecimiento radicular, por lo que se propone realizar un nuevo control bajo temperaturas de siembra cercanas a la temperatura óptima de crecimiento de los bulbos (25°C), (no se considerará el cultivo realizado bajo estufa de cultivo, experiencia n°6, por no ser representativo debido al escaso crecimiento observado, y la falta de solución en el frasco de siembra).
- La relación más apropiada, según se pudo apreciar es la efectuada en la experiencia n°3 (mejor promedio en longitud en raíces).
Considerando que el bulbo obtiene para su crecimiento el O₂ disuelto de la Solución Nutritiva, la relación SS/SN 25:75 sería la más adecuada para repetir en la batería de ensayos de la siembra final.
- Se observa que la experiencia n°4 (100% SN), no presenta un crecimiento considerable respecto de la experiencia n°3 (25% SS / 75% SN), por lo que se repetirá la siembra diluyendo la solución nutritiva en una proporción 1:5 (se presume que los bulbos requieren una concentración menor de sales presente en la misma).
- El diámetro de los bulbos debe ser menor a 6cm, de modo que permita un apropiado intercambio de O₂ con el medio. En base a este criterio, se observa que los bulbos

elegidos para este control no permitían dicho intercambio con la boca del frasco de cultivo;

1.2 SIEMBRA II

Características de siembra:

Día de Siembra Martes 6 de Junio de 2006 (16 hs.)

Día de Cosecha Viernes 8 de Junio de 2006 (16 hs.)

Lugar de Siembra Laboratorio de Física de la Universidad de Flores

Temperatura Promedio Temperatura Promedio: 25 °C

Controles Realizados

Experiencia n°1: 50% SS; 50% SN 1/5

Experiencia n°2: 75% SS; 25 % SN 1/5

Experiencia n°3: 25% SS; 75% SN 1/5

Experiencia n°4: 100% SN 1/5

Experiencia n°5: 100% Agua Destilada

Diámetro de bulbos utilizados 6 cm. (promedio)

Cantidad de bulbos utilizados 12 bulbos (6 controles por duplicado)

Resultados:

El siguiente cuadro expresa la relación SS/SN utilizada en cada experiencia, como las longitudes promedio de las raíces sembradas;

Siembra II	Relación SS/SN (1/5)	BULBO N°	Masa de SS Utilizada (g)	Masa de SN Utilizada (ml)	Número de Raíces	Longitud Promedio (mm.)	Observación Microscópica
Exp n°1	50/50	1	82	150	22	7	No
		2			SC (*)(**)		
Exp n°2	75/25	1	130	110	8	12	No
		2			50		
Exp n°3	25/75	1	40	175	6	18	Si
		2			46		
Exp n°4	0/100	1	0	100	48	15	Si
		2			24		
Exp n°5	100 Agua Destilada	1	0	0	35	10	No
		2			37		
		2			32		

(*) el bulbo presentaba su platillo deteriorado

(**) sin Crecimiento del bulbo

Tabla 4. Datos macroscópicos Siembra II

- La temperatura es un factor importante en el crecimiento de los bulbos y la que se utilizó en esta siembra es adecuada para la reproducibilidad del bioensayo, debido a que se observó en general un mejor crecimiento de las raíces, tanto en cantidad como en longitud de las mismas.
- La relación SS/SN perteneciente a la experiencia n°3 nuevamente demuestra ser la idónea para la realización del test, tanto por sus características macroscópicas como microscópicas (ambas características analizadas para dar conclusiones avaladas en los resultados obtenidos para la reproducción de la metodología).
- La dilución (1/5) de la solución nutritiva resultó más favorable para crecimiento de las raíces de los bulbos, como puede observarse en los datos referidos a cantidad y calidad de raíces obtenidas.
- Se destaca que los bulbos elegidos permitían un buen intercambio de oxígeno con su entorno por su morfología.

Características Microscópicas:

Las raíces fijadas e hidrolizadas fueron las correspondientes a las experiencias n°3, 4 y 6, por ser consideradas indicadores importantes, para la siembra final, respecto del estado de los bulbos a nivel cromosómico.

En primer lugar, se destaca que no se observaron mutaciones cromosómicas en ninguna de las mitosis observadas.

Fueron contabilizadas por raíz, y en promedio, se obtuvieron los siguientes datos:

Experiencia n°3: 52 mitosis por raíz fijada e hidrolizada;

Experiencia n°4: 50 mitosis por raíz fijada e hidrolizada;

Experiencia n°6: 32 mitosis por raíz fijada e hidrolizada;

Por lo tanto se destaca, que en la experiencia n°3 se detectó el mayor número de mitosis, respaldando la conclusión de tomar la proporción utilizada (25% SS/ 75% SN) como la representativa para la batería de ensayos a realizar.

1.3 SIEMBRA III

Se realizó la siembra de 60 bulbos, en base a los controles realizados que definieron el presente diseño experimental del siguiente modo:

- la relación SS/SN, fue de 25% y 75% respectivamente;
- la solución nutritiva se utilizó en proporción 1/5;
- fueron sembrados 60 bulbos durante 48 hs., a temperatura promedio de 25°C.
- Cada concentración fue sembrada por triplicado, y las concentraciones consideradas fueron:

Cromo	1.10^{-2} M, 1.10^{-3} M, 3.10^{-4} M, 3.10^{-5} M, 1.10^{-5} M, 3.10^{-6} M, 1.10^{-6} M
Cadmio	1.10^{-2} M, 3.10^{-3} M, 1.10^{-3} M, 3.10^{-4} M, 1.10^{-4} M, 3.10^{-5} M, 1.10^{-5} M, 3.10^{-6} M

Tabla 5. Concentraciones de cadmio y cromo utilizadas

Resultados:

Cuando se cosecharon, las características macroscópicas no presentaban un comportamiento estandarizado en anteriores estudios [23] [10], los bulbos sembrados como Control + (en este caso fue igual para ambos Cd y Cr) presentaban abundantes y largas raíces, oponiéndose a los resultados obtenidos anteriormente.

El Control - (SN 1/5) no exponía las características observadas en la siembra control III (longitud, número de raíces).

Fue definitiva la decisión al analizar las cebollas microscópicamente, sus células no se diferenciaban, lo cual confirma la hipótesis de que los bulbos no eran de buena calidad. No

obstante también se considerara una nueva dilución para la solución nutritiva debido a los resultados obtenidos en la presente siembra.

Como se observa a continuación, los bulbos sembrados tanto con soluciones de cromo y cadmio, demostraron un comportamiento no esperado por resultados expuestos en anteriores trabajos realizados con el Test de Allium para dichos metales. Ambos metales para el test, presentan curvas de concentración en función de la longitud promedio de raíces, de tipo tendencias logarítmicas y, por lo que se puede observar en los gráficos expuestos a continuación, no se observa dicho comportamiento.

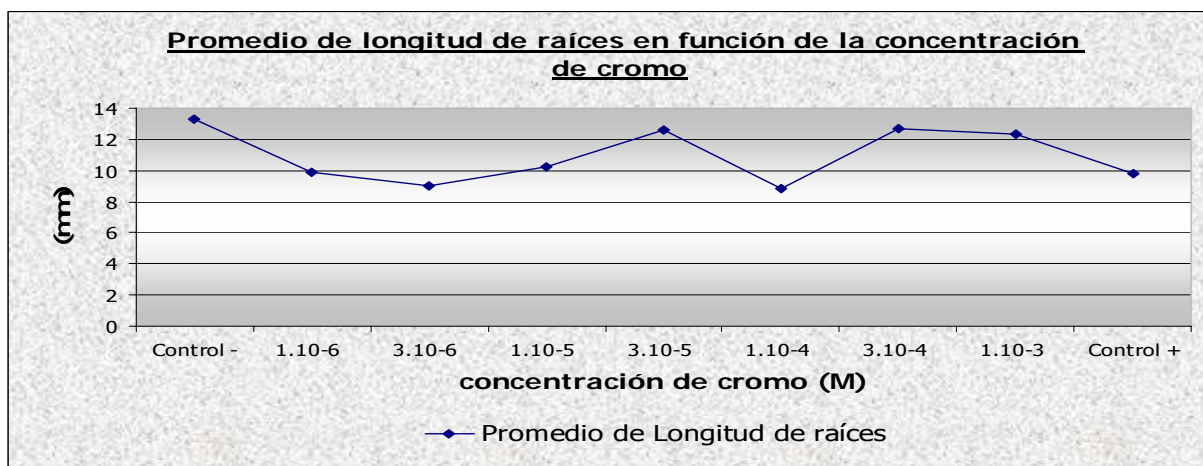


Figura 1. Promedio de longitud de raíces en función de la concentración de cromo

Para el $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ se observaron las siguientes características:

Cromo				
Concentración	Promedio de longitud de las raíces (mm.)	Promedio de Raíces por Bulbo	Color de las Raíces	Dureza de las Raíces
1,10-3 M	12,3	20,3	raíces oscuras	Muy duras
3.10-4 M	12,7	33,3	raíces blancas, punta oscura	Duras
1.10-4 M	8,8	20	raíces blancas, puntas oscuras	Duras
3.10-5 M	12,6	31,3	raíces blancas, puntas amarillas	Duras
1.10-5 M	10,26	19,7	raíces blancas, puntas claras	Normal
3.10-6 M	9,03	16,7	raíces blancas, puntas oscuras	Normal
1,10-6 M	9,93	15,3	raíces blancas, puntas amarillas	Normal
Control – SN 1:5	13,26	32,7	raíces blancas, puntas claras	Normal
Control + 1.10-2 M	9,8	24,3	raíces oscuras, puntas oscuras	Duras

Tabla 6. Datos macroscópicos siembra III para el cromo

Para el cadmio los resultados obtenidos fueron:

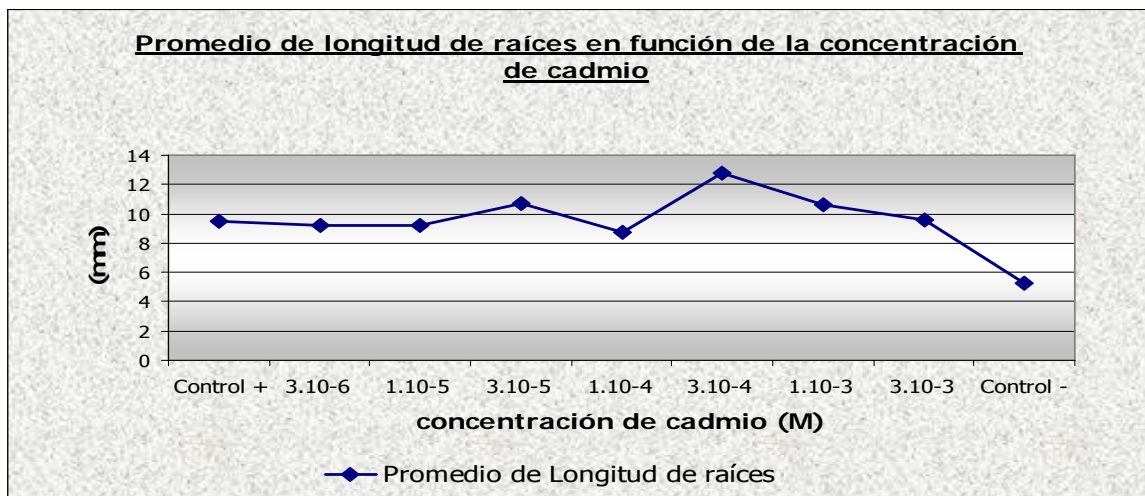


Figura 2. Promedio de longitud de raíces en función de la concentración de cadmio

Para el CdCl₂.1H₂O se observaron los siguientes datos:

Cadmio				
Concentración	Promedio de longitud de las raíces (mm.)	Promedio de Raíces por Bulbo	Color de las Raíces	Dureza de las Raíces
3.10 ⁻³ M	5,23	24	raíces amarillas, puntas oscuras	Muy duras
1.10 ⁻³ M	9,6	43	raíces blancas, puntas oscuras	Muy duras
3.10 ⁻⁴ M	10,6	20	raíces blancas, puntas oscuras	Duras
1.10 ⁻⁴ M	12,8	31,3	raíces blancas, puntas oscuras	Duras
3.10 ⁻⁵ M	8,7	20,5	raíces blancas, puntas amarillas	Duras
1.10 ⁻⁵ M	10,7	10,5	raíces blancas	Normal
3.10 ⁻⁶ M	9,2	36,7	raíces blancas, puntas claras	Normal
Control – SN 1:5	9,2	23,3	raíces blancas, puntas claras	Normal
Control + 1.10 ⁻² M	9,53	13,5	raíces oscuras, puntas oscuras	Muy duras

Tabla 7. Datos macroscópicos Siembra III para el cadmio

Por lo expuesto se consideró:

- Realizar una nueva siembra empleando una mayor dilución para la solución nutritiva Hogland y Arnon (1:10)
- La siembra de 6 (seis) testigos, con agua corriente con el objetivo de evaluar el comportamiento de los bulbos frente a las condiciones de siembra experimentales
- La utilización de bulbos comerciales de diferente partida

1.4 SIEMBRA IV

Considerando los resultados anteriores se procedió a una nueva siembra, utilizando las mismas concentraciones de los metales a analizar, en un medio diluido en relación 1:10, bajo las mismas condiciones de siembra.

Resultados:

Los resultados obtenidos de la Siembra N°IV macro y microscópicamente, demostraron un comportamiento acorde a los estudios mencionados.

Los mismos serán considerados para la obtención de conclusiones del presente estudio.

A continuación se exponen los datos obtenidos por bulbo y en promedio de los ensayos realizados:

Metal Pesado: **CADMIO**

CdCl₂·1H₂O (3·10⁻³ M)						
Bulbo Nº	Longitud de las raíces (mm.)	Cantidad de raíces por bulbo	Color de las Raíces	Dureza de las Raíces	% MN	% MA
1	12	56	Raíces amarillas, puntas oscuras	Muy duras	62	38
2	1	28				
3	9	60				
CdCl₂·1H₂O (1·10⁻³ M)						
Bulbo Nº	Longitud de las raíces (mm.)	Cantidad de raíces por bulbo	Color de las Raíces	Dureza de las Raíces	% MN	% MA
1	10	54	Raíces blancas, puntas amarillas	Muy duras	71,1	28,9
2	13	62				
3	13	64				
CdCl₂·1H₂O (3·10⁻⁴ M)						
Bulbo Nº	Promedio Longitud de las raíces (mm.)	Cantidad de raíces por bulbo	Color de las Raíces	Dureza de las Raíces	% MN	% MA
1	15	60	Raíces blancas, puntas amarillas	Duras	76,2	23,8
2	15	78				
3	15	53				
CdCl₂·1H₂O (1·10⁻⁴ M)						
Bulbo Nº	Promedio Longitud de las raíces (mm.)	Cantidad de raíces por bulbo	Color de las Raíces	Dureza de las Raíces	% MN	% MA
1	15	46	Raíces blancas, puntas oscuras	Duras	79,4	20,6
2	17	28				
3	16	20				

Tabla 8. Datos macroscópicos y microscópicos de siembra, metal cadmio.

CdCl₂.1H₂O (3.10⁻⁵ M)						
Bulbo N°	Promedio Longitud de las raíces (mm.)	Cantidad de raíces por bulbo	Color de las Raíces	Dureza de las Raíces	% MN	% MA
1	16	38	Raíces blancas, puntas oscuras	duras	81,7	18,3
2	16	52				
3	16	15				

CdCl₂.1H₂O (1.10⁻⁵ M)						
Bulbo N°	Promedio Longitud de las raíces (mm.)	Cantidad de raíces por bulbo	Color de las Raíces	Dureza de las Raíces	% MN	% MA
1	21	74	Raíces blancas, puntas claras	Normal	84,5	15,5
2	19	62				
3	13	44				

CdCl₂.1H₂O (3.10⁻⁶ M)						
Bulbo N°	Promedio Longitud de las raíces (mm.)	Cantidad de raíces por bulbo	Color de las Raíces	Dureza de las Raíces	% MN	% MA
1	18	56	Raíces blancas, puntas claras	Normal	89,9	10,1
2	18	70				
3	19	30				

CdCl₂.1H₂O (1.10⁻² M)						
Bulbo N°	Promedio Longitud de las raíces (mm.)	Cantidad de raíces por bulbo	Color de las Raíces	Dureza de las Raíces	% MN	% MA
1	5	54	Raíces oscuras, puntas oscuras	Muy Duras	33,3	66,7
2	5	64				
3	9	78				

Tabla 9. Datos macroscópicos y microscópicos de siembra, metal cadmio (continuación).

Metal Pesado: **CROMO**

CrCl₃.6H₂O (1.10⁻³ M)						
Bulbo N°	Promedio Longitud de las raíces (mm.)	Cantidad de raíces por bulbo	Color de las Raíces	Dureza de las Raíces	% MN	% MA
1	8	65	Raíces Oscuras	Muy Duras	37,7	62,3
2	5	14				
3	4	3				
CrCl₃.6H₂O (3.10⁻⁴ M)						
Bulbo N°	Promedio Longitud de las raíces (mm.)	Cantidad de raíces por bulbo	Color de las Raíces	Dureza de las Raíces	% MN	% MA
1	20	62	Raíces blancas, puntas oscuras	Duras	63,1	36,8
2	17	60				
3	8	14				
CrCl₃.6H₂O (1.10⁻⁴ M)						
Bulbo N°	Promedio Longitud de las raíces (mm.)	Cantidad de raíces por bulbo	Color de las Raíces	Dureza de las Raíces	% MN	% MA
1	0	0	Raíces blancas, puntas oscuras	Duras	76	24
2	10	26				
3	23	62				
CrCl₃.6H₂O (3.10⁻⁵ M)						
Bulbo N°	Promedio Longitud de las raíces (mm.)	Cantidad de raíces por bulbo	Color de las Raíces	Dureza de las Raíces	% MN	% MA
1	20	45	Raíces blancas, puntas amarillas	Duras	76,9	23,1
2	16	53				
3	16	58				

Tabla 10. Datos macroscópicos y microscópicos de siembra, metal cromo.

CrCl₃.6H₂O (1.10⁻⁵ M)						
Bulbo N°	Promedio Longitud de las raíces (mm.)	Cantidad de raíces por bulbo	Color de las Raíces	Dureza de las Raíces	% MN	% MA
1	23	64	Raíces blancas, puntas claras	Normal	78	22
2	19	40				
3	17	56				
CrCl₃.6H₂O (3.10⁻⁶ M)						
Bulbo N°	Promedio Longitud de las raíces (mm.)	Cantidad de raíces por bulbo	Color de las Raíces	Dureza de las Raíces	% MN	% MA
1	21	32	Raíces blancas, puntas amarillas	Normal	78,3	22
2	22	96				
3	22	54				
CrCl₃.6H₂O (1.10⁻⁶ M)						
Bulbo N°	Promedio Longitud de las raíces (mm.)	Cantidad de raíces por bulbo	Color de las Raíces	Dureza de las Raíces	% MN	% MA
1	21	30	Raíces blancas, puntas amarillas	Normal	80,2	19,8
2	22	54				
3	23	45				
CrCl₃.6H₂O (1.10⁻² M)						
Bulbo N°	Promedio Longitud de las raíces (mm.)	Cantidad de raíces por bulbo	Color de las Raíces	Dureza de las Raíces	% MN	% MA
1	0	0	Raíces oscuras, puntas oscuras	Duras	0	0
2	2	1				
3	2,5	52				

Tabla 11. Datos macroscópicos y microscópicos de siembra, metal cromo (continuación).

CONTROL – (Solución Nutritiva y Suelo Sintético)

CONTROL - (Sc. Nutritiva 1:10 y Suelo Sintético)						
Bulbo Nº	Promedio Longitud de las raíces (mm.)	Cantidad de raíces por bulbo	Color de las Raíces	Dureza de las Raíces	% MN	% MA
1	19	42	Raíces blancas, puntas claras	Normal	95,4	4,6
2	18	60				
3	18	72				
4	20	50				
5	22	44				
6	16	37				

Tabla 12. Datos macroscópicos y microscópicos, siembra control -

TESTIGO (Agua Corriente)

Testigo (Agua Corriente)						
Bulbo Nº	Promedio Longitud de las raíces (mm.)	Cantidad de raíces por bulbo	Color de las Raíces	Dureza de las Raíces	% MN	% MA
1	16	26	Raíces blancas, puntas claras	Normal	99	1
2	19	62				
3	23	34				
4	21	50				
5	21	38				
6	20	36				

Tabla 13. Datos macroscópicos y microscópicos, siembra testigo

2. SIEMBRA FINAL CADMIO

CdCl ₂ .1H ₂ O													
Concentración	Prom. de longitud de las raíces (mm.)	Cantidad de raíces por bulbo	Promedio de Raíces por Bulbo	Color de las Raíces	Dureza de las Raíces	Nº de Células en Mitosis	% MN	% MA	% C-M	% CE	% P	% M	% CS
3.10-3 M	10,3	56 / 28 / 60	48	raíces amarillas, puntas oscuras	Muy duras	86,0	62,0	38,0	6,6	29,8	1,6	0,0	0,0
1.10-3 M	12	54 / 62 / 64	60	raíces blancas, puntas amarillas	Muy duras	126,7	71,1	28,9	2,8	22,2	3,4	0,0	0,6
3.10-4 M	15	60 / 78 / 53	64	raíces blancas, puntas amarillas	Duras	211,3	76,2	23,8	2,9	18,9	1,6	0,0	2,8
1.10-4 M	16	46 / 28 / 20	31,3	raíces blancas, puntas oscuras	Duras	100,3	79,4	20,6	6,3	13,7	0,3	0,0	0,3
3.10-5 M	16	38 / 52 / 15	35	raíces blancas, puntas oscuras	Duras	166,0	81,7	18,3	4,3	12,0	1,1	0,0	1,0
1.10-5 M	17,3	74 / 62 / 44	60	raíces blancas, puntas claras	Normal	160,0	84,5	15,5	5,1	10,1	0,2	0,0	0,2
3.10-6 M	18,3	56 / 70 / 30	47	raíces blancas, puntas claras	Normal	158,3	89,9	10,1	2,1	6,4	1,0	0,0	0,2
Control -	18,3	42 / 60 / 72	58	raíces blancas, puntas claras	Normal	117,3	95,4	4,6	2,2	0,7	1,1	0,0	0,5
Control +	6,3	54 / 64 / 78	65	raíces oscuras, puntas oscuras	Muy duras	1,0	0,0	66,7	16,7	50,0	0,0	0,0	0,0

Nota: MN: Mitosis Normales; MA: Mitosis Anormales; %C-M: % C-Mitosis; %CE: % Cromosomas Errantes; %P: % Puentes; %M: % Micronúcleos; %CS: % Cromosomas Sticky

Tabla 14. Datos macroscópicos y microscópicos completos, cadmio.

3. SIEMBRA FINAL CROMO

CrCl3.6H2O													
Concentración	Promedio de longitud de las raíces (mm.)	Cantidad de raíces por bulbo	Promedio de raíces por bulbo	Color de las Raíces	Dureza de las Raíces	N° de Células en Mitosis	% MN	% MA	% C-M	% CE	% P	% M	% CS
1.10-3 M	5,6	65 / 14 / 3	27,3	raíces oscuras	Muy duras	47,7	37,7	62,3	11,2	51,1	0,0	0,0	0,0
3.10-4 M	15	62 / 60 / 14	45,3	raíces blancas, punta oscura	Duras	170,7	63,1	36,8	1,9	35,0	0,0	0,0	0,0
1.10-4 M	16,5	26 / 62	44	raíces blancas, puntas oscuras	Duras	109,7	76,0	24,0	1,7	21,3	1,1	0,0	0,0
3.10-5 M	17,3	45 / 53 / 58	52	raíces blancas, puntas amarillas	Duras	140,0	76,9	23,1	1,6	21,4	0,2	0,0	0,0
1.10-5 M	19,6	64 / 40 / 56	53,3	raíces blancas, puntas claras	Normal	222,0	78,0	22,0	1,4	22,7	0,0	0,0	0,0
3.10-6 M	21,6	32 / 96 / 54	60,7	raíces blancas, puntas amarillas	Normal	266,3	78,3	21,7	1,3	26,9	0,0	0,0	0,0
1.10-6 M	22	30 / 54 / 45	43	raíces blancas, puntas amarillas	Normal	131,0	80,2	19,8	1,9	17,5	0,4	0,0	0,0
Control -	19,3	50 / 44 / 37	19	raíces blancas, puntas claras	Normal	117,3	95,4	4,6	2,2	0,7	1,1	0,0	0,5
Control +	2,3	0 / 0 / 52	52	raíces oscuras, puntas oscuras	Duras	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Nota: MN: Mitosis Normales; MA: Mitosis Anormales; %C-M: % C-Mitosis; %CE: %Cromosomas Errantes; %P: % puentes; %M: % Micronúcleos; %CS: % Cromosomas Sticky

Tabla 15. Datos macroscópicos y microscópicos completos, cromo

4. Gráficos cadmio y cromo

4.1 Longitud de raíces

CADMIO

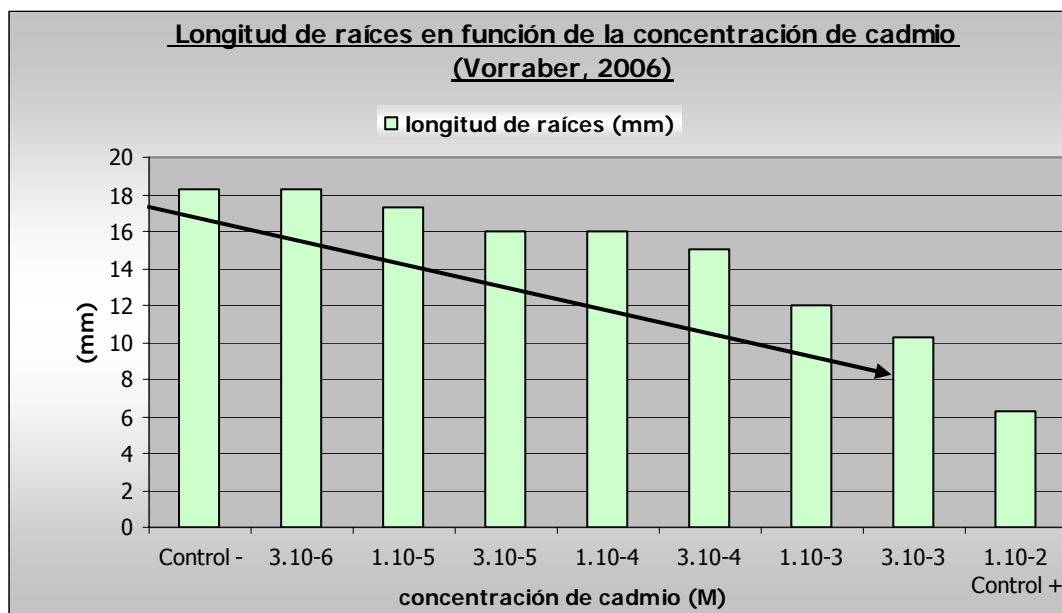


Figura 3. Longitud de raíces (mm) en función de la concentración de cadmio (M); (Vorraber, 2006)

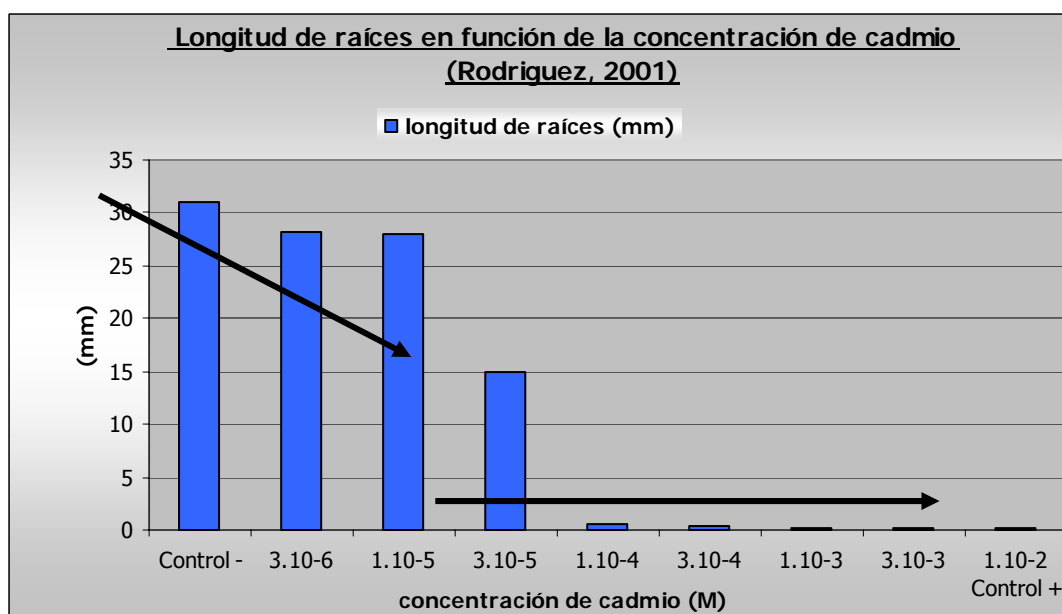


Figura 4. Longitud de raíces (mm) en función de la concentración de cadmio (M); (Rodríguez, 2006)

CROMO

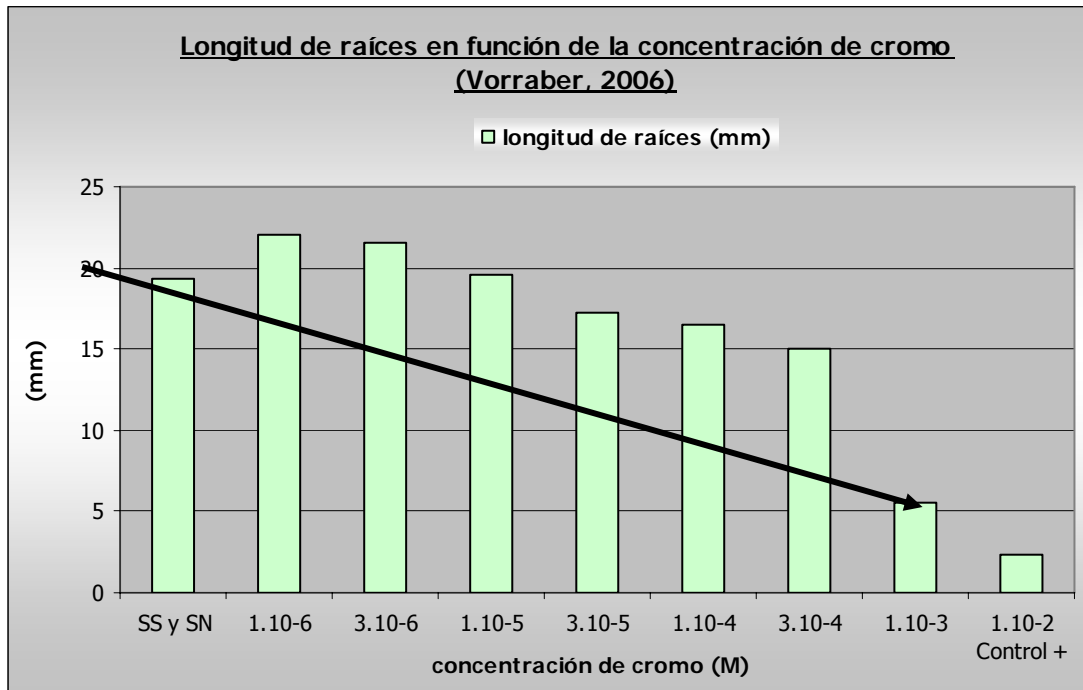


Figura 5. Longitud de raíces (mm) en función de la concentración de cromo (M); (Vorraber, 2006)

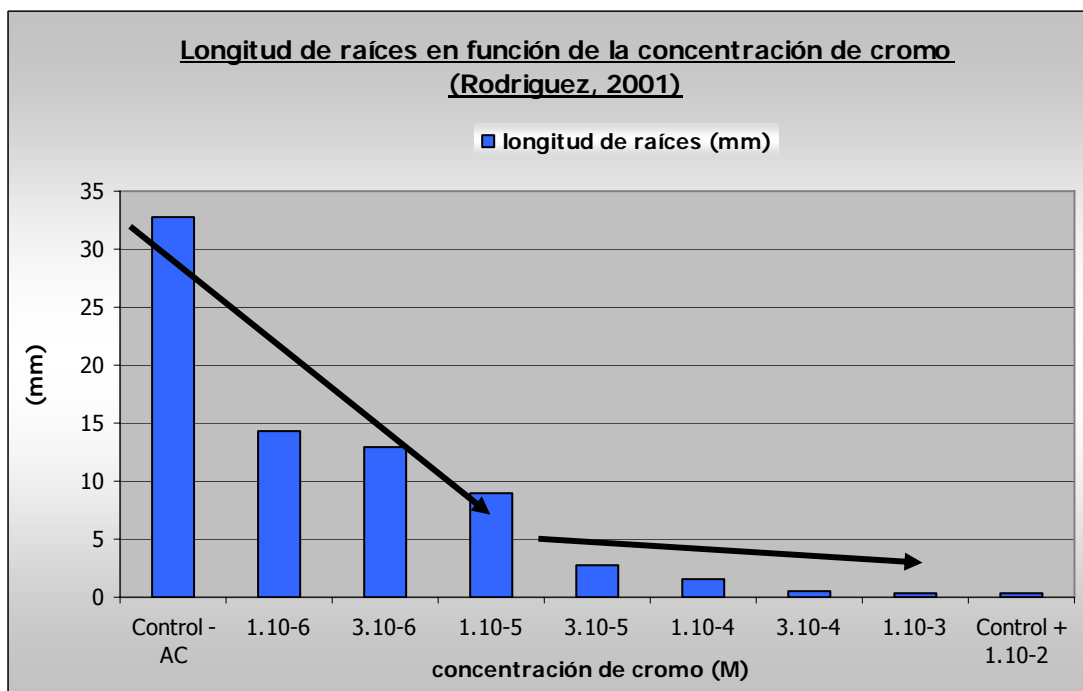


Figura 6. Longitud de raíces (mm) en función de la concentración de cromo (M); (Rodríguez, 2006)

4.2 Número de raíces

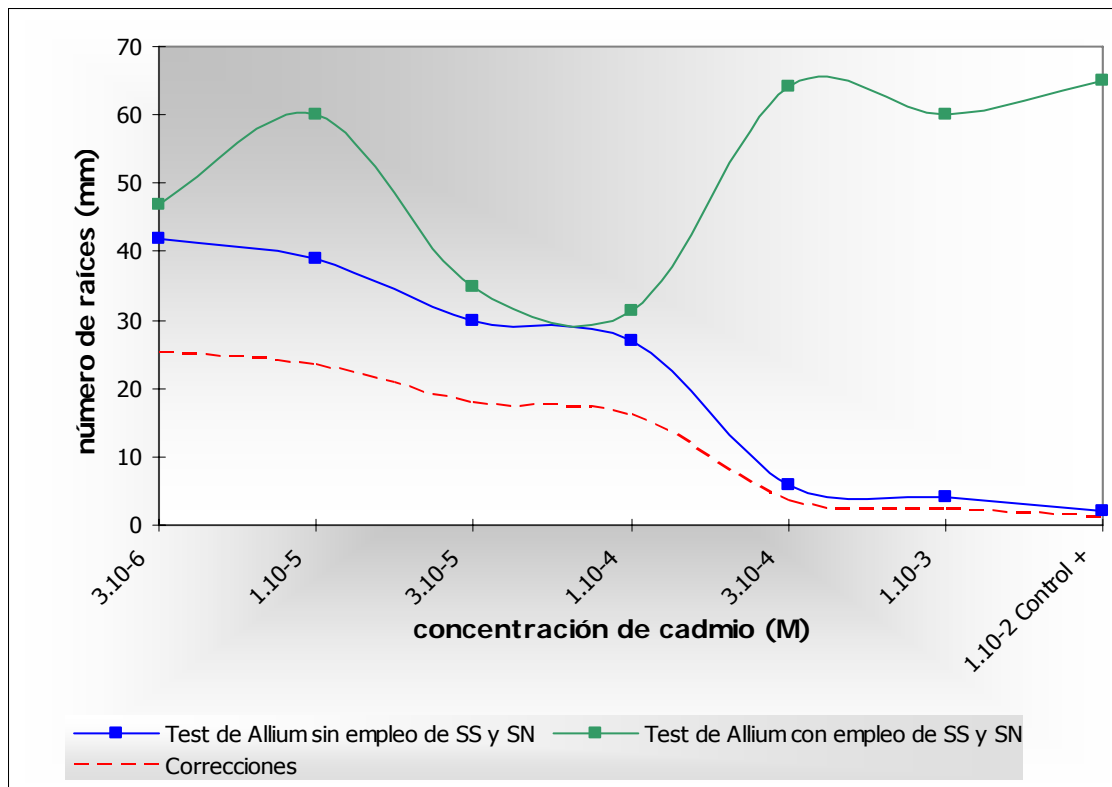


Figura 7. Número de raíces en función de la concentración de cadmio;

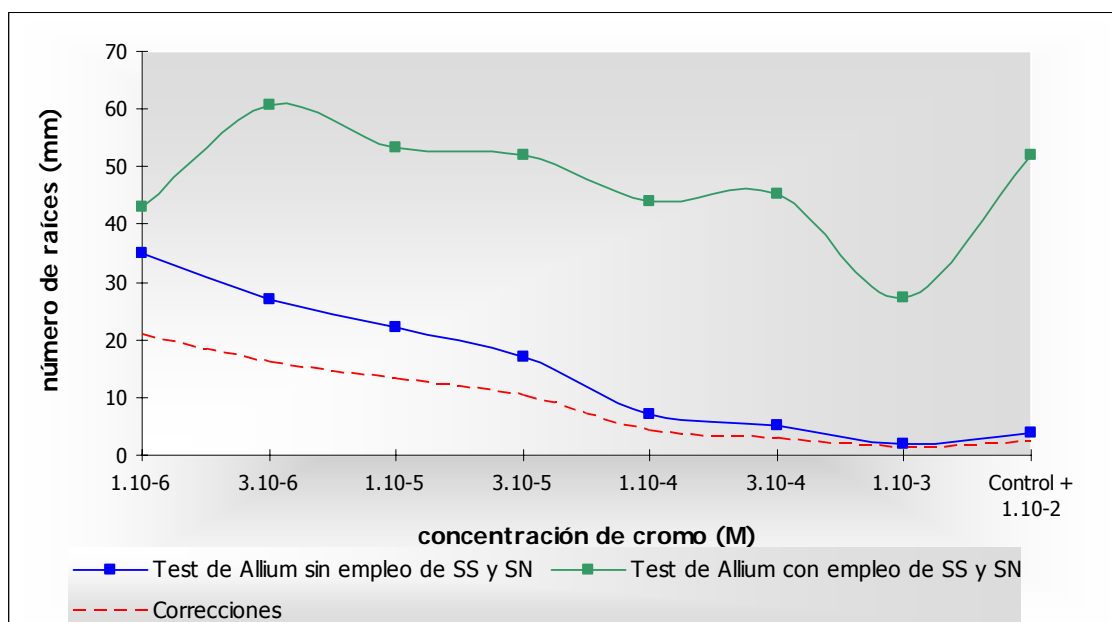


Figura 8. Número de raíces en función de la concentración de cromo.

NOTA: cabe destacar, que para ambos gráficos, el test sin empleo de suelo sintético y solución nutritiva corresponde al trabajo realizado por Rodríguez (Navntoft, Castro, Handel, 2001) [23] y el test con empleo de suelo sintético y solución nutritiva corresponde al presente estudio.

4.3 Porcentaje de Mitosis Anormales:

CROMO

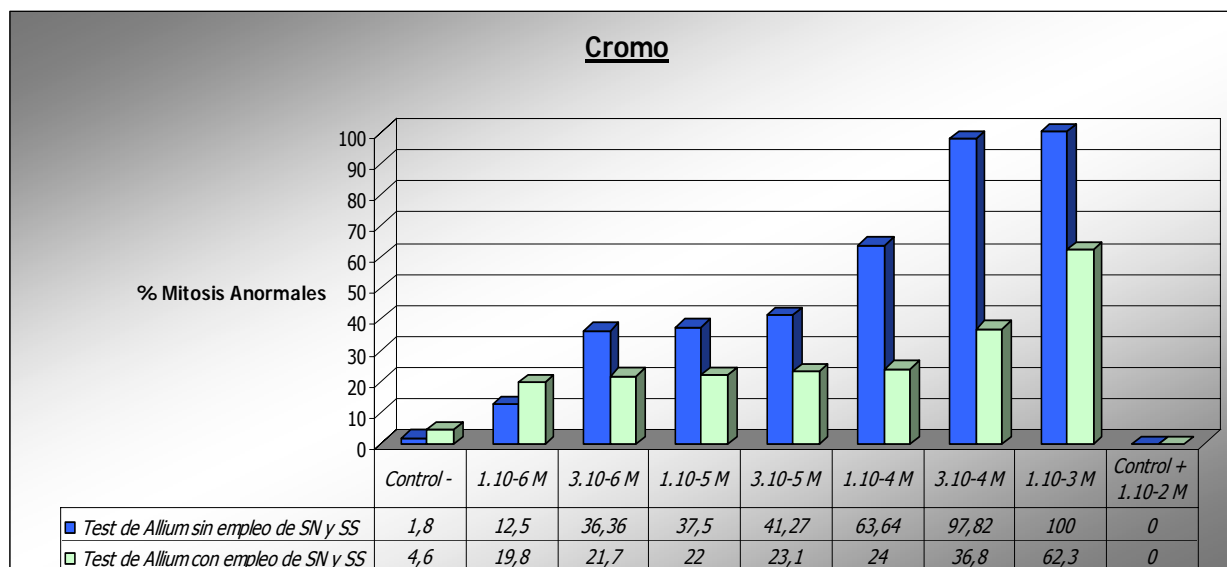


Figura 9. Porcentaje de mitosis anormales en función de la concentración de cromo para estudios en comparación.

CADMIO

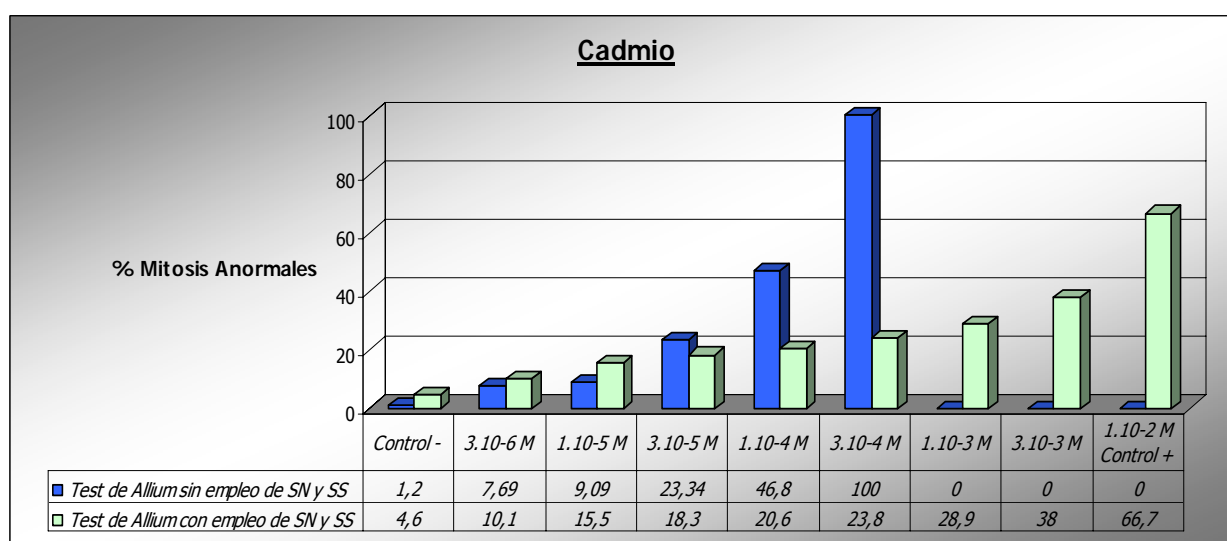


Figura 10. Porcentaje de mitosis anormales en función de la concentración de cadmio para estudios en comparación.

4.4 Efecto Genotóxico

CADMIO

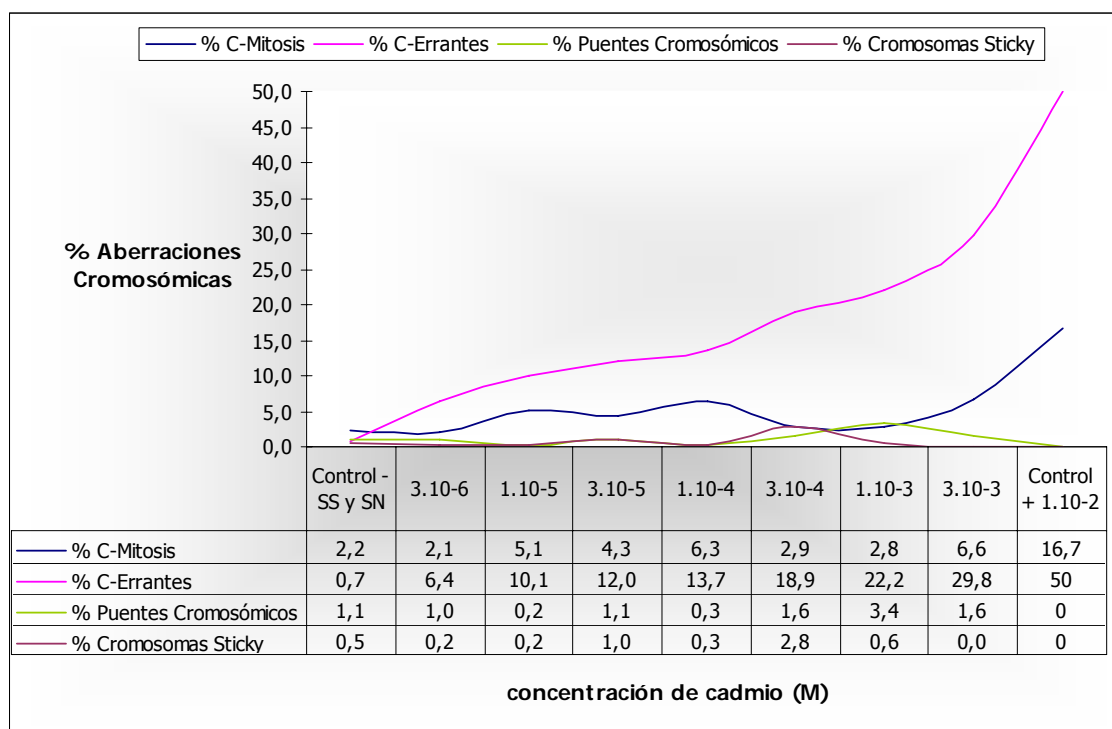


Figura 11. Porcentaje de aberraciones cromosómicas observadas en función de la concentración de cadmio, para el presente estudio.

CROMO

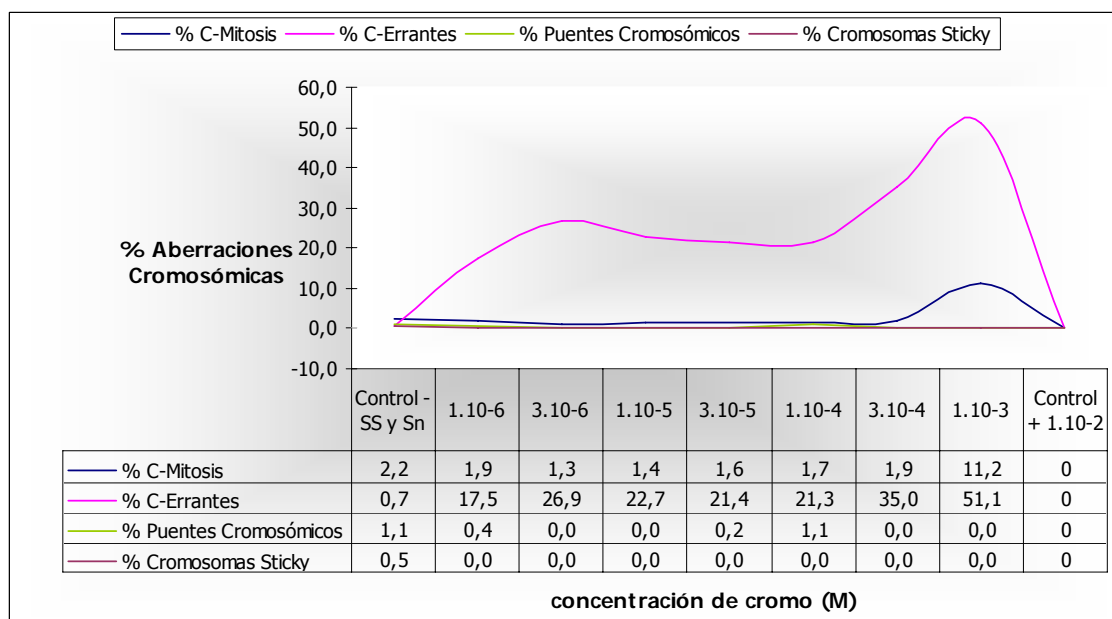


Figura 12. Porcentaje de aberraciones cromosómicas observadas en función de la concentración de cromo, para el presente estudio.

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos a partir del programa estadístico Benchmark Dose Software (BMDS) versión 1.3.2 y el modelo estadístico Probit son:

5.1. Metal Pesado: Cadmio

Dose	Est._Prob.	Expected	Observed	Scaled Size	Residual
3.0000	0.4444	114.655	98	258	-2.087
1.0000	0.2175	82.659	110	380	3.4
0.3000	0.1575	99.844	151	634	5.578
0.1000	0.1426	42.908	62	301	3.148
0.0300	0.1376	68.504	91	498	2.927
0.0100	0.1362	65.354	74	480	1.151
0.0030	0.1357	64.441	48	475	-2.203
0.0000	0.1355	95.631	1	706	-10.41

Chi-square = 179.99 DF = 6 P-value = 0.0000

Benchmark Dose Computation

Specified effect = 0.5

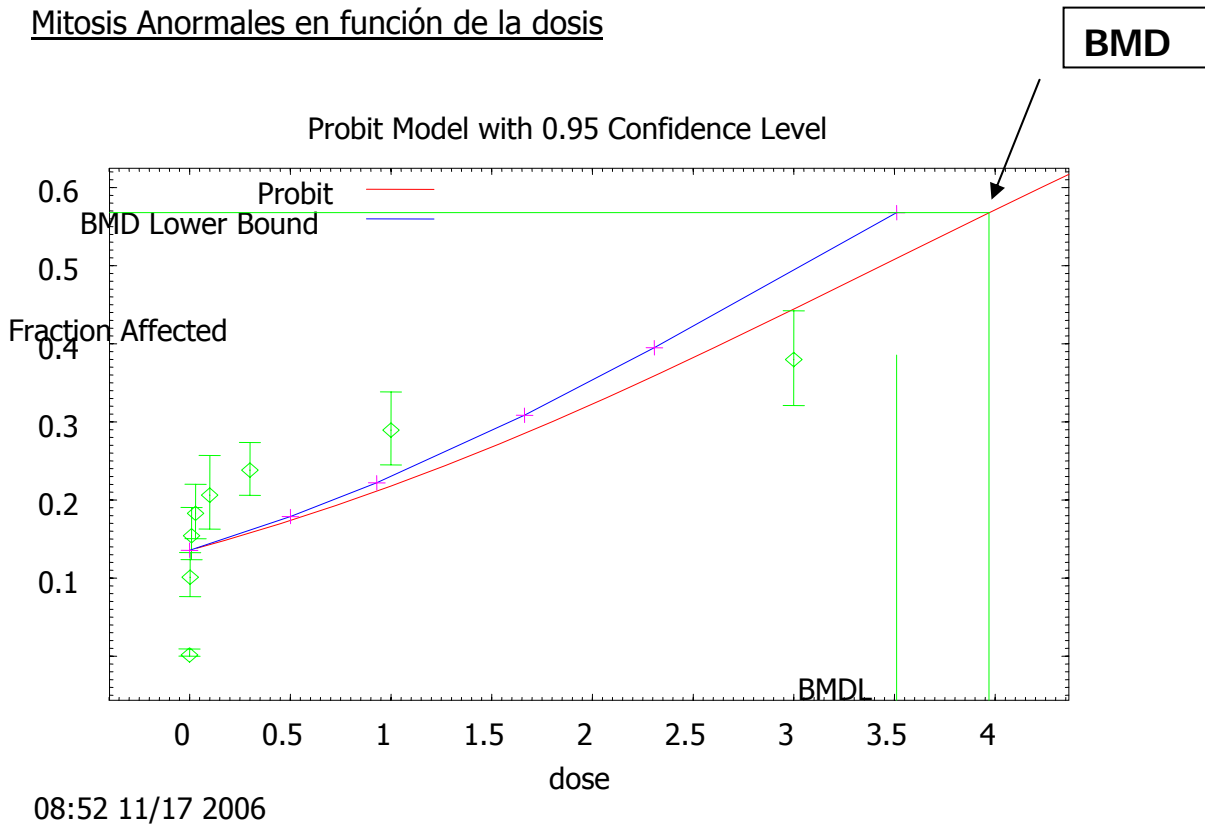
Risk Type = Extra risk

Confidence level = 0.95

BMD = 3.96888

BMDL = 3.51065

- Mitosis Anormales en función de la dosis



CL50 = 3.97 ± 0.46

$\chi^2 = 179.99$ $DF = 6$ $P = 0.0000$
 Nivel de confianza = 0.95

5.2. Metal Pesado: Cromo

Dose	Est._Prob.	Expected	Observed	Size	Scaled Residual
1.0000	0.4301	61.640	62	143	0.1114
0.3000	0.0847	43.379	37	512	-1.033
0.1000	0.0431	14.171	24	329	2.669
0.0300	0.0332	13.941	23	420	2.484
0.0100	0.0307	20.471	22	666	0.35
0.0030	0.0299	23.893	22	799	-0.4493
0.0010	0.0297	11.659	20	393	2.415
0.0000	0.0296	20.880	0	706	-4.594

Chi-square = 41.63 $DF = 6$ P-value = 0.0000

Benchmark Dose Computation

Specified effect =0.5

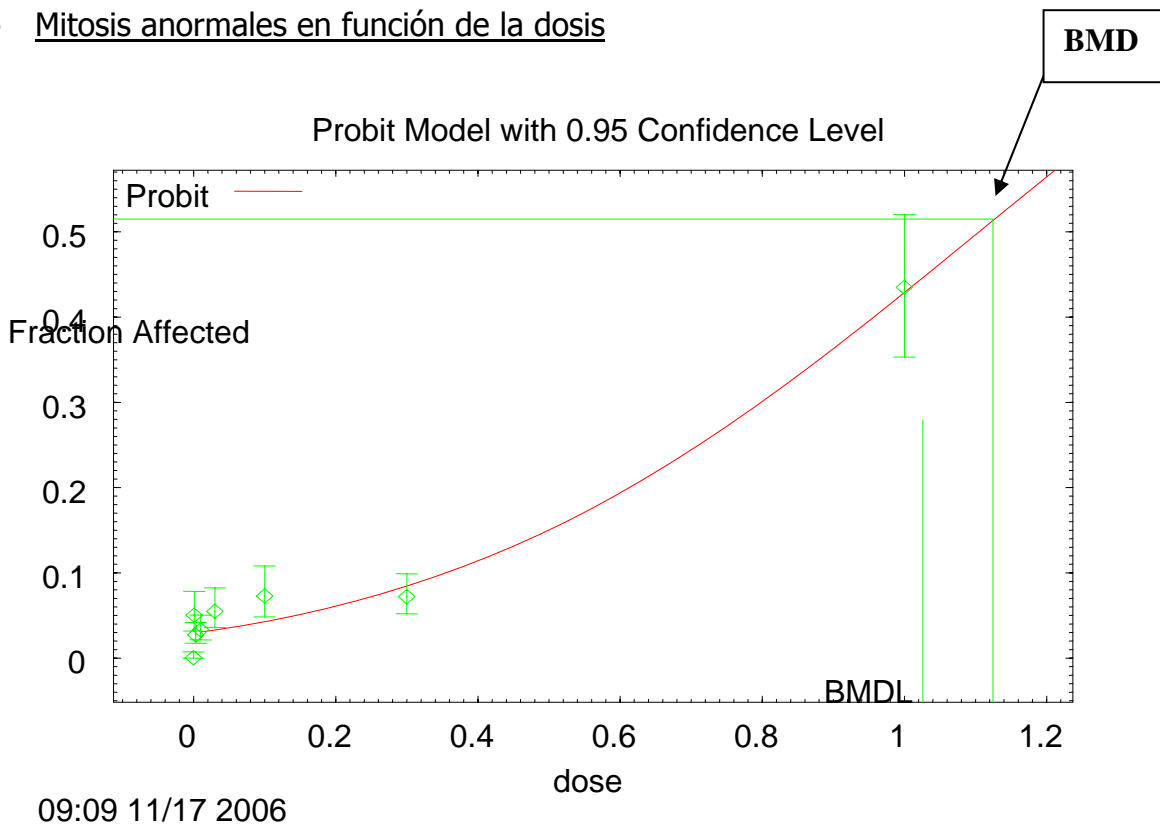
Risk Type= Extra risk

Confidence level = 0.95

BMD= 1.12452

BMDL= 1.0262

- Mitosis anormales en función de la dosis



CL50 = 1.12 ± 0.09

$\chi^2 = 41.63$ $DF = 6$ $P = 0.0000$

Nivel de confianza = 0.95

- La dosis representada en los gráficos corresponde a las concentraciones utilizadas en los ensayos, multiplicadas por el factor 1.10^3 , por lo que para cada concentración el valor correspondiente en el eje x (dosis) será:

	Concentración del metal pesado	Dosis	
CADMIO	0,01	10	$CL_{50}=3,97.10^{-3}M$
	0,003	3	
	0,001	1	
	0,0003	0,3	
	0,0001	0,1	
	0,00003	0,03	
	0,00001	0,01	
	0,000003	0,003	
CROMO	0,01	10	$CL_{50}=1,12.10^{-3}M$
	0,001	1	
	0,0003	0,3	
	0,0001	0,1	
	0,00003	0,03	
	0,00001	0,01	
	0,000003	0,003	
	0,000001	0,001	

Del presente esquema, se deduce que el dato obtenido del programa estadístico, corresponde a las siguientes concentraciones:

Cadmio $CL_{50}= 3,97.10^{-3} M$

Cromo $CL_{50}= 1,12.10^{-3} M$

6. Análisis de Varianza

Los datos obtenidos mediante el método ANOVA, se presentan en las siguientes tablas:

NOTA:

En las tablas presentadas a continuación las referencias para cada celda son:

Datos significativamente distintos	
Datos significativamente NO distintos	
Datos provenientes de la media en estudio	

CADMIO

	3 x 10 ⁻³				
	Suma Cuad.	G.L.	Cuad. Medio	F	Sig.
Between Groups	2766,221	1	2766,221	170,691	0
Within Groups	1977,134	122	16,206		
Total	4743,355	123			

	Media	N	Desv.St.
300 x10 5	10,379	66	3,999
testigo	19,845	58	4,056
Total	14,806	124	6,210

	1 x 10 ⁻³				
	Suma Cuad.	G.L.	Cuad. Medio	F	Sig.
Between Groups	2262,635	1,000	2262,635	118,327	0
Within Groups	2830,038	148,000	19,122		
Total	5092,673	149,000			

	Media	N	Desv.St.
testigo	19,845	58,000	4,056
100 x10 5	11,870	92,000	4,560
Total	14,953	150,000	5,846

	3 x 10 ⁻⁴				
	Suma Cuad.	G.L.	Cuad. Medio	F	Sig.
Between Groups	695,127	1	695,127	49,899	0
Within Groups	1727,412	124	13,931		
Total	2422,540	125			

	Media	N	Desv.St.
testigo	19,845	58	4,056
30 x10 5	15,132	68	3,433
Total	17,302	126	4,402

	1 x 10 ⁻⁴				
	Suma Cuad.	G.L.	Cuad. Medio	F	Sig.
Between Groups	392,239	1	392,239	21,957	0
Within Groups	1697,039	95	17,864		
Total	2089,278	96			

	Media	N	Desv.St.
testigo	19,845	58	4,056
10 x10 5	15,744	39	4,470
Total	18,196	97	4,665

	3 x10-5				
	Suma Cuad.	G.L.	Cuad. Medio	F	Sig.
Between Groups	416,064	1	416,064	25,830	0
Within Groups	1562,481	97	16,108		
Total	1978,545	98			

	Media	N	Desv.St.
testigo	19,845	58	4,056
3 x10 5	15,683	41	3,952
Total	18,121	99	4,493

	1 x10-5				
	Suma Cuad.	G.L.	Cuad. Medio	F	Sig.
Between Groups	69,156	1	69,156	3,991	0,048
Within Groups	1836,723	106	17,328		
Total	1905,880	107			

	Media	N	Desv.St.
testigo	19,845	58	4,056
1 x10 5	18,240	50	4,284
Total	19,102	108	4,220

	3 x 10-6				
	Suma Cuad.	G.L.	Cuad. Medio	F	Sig.
Between Groups	90,861	1	90,861	5,005	0,027
Within Groups	2196,619	121	18,154		
Total	2287,480	122			

	Media	N	Desv.St.
testigo	19,845	58	4,056
0,3 x10 5	18,123	65	4,435
Total	18,935	123	4,330

CROMO

	1.10-3				
	Suma Cuad.	G.L.	Cuad. Medio	F	Sig.
Between Groups	4201,253	1,000	4201,253	279,761	0
Within Groups	1366,575	91,000	15,017		
Total	5567,828	92,000			

	Media	N	Desv.St.
1.10-3	5,971	35,000	3,552
testigo	19,845	58,000	4,056
Total	14,624	93,000	7,779

	3.10-4				
	Suma Cuad.	G.L.	Cuad. Medio	F	Sig.
Between Groups	279,310	1,000	279,310	8,978	0,003
Within Groups	3546,724	114,000	31,112		
Total	3826,034	115,000			

	Media	N	Desv.St.
3.10-4	16,741	58,000	6,766
testigo	19,845	58,000	4,056
Total	18,293	116,000	5,768

	1.10-4				
	Suma Cuad.	G.L.	Cuad. Medio	F	Sig.
Between Groups	162,879	1,000	162,879	4,781	0,031
Within Groups	3066,339	90,000	34,070		
Total	3229,217	91,000			

	Media	N	Desv.St.
1.10-4	17,088	34,000	8,032
testigo	19,845	58,000	4,056
Total	18,826	92,000	5,957

	3.10-5				
	Suma Cuad.	G.L.	Cuad. Medio	F	Sig.
Between Groups	206,045	1,000	206,045	13,135	0
Within Groups	2070,709	132,000	15,687		
Total	2276,754	133,000			

	Media	N	Desv.St.
3.10-5	17,342	76,000	3,887
testigo	19,845	58,000	4,056
Total	18,425	134,000	4,137

	1. 10-5				
	Suma Cuad.	G.L.	Cuad. Medio	F	Sig.
Between Groups	0,282	1,000	0,282	0,018	0,893
Within Groups	1310,569	85,000	15,418		
Total	1310,851	86,000			


	Media	N	Desv.St.
1. 10-5	19,966	29,000	3,650
testigo	19,845	58,000	4,056
Total	19,885	87,000	3,904

	3.10-6				
	Suma Cuad.	G.L.	Cuad. Medio	F	Sig.
Between Groups	94,199	1,000	94,199	7,506	0,007
Within Groups	1129,486	90,000	12,550		
Total	1223,685	91,000			

	Media	N	Desv.St.
3.10-6	21,941	34,000	2,411
	19,845	58,000	4,056
Total	20,620	92,000	3,667

	1.10-6				
	Suma Cuad.	G.L.	Cuad. Medio	F	Sig.
Between Groups	70,257	1,000	70,257	5,297	0,024
Within Groups	1153,991	87,000	13,264		
Total	1224,247	88,000			

	Media	N	Desv.St.
1.10-6	21,710	31,000	2,686
8	19,845	58,000	4,056
Total	20,494	89,000	3,730



DISCUSSION

Discusión

A partir de los datos presentados en el apartado "resultados", se obtuvieron las siguientes conclusiones.

Los resultados fueron comparados con los obtenidos en un estudio anterior en el cual se utilizó como control –, agua corriente de la ciudad de Buenos Aires. [23]

Es importante destacar que la temperatura de siembra y la cantidad de bulbos sembrados por concentración no es la misma para ambos trabajos.

No obstante ello, los resultados serán contrastados por considerarlos apropiados para la evaluación del presente estudio.

1. Longitud de raíces:

- ❖ La longitud de las raíces disminuye conforme aumenta la concentración del tóxico utilizada en la siembra, tanto para el cromo como para el cadmio.
- ❖ Para el gráfico del cadmio (longitud de raíces en función de la concentración de cadmio -figura 3-) se denota que no se presentan cambios abruptos respecto a la longitud de las raíces. Si se observa el gráfico similar (figura 4) realizado para dicha experiencia en el estudio en comparación (Rodríguez; 2001), se denotan cambios significativos respecto a la longitud partir de la concentración $1 \cdot 10^{-4}$ M.
- ❖ Al analizar los mismos gráficos para el cromo, se observa la misma tendencia en cuanto a la longitud de las raíces. Para el presente trabajo (figura 5) el crecimiento es uniforme, en tanto para el trabajo en comparación (figura 6) es evidente la disminución importante en la longitud de las raíces a partir de la concentración $3 \cdot 10^{-5}$ M
- ❖ El efecto producido por los tóxicos en estudio es debido a que los ápices radiculares de *Allium cepa*, presentan una alta sensibilidad a los cambios nutricionales, lo que determina la inhibición en el crecimiento de las raíces. [9]

2. Número de raíces

- ❖ Si se realiza un análisis comparativo, mediante gráficos, respecto del número de raíces contabilizadas para cadmio y cromo, se observa que el

valor obtenido para el estudio realizado con empleo de suelo sintético y solución nutritiva (-figura 7 y 8-) es superior al estudio realizado sin empleo de solución nutritiva y suelo sintético.

NOTA: si bien la cantidad de bulbos sembrados por concentración no es la misma para ambos trabajos, al hacer la corrección correspondiente, el número de raíces continúa siendo menor en el test con empleo de suelo sintético y solución nutritiva.

Dicha corrección, se puede observar en los gráficos presentados en resultados (figura 7 y figura 8) mediante línea punteada roja.

A continuación se detallan las correcciones consideradas para las curvas:

Para el cadmio:

Concentración	Número de raíces		
	Promedio de siembra por quintuplicado (Rodríguez, 2001)	Promedio de siembra por bulbo	Curva Corrección (siembra por triplicado)
1.10 ⁻² M Control +	2	0,4	1,2
3.10 ⁻³ M	3	0,6	1,8
1.10 ⁻³ M	4	0,8	2,4
3.10 ⁻⁴ M	6	1,2	3,6
1.10 ⁻⁴ M	27	5,4	16,2
3.10 ⁻⁵ M	30	6	18
1.10 ⁻⁵ M	39	7,8	23,4
3.10 ⁻⁶ M	42	8,4	25,2
Agua Corriente Control -	56	11,2	33,6

Tabla 1. Corrección considerada para la comparación de los estudios, Cd.

Para el cromo:

Concentración	Número de raíces		
	Promedio de siembra por quintuplicado (Rodríguez, 2001)	Promedio de siembra por bulbo	Curva Corrección (siembra por triplicado)
Control + 1.10 ⁻² M	4	0,8	2,4
1.10 ⁻³ M	2	0,4	1,2
3.10 ⁻⁴ M	5	1	3
1.10 ⁻⁴ M	7	1,4	4,2
3.10 ⁻⁵ M	17	3,4	10,2
1.10 ⁻⁵ M	22	4,4	13,2
3.10 ⁻⁶ M	27	5,4	16,2
1.10 ⁻⁶ M	35	7	21
Agua corriente Control -	42	8,4	25,2

Tabla 2. Corrección considerada para la comparación de los estudios, Cr.

- ❖ Los datos considerados, demuestran que el empleo de soluciones nutritivas y suelos sintéticos, inducen mejor el crecimiento de raíces, por contener los nutrientes necesarios para su desarrollo;

3. Dureza de raíces:

- ❖ A medida que aumenta la concentración del tóxico, la dureza de las raíces es mayor en ambos metales considerados para la siembra, por lo que sería conveniente realizar futuros estudios con el fin de determinar la posible relación entre dicho factor y la concentración del tóxico.

4. Color de las raíces:

- ❖ Se observa que, a medida que aumenta la concentración de los metales estudiados, el color de las raíces es significativamente más oscuro.



- ❖ Los cambios macroscópicos, observados en la longitud de las raíces, dureza, color y número de las mismas, son efectos visibles (o fenotípicos), de los efectos genotóxicos de los metales sobre las células de *Allium cepa*.

Dadas las últimas conclusiones acerca de la longitud, dureza, color y número de raíces se puede confirmar que el presente estudio, verifica su factibilidad de uso

para determinar la toxicidad de compuestos químicos mediante el empleo del test de *Allium*.

5. Porcentaje de Mitosis Anormales:

- ❖ A medida que la concentración de ambos tóxicos analizados aumenta, el porcentaje de mitosis anormales aumenta. Si se observa el gráfico comparativo (figura 9 y 10) entre ensayos utilizando suelo sintético y soluciones nutritivas frente a ensayos sin el empleo de los mismos, se destaca la observación de mitosis anormales en concentraciones ($1 \cdot 10^{-2}$ M, $3 \cdot 10^{-3}$ M, $1 \cdot 10^{-3}$ M) donde el estudio sin SS y SN no presentó.
- ❖ Para ambos metales la disminución en el porcentaje de mitosis anormales es representativamente más uniforme en el presente estudio.
- ❖ No hay presencia de mayor porcentaje de mitosis anormales respecto anteriores estudios, pero sí un aumento en el número de raíces, como anteriormente se aclaró.

6. Efecto Genotóxico

- ❖ Para ambos metales, se observa que para las concentraciones más altas la patología predominante son los cromosomas *errantes* y *c-mitosis*, mientras que a medida que disminuye la concentración hay presencia de *cromosomas sticky* y *puentes cromosómicos*. (figura 11 Y figura 12)
- ❖ Los *cromosomas errantes*, es la patología de mayor porcentaje inducida por ambos tóxicos. Esta patología, cabe recordar es de tipo reversible, mientras que la *c-mitosis* (segunda en importancia de inducción por los tóxicos), es de tipo irreversible.
- ❖ En tanto para ambos metales, no se observó presencia de *micronúcleos* en las mitosis analizadas.
- ❖ Los resultados de los bioensayos indican que tanto el Cd como el Cr presentan un importante efecto genotóxico sobre células de *Allium cepa*. Dicho efecto se torna más importante a medida que aumenta la concentración del tóxico.
- ❖ El análisis microscópico confirma, que existe una correlación entre toxicidad y genotoxicidad para el test de *Allium*. [8] Confirmada, según los datos macroscópicos, una toxicidad de los metales analizados (disminución en longitud, dureza, color y número de raíces), el análisis posterior microscópico demostró un efecto genotóxico al contabilizar el porcentaje de mitosis anormales en concentraciones altas y bajas de dichos metales.

7. Estadística comparada

- ❖ Los datos estadísticos obtenidos mediante el Probit, para los estudios en comparación, arrojan datos diferentes según se pudo apreciar.

	CL₅₀ Cadmio	CL₅₀ Cromo
Test de <i>Allium</i> sin empleo de suelo sintético y solución nutritiva (Rodríguez, 2001)	1,5.10 ⁻⁴ M	1,1.10 ⁻⁴ M
Test de <i>Allium</i> con empleo de suelo sintético y solución nutritiva (Rodríguez, 2001)	3,97.10 ⁻³ M	1,12.10 ⁻³ M

- ❖ La diferencia entre dichos datos, esta dada por las diferentes condiciones de siembra utilizadas que no permiten comparaciones entre los resultados, por lo cual solamente se presentarán los resultados obtenidos
- ❖ Cabe destacar que para el trabajo en comparación se consideró la CE₅₀ (concentración efectiva al 50% de mitosis alteradas) por analizar los datos estadísticamente a partir de los bioensayos realizados, donde hubo observación de mitosis en el tratamiento control (1.10⁻² M), a diferencia del presente estudio. Para el presente estudio se consideró la denominación CL₅₀ (concentración letal al 50% de mitosis anormales), dado que no hubo observación de mitosis en el tratamiento control (1.10⁻² M).

8. Soluciones Nutritivas y Suelos Sintéticos

- ❖ El empleo de soluciones nutritivas y suelos sintéticos, propician un medio idóneo para la reproducibilidad del test de *Allium*, permitiendo observaciones tanto macro como microscópicas claras de los efectos producidos por los tóxicos expuestos.
- ❖ En cuanto al número de raíces contabilizadas por tratamiento, es mayor en el presente estudio, en comparación a los resultados obtenidos empleando el test de *Allium* sin utilización de suelos sintéticos y soluciones nutritivas.

- ❖ El porcentaje de mitosis alteradas, aumenta conforme aumenta el número de raíces contabilizadas; pero no incrementa su número respecto del test de *Allium* sin empleo de suelo sintético y solución nutritiva.
- ❖ El efecto del empleo de solución nutritiva y suelo sintético, parece inducir el crecimiento de las raíces en los bulbos, pero se recomienda realizar otras pruebas empleando dicho suelo y solución, para aseverar esta hipótesis.

9. Análisis de varianza

En referencia a los datos obtenidos para el análisis de varianza de los tratamientos utilizados y el testigo desarrollado en el presente estudio, las conclusiones obtenidas del mismo son:

- ❖ Para ambos metales, se observó que los valores contrastados son significativamente distintos;
- ❖ Estos valores significativamente distintos, permiten demostrar que los resultados obtenidos para el presente estudio, difieren de los obtenidos para test de *Allium*, sin utilización de suelos sintéticos y soluciones nutritivas;
- ❖ Se destaca, que para el cadmio, el tratamiento 1.10^{-5} M, no presenta datos significativamente distintos respecto al testigo ensayado, con agua corriente;
- ❖ Dicho sesgo en los datos, se otorga a la aleatoriedad de los parámetros involucrados en el estudio,

10. Análisis químicos y bioensayos

El deterioro ambiental ha motivado la intensificación de estudios fisicoquímicos y biológicos en conjunto. Es importante destacar que los organismos biológicos son detectores de condiciones ambientales complejas, desempeñándose como finos sensores de los cambios que operan en el medio.

Las pruebas ecotoxicológicas determinan el efecto de una amplia gama de productos sobre un grupo de organismos seleccionados, y dan así una respuesta global de toxicidad.

Las descargas de contaminantes al ambiente, suelen ser en forma discontinua, los organismos expresan alteraciones que operan en un periodo de tiempo en el ecosistema, mientras que los análisis fisicoquímicos tradicionales, pueden no detectar los cambios mencionados. Se destaca, que mientras los análisis fisicoquímicos brindan información acerca de la presencia y concentración del contaminante, los bioensayos determinan la toxicidad y genotoxicidad,

importante para la detección de efectos producidos en organismos vivos como así también los efectos sinérgicos de otras sustancias que pueden estar presentes en el ecosistema y su biodisponibilidad.

Por lo dicho, se considera que al utilizar un bioensayo se puede detectar la contaminación, aún cuando los parámetros fisicoquímicos analizados no sobrepasen los límites establecidos por las normas. [15]



BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Albert, L. "*Curso básico de toxicología ambiental*"; Centro panamericano de ecología y salud – Organización panamericana de salud- Organización mundial de la salud- UTEHA Grupo Noriega Editores, 1999.
- [2] Allison, K.; E. Cerny, D.; Smith, A.; Wagh and M. Bhattacharyya. 1996. "*Effects of Cadmio on osteoclast formation and activity in vitro.*" *Toxicology Appl Pharm* 140:451-460.
- [3] Aportella Gilling, Patricia; González Pérez, Yuleies; "*Evaluación toxicológica del bicromato de potasio en plantas de lechuga, Lactuca Sativa L.*" (1997)
- [4] Cátedra Biología Celular, Apuntes U.B.A. (capítulo 5), C.B.C. 1998, Facultad de Medicina.
- [5] De la Borbolla, M^a. José, Camoyán, M^a. De los Ángeles; *Anales del Instituto Español de Edafología, Ecología y Fisiología Vegetal. "La preparación de soluciones nutritivas par investigación de nutrición vegetal"*; Tomo VII, Madrid, Agosto 1948 Vol. II.
- [6] Dutka; B. J.: *Methods for microbiological and toxicological analysis of waters, wastewaters and sediments.* National Water Research Institute (NWRI), Canada ; Burlington ; 1989.
- [7] Figueroa, Mercedes, Duggan, Martín, "*Cebolla: bases nutricionales de la fertilización*". EEA INTA, Pergamino, (1998). Publicado en www.inti.gov.ar
- [8] Fiskesjö, G.; "*Allium test for screnning chemicals, evaluation of citological parameters*".
- [9] Fiskesjö, G.; "*The Allium test as a standard in environmental monitoring*". *Hereditas* 120: 99-112.
- [10] Fiskesjö, Gerid; Technical Methods Section "a Allium Test II: Assessment of a chemical's Genotoxic Potential by recording aberrations in chromosomes and cell divisions in root tips of Allium cepa L." Department of Genetics, University of Lund, S-223 62 Lund, Sweden.
- [11] Fiskesjö; Allium test II. Assessment of a chemical's genotoxicity potential by recording aberrations in chromosomes and cell divisions in root tips of allium cepa L. (1994)
- [12] Fiskesjö; "*The Allium test –an alternative in environmental studies: the relative toxicity of metal ions*". (1988)

[13] Fiskesjö; "*The Allium test as a standard in environmental monitoring.*" Hereditas 102:99-112. (1985)

[14] Fiskesjö; "*The Allium test in wastewater monitoring*". (1993)

[15] Gächter¹, J. Mérida², K. Becker van Slooten¹, J. Tarradellas. "*Evaluación de la Ecotoxicidad de un Efluente Proveniente de la Industria Minera de Honduras con la Ayuda de una Batería de Bioensayos.*" Escuela Politécnica Federal de Lausana. Suiza. Publicado por la Unidad de Ecotoxicología, CESCOO. Honduras

[16] Iannacone, José; Alvaríño, Lorena; "*Efecto Ecotoxicológico de tres metales pesados sobre el crecimiento radicular de cuatro plantas vasculares*"; Universidad Nacional Federico Villareal, Facultad de Ciencias naturales y Matemáticas, Pueblo Libre, Perú, (Abril-Junio 1998).

[17] Kimbrough, D.E, Cohen, Y., Winer, A.M., Creelman, L. and Mabuni, C. (1999). "A critical assessment of chromium in the environment." Critical Reviews in environmental Science and Technology 29, 1:1-46

[18] Kolthoff, I; Sandel, E.; Meehan, E.; "*análisis químico cuantitativo*"; cuarta edición, Librería y Editorial Nigar S.R.L., Buenos Aires

[19] Levan A., "*The Effect of Colchicines on root mitosis in Allium*"; 1938.

[20] Llanos Peada; Pedro H.; "*La solución nutritiva, nutrientes comerciales, y fórmulas empíricas*". Bogotá, Colombia, 18 de Mayo de 2001.

[21] Quiroga, Echazú; "*Análisis Comparativo de Soluciones Nutritivas en Cultivos Hidropónicos en Invernadero*". Universidad de Salta. (1999)

[22] Richard, F.C. and Bourg, A.C.M. (1991). "*Aqueous geochemistry of chromium: a review.*" Wat. Res 25, 7:807-816

[23] Rodríguez, Patricia; Handel, María; Navntoft, Cristian; Castro, Roberto. "*Efectos genotóxicos del cadmio y cromo, sobre células meristemáticas de Allium cepa.*" Universidad de Flores, Buenos Aires, Argentina, 2001

[25] Shimkin MKE Environmental health indicators in Latin America and the Caribbean. Wash.D.C. PAHO.

[26] 1996. http://www2.medioambiente.gov.ar/cambio_climatico/programas/indicadores/default.htm.

[27] Turner MA, & Rust RH; "Effects of Chromium on growth and mineral nutrition of soybeans Soil"; Sci Soc. Am. Proc. (1971)

[28] W Lopez ; Ritas ; Lopez, Melida ; "*El diagnóstico de suelos y plantas, (métodos de campo y laboratorio)*", 4ª edición; Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, 1990

[29] http://www.bvs.sld.cu/revistas/hie/vol41_2-3_03/hie092-3202.htm#autor

[30] http://www.ub.es/biocel/wbc/biocel/pdf/CicloCelular20I-05_06-26-44.pdf