



EVALUACIÓN DE *Lactuca sativa* Y *Selenastrum capricornutum* COMO INDICADORES DE TOXICIDAD EN AGUAS

ASSESSMENT OF *Lactuca sativa* AND *Selenastrum capricornutum* LIKE INDICATORS OF WATER TOXICITY

P. Bohórquez-Echeverry, C. Campos-Pinilla

*Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias,
Pontificia Universidad Javeriana, Carrera 7 # 43-82, Bogotá, Colombia.
pbohorquez@javeriana.edu.co*

Resumen

El bioensayo con *Selenastrum capricornutum* ha sido utilizado como herramienta de valoración de la contaminación del agua, debido a su habilidad para detectar efectos adversos a mezclas complejas de sustancias químicas. El objetivo de este estudio fue comparar la sensibilidad de *S. capricornutum* con el ensayo de *Lactuca sativa* y seleccionar el mejor indicador de toxicidad. Para este fin, se determinaron como puntos finales, efectos de estimulación o inhibición sobre el crecimiento de las células algales y las semillas de lechuga. Se determinó la sensibilidad de cada organismo frente a Zn (II) como tóxico de referencia para homologar los resultados entre *S. capricornutum* y *L. sativa*. Sin embargo, con *S. capricornutum* se observaron grandes variaciones entre los resultados; por lo cual se utilizó Cr (VI). Para *L. sativa* se obtuvo un valor de $CE_{50-120h}$ de 24.48 mgZn⁺²/L y para *S. capricornutum* un valor de CE_{50-96h} de 0.29 mgCr⁺⁶/L. Para evaluar la sensibilidad de los indicadores, se seleccionaron dos muestras de agua en el río Bogotá y otra en el efluente de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales El Salitre. Los resultados indicaron que ambos modelos presentaron respuestas similares, lo cual podría atribuirse a la concentración de materia orgánica presente en las muestras.

Palabras clave: bioensayos, contaminación del agua, *Lactuca sativa* y *Selenastrum capricornutum*, toxicidad

Abstract

The use of *Selenastrum capricornutum* in acute toxicity assessment is a potentially useful tool in water monitoring. The main objective of this study was to compare the sensitivity of *S. capricornutum* with the extensively used *Lactuca sativa* bioassay in water and to select the best indicator. For this purpose, inhibition or stimulation effects of algae cell growth and seed growth were determined as end points. Sensitivity of both organisms was determined with Zn (II) as reference toxicant to homologate the results between *S. capricornutum* and *L. sativa*. However, when *Selenastrum* was exposed to Zn (II) there was a strong variation in results. Therefore, Cr (VI) was used as a reference toxicant. The $CE_{50-120h}$ value for Zn (II) for *L. sativa* was 24.48 mg/L and the CE_{50-96h} value for Cr (VI) for *S. capricornutum* was 0.29 mg/L. Two environmental samples were collected from the Bogotá River and other from the Salitre wastewater treatment plant, to evaluate sensitivity of indicators. Results showed similar responses on both organisms, possibly due to the organic matter concentration in evaluated samples.

Keywords: bioassays, *Lactuca sativa*, *Selenastrum capricornutum*, water pollution.

INTRODUCCIÓN

La contaminación del agua se produce por vertimientos de origen industrial o municipal, residuos agrícolas, drenajes de minas y lixiviados de rellenos sanitarios los cuales son liberados al medio ambiente sin ningún control o por fuentes difusas a través de la erosión. Estas fuentes de contaminación pueden contener sustancias potencialmente tóxicas para la biota acuática deteriorando las condiciones en que sobreviven plantas y animales, con respecto a cambios en su reproducción, desarrollo, comportamiento o supervivencia. Adicionalmente, las transformaciones o interacciones que se pueden presentar entre las sustancias tóxicas y con ligandos orgánicos e inorgánicos pueden producir fenómenos de complejación o especiación, aumentando o disminuyendo la toxicidad por medio de efectos de sinergismo, antagonismo o aditividad (Magdaleno y De Rosa, 2000; Gómez *et al.*, 2001). Por esta razón, en muchos estudios se determinan las formas biodisponibles de los contaminantes para evaluar mejor la toxicidad (Wong *et al.*, 1994).

La toxicología acuática proporciona herramientas que ayudan a la detección y control de descargas de residuos peligrosos. Una de ellas es el análisis detallado de las propiedades físicas y químicas de los contaminantes, lo cual permite en algunos casos, evaluar el grado de riesgo que presenta para los organismos acuáticos y de esta forma hacer predicciones con un alto grado de confiabilidad. Sin embargo, la caracterización química de los contaminantes es bastante compleja y costosa, por lo cual se contempla el uso de pruebas biológicas como complemento de los análisis fisicoquímicos (Gómez *et al.*, 2001). Estas pruebas ayudan a evaluar la calidad de los efluentes y de esta forma prevenir o alertar sobre riesgos en el ecosistema (Blaise y

Kusui, 1997; Persoone *et al.*, 2003; Manusadianas *et al.*, 2003).

Actualmente se utilizan diferentes especies de organismos acuáticos y terrestre de varios niveles filogenéticos como “indicadores” para determinar los efectos tóxicos de contaminantes vertidos o liberados en el ecosistema. Sin embargo no es aconsejable realizar bioensayos con un sólo grupo de organismos o con sólo una especie para emitir un diagnóstico en caso de contaminación hídrica (Blaise y Kusui, 1997; Castillo *et al.*, 2000). Lo indicado es utilizar una “batería” de bioensayos que incluya organismos que representan distintos niveles tróficos (descomponedores, productores y consumidores). De esta forma se pueden evaluar procesos de biomagnificación en la cadena alimenticia y extrapolar los datos experimentales de las pruebas de toxicidad a los efectos del ecosistema.

En la legislación de varios países como Estados Unidos, Canadá y los de la Comunidad Europea, entre otros, se han incluido los ensayos con organismos vivos para cuantificar el grado de toxicidad de efluentes industriales, aguas residuales y/o residuos sólidos, para determinar los límites de descarga y los efectos tóxicos sobre la biota (Persoone *et al.*, 2003; Arensberg *et al.*, 1995; Halling *et al.*, 1996; Mayew *et al.*, 1997; Mitchell *et al.*, 2002).

En Colombia el control de la contaminación del agua generalmente se basa en análisis fisicoquímicos y microbiológicos de aguas, centrándose en la implementación de sistemas de tratamiento para la eliminación de materia orgánica y microorganismos. No obstante en el decreto 1594 de 1984 del Ministerio de Salud, se ha contemplado el uso de concentraciones letales medias (CL₅₀-96h) para algunos contaminantes prioritarios, en aguas destinadas a la preservación de flora y fauna (Ministerio de Salud, 1984).

En estudios recientes se ha trabajado con bioensayos de toxicidad aguda para evaluar la calidad del agua del Humedal Gualí Tres Esquinas y posteriormente el río Bogotá. Inicialmente, se empleó una batería de bioensayos conformada por dos indicadores de modelo animal, *Hydra attenuata* y *Daphnia magna* y por un modelo vegetal, *Lactuca sativa*. A partir de los resultados obtenidos en estos estudios se observó que *H. attenuata* era un modelo animal más sensible comparado con *D. magna* al obtener valores de CL_{50} entre 2.36 y 85.72% y 84.6 y 137%, respectivamente; mientras que con *L. sativa*, no se presentaron efectos de inhibición sobre el crecimiento de la radícula en las muestras evaluadas, obteniendo valores de CE_{50} mínimos de 132% y máximos de 475% (Bohórquez y Cáceres, 2002; PUJ, 2004).

Frente a la baja sensibilidad del modelo vegetal evaluado en estas aguas y para seguir utilizando modelos de diferentes niveles tróficos dentro de la batería de bioensayos, se planteó comparar la sensibilidad de *L. sativa* y *S. capricornutum*, frente a diferentes fuentes de agua para establecer cuál de los organismos es mejor indicador vegetal. Para este fin, se requería poner a punto la técnica con *Selenastrum* ya que la técnica con *L. sativa* estaba implementada en el laboratorio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Bioensayo con *Lactuca sativa*

El bioensayo con *Lactuca sativa*, se desarrolló de acuerdo a la técnica de McInnis (1989). Las semillas de lechuga *L. sativa* variedad prestine cabeza de mantequilla se adquirieron en el Centro de Abastos Agropecuarios (CEBA). El bioensayo de toxicidad con semillas de lechuga es una prueba estática de toxicidad aguda (120 h) en la que se pueden evaluar los efectos fitotóxicos en el desarrollo de la plántula

durante los primeros días de crecimiento. En la prueba, se tomaron 20 semillas de tamaño similar, forma y color; se distribuyeron uniformemente sobre papel Whatman n° 3 impregnado con 4 mL de la muestra dentro de una caja de Petri, se incubó en oscuridad a $22 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 5 días. Después del periodo de incubación, se midió y registró el promedio de longitud de las raíces por cada concentración de la muestra. Finalmente, se estimó la concentración que produce el 50% de inhibición (CE/CI_{50}) en el crecimiento de la raíz. Se utilizó como control negativo y como diluyente agua dura reconstituida y como control positivo, 20 mg Zn^{+2}/L ; establecido por bioensayos sucesivos ($n=20$) frente a Zn (II) a través de una carta control.

Bioensayo con *Selenastrum capricornutum*

Este ensayo se desarrolló de acuerdo a la técnica de EPA (1994) modificada por Cifuentes *et al.*, (1998). *S. capricornutum* (UTEX 1648) se adquirió en la colección de referencia algal de la Universidad de Texas. Este organismo ha sido ampliamente recomendado por diferentes agencias reguladoras del medio ambiente por mostrar alta y constante sensibilidad a tóxicos, alta disponibilidad, estabilidad genética, uniformidad en las poblaciones, es representativo del nivel trófico y es de fácil cultivo (EPA, 1994; OECD 1984; ISO, 1989; APHA, 1998). El bioensayo de toxicidad aguda con *S. capricornutum* es una prueba estática (96h de exposición). En la prueba, se utilizaron 18 erlenmeyers de 250 ml de capacidad, debidamente rotulados con la concentración y el número de réplica correspondiente (5 concentraciones y un control con 3 réplicas, para cada uno). Se inculó en cada erlenmeyer el volumen calculado de cultivo para tener una densidad celular inicial de 10^4 cel ml^{-1} . Posteriormente se incubaron los cultivos a $23 \pm 2^\circ\text{C}$, intensidad lumínica de 4.304 lux

± 10 , con agitación continua de 100 revoluciones por minuto (rpm). Después del periodo de incubación se determinó el porcentaje de inhibición de cada concentración con respecto al control por turbidez a una longitud de onda estándar de 750 nanómetros (nm), utilizando como blanco medio de cultivo algal. Posteriormente, se calculó la concentración que produce el 50% de inhibición en el crecimiento de las células algales.

Condiciones del cultivo

Los cultivos algales se mantuvieron en tubos de ensayo con medio sólido, preparado con agar-agar al 1.5% (Cifuentes *et al.*, 1998). Se realizaron repiques a tubos con medio fresco cada tres meses. Estos cultivos se almacenaron en oscuridad a 4°C. A partir de los cultivos sólidos, se iniciaron los cultivos en medio líquido, los cuales se mantuvieron a $23 \pm 2^\circ\text{C}$, intensidad lumínica de $4.304 \text{ lux} \pm 10$, con agitación continua de 100 rpm; de acuerdo a la metodología sugerida por la Agencia de Protección Ambiental (EPA, 1994). Una vez el cultivo alcanza la fase estacionaria, se retira de la cámara de incubación y se cuantifica la biomasa para su posterior uso como inóculo en las pruebas de toxicidad.

Medio de cultivo para la proliferación de *S. capricornutum*

El medio de cultivo empleado para el crecimiento algal fue el propuesto por EPA (1994) modificado por Cifuentes *et al.*, 1998 en el cual se aumentan las concentraciones de nitrógeno y fósforo cinco veces (tabla 1), para obtener cultivos con densidades celulares altas.

El medio de cultivo algal se preparó a partir de 7 soluciones concentradas de nutrientes. Se tomó 1 ml de las soluciones 1, 2, 4, 6 y 7 y 5 ml de las soluciones 3 y 5; finalmente se adicionó agua destilada hasta

completar 1L. El pH del medio se mantuvo en 7.5 ± 0.1 por lo que fue necesario ajustarlo con NaOH o HCL 1N. Posteriormente se esterilizó el medio de cultivo a 15lb/15 minutos a 120°C . Se debe tener precaución al adicionar EDTA al medio de cultivo porque puede interferir en la toxicidad de los metales. Si se sospecha que la muestra ambiental presenta metales no se debe adicionar.

Curva de crecimiento

Se realizó una curva de crecimiento de este organismo para identificar el momento en el cual las células algales se encuentran en la fase logarítmica y de esta forma obtener el inóculo para las pruebas de toxicidad. La biomasa se determinó por los métodos de recuento en cámara de Neubauer (Blaise *et al.*, 2000) ya que permite examinar la morfología de las células y por cuantificación del contenido de clorofila a (APHA, 1998) para identificar si las células poseen clorofila o feofitina, aunque la cantidad de biomasa fuese elevada.

Estimación de biomasa

Antes de realizar las pruebas de sensibilidad de *S. capricornutum* frente a Cr (VI), se determinó en cinco experimentos la biomasa de concentrados algales por dos métodos de estimación, recuento en cámara de Neubauer y por turbidez; con el objeto de determinar el método más apropiado para este fin. La tasa de crecimiento algal (μ), se calculó a partir de la siguiente ecuación:

$$\mu = \frac{\ln N_n - \ln N_o}{\Delta t} \text{ Donde:}$$

\ln = logaritmo natural

N_n = densidad celular al finalizar la prueba

N_o = densidad celular inicial

Δt = intervalo de tiempo considerado

Pruebas de sensibilidad

Para establecer los intervalos aceptables de variación de la repuesta tanto de las algas como de las semillas de lechuga frente a Zn (II) como tóxico de referencia, con un margen de confianza del 95%, se realizó una carta control que sirvió de referencia para evidenciar la sensibilidad de cada especie frente al tóxico, la estabilidad de la respuesta biológica y la reproducibilidad de los resultados obtenidos. En el bioensayo con *L. sativa* se evidenció la sensibilidad que este organismo tiene frente al zinc; sin embargo con *S. capricornutum* no se obtuvieron resultados reproducibles entre ensayos, por lo que se utilizó 1 mg/L de cromo (VI), sustancia con la que se obtuvieron resultados satisfactorios de sensibilidad y reproducibilidad y que es ampliamente recomendada para este tipo de pruebas. Esta carta se generó después de exponer los organismos a diferentes concentraciones del tóxico a través de ensayos sucesivos (n=14), en la cual se obtuvo el valor de la concentración de efecto medio (CE₅₀). Inicialmente la carta puede ser construida con un mínimo de cinco datos y posteriormente se debe continuar realizando ensayos con el tóxico para ingresar mensualmente nuevos valores hasta completar una serie de veinte datos. Con los datos del promedio, desviación estándar y coeficiente de variación obtenidos en la carta control, se evalúa si es posible obtener resultados confiables con la técnica, antes de llevar a cabo pruebas con muestras ambientales.

Muestras ambientales

Las muestras de agua se recolectaron en tres estaciones de muestreo. La recolección de las muestras se realizó durante los meses de marzo, abril y mayo de 2005 con tres eventos de muestreo para cada una. Los sitios seleccionados fueron los siguientes: dos estaciones de muestreo sobre el río Bogotá: 1) Puente Florencia 2)

El Cortijo y 3) el efluente de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR) El Salitre. En Puente Florencia la contaminación del agua se atribuye a los diferentes compuestos químicos (pesticidas y agroquímicos) producto de las actividades agrícolas, y adicional a ello a los químicos (sulfatos, cloruros, cromo y taninos) generados por el sector industrial de esta zona, representado principalmente por curtiembres. Mientras que en El Cortijo predomina la contaminación con materia orgánica, generada por las aguas residuales domésticas del distrito capital y la PTAR El Salitre que trata parte del agua residual doméstica de Bogotá por medio de un sistema primario avanzado, para luego ser vertida al río Bogotá. Las muestras de agua se transportaron a 4°C hasta el laboratorio y se procesaron dentro de las 24 horas después de su recolección. Antes de iniciar el montaje de las pruebas de toxicidad con *S. capricornutum*, las muestras de agua se pasaron a través de filtros con tamaño de poro > 50mm para eliminar material suspendido y luego por filtros con tamaño de poro de 0.45 µm para eliminar microalgas. Para las pruebas de toxicidad se realizaron 4 concentraciones a partir de las muestras de agua: 12.5, 25, 50 y 100%.

Análisis estadístico

Se realizó estadística descriptiva para los modelos vegetales debido a que los bioensayos con *L. sativa* y *S. capricornutum* no mostraron efectos de inhibición gradual sobre el crecimiento radicular y sobre la tasa de crecimiento, respectivamente; sino que se observaron efectos de exaltación u hormesis.

Se realizó una correlación de Pearson (p < 0.05) como medida de asociación entre las variables, número de células por mililitro (métodos de recuento en cámara de Neubauer) y densidad óptica (turbidez) y

así seleccionar el más apropiado en cuanto a practicidad, confiabilidad y reproducibilidad.

RESULTADOS

Bioensayo con *L. sativa*

En la prueba de sensibilidad con semillas de lechuga, se determinó la CE₅₀ a partir de cuatro concentraciones de Zn (II): 10, 20, 40 y 100 mg/L (figura 1).

La concentración efectiva media para *L. sativa* fue 24.48 mg/L de Zn²⁺, con intervalos de confianza del 95% entre 14.60 y

34.36 mg/L y con coeficiente de variación (C.V) del 20%.

Bioensayo con *S. capricornutum*

Medio de cultivo para la proliferación de *S. capricornutum*

La curva de crecimiento de *S. capricornutum*, muestra que el medio EPA modificado genera resultados reproducibles en la proliferación algal con fases de crecimiento exponencial más largas, con respecto al medio original, y con densidades celulares de 10⁶ células.ml⁻¹ en la fase estacionaria de crecimiento.

Tabla 1
Medio EPA modificado por Cifuentes *et al*, para el mantenimiento de los cultivos algales

SOLUCIÓN	REACTIVO	CONCENTRACIÓN
	MACRONUTRIENTES	500ml
1	MgCl ₂ .6H ₂ O	6.08 g
2	CaCl ₂ .2H ₂ O	2.20 g
3	NaNO ₃	12.75 g
4	MgSO ₄ .7H ₂ O	7.35 g
5	K ₂ HPO ₄	0.52 g
6	NaHCO ₃	7.50 g
	MICRONUTRIENTES	500ml
7	H ₃ BO ₃ ,	92.8 mg
	MnCl ₂ .4H ₂ O	208.0 mg
	ZnCl ₂	1.64 mg ¹
	FeCl ₃ .6H ₂ O	79.9 mg
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0.714 mg ²
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	3.63 mg ³
	CuCl ₂ .2H ₂ O	0.006 mg ⁴
	Na ₂ SeO ₄ .5H ₂ O	1.196 mg ⁵
	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	150 mg

¹ Pese 1.64 mg de ZnCl₂ y diluya en 100 ml de agua destilada.

² Pese 0.714 mg de CoCl₂.6H₂O y diluya en 100 ml de agua destilada.

³ Pese 3.63 mg de Na₂MoO₄.2H₂O y diluya en 10 ml de agua destilada.

⁴ Pese 0.006 mg de CuCl₂.2H₂O y diluya en 1000 ml de agua destilada.

⁵ Pese 1.196 mg de Na₂SeO₄.5H₂O y diluya en 100 ml de agua destilada.

Fuente: Cifuentes *et al*, 1998.

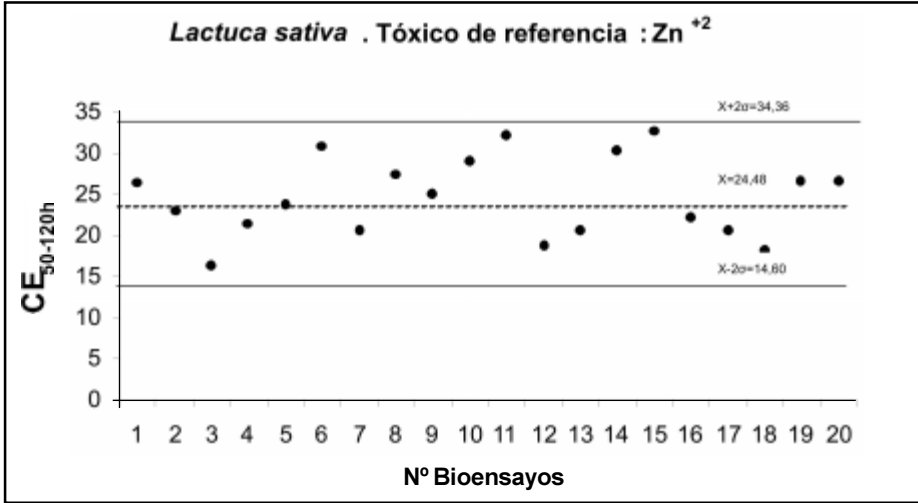


FIGURA 1. Representación gráfica de la prueba de sensibilidad de *L. sativa*.

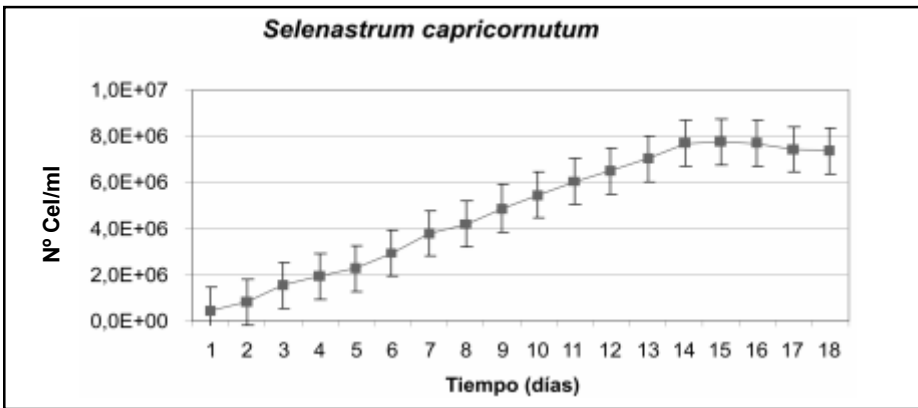


FIGURA 2. Representación gráfica de la cinética de crecimiento de *S. capricornutum* por recuento en cámara

Tabla 2

Resultados de la cuantificación de pigmentos con su respectivo IEF para cada réplica en la curva de crecimiento

Tiempo	Réplica1				Réplica2				Réplica3				
	Día	Recuento (Cel/ml)	μ	<i>C_a</i> (mg/m ³)	IEF	Recuento (Cel/ml)	μ	<i>C_a</i> (mg/m ³)	IEF	Recuento (Cel/ml)	μ	<i>C_a</i> (mg/m ³)	IEF
4	4	1.3 x 10 ⁶	7,53	15,67	1,7	2.8 x 10 ⁶	8,01	4,21	1,2	1.6 x 10 ⁶	7,55	20,23	1,1
8	8	3.5 x 10 ⁶	5,48	22,23	1,7	5.2 x 10 ⁶	5,89	15,83	1,2	3.8 x 10 ⁶	5,70	28,56	1,7
12	12	5.2 x 10 ⁶	2,38	17,64	1,5	7.8 x 10 ⁶	2,69	25,10	1,6	6.5 x 10 ⁶	2,57	19,31	1,4
16	16	5.8 x 10 ⁶	-1,45	6,62	1,1	9.0 x 10 ⁶	-0,95	6,62	1,1	8.2 x 10 ⁶	-1,02	12,8	1,0

Ca: clorofila *a*.

IEF: índice de estado fisiológico.

Curva de crecimiento

Los resultados obtenidos en la curva de crecimiento muestra (figura 2) que entre los días 3 y 14 las células están en fase exponencial con concentraciones algales entre 1.1×10^6 y 8.3×10^6 cel/mL.

Los resultados de recuento celular, velocidad de crecimiento, contenido de clorofila *a* y el respectivo índice de estado fisiológico (IEF) se observan en la tabla 2. Para obtener estos resultados se tuvo en cuenta el tiempo total que duraba la curva de crecimiento (20 días aproximadamente) y se seleccionaron 4 días intermedios para su determinación. En la tabla se observa que en las réplicas 1 y 3 hasta el día 8 y en la réplica 2 hasta el día 12, al aumentar o disminuir la concentración de células a través del tiempo, aumenta o disminuye la cantidad de clorofila *a* y este comportamiento se relaciona a su vez con el índice de estado fisiológico, mientras que la velocidad de crecimiento celular tiende a disminuir en el transcurso del tiempo en las tres réplicas. Después del día 8 en las réplicas 1 y 3, y el día 12 en la réplica 2, aunque aumenta la concentración de células disminuye el contenido de clorofila *a* y el IEF. Este índice indica el radio de clorofila *a*/feofitina *a*. Cuando el índice es de 1.7 se considera que no hay feofitina *a*, es decir, clorofila degradada y están en estado fisiológico excelente. Las soluciones de feofitina *a* pura tienen un valor de 1.0, sin embargo las mezclas de clorofila *a* y feofitina *a* van desde 1.0 a 1.7.

Como se observa en la tabla 2 en los días 4 y 8 de la primera réplica, día 12 de la segunda réplica y día 8 de la tercera réplica se encuentran valores iguales a 1.7 mientras que en los otros días son más bajos y variables, lo que significa que hubo presencia de feofitina durante los primeros y últimos días, debido a un estado fisiológico deficiente; sin embargo el índice se

aproximó al adecuado (1.6-1.7) con el tiempo en la fase exponencial.

Estimación de biomasa

Al realizar la correlación de Pearson entre el número de células por mililitro (recuento en cámara de Neubauer) y la densidad óptica (turbidez) entre los concentrados de *S. capricornutum*, se obtuvo una relación de significancia ($n=5$; $r= 0.99$; $p < 0.05$) entre las dos variables, con lo cual se puede concluir que al utilizar uno u otro método, los resultados obtenidos son similares; es decir, que cuando aumentan los valores de *X* aumentan los valores de *Y* y viceversa. Razón por la cual, durante las pruebas de sensibilidad con algas se utilizará el método de turbidez para determinar la biomasa, debido a que es más fácil de realizar.

Prueba de sensibilidad con *S. capricornutum*

En la prueba de sensibilidad con esta cepa, se determinó la CE_{50} por turbidez a partir de cinco concentraciones de Cr (VI): 0.10, 0.20, 0.30, 0.40 y 0.50 mg/L (figura 3), teniendo en cuenta que por debajo de 0.10 mg/L de cromo no se observan efectos de subletalidad.

La concentración efectiva media para *S. capricornutum* por turbidez fue 0.29 mg Cr⁺⁶/L con intervalos de confianza del 95% entre 0.16 y 0.41 mg/L y con coeficiente de variación (CV) del 22%.

Muestras ambientales

En los bioensayos realizados con *S. capricornutum* y *L. sativa*, no se observó ningún efecto (0%) en los controles negativos de cada muestra. De acuerdo a este comportamiento se comprobó el buen estado de los organismos de prueba, la calidad del agua utilizada para las diluciones y en general las condiciones en el procesamiento de cada ensayo. Esta apreciación se refleja en

los coeficientes de variación de los controles negativos en las pruebas de *S. capricornutum* que fueron 12.2% y 30% para *L. sativa*. Los resultados obtenidos de los controles positivos tanto en *S. capricornutum* como en *L. sativa* fueron similares a los obtenidos en la carta control, produciendo efectos de inhibición cercanos al 50%.

Los resultados obtenidos con el bioensayo de toxicidad aguda con *S. capricornutum* en la Estación Puente Florencia, El Cortijo y la PTAR El Salitre se presentan en la tabla 3.

Debido a que los resultados de toxicidad no arrojaron datos de manera gradual entre

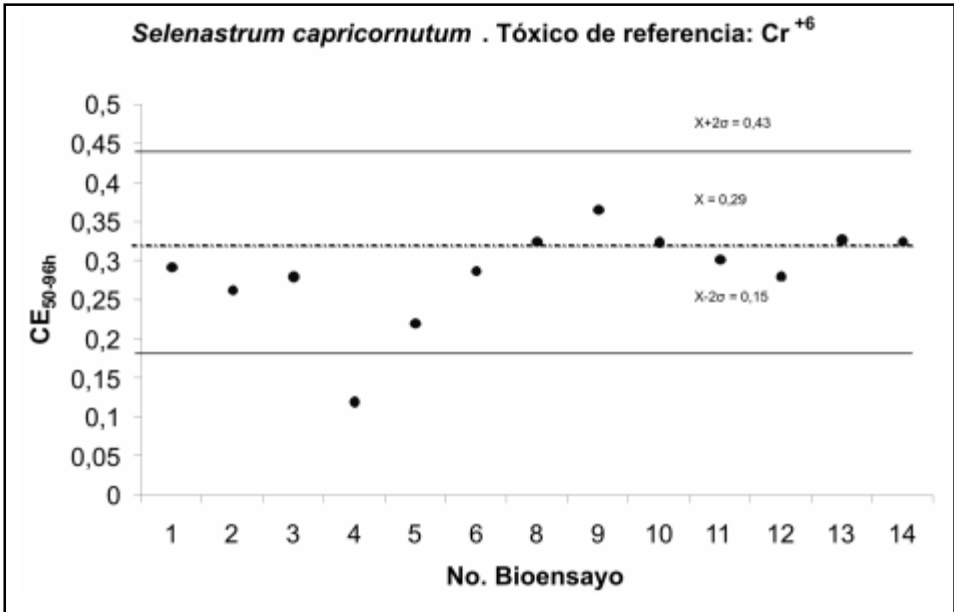


FIGURA 3. Representación gráfica de la prueba de sensibilidad de *S. capricornutum* por turbidez.

Tabla 3

Porcentaje de inhibición del crecimiento de las células de *S. capricornutum* en las diferentes concentraciones evaluadas en la muestra proveniente de Puente Florencia, El Cortijo y la PTAR El Salitre por turbidez

[]	Puente Florencia			El Cortijo			PTAR El Salitre		
	Turbidez								
	Inhibición (%)								
	Evento 1	Evento 2	Evento 3	Evento 1	Evento 2	Evento 3	Evento 1	Evento 2	Evento 3
12,5%	9,42	-0,77	-14,71	24,55	-10,3	17,29	15,52	-28,01	-24,79
25,0%	6,73	-1,78	-25,27	37,26	-0,59	12,88	7,04	-36,03	-28,65
50,0%	6,22	-4,98	0,49	41,05	-29,64	15,73	21,57	-41,93	0,49
100,0%	8,81	2,98	1,26	7,1	-12,12	0,04	35,29	-18,20	10,61

[]: Concentración

las concentraciones evaluadas (12.5% - 100%), no se pudo determinar la CE_{50} ; por esta razón los valores de toxicidad se expresaron como porcentaje de inhibición (volumen/volumen); los cuales se obtuvieron a partir de la técnica de turbidez para las tres estaciones. En Puente Florencia se obtuvieron valores de inhibición de aproximadamente el 10% en todas las concentraciones evaluadas en el primer evento de muestreo; mientras que en el segundo y tercer muestreo sólo se obtuvo inhibición del crecimiento algal en la concentración del 100%, entre 1.26 y 2.98%. y al 50% de 0.49%. Cabe resaltar que en la concentración del 100%, se observó efecto de inhibición en los tres eventos de muestreo, en los eventos dos y tres a partir de efectos de exaltación (valores negativos en la tabla) hasta llegar a efectos de inhibición bajos.

En El Cortijo en el segundo evento no se obtuvieron efectos de inhibición, por el contrario hubo mayor crecimiento con respecto al control negativo. En el primer y tercer evento de muestreo se observó inhibición del crecimiento en todas las concentraciones evaluadas, sin embargo el efecto se presentó de forma descendente,

es decir, que en concentraciones bajas se producía más inhibición que en la muestra al 100%. En los resultados de la PTAR El Salitre, se observa que en el primer evento se obtuvieron valores de inhibición, en el segundo evento de estimulación y en el último se observaron valores de inhibición en las concentraciones del 50 y 100%.

Los resultados de toxicidad aguda obtenidos con el bioensayo *Lactuca sativa* después de exponer las semillas frente a las muestras de agua de las 3 estaciones, se presentan en la tabla 4. Los resultados de toxicidad se expresaron como porcentaje de inhibición (volumen/volumen).

Como se observa en la tabla a medida que aumentan las concentraciones desde 12.5 hasta 100%, disminuye la toxicidad en Puente Florencia en el evento uno y dos, en la concentración del 12.5% se obtuvieron efectos de inhibición del 38 y 14%, respectivamente; mientras que en la concentración al 100%, se obtuvieron porcentajes de inhibición de 18 y 0%. En el tercer evento hubo mayor crecimiento al 100% comparado con el control negativo, observándose valores negativos.

Tabla 4
Porcentaje de inhibición del crecimiento de las raíces de *L. sativa* en las diferentes concentraciones evaluadas en las muestras provenientes de Puente Florencia, El Cortijo y la PTAR El Salitre.

[]	Puente Florencia			El Cortijo			PTAR El Salitre		
	Inhibición (%)								
	Evento 1	Evento 2	Evento 3	Evento 1	Evento 2	Evento 3	Evento 1	Evento 2	Evento 3
12,5%	38	14	-4	15.3	15.2	18.5	8.6	-50.0	14.9
25,0%	18	18	9	13.8	12.0	26.4	9.1	-33.0	13.6
50,0%	14	21	16	9.2	24.0	9.3	27.1	-1.6	13.6
100,0%	18	0	-7	0.5	17.7	3.7	27.1	-0.5	23.1

[]): Concentración

Al igual que en Punta Florencia, en la muestra de El Cortijo, se observó un comportamiento heterogéneo en la respuesta, al no seguir un patrón sistemático de inhibición evidenciando además en los eventos uno y tres diferencias importantes de los porcentajes de inhibición entre las concentraciones evaluadas. En la muestra de la PTAR El Salitre en los eventos uno y tres hubo inhibición del crecimiento radicular, sin embargo en el segundo evento se observó estimulación en todas las concentraciones evaluadas.

DISCUSIÓN

Prueba de sensibilidad con *L. sativa*

En este estudio se obtuvo un valor de $CE_{50-120h}$ de 24.48 mg/L para zinc (II) diferente al reportado por Dutka (1996) que fue de 10 mg/L para el mismo tóxico de referencia; sin embargo, se debe resaltar que la variabilidad entre bioensayos fue pequeña, lo cual se refleja en el valor de coeficiente de variación obtenido en esta prueba (20%); según Robles (1998); un valor de C.V. entre 0 y 20% es bueno, lo que corrobora la reproducibilidad de la técnica.

Medio de cultivo para la proliferación de *S. capricornutum*

Con base en los resultados obtenidos en la curva de crecimiento y a los reportados en la literatura es conveniente tomar el inóculo en la fase temprana de crecimiento exponencial (día 5-10) para garantizar que durante el bioensayo de toxicidad con algas, las células sean aptas para la prueba, es decir que no van a envejecer tan rápido por estar próximas a la fase estacionaria, evitando producir falsos negativos en la prueba.

Cifuentes *et al.*, (1998) estudiaron el crecimiento de 9 cepas de microalgas en dos

medios de cultivo propuestos por la Internacional Standards Organization (ISO, 1989) y por Environmental Protection Agency (EPA, 1994) y un medio EPA modificado (enriquecido cinco veces en las concentraciones de nitrógeno y de fósforo). Como resultado obtuvieron tasas de crecimiento bajas en los medios EPA e ISO, contrario a lo ocurrido con el medio modificado, en los que observaron aumento en el crecimiento de todas las cepas y periodos prolongados de crecimiento exponencial. Para *S. capricornutum* obtuvieron tasas de crecimiento y densidades celulares de 0.79, 9.0×10^4 ; 1.33 y 4.0×10^5 ; 1.85 y 1.7×10^6 para el medio EPA, ISO y EPA modificado, respectivamente. Al comparar estos resultados con los obtenidos en la tabla 2, se observan similitudes en las densidades celulares obtenidas en las curvas de crecimiento con *S. capricornutum*, con valores promedio entre 1.1×10^6 y 7.7×10^6 .

Prueba de sensibilidad con *S. capricornutum*

Como se observa en la figura 2, se obtuvo un valor de CE_{50-96h} de 0.29 mg/L (límites entre 0.16 y 0.41 mg/L) para turbidez, similares a los reportados en la literatura por Magdaleno y De Rosa (2000) y Turbak *et al.*, (1986) 0.247 y 0.238 mg Cr^{+6} /L, respectivamente. Sin embargo Chen *et al.* (2003) reportaron valores de 12.43 mg Cr^{+6} /L. Probablemente las diferencias entre CE_{50} se deben a la variedad de técnicas empleadas en este tipo de bioensayos. Chen *et al.*, (1997) utilizaron cultivos continuos para evaluar la toxicidad de Cr^{+6} ; en investigaciones anteriores habían obtenido sensibilidades mayores en este tipo de cultivos comparados con los discontinuos (utilizados en este trabajo) debido a que la respuesta puede verse afectada cuando los nutrientes empiezan a ser limitantes. Rojièková *et al.*, (1998) compararon las metodologías con tubos de poliestireno (volumen de 15 ml) y la de erlenmeyers en

vidrio de borosilicato (volumen de 50 ó 100 ml) utilizando 12 sustancias químicas y 8 muestras ambientales, encontrando que la técnica con tubos era comparable a la técnica con erlenmeyers ($p < 0.05$) y que las dos presentaban ventajas y desventajas. En la técnica con tubos el área superficial y la cantidad de volumen total del bioensayo podría participar en la adherencia de algunos químicos en las paredes del tubo de poliestireno, de esta forma podrían obtenerse valores superiores de CE_{50} comparado con erlenmeyers. El ensayo con tubos es conveniente cuando se van a evaluar muestras que contienen sustancias volátiles. La agitación en el ensayo con botellas es homogénea y garantiza el intercambio de gases (CO_2 y O_2) punto crítico de control durante el bioensayo; además en esta técnica las células algales pueden interactuar más con la muestra gracias al volumen que se maneja.

Para determinar la variabilidad entre ensayos se calculó el coeficiente de variación para turbidez (22%), de acuerdo a Robles (1998); un valor de C.V. entre 20 y 40% es aceptable, lo que indica que hay que afinar más la técnica, sin embargo este porcentaje es muy cercano a un rango bueno de aceptabilidad.

Muestras ambientales

Los valores negativos que se observan en las tablas 3 y 4 hacen referencia a efectos de exaltación, es decir, que hubo mayor crecimiento de células algales y de las semillas de lechuga con respecto al control negativo que estaba libre de contaminantes. Resultados similares obtuvieron Manusadzianas *et al.*, (2003) al evaluar aguas residuales domésticas en Lituania y Estonia. Probablemente este comportamiento se deba a la presencia de altas concentraciones de nutrientes para estos organismos, presentes en las descargas domésticas.

De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio, se podría decir que para las condiciones del estudio no hubo un efecto claro de inhibición debido a la influencia que tuvo la presencia de materia orgánica en estas muestras de agua, lo que estimuló el crecimiento de los dos indicadores. Resultados similares obtuvieron O'Farrel *et al.*, (2002) y Olguín *et al.*, (2000) al observar un aumento en la tasa de crecimiento de las células de *S. capricornutum*, *Scenedesmus acutus* y *Chlorella pyrenoidosa* al evaluar la calidad de los ríos Luján y Reconquista (Argentina); atribuidos a las altas concentraciones de amonio, entre 0.098 - 1.45 mg/L y a las concentraciones de DBO (demanda biológica de oxígeno) entre 8.4 y 81 mg/L. En Puente Florencia se han encontrado concentraciones entre 23 y 27 mg/L de DBO, de nitrógeno total entre 0.49 y 0.53 mg/L y de fósforo total entre 0.010 y 0.22 mg/L, en El Cortijo concentraciones entre 15 y 53 mg/L para DBO, de 9.8 y 17.3 mg/L para nitrógeno y de 1.27 a 2.15 mg/L para fósforo total, valores inferiores a los obtenidos en la PTAR El Salitre con concentraciones entre 67 y 193 mg/L para DBO, de 1.5 y 64.9 mg/L para nitrógeno y de 2.67 a 26.8 mg/L para fósforo total (PUJ, 2004). Blinova (2000), también obtuvo estimulación del crecimiento en dos modelos vegetales cuando utilizó *Lemna minor* y *S. capricornutum* en la evaluación de efluentes industriales y PTAR en Estonia, atribuyendo este efecto a altas concentración de nitrógeno y fósforo, los cuales son nutrientes limitantes para muchas plantas.

Evaluación de *Lactuca sativa* y *Selenastrum capricornutum* como modelo vegetal en pruebas de toxicidad en aguas

Al comparar la toxicidad observada en Puente Florencia, con los dos modelos se encontró que *S. capricornutum* presentó efecto de inhibición en la concentración del 100% en los tres eventos de muestreo por

turbidez, mientras que en El Cortijo sólo se observó en el evento uno y tres (tabla 3). Para el bioensayo con *L. sativa* se observó toxicidad en la concentración del 100% en Puente Florencia en los eventos uno y dos (tabla 4), en la estación El Cortijo en las tres réplicas y en la PTAR El Salitre en el primer y tercer evento.

Al no encontrarse una concentración efectiva/media inhibitoria es difícil seleccionar el mejor indicador entre los dos modelos, pues ambos respondieron de manera similar a las muestras evaluadas, presentando en algunas concentraciones efectos de inhibición en porcentajes muy bajos con respecto al control negativo y en otras concentraciones, mayor crecimiento. Sin embargo los resultados obtenidos con *L. sativa*, señalan que este organismo presentó más signos de sensibilidad frente a las muestras evaluadas aunque no superaron el 50% de efecto.

A pesar de que las muestras de agua recolectadas durante el estudio tienen influencia de residuos industriales producto de las actividades antropogénicas realizadas alrededor de la zona de estudio, no se evidenció efecto tóxico. Es probable que la baja detección de toxicidad por parte de estos organismos se deba a las mezclas de los químicos en el agua que pueden a la vez interactuar con materia orgánica y otras sustancias, generando efectos de antagonismo, modificando su biodisponibilidad para *Selenastrum* y *Lactuca*. También se debe tener en cuenta que los contaminantes podrían diluirse o dispersarse en el cuerpo de agua, moverse con las corrientes y depositarse en los sedimentos.

Slabbert y Venter (1999) y Castillo (2004) señalan que se debe considerar el mayor desarrollo de los modelos vegetales en las muestras con respecto al control, ya que la exaltación u hormesis en un punto final no

debe ser interpretada como un efecto favorable o estimulante debido a que es posible que muchos compuestos a bajas concentraciones produzcan exaltación por ser micronutrientes para los vegetales, respuesta que debe ser evaluada de manera conjunta con los efectos registrados en otras pruebas. Es probable que a través de un periodo de exposición de 96 horas para las microalgas y 120 horas para las semillas de lechuga, los efectos adversos de los tóxicos se enmascaren por la cantidad de compuestos que estimulan el crecimiento (Manusad•ianas, 2003). En estudios realizados en la cuenca del río Bogotá con el bioensayo de *H. attenuata* en Puente Florencia, se obtuvieron valores entre 39.99 CE_{50-96h} y 88.59 CE_{50-96h} y en El Cortijo valores entre 2.52 CL_{50-96h} y 13.03 CL_{50-96h} ; valores que confirman que en el agua hay sustancias tóxicas que alteran la morfología de *Hydra* generando efectos de subletalidad y letalidad.

Conclusiones

Es recomendable utilizar la técnica de turbidez para estimación de la biomasa en las pruebas de sensibilidad, por ser un método rápido, sencillo y confiable. Para las curvas de crecimiento se sugiere trabajar con la técnica de cuantificación del contenido de clorofila *a* debido a que permite identificar cuando las cepas algales tienen un excelente estado fisiológico independientemente de la cantidad de biomasa determinada.

Aunque *Lactuca sativa* y *Selenastrum capricornutum* no presentaron un efecto de inhibición en su crecimiento pueden estar alertando sobre problemas de eutrofización en las estaciones de muestreo evaluadas.

Los modelos vegetales se podrían utilizar en la evaluación de efluentes industriales,

acompañados de indicadores de diferentes niveles tróficos para detectar toxicidad en las muestras.

Otro factor importante relacionado con el efecto de hormesis en los organismos de prueba es que al desempeñarse como productores en la cadena trófica, podrían estar acumulando sustancias tóxicas en su interior y el riesgo estaría asociado directamente con los organismos consumidores, debido a que se estarían generando procesos de biomagnificación, los cuales repercutirán en la población humana.

Para poder definir las ventajas del uso de estos bioensayos como modelos vegetales, es necesario realizar ensayos con aguas provenientes de otras estaciones de muestreo con diferente tipo de contaminación.

LITERATURA CITADA

- APHA, AWWA, WEF. American Public Health Association. *Standard methods for the examination of water and wastewater*, 1998, 20th edition, Washington DC, 1325.
- ARENSBERG, P., HEMMINGSEN, V.H. and NYHOLM, N. A miniscale algal toxicity test. *Chemosphere*, 1995, 30 (11), 2103-15.
- BLAISE, C. and KUSUI, T. Acute toxicity assessment of industrial effluents with a microplate based *Hydra attenuata* assay. *Environmental Toxicology Water Quality*, 1997, 12, 53-60.
- BLAISE, C., TROTTIER, S. and FORGET, G. Toxicity screening of aqueous samples using a cost-effective 72-h exposure *Selenastrum capricornutum* assay. *Environmental Toxicology*, 2000, 15, 352-9.
- BLINOVA, I. The perspective of micro-bioteest application to surface water monitoring and effluent control in Estonia. *Environmental Toxicology*, 2000, 15, 385-9.
- BOHÓRQUEZ, P. y CÁCERES, L. Puesta a punto de una batería de bioensayos CON *Hydra attenuata*, *Daphnia magna*, *Lactuca sativa* y *Allium cepa* para evaluar toxicidad en agua. Trabajo de grado. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia, 2002.
- CASTILLO, G.C., VILA, I.C., and NEILD, E. Ecotoxiciy assessment of metals and wastewater using multitrophic assays. *Environmental Toxicology*, 2000, 15, 370-5.
- CASTILLO, G. *Ensayos ecotoxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones*, 1^a edición, Centro Internacional de Investigación para el Desarrollo - CIID e Instituto Mexicano de Tecnología del Agua – IMTA, México, DF, 2004, 179.
- CHEN, H., LIN, K. and YAND, D. Comparison of the relative toxicity relationships based on batch and continuous algal toxicity tests. *Chemosphere*, 1997, 35(9), 1959-65.
- CHEN, H., PAN, G., YAN, H. and QIN, Y. Toxic effects of hexavalent chromium on the growth of blue-green microalgae. *Environmental Science*, 2003, 24(2), 13-8.
- CIFUENTES, A., SILVA, J., BAY-SCHMITH, E., LARRAIN, A. Selección de cepas de microalgas para ser utilizadas en bioensayos de toxicidad. *Gayana Oceanol*, 1998, 6 (1-2), 1-9.
- DUTKA, J.B. *Introduction to bioassay testing, Environmental Toxicology, Sample Storage and Preservation, Sample Concentration and Extraction, Qual-*

- ity Assurance/Standardization*, 1996, págs. 1-7.
- EPA. *Environmental Protection Agency*. Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms. Test method Green alga, *Selenastrum capricornutum*, growth test. EPA/600/4-91/002, 1994.
- GÓMEZ, C.E., CONTENTO, L. and CARSEN, A.E. Toxicity tests to assess pollutants removal during wastewater treatment and the quality of receiving waters in Argentina. *Environmental Toxicology*, 2001, 16, 217-24.
- HALLING, B., NYHOLM, N. and BAUN, A. Algal toxicity tests with volatile and hazardous compounds in air-tight test flasks with Co and enriched headspace. *Chemosphere*, 1996, 32 (8), 1513-26.
- ISO. *International Organization for Standardization*. Water quality-fresh water algal growth inhibition test with *Scenedesmus subpicatus* and *Selenastrum capricornutum*. ISO 8692, 1989.
- MAGDALENO, A. and DE ROSA, E. Chemical Composition and Toxicity of Waste Dump Leachates using *Selenastrum capricornutum* Printz (Chlorococcales, Chlorophyta). *Environmental Toxicology*, 2000, 15, 76-80.
- MANUSADZIANAS, L., BALKELYTE, K., SADAUSKAS, I., BLIONOVA, L., PÖLLUMAA, A. and KAHRU, A. Ecotoxicological study of Lithuanian and Estonian wastewaters *et al*: selection of the biotest, and correspondence between toxicity and chemical-based indices. *Aquatic Toxicology*, 2003, 63, 27-41.
- MAYEW, P., CUHEL, R. and NYHOLM, N. A simple in vitro fluorescence method for biomass measurements in algal growth inhibition tests. *Water Research*, 1997, 31(10), 2525-31.
- MCINNIS, R. *Short term elongation toxicity bioassay*. National Water Research Institute (NWRI). Québec, Canada, 1989, 1-7.
- Ministerio de Salud. Decreto 1594, Usos del agua y residuos líquidos, Santa Fe de Bogotá, DC, Colombia, 1984.
- MITCHELL, J.A., BURGESS, J.E. and STUETZ, R.M. Developments in ecotoxicity testing. *Reviews in Environmental Science & Bio/Technology*, 2002, 1, 169-98.
- OECD. *Organization of economic cooperation and development*. Guideline for testing of chemicals. Alga, Growth Inhibition Test, 1984.
- O'FARRELL, I., LOMBARDO, R., PINTO, P. and LOEZ, C. The assessment of water quality in the Lower Luján River (Buenos Aires, Argentina): phytoplankton and algal bioassays. *Environmental Pollution*, 2002, 120: 207-18.
- OLGUÍN, H.F., SALIBIÁN, A. and PUIG, A. Comparative sensitivity of *Scenedesmus acutus* and *Chlorella pyrenoidosa* as sentinel organisms for aquatic ecotoxicity assessment: studies on a highly polluted urban river. *Environmental Toxicology*, 2000, 15, 14-22.
- PERSOONE, G., MARSALEK, B., BLINOVA, I., TOROKNE, A., ZARINA, D., MANUSADZIANAS, L., NALECZ-JAWECKI, G., TOFAN, L., STEPANOVA, N., TOTHOVA, N. and KOLAR, B. A practical and user-friendly toxicity classification system with microbiotests for natural waters and wastewaters. *Environmental Toxicology*, 2003, 18, 395-402.

- PUJ. Pontificia Universidad Javeriana. *Monitoreo y diagnóstico de la calidad del agua del río Bogotá analizando aspectos biológicos y su impacto en la salud de las comunidades. Informe final*, 2004, 121.
- ROBLES, J.R. Metodología para el diseño de bioensayos en toxicología acuática. Tesis de posgrado. Universidad Nacional de Colombia. Colombia, 1998.
- ROJIÈKOVÁ, R., DVOØÁKOVA, D. and MARŠÁLEK, B. The use of miniaturized algal bioassays in comparison to the Standard flash assay. *Environmental Toxicology Water Quality*, 1998, 13, 235-41.
- SLABBERT, J.L. and VENTER, E.A. Biological assay for aquatic toxicity testing. *Water Science and Technology*, 1999, 39 (10-11), 367-73.
- TURBAK, S.C., OLSON, S.B. and MCFETERS, G.A. Comparison of algal assay systems for detecting waterborne herbicides and metals. *Water Research*, 1986, 20(1), 91-6.
- WONG, S.L., NAKAMOTO, L. and WAINWRIGHT, J.F. Identification of toxic metals in affected algal cells in assay of wastewaters. *Journal of Applied Phycology*, 1994, 6, 405-14.

Recibido: 04-08-2006

Aprobado: 30-08-2007