



Universidad Nacional de La Plata

Facultad de Ciencias Naturales y Museo

ESTUDIO DE LA FITOTOXICIDAD DE METALES PESADOS Y DEL HERBICIDA
GLIFOSATO EN AMBIENTES ACUÁTICOS. BIOENSAYOS CON PLANTAS
VASCULARES COMO ORGANISMOS DIAGNÓSTICO

Tesis presentada para optar por el título de Doctor en Ciencias Naturales.

Lic. María Cecilia Sobrero

Director: Dra. Alicia E. Ronco

Co- director: Ing. José Beltrano

Noviembre de 2010

INDICE

RESUMEN	I
ABSTRACT	V
I INTRODUCCIÓN	1
I.1. BIOENSAYOS DE TOXICIDAD CON PLANTAS VASCULARES	
I.1.1. Las plantas vasculares y su utilización en bioensayos de toxicidad.	4
I.2. LOS METALES PESADOS Y EL HERBICIDA GLIFOSATO EN LOS CIRCUITOS AMBIENTALES	10
I.2.1. Las plantas vasculares para la evaluación de la toxicidad y bioacumulación de metales pesados: Antecedentes.	12
I.3. ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN, CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS Y EFECTOS BIOLÓGICOS DE LOS METALES PESADOS COBRE(II), CROMO (VI) Y CADMIO (II).	16
I.3.1. Cobre	
I.3.1.1. Distribución, producción y usos	16
I.3.1.2. Absorción, translocación y acumulación del cobre en plantas vasculares	18
I.3.1.3. Funciones del Cu(II) en el metabolismo vegetal	19
I.3.1.4. Efectos fitotóxicos del Cu(II)	19
I.3.2. Cromo	
I.3.2.1. Distribución, producción y usos	20
I.3.2.2. Absorción, translocación y acumulación del cromo en plantas vasculares	22
I.3.2.3. Efectos beneficiosos del cromo.....	23
I.3.2.4. Efectos fitotóxicos del Cr(III) y Cr(VI)	23
I.3.3. Cadmio	
I.3.3.1. Distribución, producción y usos.....	25
I.3.3.2. Absorción, translocación y acumulación del cadmio en plantas vasculares	26
I.3.3.3. Efectos fitotóxicos del Cd(II)	27

I.4. CARACTERÍSTICAS, USOS, DISTRIBUCIÓN Y EFECTOS BIOLÓGICOS DEL HERBICIDA GLIFOSATO.....	29
I.4.1. Características fisicoquímicas, comportamiento en el ambiente, modo de acción y efectos fitotóxicos del glifosato	30
II HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	37
III BIOENSAYO DE TOXICIDAD CON <i>Lactuca sativa</i> L.....	40
III.1 BIOENSAYO DE TOXICIDAD AGUDA CON SEMILLAS DE <i>Lactuca sativa</i> ; OBTENCIÓN DE MATERIAL BIOLÓGICO Y PROTOCOLO DE ENSAYO DE TOXICIDAD AGUDA.	
III.1.1 Características generales de las semillas y su aplicación en bioensayos de toxicidad	41
III.1.2 Obtención, selección y conservación de las semillas	42
III.1.3 Protocolo del ensayo de toxicidad aguda	43
III.1.4 Puntos finales de evaluación de la toxicidad	44
III.1.5 Expresión de los resultados de toxicidad	47
III.1.6 Interferencias en el proceso normal de germinación o desarrollo de las plántulas	48
III.2 EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DE <i>Lactuca sativa</i> L. A LOS METALES Cu(II), Cr(VI) y Cd(II). ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS EFECTOS AGUDOS Y SUBCRÓNICOS Y EVALUACIÓN DE LA RECUPERACIÓN.	
III.2.1 Introducción y objetivos	51
III.2.2 Metodología	53
III.2.2.1 Evaluación de la toxicidad aguda de los metales Cu(II), Cr(VI) y Cd(II) en <i>L. sativa</i>	53
III.2.2.2 Evaluación de la toxicidad subcrónica del Cr(VI) en <i>L. sativa</i>	54
III.2.2.3 Evaluación de la recuperación de <i>L. sativa</i> luego de la exposición aguda al Cr(VI)	56
III.2.3 Resultados y discusión	
III.2.3.1 Evaluación de la toxicidad aguda de los metales Cu(II), Cr(VI) y Cd(II) en <i>L. sativa</i>	58
III.2.3.2 Evaluación de la toxicidad subcrónica del Cr(VI) en <i>L. sativa</i>	63
III.2.3.3 Evaluación de la recuperación de <i>L. sativa</i> luego de la exposición aguda al Cr(VI)	67

III.2.4 Conclusiones	70
IV BIOENSAYO DE TOXICIDAD SUBCRÓNICA CON LEMNÁCEAS	
IV.1. BIOENSAYO CON LEMNÁCEAS: METODOLOGÍA PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA VEGETAL EN LABORATORIO Y PROTOCOLO DE ENSAYO DE TOXICIDAD SUBCRÓNICO.	
IV.1.1 Características generales de las Lemnáceas y su aplicación en bioensayos de toxicidad	73
IV.1.2 Estructura y organización de las frondes de Lemnáceas	75
IV.1.3 Obtención e identificación de los clones de Lemnáceas utilizados en los bioensayos de toxicidad.	76
IV.1.4 Producción de biomasa de Lemnáceas en laboratorio y conservación de los clones.	78
IV.1.5 Cultivo de Lemnáceas en condiciones limitantes para el crecimiento	80
IV.1.6 Bioensayo de toxicidad subcrónica con Lemnáceas: establecimiento de las condiciones óptimas de crecimiento a lo largo del período de ensayo.	80
IV.1.7 Protocolo del ensayo de toxicidad subcrónica	82
IV.1.8 Puntos finales de evaluación de la toxicidad	83
IV.1.9 Expresión de los resultados de toxicidad	86
IV.2. CONTROL DE LA VARIACIÓN DE PH DEL MEDIO NUTRITIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA VEGETAL EN LABORATORIO Y ENSAYO DE TOXICIDAD CON LEMNÁCEAS.	
IV.2.1 Introducción y objetivos	88
IV.2.2 Metodología	
IV.2.2.1 Modificación de la concentración de NaHCO_3	89
IV.2.2.2 Modificación de la fuente de nitrógeno.....	90
IV.2.3 Resultados y discusión	
IV.2.3.1 Modificación de la concentración de NaHCO_3	90
IV.2.3.2 Modificación de la fuente de nitrógeno.....	93
IV.2.4 Conclusiones.....	96
IV.3. EVALUACION DE LA SENSIBILIDAD DE LEMNACEAS A LA EXPOSICION SUBCRONICA A COMPUESTOS PUROS: EFECTO COMPARATIVO DEL Cu(II), Cr(VI) Y Cd(II).	
IV.3.1 Introducción y objetivos	98
IV.3.2 Metodología	99

IV.3.3 Resultados y discusión	
IV.3.3.1 Toxicidad subcrónica del Cobre (II).	100
IV.3.3.1.1 Efecto del Cu(II) en la tasa de multiplicación (TM)	104
IV.3.3.1.2 Efecto del Cu(II) en el área foliar (AF)	105
IV.3.3.1.3 Efecto del Cu(II) en el contenido de clorofila (CTC)	106
IV.3.3.1.4 Efecto del Cu(II) en la relación Cla/Clb	107
IV.3.3.1.5 Sensibilidad de la respuesta de los clones de Lemnáceas	111
IV.3.3.2 Toxicidad subcrónica del Cromo (VI)	114
IV.3.3.2.1 Efecto del Cr(VI) en la tasa de multiplicación (TM)	118
IV.3.3.2.2 Efecto del Cr(VI) en el área foliar (AF)	119
IV.3.3.2.3 Efecto del Cr(VI) en el contenido de clorofila (CTC)	120
IV.3.3.2.4 Efecto del Cr(VI) en la relación Cla/Clb	121
IV.3.3.2.5 Sensibilidad de la respuesta de los clones de Lemnáceas	124
IV.3.3.3 Toxicidad subcrónica del Cadmio (II)	128
IV.3.3.3.1 Efecto del Cd(II) en la tasa de multiplicación (TM)	132
IV.3.3.3.2 Efecto del Cd(II) en el área foliar (AF)	133
IV.3.3.3.3 Efecto del Cd(II) en el contenido de clorofila (CTC)	134
IV.3.3.3.4 Efecto del Cd(II) en la relación Cla/Clb	135
IV.3.3.3.5 Sensibilidad de la respuesta de los clones de Lemnáceas	137
IV.3.3.4 Consideraciones respecto de la evaluación de la fitotoxicidad del Cu(II), Cr(VI) y Cd(II) a partir del puntos finales área foliar (AF), tasa de multiplicación (TM), contenido total de clorofila (CTC) y la relación cla/clb	141
IV.3.4 Conclusiones	148
IV.4. FITOTOXICIDAD DEL PRINCIPIO ACTIVO GLIFOSATO Y DEL FORMULADO COMERCIAL ROUNDUP®MAX EN LA ESPECIE NO BLANCO <i>Lemna gibba</i> .	
IV.4.1. Introducción y objetivos	151
IV.4.2. Metodología	152
IV.4.2.1. Análisis estadístico de los resultados	153
IV.4.3. Resultados y discusión	
IV.4.3.1. Efecto del glifosato en el crecimiento poblacional	153
IV.4.3.2. Efecto del glifosato en el crecimiento foliar	161
IV.4.3.3. Efecto en el número de frondes por colonia (NFC) y modificaciones en la arquitectura de la colonia (AC)	165
IV.4.3.4. Efectos en el contenido total de clorofila (CTC) y en la elongación de la raíz	167

IV.4.3.5. Control de calidad del ensayo	169
IV.4.4. Conclusiones	175
IV.5. BIODISPONIBILIDAD DE CONTAMINANTES EN AGUAS SUPERFICIALES: EVALUACIÓN DE LA FITOTOXICIDAD DE METALES PESADOS Y DEL HERBICIDA GLIFOSATO EN <i>Lemna gibba</i> .	
IV.5.1. Introducción y objetivos	177
IV.5.2. Metodología	179
IV.5.2.1. Muestras ambientales y determinación de parámetros fisicoquímicos.	179
IV.5.2.2. Evaluación de la toxicidad y bioacumulación de los metales pesados Cu(II), Cr(VI) y Cd(II).	181
IV.5.2.3. Evaluación de la toxicidad del herbicida glifosato (formulado comercial Roundup®Max).	182
IV.5.2.4. Análisis estadístico de los resultados y calculo de la Relación Agua- Efecto (RAE)	183
IV.5.3. Resultados y discusión	
IV.5.3.1. Biodisponibilidad del Cu(II), Cr(VI) y Cd(II) en aguas naturales. ...	183
IV.5.3.2. Bioacumulación del Cu(II), Cr(VI) y Cd(II) en aguas naturales	193
IV.5.3.3. Biodisponibilidad del herbicida glifosato (formulado comercial Roundup®Max) en aguas naturales	198
IV.5.4. Conclusiones	205
V CONCLUSIONES GENERALES	208
VI ANEXOS	
VI.1 Niveles de metales pesados en los diferentes compartimentos de ambientes acuáticos en la cuenca del Río de La Plata.	213
VII BIBLIOGRAFÍA CITADA	218

RESUMEN

Como consecuencia del uso y el vertido de contaminantes provenientes de la actividad agro-industrial y del desarrollo de grandes centros urbanos, una de las necesidades más relevantes en el manejo y la gestión medioambiental, es el desarrollo de herramientas de monitoreo para la evaluación de los efectos tóxicos de estos compuestos sobre los sistemas biológicos. Entre la metodología bioanalítica existente, la aplicación de bioensayos de toxicidad con plantas vasculares, es considerada de manera creciente en baterías de ensayo para el diagnóstico ecotoxicológico.

Vinculado a ambientes urbano industriales, la presencia de los metales pesados en aguas superficiales constituye un importante factor de riesgo para los sistemas naturales por lo que es necesario evaluar los efectos de los mismos en especies vegetales. Por otra parte, dado el importante incremento en el uso del herbicida glifosato en la Argentina, además de la creciente extensión de la frontera agrícola con cultivos resistentes (plantas transgénicas), es de relevancia conocer su fitotoxicidad en especies vegetales no blanco, representativas de la flora acuática de nuestros agroecosistemas. El efecto fitotóxico de este grupo de contaminantes no puede ser definido o predicho de manera generalizada, por lo que es necesario el estudio comparativo considerando diferentes especies diagnóstico y evaluando puntos finales que abarquen distintas respuestas fisiológicas.

El presente trabajo comprende el estudio comparativo de dos bioensayos de laboratorio con plantas vasculares: a) ensayo de toxicidad aguda (96 h) con semillas de *Lactuca sativa* (Compuesta), b) ensayo de toxicidad subcrónica (14 días) con las macrófitas *Lemna gibba* y *L. minor* (Lemnáceas). Se consideran aspectos vinculados a la estandarización del procedimiento de ensayo, así como a la evaluación de la sensibilidad de estas especies a la exposición a los metales pesados Cu(II), Cr(VI) y Cd(II), y al herbicida glifosato. Se analiza además en cada ensayo, la respuesta de diferentes puntos finales de evaluación de la fitotoxicidad, abarcando en ello diferentes etapas ontogenéticas (semilla, plántula, planta) y procesos fisiológicos distintos (germinación, elongación de radícula, producción de biomasa, fotosíntesis, producción, crecimiento y morfología foliar y modificaciones en la arquitectura de las colonias), con el fin de seleccionar aquellos que brinden mayor información acerca del modo de acción de los contaminantes y que presenten sensibilidad de respuesta frente a los mismos.

Con relación al ensayo con *L. sativa*, se evalúan los criterios y procedimientos de selección y conservación de las semillas de diferentes cultivares (poder germinativo, homogeneidad y sensibilidad en la respuesta), así como las condiciones óptimas de germinación y desarrollo de las plántulas para el ensayo en laboratorio, (luz, temperatura, sustrato, volumen de imbibición), estableciéndose un protocolo estandarizado de bioensayo de toxicidad. Se evalúa la sensibilidad

de *L. sativa* a los metales pesados abarcando los intervalos de exposición de 0,25 a 7 mgCu(II)/L, 0,75 a 7 mgCr(VI)/L y 0,1 a 10 mgCd(II)/L. Se compara la respuesta en los puntos finales a través del porcentaje de germinación, elongación y peso seco de la radícula y elongación y peso seco del hipocótilo. Para el intervalo de concentraciones utilizadas en este trabajo, no se observa inhibición en la germinación ni en el peso seco de la radícula ni del hipocótilo con ninguno de los metales estudiados, observándose inhibición significativa en la elongación de la radícula y en la elongación del hipocótilo. El punto final más sensible para la evaluación de la fitotoxicidad del Cu(II), Cr(VI) y Cd(II), mediante el bioensayo con *L. sativa* (96 h), fue la elongación de la radícula, siendo los valores de la NOEC, LOEC y la $CI_{50-96\ h}$, respectivamente, 0,1; 0,25 y 1,99 mgCu(II)/L, 0,75; 1,00 y 5,09 mgCr(VI)/L y 0,1; 0,5 y 3,72 mgCd(II)/L..

La evaluación de los efectos de los metales pesados en *L. sativa* se complementa con la comparación de las respuestas agudas y subcrónicas al Cr(VI). Se evalúa la toxicidad subcrónica (25 días) del Cr(VI) a concentraciones que no producen efecto tóxico agudo (0,05; 0,10; 0,25; 0,75 mgCr(VI)/L) y a aquellas que producen efecto agudo menor a 40 % de inhibición (1,25 mgCr(VI)/L), se comparó la respuesta y la sensibilidad mediante la determinación del contenido de clorofila, el área foliar, peso seco total y número de hojas. Se observó toxicidad significativa en todos los puntos finales, aún a 0,05 mgCr(VI)/L, siendo el área foliar y el peso seco de las plántulas los parámetro más afectados. Los valores de la $CI_{50-25\ d}$ para el área foliar, peso seco, contenido de clorofila y número de hojas son 0,09, 0,12, 0,38 y > 1,25 mgCr(VI)/L, respectivamente. La sensibilidad se incrementa significativamente, al prolongar el tiempo de exposición, lo que permite detectar fitotoxicidad en *L. sativa* aún a 0,05 mgCr(VI)/L.

Otro aspecto que se considera en este trabajo es la evaluación de la capacidad de recuperación que poseen las plántulas, previamente expuestas a dosis efectivas de tóxicos, cuando éstas continúan su desarrollo en medios no contaminados. Luego de la exposición aguda de *L. sativa* a 5,09 mgCr(VI)/L, concentración correspondiente $CI_{50-96\ h}$ para la elongación de la radícula, se evalúa la capacidad de la especie de revertir los efectos fitotóxicos agudos. Se observa, luego de 21 días de crecimiento en ausencia de tóxico, que los efectos agudos por exposición al Cr (VI) no se revierten totalmente, evidenciándose inhibición significativa en el área foliar, el peso seco y el número de hojas de las plántulas.

Para los bioensayos de toxicidad con Lemnáceas, se utilizan tres clones con diferente origen geográfico, pertenecientes a las especies *L. minor* (clon LmJ; Alemania) y *L. gibba*. (clon LgJ; Alemania y clon LgP, clon local, Bs. As.). El clon local de *L. gibba* se obtiene a partir de material colectado en el A° El Pescado (Bs. As.), implementándose la metodología de aislamiento y clonación en condiciones axénicas de laboratorio. Se establecieron las condiciones de laboratorio (luz, temperatura, composición y frecuencia de renovación de medio nutritivo) óptimas para la producción de biomasa de Lemnáceas necesaria para la ejecución del ensayo de toxicidad y para la conservación de los clones. Se establece la composición del medio nutritivo,

modificando la fuente de N y la concentración de NaHCO_3 con el fin de generar condiciones óptimas de producción de biomasa de los tres clones y reducir la variación del pH durante el periodo de ensayo.

Se consideran además, aspectos metodológicos vinculados a la estandarización del procedimiento de ensayo, estableciéndose un protocolo de ensayo de toxicidad subcrónica con Lemnáceas. La fitotoxicidad se evalúa considerando las siguientes respuestas subletales como puntos finales del ensayo: tasa de multiplicación (TM), número de frondes por colonia (NFC), área folia (AF), crecimiento foliar (CF), contenido total de clorofila (CTC) y relación cla/clb.

Se evalúa la sensibilidad intra e interespecífica frente a la exposición a los metales pesados y al herbicida glifosato, comparando la respuesta en los diferentes puntos finales de toxicidad. La toxicidad a los metales pesados se evalúa considerando los intervalos de exposición de 0,1 a 1,25 mgCu(II)/L, 0,05 a 5 mgCr(VI)/L y 0,01 a 0,35 mgCd(II)/L. Para el cobre y cromo, todas las concentraciones ensayadas inhiben significativamente alguno de los parámetros evaluados, mientras que los efectos del cadmio fueron significativos a partir de 0,025 mg/L. Si bien los tres metales afectan todos los parámetros finales de respuesta, la sensibilidad de estos es variable y dependiente de la concentración de exposición y del metal considerado. En la exposición al cobre, el AF es el parámetro más sensible, aún a bajos niveles de metal. Para el clon más sensible (clon LgJ), los valores de la LOEC y CI_{50} son 0,1 y 0,68 mgCu(II)/L, respectivamente. Para el cromo, el clon más sensible a bajas concentraciones es *L.minor*, siendo los valores de la LOEC de 0,1 mgCr(VI)/L, para la TM, mientras que a mayores niveles de exposición la mayor sensibilidad se ve en el clon LgP en el CTC: CI_{50} 0,9 mgCr(VI)/L. Al evaluar los efectos del cadmio, el clon más sensible es el local (clon LgP), siendo los valores de la LOEC 0,025 mgCd(II)/L, para la TM, y 0,13 mgCd(II)/L la CI_{50} en el CTC. La relación cla/clb no es un parámetro de buena sensibilidad, aunque aporta información relevante acerca del mayor efecto de los tres metales sobre la cla, respecto de la clb.. Para los tres metales se observa, alteraciones en el NFC, en la arquitectura de la colonia (AC), en la morfología foliar (MF) e inhibición en el crecimiento de las raíces.

No obstante la variabilidad intra e interespecífica, de los tres clones utilizados presentan buena sensibilidad a los metales, los valores de CI o LOEC están en el orden de lo informado en la bibliografía para diferentes especies y puntos finales. Al comparar con los resultados obtenidos con *L. sativa* en exposiciones agudas, la sensibilidad del ensayo con Lemnáceas es 3, 5,6 y 28 veces mayor para el cobre, cromo y cadmio, respectivamente. No obstante esto, la exposición subcrónica (25 d) de *L. sativa* al cromo indica que la sensibilidad en esta especie, al aumentar el tiempo de exposición, supera a la de las Lemnáceas. El valor de LOEC para la TM en el clon más sensible a este metal (LmJ) es 0,1 mgCr(VI)/L mientras que a 0,05 mgCr(VI)/L se observa el 45% de inhibición en el peso seco de *L. sativa*. Los resultados obtenidos indican que, en ensayos subcrónicos, la sensibilidad de *L. sativa* al cromo es, dependiendo del punto final considerado, entre 28 y 2,4 veces mayor que en las Lemnáceas.

Se analiza la sensibilidad del clon local de *L.gibba* al herbicida glifosato comparando la toxicidad del principio activo (p.a.) y del formulado Roundup (entre 0,5 y 80 mgp.a./L), evaluando su variación con el tiempo de exposición (7 y 10 días) y en los diferentes puntos finales. Los efectos del formulado fueron mayores al del p.a. en todos los puntos finales siendo el CF el parámetro más afectado (LOEC:1,0 CI_{50-10d} :8,8 mgp.a./L). Los efectos se incrementan con el tiempo de exposición, siendo las frondes hijas las más afectadas. Se observan alteraciones en la MF, en la AC y en el NFC, además de clorosis marcada y daño de las raíces. La sensibilidad del clon local (LgP) al herbicida glifosato está en el orden de lo informado en la bibliografía para diferentes especies y puntos finales, detectando toxicidad a concentraciones relevantes para ambientes acuáticos de agroecosistemas de la región pampeana.

Se evalúa en *L.gibba* (clon LgP) la biodisponibilidad del Cu(II), Cd(II) y Cr(VI) y del herbicida glifosato en cuerpos de agua superficial con características fisicoquímicas diferentes. Se compara la toxicidad, y fitoacumulación para los metales, por exposición en la solución nutritiva de crecimiento y en el agua de arroyos de la Pcia. de Buenos Aires. La biodisponibilidad de los metales disminuye en aguas naturales. El cálculo de la Relación Agua-Efecto (RAE: $CI_{Arroyo}/CI_{Solución\ nutritiva}$) muestra los valores máximos para el Cd(II), seguido del Cr(VI) y, en tercer lugar, el Cu(II), indicando que es con el cadmio donde más se modificó la biodisponibilidad al realizar la exposición en aguas naturales. La reducción de la biodisponibilidad se verifica también para el glifosato cuando la exposición es en aguas naturales. La bioacumulación de los 3 metales fue significativa en todos los medios y se incrementa con la concentración de exposición, aún a niveles tóxicos, siendo máxima en solución nutritiva y reduciéndose con la menor biodisponibilidad en los arroyos.

La respuesta observada en los bioensayos de toxicidad con semillas de *L. sativa* y Lemnáceas en la exposición aguda y subcrónica al cobre, cromo y cadmio, y al herbicida glifosato, sugieren el posible uso de estas especies como herramienta de control en muestras ambientales, presentando alta sensibilidad para detectar los niveles de metales posibles de encontrar en efluentes industriales o en sitios de vuelco de los mismos, así como del glifosato para agroecosistemas, siendo factible su empleo como especies diagnóstico representativas en estudios ecotoxicológicos en la región. Por otro lado, conocer los umbrales de respuesta de estos contaminantes para los diferentes puntos finales, tanto para exposiciones agudas o subcrónicas, así como la variación de su biodisponibilidad en medios naturales, aporta información de interés para el establecimiento de niveles guía de protección ambiental, además de la certificación de productos agro-industriales previo a su introducción en los circuitos ambientales.

ABSTRACT

As consequence of the introduction of pollutants the environment from industrial and agricultural activity, and of urbanized areas, new tools for the assessment of biological effects of toxicants have been developed and introduced within management practices. Between these strategies, the use of toxicity tests with vascular plants has been taken into account in ecotoxicological evaluations.

Related to urban and industrial environments, the presence of heavy metals in surface waters has been considered an important source of risk in natural systems, consequently the relevance of the assessment of effects on plant species. On the other hand, given the enormous increment in the use of glyphosate in Argentina, together with an increase in the extension of cultivated areas with biotech crops resistant to this herbicide, the knowledge related to the effects of this compound on non target vascular aquatic plants from our agroecosystems has become highly relevant. Phytotoxicity of this group of pollutants could not be predicted in a generalized manner. It is necessary to perform comparative studies including different species, assessing diverse end-points covering different physiological responses.

The present study deals on a comparative assessment of the response of two laboratory bioassays using vascular plants: the acute toxicity test (96h) with seeds of *Lactuca sativa* (Compositae), and the subchronic toxicity test (14 d) with the macrophytes *Lemna gibba* and *L. minor* (Lemnaceae). The study covers the standardization of test procedures as well as the assessment of sensitivity of these species to metals Cu(II), Cr(VI) and Cd(II), and to the herbicide glyphosate. It is also evaluated the response of different end-points in the phytotoxicity, considering diverse ontogenic levels (seed, seedling, plant) and physiological processes (germination, root elongation, biomass production, photosynthesis, foliar production, growth and morphology, effects on colony architecture), with the aim of selecting those providing further information on the mode of action of contaminants and exhibiting sensitive response before them.

In relation with the *L. sativa* test, several points were taken into account, such as: criteria and procedures of selection and conservation of seed cultivars (germination capacity, homogeneity and sensibility of responses), as well as the optimum germination conditions and development of seedlings for testing in laboratory conditions (light, temperature, substrate, imbibition volume), defining a standardized protocol for toxicity tests. The sensitivity of *L. sativa* to the metals was assessed within concentration ranges of exposure of 0.25 to 7 mgCu(II)/L; 0.75 to 7 mgCr(VI)/L; and 0.1 to 10 mgCd(II)/L. A comparison between the response of germination, root and hypocotyl elongation and dry weight were assessed. No inhibition in the germination, dry weight of root and hypocotyl was detected within the tested concentration ranges of the studied metals, observing significant reduction in the elongation of root and in the

hypocotyl. The most sensitive end-point for the assessment of Cu(II), Cr(VI) and Cd(II) phytotoxicity with *L. sativa* (96h) test is the root elongation, being the NOEC, LOEC and $CI_{50-96\text{ h}}$ values, respectively, 0.1, 0.25 y 1.99 mgCu(II)/L, 0.75, 1.00 y 5.09 mgCr(VI)/L and 0.1, 0.5 and 3.72 mgCd(II)/L.

The study of the effects of metals on *L. sativa* was complemented with a comparison between acute and subchronic responses to Cr(VI). The assessment of the subchronic toxicity (25d) to chromium was performed within the range of those not inducing acute effects (0.05, 0.10, 0.25 and 0.75 mg (Cr(VI)/L) and to concentrations inducing acute effects below 40% (1.25 mgCr(VI)/L), comparing the response and sensitivity in the chlorophyll content, leaf area, total dry weight and number of leaves. It was evident significant toxicity on all end-points, even at 0.05 mg/L, being the leaf area and dry weight of seedlings the most affected. The $CI_{50-25\text{ d}}$ for leaf area, dry weight, chlorophyll content and number of leaves 0.09, 0.12, 0.38 y >1.25 mgCr(VI)/L, respectively. The sensitivity of the species significantly increments at longer exposure time, allowing to detect phytotoxicity on *L. sativa* down to a concentration of 0.05 mgCr(VI)/L.

Another aspect considered in this study was the evaluation of the capacity of recovery of plants that were previously exposed to effectively toxic levels, when they keep developing in non contaminated media. After the exposure of *L. sativa* to 5.09 mgCr(VI)/L ($CI_{50-96\text{ h}}$ value for root elongation), it was studied the capacity of this plant species to revert effects from acute exposure. It could be seen that after 21 days of growth in non contaminated media, acute effects to chromium were not completely reverted, exhibiting significant inhibition in the leaf area, dry weight and number of leaves of plants.

The study of effects with Lemnaceae was carried using three clones from different geographical origin, belonging to the species *L. minor* (clon LmJ; Germany) and *L. gibba* (clone LgJ; Germany and clon LgP, local clon, Buenos Aires). The source of the local clone was obtained from material collected in El Pescado stream (Buenos Aires), implementing methods of isolation and cloning in axenic laboratory conditions. Optimum conditions of growth (light, temperature, growth media composition and frequency of renewal, between others) were obtained for biomass production of organisms used in toxicity testing and for clone maintenance. It was established the composition of growth media, modifying the source of N ($125\mu\text{M NH}_4\text{NO}_3$) and the concentration of NaHCO_3 ($250\mu\text{M NaHCO}_3$) aiming towards optimal conditions of biomass production of the three clones and a reduction of the pH drift during toxicity testing.

Other further methodological aspects were also taken into account in relation to the standardization of a procedure for subchronic toxicity testing with Lemnaceae. Phytotoxicity was assessed by means of the following sublethal end-points: growth rate (GR), number of fronds

per colony (NFC), leaf area (LA), leaf growth (LG), total chlorophyll content (TCC) and the cla/clb ratio.

The intra and inter specific sensitivity of Lemnaceae was assessed before exposure to heavy metals and the herbicide glyphosate, comparing the response of different end-points. Toxicity to metals was studied under exposure to the following metal concentrations: 0.1 a 1.25 mgCu(II)/L, 0.05 a 5 mgCr(VI)/L y 0.01 a 0.35 mgCd(II)/L. All tested concentrations of copper and chromium significantly inhibited some of the tested parameters, while cadmium induced toxic effects from 0.025 mg/L. Although the three metals affect all tested end-points, sensitivity of them is variable and dependent of the exposure concentration and studied metal. Copper exposure induced higher effects on FA, being this the most sensitive parameter, even at low levels of the metal. For the most sensitive clone (LgJ), the LOEC and CI_{50} values were 0.1 y 0.68 mgCu(II)/L, respectively. The most sensitive clone to low concentrations of chromium was the one of *L. minor*, being the LOEC values of 0.1 mgCr(VI)/L for GR, while at higher concentrations of exposure it was detected higher sensitivity on clone LgP for TCC: CI_{50} 0.9 mgCr(VI)/L. When assessing the effects of cadmium it was detected higher sensitivity with the local clone (LgP), with a LOEC of 0.025 mgCd(II)/L for GR, and 0.13 mgCd(II)/L the TCC CI_{50} . The cla/clb ratio did not appear being a sensitive end-point, though it provides relevant information on higher effects of the three studied metals on cla respect to clb. The three metals induce effects on NFC, colony architecture (CA), leaf morphology (LM) and root growth inhibition.

Although the intra and inter specific variability, the three clones showed good sensitivity to metals, being the IC and LOEC within the order of reported values in the literature for different end points and test species. When comparing obtained results with the macrophyte with those observed for acute exposure with *L. sativa*, sensitivity of Lemnaceae to copper, chromium and cadmium is 3; 5.6 and 28 times higher, respectively. Although, *L. sativa* under subchronic exposure (25 d) shows high sensitivity to chromium, being under this condition more sensitive than Lemnaceae. The GR LOEC value for the most sensitive clone to chromium (LmJ) is 0.1 mg(Cr(VI)/L, while at 0.05 mg(Cr(VI)/L it could be seen 45% inhibition on the dry weight of *L. sativa*. Results indicate a good sensitivity of *L. sativa* in subchronic tests, being between 28 and 2.4 times higher than Lemnaceae, depending on the end-point being compared.

The sensitivity of the local clone of *L. gibba* was tested with glyphosate active ingredient (a.i.) and the Roundup formulation (between 0.5 and 80 mg ai/L), assessing the variation of the response on different end-points along the time of exposure (7 and 10 d). Observed effects were higher with the a.i. for all tested end-points, being the leaf growth the most affected (LOEC:1.0 CI_{50-10d} :8,8 mg a.i/L). Effects increase with time of exposure, being the daughter fronds the most affected. Alterations in MF, AC, LM, CA and number of fronds per colony, marked chlorosis and root damage were detected. Sensitivity of the local clone to the herbicide

is within the reported values from literature for different end-points and species, detecting toxicity at concentrations environmentally relevant in agroecosystems of the Pampas region.

The assessment of the bioavailability of Cu(II), Cd(II), Cr(VI) and the herbicide glyphosate on the local clone of *L. gibba* was carried in water from streams with different physicochemical properties. Toxicity and also metal phytoaccumulation was evaluated and compared in tests using growth media and tests with stream water. Bioavailability of metals is lower in stream water. The Water Effect Ratio (WER: $IC_{stream}/IC_{nutrient\ solution}$) shows maxima for Cd(II), followed by Cr(VI), indicating that cadmium bioavailability is the most modified in natural waters. Significant bioaccumulation of the three metals was observed, increasing with exposure time, even at toxic levels, being higher in nutrient growth.

The acute and subchronic response on *L. sativa* seeds and Lemnaceae to copper, chromium and cadmium, and the herbicide glyphosate, indicate the potential use of these species as control tools in toxicity testing of environmental samples, showing high sensitivity for detecting effects of metals at concentration levels found in industrial effluents or sites of discharges. Also, at glyphosate concentrations that are detected in agroecosystems. They are relevant assessment tests that could be employed in ecotoxicological studies in the region. Knowledge of threshold levels of pollutants on different end-points, for acute and subchronic exposure, and the variation of bioavailability in natural waters provides relevant information when defining protection guideline concentrations, and also, for products certification before their introduction in the environment.

I INTRODUCCIÓN

I INTRODUCCIÓN

No resulta novedoso y mucho menos discutible, que como resultado del aumento de la población y el gran desarrollo urbano a nivel mundial, situación ésta que va inexorablemente de la mano de la industrialización y de un gran avance tecnológico y agropecuario, tanto los países desarrollados, como aquellos en desarrollo, se enfrentan a serios problemas toxicológicos y ecotoxicológicos originados por la utilización de una alta diversidad de compuestos tóxicos y su vertido en los ambientes naturales (Zakrzewski,1991; Harrison,1992; Baird, 2001; Manahan, 2007).

Dada su alta complejidad, a la vez que diversidad, los sistemas acuáticos son significativamente vulnerables a la contaminación, ya que constituyen los receptores naturales de la gran mayoría de las sustancias tóxicas que a diario emiten y producen la industria, así como la agricultura y más aún, nuestras actividades domésticas (Wetzel, 1981; Laws, 1993; Manahan, 2007). Las alteraciones que los contaminantes generan en los ecosistemas acuáticos como lagunas, arroyos, ríos, estuarios, etc., son el resultado de los efectos letales y subletales sobre los individuos de diferente escala trófica (productores-consumidores-descomponedores) y distinto nivel de organización (microorganismos-invertebrados-vertebrados-algas-plantas vasculares). Estos efectos a nivel individual, repercuten luego a niveles mayores de organización alterando la estructura y dinámica de las poblaciones y comunidades y, consecuentemente, el equilibrio de los ecosistemas (Wetzel, 1981; Margalef, 1983; Newman & Jagoe,1996). La incorporación de compuestos contaminantes a los sistemas acuáticos no solo afecta a los componentes bióticos de los mismos, sino que limita además el uso de los recursos acuáticos (consumo humano, recreativo, agrícola, industrial), poniendo incluso en riesgo a la salud humana (Margalef, 1983; Zakrzewski,1991; Laws, 1993; Manahan, 2007).

A pesar del gran desarrollo de metodologías analíticas y la avanzada tecnología instrumental disponible en la actualidad para el monitoreo físicoquímico de efluentes y cuerpos de agua receptores, este enfoque, aunque muy valioso, sólo permite identificar y cuantificar los diferentes constituyentes descargados en el sistema (APHA-AWWA-WEF, 1998; Manahan, 2007). Estimar los efectos en la biota basándose exclusivamente en este tipo de datos es incompleto por diferentes razones. Por un lado, conocer la composición química de un efluente no proporciona información sobre sus efectos biológicos en el cuerpo de agua receptor. Por otra parte, cuando una sustancia se incorpora en un sistema acuático, las reacciones químicas que puedan ocurrir al producirse esta mezcla pueden modificar significativamente la biodisponibilidad de la sustancia, aumentando o disminuyendo su toxicidad. Para el caso de mezclas de diferentes compuestos, no es posible predecir su toxicidad, aún conociendo las toxicidades de sus componentes individuales, dada la posibilidad de que se generen efectos

sinérgicos, aditivos o antagónicos de los contaminantes en los sistemas vivos. Todo esto sin considerar que monitorear todos los constituyentes en un efluente o cuerpo de agua superficial puede implicar costos elevados además de su baja practicidad (Burton, 1990; Cairns & Mount, 1990; Newman & Jagoe, 1996; Castillo, 2004).

No existen herramientas analíticas ni instrumentales para medir la toxicidad. Es sólo mediante el uso de organismos vivos que podemos estimar los efectos de los contaminantes en los sistemas biológicos. La ecotoxicología es una rama de la ciencia que integra conceptos de ecología y toxicología (Zakrzewski, 1991; Newman & Jagoe, 1996). El término "ecotoxicología" fue establecido por Thuhaut en 1969 haciendo referencia al estudio del efecto y destino de los contaminantes en los ecosistemas. Estudia y analiza los efectos de agentes químicos y físicos vertidos en diferentes compartimentos ambientales sobre los organismos vivos, con particular atención a poblaciones y comunidades de ecosistemas definidos (Burton, 1990; Cairns & Mount, 1990; Newman & Jagoe, 1996)

La ecotoxicología aplicada tiene como objetivo el desarrollo de protocolos de ensayos biológicos estandarizados (bioensayos de toxicidad) que puedan ser utilizados como herramientas de diagnóstico y predicción temprana que permitan definir umbrales permisibles, con niveles de incertidumbre aceptables, y sirvan de guía a las entidades reguladoras para la toma de decisiones, además de su aplicación en la evaluación de riesgo ecológico de los efectos adversos de las actividades antrópicas en ambientes naturales (Suter, 1993; Environment Canada 1999a, Castillo, 2004).

Los ensayos biológicos permiten determinar la toxicidad de agentes físicos y químicos sobre los organismos de prueba, bajo condiciones experimentales específicas y controladas. La toxicidad o capacidad de una sustancia de generar un efecto nocivo en un organismo vivo, estará condicionada a sus características fisicoquímicas así como a la concentración y frecuencia y tiempo de exposición (*Exposición aguda, subcrónica, crónica*). Los efectos adversos en un individuo pueden ser tanto de inhibición como de magnificación, generando desde la muerte del individuo (*efecto letal*) o produciendo una gran diversidad de respuestas a distintos niveles de la organización biológica (*efectos subletales*), que van desde alteraciones bioquímicas y celulares, incluyendo genotoxicidad y disrupciones endócrinas, alteraciones a nivel morfológico y fisiológico, efectos en el crecimiento y desarrollo, además de alteraciones en parámetros poblacionales. En cada bioensayo de toxicidad se cuantifica uno o varios de estos efectos nocivos, denominándose a cada uno de estos parámetros seleccionados como *punto final de evaluación de la toxicidad* (Dutka, 1989; Boutin et al., 1993; APHA-AWWA-WEF, 1998; Environment Canada, 1999a)

A pesar de haber un alcance limitado en el uso de la información proveniente de los ensayos de toxicidad para su extrapolación a escala ambiental, los estudios con organismos en laboratorio, en condiciones controladas y estandarizadas para la evaluación de respuestas, constituyen la fuente de información predominante para la evaluación ecológica de los efectos

de los contaminantes (Cairns & Mount, 1990; Newman & Jagoe, 1996; Environment Canada, 1999a; Castillo, 2004). Los bioensayos estandarizados de uso corriente en sistemas acuáticos, normalmente recurren al uso de diferentes especies diagnóstico de microorganismos (bacterias, levaduras, algas unicelulares), pequeños invertebrados (rotíferos, cladóceros, anfípodos, larvas de insectos, etc.) larvas de anfibios, peces y plantas vasculares, en los que se evalúa el efecto tóxico en exposiciones agudas o crónicas tanto a compuestos puros, intentando determinar niveles de concentración aconsejables en los circuitos ambientales, como a mezclas contaminantes provenientes de fuentes puntuales y difusas. Estos bioensayos son recomendados por organismos de protección del medio ambiente tales como la USEPA -Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos-(USEPA, 1989, 1990, 1991b, 1994) y la Agencia Ambiental de Canadá (Blaise et al., 1988; Dutka, 1989; Environment Canada, 1999a, 2007), además de la Organización para el Desarrollo y Cooperación Económica (OECD, 1987, 2002) y la Asociación Americana para la Salud Pública (APHA-AWWA-WEF, 1998).

I.1 BIOENSAYOS DE TOXICIDAD CON PLANTAS VASCULARES

I.1.1 Las plantas vasculares y su utilización en bioensayos de toxicidad

Los vegetales juegan un rol fundamental, tanto en los ecosistemas acuáticos como terrestres, por su importancia en la productividad primaria y en el reciclado de nutrientes, además de proporcionar alimento y hábitat para otros organismos. Si bien las algas constituyen los principales productores primarios en los ecosistemas acuáticos, principalmente en grandes cuerpos de agua, existe un delicado balance en el desarrollo de las poblaciones algales y el de macrófitas vasculares (plantas vasculares con hojas flotantes, emergentes o totalmente sumergidas; libres o arraigadas al sustrato), el cual sirve de sustento para el mantenimiento de la diversidad específica de los niveles tróficos superiores. En un cuerpo de agua superficial, las plantas vasculares proveen de alimento a muchas especies animales y generan diversidad de hábitats, proporcionando refugio frente a predadores, áreas de cría más protegidas y sustrato para otras comunidades, además de contribuir en la regulación del flujo de agua (Margalef, 1983; Boutin et al., 1995; Mohan & Hosetti, 1999). Por otra parte, la vegetación de las márgenes constituye el hábitat y área de nidificación de numerosas especies silvestres de aves y mamíferos así como de muchos insectos terrestres que sirven de alimento a peces y otros organismos del ambiente acuático (Boutin et al., 1993; Correll, 2005). Por otra parte, la flora riparia y la asociada a márgenes de cuerpos de agua lénticos como los lagos, lagunas y esteros, contribuyen a mantener la estabilidad del suelo reduciendo la erosión, además de aportar energía al sistema a través de hojas y otros restos de biomasa que ingresan al mismo (Wetzel, 1981). Los cambios en la dinámica de las comunidades tanto de algas como de plantas vasculares, pueden afectar no sólo a la biota asociada a niveles tróficos superiores sino

que generan además un deterioro en la calidad del agua para sus diferentes usos, sea agua de bebida, riego o de uso recreacional (Wetzel, 1981; Margalef, 1983; Lewis, 1995; Mohan & Hosetti, 1999). Para el caso de los agroecosistemas, un buen desarrollo de la flora riparia en los cuerpos de agua asociados a campos con cultivos, cumple un rol fundamental en la atenuación del impacto de los agroquímicos sobre el cuerpo de agua, tanto de aquellos provenientes por deriva de las aplicaciones o lo movilizado por escurrimiento o escorrentía superficial asociada a los eventos de lluvia (Marrs et al., 1993; Boutin et al. 2003; Syversen & Bechmann, 2004; Correll, 2005).

A pesar de la importancia que las plantas vasculares tienen en el mantenimiento de la salud de los ambientes dulceacuícolas, son pocos los ensayos estandarizados en los que se aplican estos organismos en la evaluación y cuantificación de la toxicidad de contaminantes en estos ambientes, si lo comparamos con la gran diversidad de ensayos en los que utilizan microorganismos y organismos animales como pequeños invertebrados, larvas de anfibios y peces (USEPA, 1985; Wang, 1987; USEPA, 1989; Wang, 1990; Boutin et al., 1995; Lewis, 1995; USEPA, 1993,1994; Environment Canada, 1999a,b, 2007)

Históricamente se ha considerado a las plantas acuáticas con menor sensibilidad que las especies animales frente a la exposición a compuestos tóxicos, generándose, consecuentemente, un menor desarrollo de protocolos de ensayo con especies vegetales y bibliografía referida a datos de fitotoxicidad, así como una menor aplicación de estos bioensayos en el registro de nuevas sustancias (con excepción de los herbicidas) y en la evaluación de la toxicidad de sustancias peligrosas (Lewis, 1995; Wang & Freemark, 1995; Mohan & Hosetti, 1999). Se considera, erróneamente, que los resultados de los ensayos de toxicidad con especies animales pueden ser extrapolados para la protección de especies vegetales (Mohan & Hosetti, 1999; Lytle & Lytle, 2001). Un ejemplo concreto de esta situación para nuestro país, lo demuestra la aplicación de datos bibliográficos de toxicidad del herbicida glifosato, por parte de la Subsecretaria de Recursos Hídricos de la Nación (SRHN, 2003a), para el "Desarrollo de niveles guía nacionales de calidad de agua ambiente para el herbicida glifosato". En la elaboración de estos niveles guía, la SRHN se basó en solamente 9 datos bibliográficos de fitotoxicidad de este herbicida mientras que se consideraron 55 antecedentes de toxicidad para especies animales (peces, mayoritariamente, anfibios, crustáceos e insectos). De los datos de fitotoxicidad, 5 corresponden a algas de las especies *Selenastrum capricornutum*, *Chlorella sorokiniana* y *Ch. pyrenoidosa* y 4 a plantas vasculares (*Lemna gibba*, *L. minor*, *Potamogeton pectinatus* y *Myriophyllum sibiricum*). Esto mismo se observa para el desarrollo de niveles guía nacionales de calidad de agua ambiente para el cadmio, cromo y cobre. Para la elaboración de los niveles de cadmio se consideraron 34 datos de toxicidad en animales y 12 antecedentes de fitotoxicidad de los cuales sólo dos corresponden a macrófitas (*Lemna trisulca* y *Marsilea minuta*) pero ninguna de ellas es nativa en nuestro territorio (SRHN, 2003b). Una situación similar se verifica para el cobre, con 56 datos para especies animales,

13 para algas y dos macrófitas exóticas, *L. minor* y *Elodea canadensis* (SRHN, 2005). Para el caso del cromo, se fueron 114 los antecedentes de toxicidad en especies animales, considerándose sólo 6 datos de especies de algas, y ninguno de macrófitas, para estimar la fitotoxicidad (SRHN, 2004).

Para la evaluación de la fitotoxicidad en muestras de agua, efluentes, compuestos puros, etc., las microalgas han sido los primeros organismos seleccionados y que más extensivamente se han utilizado en las baterías de bioensayos de toxicidad (OECD, 1984a; Dutka, 1989; Lewis, 1995; Mohan & Hosetti, 1999; Castillo, 2004). Entre los ensayos más difundidos se encuentran los que utilizan especies de los géneros *Selenastrum*, *Chlorella*, *Scenedesmus*, entre las clorofitas, además de especies de diatomáceas (*Navicula*, *Dunaliella*) y cianofitas (*Anabaena*, *Microcystis*). En variadas aplicaciones, los resultados de fitotoxicidad obtenidos con especies algales se extrapolan a la evaluación de los efectos sobre macrófitas o incluso a plantas terrestres. Si bien las algas son organismos fotosintetizadores y comparten numerosas rutas metabólicas con las plantas vasculares, la sola consideración de la complejidad estructural de estas últimas, amerita la integración de ambos grupos de organismos productores en la evaluación de efectos fitotóxicos, sin considerar a los ensayos con especies algales como herramientas diagnósticas que puedan reemplazar a aquello con plantas vasculares, sino como metodologías que aportan información complementaria.

El uso de plantas vasculares se ha remitido principalmente a la evaluación de efectos tóxicos, genotóxicos y estudios de exposición en ecosistemas terrestres, en especial considerando el daño en cultivos y especies de interés agronómico, y en estudios de contaminación atmosférica (Tardiff & Goldstein, 1988; Tardiff, 1988; Bourdeau et al., 1990; Wang & Freemark, 1995; Lytle & Lytle, 2001; Wu & Zhang; 2002). Respecto de su aplicación en la evaluación de la calidad de ambientes, ésta ha sido principalmente usada en el monitoreo *in situ* -especies centinela- (Burton, 1986; Franzaring et al., 1992; Lytle & Lytle, 2001) y, con un creciente desarrollo en los últimos años, en procesos de bioremediación, utilizándolos para la remoción de sólidos en suspensión, nutrientes, metales pesados, tóxicos, etc., ya sea en cuerpos de agua naturales y artificiales como así también en plantas industriales (Delgado et al, 1993; Dushenkov. et al, 1995; Lewis, 1995; Wahaab et al, 1995; Miretzky et al., 2004; Hadad et al., 2006; Maine et al., 2007).

Las especies vegetales presentan diferente sensibilidad frente a los distintos contaminantes debido a sus diferentes características biológicas, fisiología, morfología, estructura, hábitat y rol ecológico, además de la variación asociada a las diferentes vías de exposición a los tóxicos (contacto directo, a través del agua o suelo) y estado ontogenético durante la exposición (semilla, plántula, planta) (Boutin et al., 1993; Mohan & Hosetti, 1999). Si comparamos la sensibilidad en la respuesta de los bioensayos con especies animales respecto de aquellos con vegetales, no existen tendencias claramente definidas cuando se establecen estas comparaciones. En general las variaciones en la sensibilidad dependen del tipo de

muestra analizada, punto final de evaluación del efecto, nivel de organización y trófico de la especie, tiempo de exposición, etc. (Wang, 1990; Lewis, 1995; Mohan & Hosetti, 1999). Dado que no es posible establecer patrones generales de respuesta frente a una muestra ambiental o compuesto determinado y que los efectos fitotóxicos no pueden extrapolarse a partir de la respuesta evaluada en organismos animales, es importante la aplicación de baterías de ensayo en las que se consideren, además de especies animales y microalgas, bioensayos estandarizados con plantas vasculares.

Ante esta situación se considera relevante obtener información sistemática y comparativa de los niveles de toxicidad y el daño que ocasionan distintos contaminantes ambientales sobre especies vegetales, a pesar de que existan datos fitotoxicológicos de una amplia variedad de compuestos orgánicos e inorgánicos (Wang, 1987; van Assche et al., 1988; Barceló & Poschenrieder, 1989; Cheung et al., 1989; Stefani et al., 1991; Hulzebos et al., 1993; Arambašić et al., 1995), además de numerosos trabajos fisiológicos evaluando efectos nocivos y exposición en plantas superiores (Caux et al., 1988; McKenna et al., 1993; Jayaprakash et al., 1994; Prasad et al., 2001).

En los ambientes acuáticos, la aplicación de bioensayos de toxicidad estandarizados con plantas vasculares constituyen una excelente herramienta de diagnóstico para la evaluación de la toxicidad de aguas superficiales, efluentes municipales e industriales, de muestras de sedimentos y lixiviados de residuos peligrosos, así como en el establecimiento de niveles guía de concentración en ambientes acuáticos, además de la certificación de productos agroindustriales, previo a su introducción en los circuitos ambientales (Boutin et al., 1993; Mohan & Hosetti, 1999; Lytle & Lytle, 2001; Castillo 2004). Este tipo de información, además de los aportes al conocimiento y la comprensión de los mecanismos de acción de contaminantes, permitiría la incorporación de datos de fitotoxicidad, no extrapolables a partir de ensayos con organismos animales, para establecer niveles guía de protección ambiental así como en cálculos de estimación de riesgo de ecosistemas acuáticos (van Leeuwen, 1990; Huebert y Shay, 1993a; Suter, 1993).

Actualmente en Argentina, son pocas las situaciones en las que se consideran bioensayos de toxicidad, ya sea para el control ambiental o en la certificación de productos nuevos, aunque progresivamente se van incorporando cada vez más en la legislación nacional y provincial, exigencias de evaluaciones ecotoxicológicas. Se mencionan a continuación, algunos ejemplos.

La Ley Nacional N° 24.051/92 de residuos peligrosos y su Decreto Reglamentario 831/93 establece en su Anexo IV que entre las características de riesgo que permiten identificar a un residuo como peligroso se debe considerar la toxicidad humana, ecotoxicidad, teratogenicidad, mutagenicidad y carcinogenicidad del mismo. La Resolución 619/98 de esta misma ley, reglamenta la habilitación del uso de productos biológicos en el tratamiento de residuos

peligrosos, estableciendo los ensayos de toxicidad (alga-crustáceo-pez) necesarios para certificar que dichos productos no son ecotóxicos.

Para el caso de Buenos Aires, la Ley Provincial N° 11.720 de residuos especiales y su Decreto Reglamentario 806/97, de manera similar a lo que ocurre a nivel nacional, considera la ecotoxicidad del residuo entre los criterios de caracterización de los mismos, pero sin dar especificaciones acerca del tipo de bioensayo o metodología a aplicar, ni establece criterios o niveles guía para la evaluación del riesgo ecotoxicológico de los residuos.

La Prefectura Naval Argentina, en la Ordenanza Marítima N°1/98 establece los niveles de toxicidad permitidos, en la aplicación de bioensayos con microcrustáceos (*Artemia franciscana*) y peces (*Cnesterodon descenmaculatus*), para la certificación y regulación del uso de productos dispersantes para limpieza y en el control de derrames de hidrocarburos en ambientes marinos.

Por otra parte, en la Resolución 350/99 de la Secretaria de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación, se aprobó el “Manual de Procedimientos, Criterios y Alcances para el Registro de Productos Fitosanitarios en la República Argentina” en el que se establecen diferentes requerimientos para la certificación de nuevos productos fitosanitarios. Entre ellos se solicita información ecotoxicológica del producto, para lo que se requieren ensayos de toxicidad para la protección de organismos acuáticos, organismos del suelo y aves. Para la protección de la vida acuática, se especifica la aplicación de los bioensayos de toxicidad aguda y crónica además de la evaluación de efectos en el crecimiento y reproducción en peces (trucha, carpa) y microcrustáceo (*Daphnia magna*) y ensayos de crecimiento con algas (*Selenastrum capricornutum*). Si bien los requisitos de los ensayos ecotoxicológicos que se establecen en este manual fueron aprobados en el año 1999, son estos mismos los que rigen en la actualidad para el registro de productos fitosanitarios (Gelosi, 2009), no habiéndose considerado aún la exigencia de la evaluación de efectos fitotxicológicos en especies vegetales no blanco terrestres ni acuáticas.

Con relación a la certificación de productos fitosanitarios, en otros países como Canadá, existen pautas y protocolos específicos para la evaluación del efecto de pesticidas en especies vegetales (Boutin et al., 1993; Boutin et al., 1995), en los que se considera el efecto en algas y en plantas vasculares, considerando ensayos con especies nativas silvestres o de interés agronómico, tanto acuáticas como terrestres, evaluando la fitotoxicidad en diferentes puntos finales: germinación, elongación de la raíz y crecimiento. En los EEUU, la FIFRA (Federal Insecticide, Fungicide and Rodenticide Act), es el organismo de regulación que establece los protocolos y procedimientos de aplicación de bioensayos de toxicidad necesarios para el registro de pesticidas, incluyendo en estos ensayos la evaluación de la fitotoxicidad (Lewis, 1995; Wang & Freemark, 1995; USEPA, 1996).

Como ya se ha mencionado para Argentina, los datos bibliográficos de fitotoxicidad, obtenidos a partir de ensayos con algas y plantas vasculares se han considerado por la SRHN

para establecer criterios de calidad del agua y niveles guía nacionales para la protección de la biota (SRHN, 2003ab, 2004, 2005). Además, los ensayos con especies vegetales se han aplicado a nivel local, integrando baterías de bioensayos junto con especies de microorganismos y de animales, para la evaluación de la toxicidad de muestras ambientales y efluentes industriales y en índices para la evaluación de peligrosidad de contaminantes (Ronco et al., 1995; Grassi et al., 2000; Ronco et al., 2000; Castillo 2004; Ronco et al., 2005a; Ronco et al., 2005b).

Siendo que en nuestro país se está comenzando a considerar y aplicar bioensayos de toxicidad en las evaluaciones de riesgo ecotoxicológicas, en el control de la calidad ambiental y caracterización de residuos, así como en la certificación y registro de sustancias nuevas, surge la necesidad de desarrollar bioensayos de toxicidad estandarizados de acuerdo a las necesidades locales. Esta necesidad implica un mayor desarrollo en el campo de la ecotoxicología práctica, estableciéndose pautas claras para la ejecución de los bioensayos, así como para la obtención de organismos o producción de biomasa en condiciones controladas de laboratorio, y para la interpretación y toma de decisiones a partir de los resultados obtenidos con los mismos. Con relación al esto, el IRAM ha establecido recientemente protocolos estandarizados para la ejecución de bioensayos con invertebrados, peces, algas y semillas (IRAM, 2004, 2006a, 2006b, 2008 y 2009). La aplicación de bioensayos de toxicidad requiere además, de la disponibilidad de laboratorios normatizados que ejecuten este tipo de ensayos, tendiendo además hacia la intercalibración de los bioensayos entre diferentes laboratorios ejecutores (Environment Canada, 1990; USEPA, 1991a; APHA-AEEA-WPCF, 1992; Environment Canada, 1999a; Ronco et al., 2000; Castillo, 2004).

Entre los ensayos con plantas vasculares recomendados para la evaluación de efectos fitotóxicos, se encuentran aquellos que recurren al uso de semillas de plantas terrestres, evaluando principalmente el efecto de los contaminantes en el proceso de germinación y en el desarrollo y establecimiento de las plántulas en los primeros días de crecimiento (OECD, 1984b; ASTM, 1991a; Hulzebos et al., 1993; Wang & Freemark, 1995; Blackburn & Boutin, 2003). En los diferentes protocolos para evaluar la toxicidad con semillas, se recomienda la consideración de diferentes familias botánicas (Compuestas, Crucíferas, Amarilidáceas, Gramíneas, Labiadas, Polygonáceas y Leguminosas, entre otras) siendo la especie *Lactuca sativa* ampliamente difundida para su aplicación en este tipo de ensayos, tanto por su sensibilidad a diferentes tipos de contaminantes (metales, pesticidas y otros compuestos orgánicos), como por su simplicidad en la ejecución del bioensayo (Wang, 1987; Dutka, 1989; USEPA, 1989; Mohan & Hosetti, 1999; Sobrero & Ronco, 2004).

Entre los bioensayos de toxicidad con plantas acuáticas, se han aplicado ensayos con macrófitas sumergidas (*Elodea canadensis*, *Ceratophyllum demersum*, *Hydrilla verticillata*, *Myriophyllum* spp.), arraigadas emergentes (*Potamogeton pectinatus*) y flotantes (*Eichornia crassipes*, *Pistia stratiotes*, *Salvinia* spp, *Lemna* spp, *Spirodela* spp.), entre otras (Lewis, 1995;

Wang & Freemark, 1995; Mohan & Hosetti, 1999; Lytle & Lytle, 2001; Moschione et al., 2002; Miretzky et al., 2004).

Las Lemnáceas (*Lemna* spp. y *Spirodela* spp.) se encuentran entre las macrófitas más utilizadas en bioensayos de fitotoxicidad (Wang, 1990; Lewis, 1995; Wang & Freemark, 1995; Mohan & Hosetti, 1999), existiendo además protocolos estandarizados para la ejecución de los mismos (ASTM, 1991b; USEPA, 1996; Environment Canada 1999b; OECD, 2002; Environment Canada, 2007). Estos ensayos permiten cuantificar el efecto de los contaminantes en diferentes parámetros considerados como puntos finales de evaluación de la toxicidad, tales como contenido de clorofila, crecimiento foliar, tasa de multiplicación de la población clonal, etc. El tamaño reducido de estas plantas ofrece ventajas metodológicas para la realización de los ensayos de toxicidad, lo que permite además obtener resultados con menor variabilidad respecto de los ensayos con las demás macrófitas anteriormente mencionadas (Lewis, 1995; Wang & Freemark, 1995; Environment Canada, 2007).

I.2 LOS METALES PESADOS Y EL HERBICIDA GLIFOSATO EN LOS CIRCUITOS AMBIENTALES

Entre la gran diversidad de contaminantes presentes en los distintos compartimentos de los ecosistemas, los metales pesados, aquellos metales con una densidad mayor a 5 g/cm^3 como el cromo, cadmio, mercurio, cobre, aluminio, zinc, etc., constituyen un tipo de compuesto de relevante importancia por sus efectos deletéreos en la biota así como en la salud humana. A pesar de que en ambientes naturales no suelen estar en altas concentraciones, salvo en suelos especiales o en zonas localizadas de actividad minera, debido a la actividad industrial y al gran desarrollo urbano, se ha venido produciendo en las últimas décadas un considerable aumento de los niveles de metales pesados en diferentes compartimentos ambientales (Kabata-Pendias & Pendias, 1985; Barceló & Poschenrieder, 1989; Harrison, 1992; Laws, 1993; Tölgyessy, 1993; Ashmore, 1997; Sanità di Toppi & Gabbrielli, 1999; Baird, 2001; Manahan, 2007).

Como es de prever, estudios realizados en cuerpos de agua en áreas urbano-industriales de la Capital Federal, Gran Buenos Aires y La Plata, así como en el Río de la Plata, su franja costera y sus principales afluentes, revelan distintos niveles de contaminación por metales pesados (Cattogio, 1991; Ronco et al., 1992; Colombo et al., 1996; AA-AGOSBA-ILPLA-SHN, 1997; Manassero et al., 1998; Villar et al., 1998; Villar y et al., 2001; SADS-PNA-OPS-UNLP, 2007). En el Capítulo VI.1 se indican los niveles de metales pesados en los diferentes compartimentos de ambientes acuáticos en la cuenca del Río de La Plata así como los niveles de metales permitidos en agua para diferentes usos.

Otro aspecto de singular importancia a tener en cuenta es que, dentro de los países de América Latina, Argentina representa un caso inédito por la rápida transformación del modelo productivo dominante teniendo, desde la última década, el liderazgo en la implementación de

cultivos genéticamente modificados. En pocos años el paquete tecnológico caracterizado por la siembra directa de variedades transgénicas de alta productividad y la aplicación reiterada de diferentes agroquímicos, tanto herbicidas como pesticidas, ha sido adoptado por la gran mayoría de los grandes productores agropecuarios. Si hacemos referencia en particular al cultivo de la soja, el mismo se incrementó con una evolución sin precedentes, creciendo la superficie sembrada en forma sostenida desde los últimos 20 años (Pengue, 2000; Mentaberry, 2001; Satorre, 2005). La Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación de la Nación (SAGPyA, 2009) informa que en la cosecha 2006-2007 la producción de soja alcanzó a 47,5 millones de tn/ha, siendo en la actualidad la superficie sembrada superior a 16 millones de hectáreas. Para el caso del maíz, la producción de la campaña 2006-2007 fue de 21,8 millones de tn/ha, ocupando una superficie de cultivo de 3,6 millones de ha de las cuales el 75% de la superficie corresponde a siembra directa. En la actualidad, considerando el cultivo de granos, la soja ocupa más del 50% de la superficie sembrada en el país y corresponde al 50% de la producción total de granos (SAGPyA, 2009). La rápida implementación de estas nuevas ofertas tecnológicas (ej: el uso de soja transgénica resistente al glifosato y la modalidad de la siembra directa) contribuyeron a convertir las exportaciones de soja y sus derivados en una de las principales fuentes de divisas del país. En la actualidad, de la superficie de hectáreas sembradas con soja, más del 98% corresponden a una variedad transgénica de soja resistente al herbicida glifosato. Este aumento de la siembra de semillas de soja RR (Roundup Ready, resistentes al formulado de glifosato Roundup), y más recientemente la incorporación de otros cultivos resistentes al glifosato como el maíz, produjo un consecuente aumento del uso de este herbicida (Pengue, 2000; Mentaberry, 2001; Satorre, 2005; Trigo, 2005; SAGPyA, 2009). Este incremento en el uso de agroquímicos en ambientes rurales constituye un riesgo ambiental relevante dado que en cada aplicación una fracción de los mismos es transportada inevitablemente a los cursos de agua superficiales u otros ambientes naturales del agroecosistema, causando distintas respuestas en la biota, tanto en las especies animales como vegetales características de los mismos. Si bien el uso de herbicidas en cultivos resistentes está precisamente destinado a la eliminación de malezas que compiten con el cultivo de interés comercial en las plantaciones, en sectores del ambiente relegados por la práctica agrícola, como son los bordes de caminos, zonas de alambrados, los arroyos, lagunas o áreas de drenaje, existen numerosas especies no deseables de eliminar por el herbicida, *especies vegetales no blanco*, que también reciben el impacto de su aplicación (Boutin et al, 1993; Boutin et al, 1995; Boutin & Rogers, 2000; Blackburn & Boutin, 2003). Por otro lado, la expansión de la frontera agrícola, implica cambios en la biodiversidad florística asociada, no sólo al reemplazo de áreas naturales por grandes extensiones de cultivos, sino además al impacto de los herbicidas y otros productos fitosanitarios aplicados a los mismos, sobre las especies vegetales no blanco.

Precisamente, este importante incremento en el uso del glifosato en nuestro país, amén de la creciente extensión de la frontera agrícola con cultivos resistentes a este herbicida, permite sugerir que se considera de relevancia evaluar en este trabajo, la fitotoxicidad del herbicida glifosato en especies vegetales no blanco representativas de la flora acuática de nuestros agroecosistemas.

En lo que respecta a los metales pesados, si bien es claro que atañe más al ambiente urbano industrial, su presencia en cuerpos de aguas superficiales, asociado al desarrollo de grandes centros urbanos e industriales en sus márgenes, constituyen otro importante factor de riesgo para los sistemas naturales por lo que es relevante evaluar el impacto que estos contaminantes generan en especies vegetales.

I.2.1 Las plantas vasculares para la evaluación de la toxicidad y bioacumulación de metales pesados: antecedentes.

Los metales pesados provenientes de diferentes orígenes son incorporados al ambiente siguiendo los ciclos biogeoquímicos. La principal fuente antropogénica de estos contaminantes por vía aérea la constituyen la combustión de carbón y otros combustibles fósiles, así como las emisiones de la industria metalúrgica por procesos de fundición, cromados, platinados, etc.. La incorporación en suelos proviene de la producción y dispersión de residuos industriales, cenizas y barros de plantas depuradoras, además de los vuelcos de efluentes o ingreso de lixiviados en cuerpos de agua receptores. El creciente uso de productos fitosanitarios y de fertilizantes también contribuye a la incorporación de distintos metales en la cadena trófica ya que éstos, dependiendo de su origen y producción, pueden tener grandes cantidades de metales como el cadmio, plomo, cobre y zinc. Algunos fertilizantes como los superfosfatos naturales, puede contener más de 30 mg/kg de cadmio y plomo, los que, dependiendo del pH del suelo, son absorbidos y acumulados en los diferentes órganos de las plantas (Marschner, 1983; Kabata-Pendias & Pendias, 1985; Barceló & Poschenrieder, 1989; Laws, 1993; Tölgyessy, 1993; Manahan, 2007).

Para el caso particular de los ambientes acuáticos, la contaminación por metales pesados es de gran importancia y peligrosidad dado que éstos se encuentran entre los compuestos de mayor toxicidad para la biota. Esta peligrosidad se debe principalmente al tiempo de residencia elevado que tienen estos contaminantes en los diferentes compartimentos –biota, columna de agua y sedimentos- de los cuerpos de agua naturales, dependiendo de las condiciones del medio su biodisponibilidad y consecuente distribución en cada uno de ellos (Turner, 1992; Laws, 1993; Tölgyessy, 1993; Newman & Jago, 1996; Deng et al., 2004).

La biodisponibilidad, capacidad que posee un compuesto químico o un elemento mineral de penetrar activa o pasivamente en un sistema vivo (célula, órgano u organismo), determina la posibilidad de que dicho compuesto o elemento alcance un blanco biológico determinado, sea

éste de interés fisiológico o toxicológico (Turner, 1992; Tölgyessy, 1993; Newman & Jagoe, 1996; Bories, 1997). Este concepto de biodisponibilidad está relacionado estrechamente con el de “especiación” de un elemento, lo cual hace referencia a las diferentes formas fisico-químicas en que el mismo pueda hallarse distribuido o particionado en el medio (Turner, 1992; Manahan, 2007). La mayoría de los metales pesados son poco solubles a pH alcalino o neutro, mientras que en condiciones levemente ácidas se encuentran en mayor proporción en sus formas iónicas libres, aumentando así la disponibilidad para la biota y su peligrosidad. En general, la concentración de metales en los sedimentos es mayor a la de la columna de agua, constituyendo un reservorio de contaminantes. Por procesos biológicos y fisicoquímicos, los metales concentrados en los sedimentos, pueden redisolverse a la columna de agua, constituyendo de esta manera una fuente continua de metales durante mucho tiempo aunque no exista un ingreso externo al cuerpo de agua. Por otra parte, por medio de muchos efluentes industriales y líquidos cloacales, se incorporan a los cuerpos de agua gran cantidad de metales pesados complejados con diferentes sustancias. De esta manera, los metales tienen menor toxicidad que las formas iónicas libres, pero el peligro está en que los cambios en las condiciones del medio y distintos procesos biológicos degradan los complejos liberando los metales y haciéndolos biodisponibles. No obstante, su efecto tóxico puede ser amortiguado por la complejación con sustancias húmicas y fúlvicas del propio cuerpo de agua receptor (Gerzabek & Ullah, 1990a; Gerzabek & Ullah, 1990b; Ullah & Gerzabek, 1991; Laws, 1993; Porta & Ronco, 1993; Tölgyessy, 1993; Newman & Jagoe, 1996; Manahan, 2007).

Ante esta situación, las plantas constituyen un material idóneo para el estudio de los efectos tóxicos de los metales pesados sobre los seres vivos, ya que las mismas intervienen en el reciclado y transferencia de estos elementos al constituir el primer eslabón en las cadenas tróficas de los ecosistemas. Muchos vegetales se han adaptado a ambientes con una composición química muy variada, por lo que han adquirido la capacidad de acumular y bioconcentrar grandes cantidades de elementos, en especial metales pesados, siendo esto de gran relevancia en las plantas metalíferas presentes en suelos serpentinos o en áreas mineras. Esto los sitúa como organismos clave en los ciclos biogeoquímicos de muchos metales ya que son reservorios intermediarios a través de los cuales los elementos del suelo, agua y aire llegan a los organismos animales, incluido el hombre (Marschner, 1983; Kabata-Pendias & Pendias, 1985; Barceló & Poschenrieder, 1989; McKenna et al., 1992; Crawley, 1997). Es por ello que gran parte de los estudios en relación al efecto de metales pesados sobre vegetales, estén orientados a la evaluación de su acumulación y distribución en los distintos órganos de la planta, en especial en relación a especies comestibles de hortalizas (Cheung et al., 1989; McKenna et al., 1993; Moral et al., 1994; Singh et al., 1994b; Gil et al., 1995; Moral et al., 1995), cereales (Hassett et al., 1976; Cheung et al., 1989; Kubota et al., 1992; Jalil et al., 1994a; Jalil et al., 1994b; Rauser & Meuwly, 1995; Wheeler & Power, 1995;), forrajeras o

especies presentes en pasturas naturales (Cheung et al., 1989; Djingova et al., 1993; Nellessen & Fletcher, 1993).

Las plantas pueden ser receptores pasivos de diferentes elementos (absorción por raíces o intercepción a través de los órganos aéreos) pudiendo además ejercer un control del ingreso o eliminación selectiva de los mismos mediante diferentes mecanismos fisiológicos (Barceló & Poschenrieder, 1989; Salisbury & Ross, 1994; Crawley, 1997). Muchas metalofitas absorben, translocan y acumulan algunos metales como el níquel, cobre, cadmio, zinc y plomo en gran cantidad sin manifestar efectos fitotóxicos (Marschner, 1983; Kabata-Pendias & Pendias, 1985; Markert, 1992; Maine et al., 2004; Miretzky et al., 2004), siendo especies de gran relevancia por su potencial aplicación en procesos de fitoremediación de sitios contaminados por metales (Cunningham & Lee, 1995; Kumar et al., 1995; Crawley, 1997; Vajpayee et al., 2000; Deng et al., 2004; Miretzky et al., 2004; Hadad et al., 2006; Maine et al., 2007). Por otra parte, la capacidad que poseen muchas especies de plantas vasculares, de absorber y tolerar diferentes concentraciones internas de metales ha permitido, al igual que especies de líquenes y musgos, su uso como especies centinelas para el biomonitoreo de suelos contaminados y del material particulado proveniente de fuentes urbano-industriales (Burton, 1986; Djingova et al., 1993; Aksoy et al., 1999).

Existen diferentes respuestas entre distintas especies de plantas vasculares respecto de los niveles de tolerancia o toxicidad frente a la exposición a metales pesados (Kabata-Pendias & Pendias, 1985; Van Stevenick et al., 1992; Cunningham & Lee, 1995; Lewis, 1995; Gupta et al., 1996; Crawley, 1997; Samantary, 2002; Deng et al., 2004). Wang (1987) compara la respuesta de tres especies de plantas vasculares comestibles (*Lactuca sativa*, *Cucumis sativus* y *Panicum miliaceum*) expuestas a compuestos orgánicos y metales pesados, observando una mayor sensibilidad de *L. sativa* por los metales, mientras que con relación a la toxicidad de compuestos orgánicos, la sensibilidad fue mayor en la especie *P. miliaceum*. Por otra parte, Cheung et al. (1989) comparan la sensibilidad de 13 especies comestibles frente a la exposición a diferentes metales pesados, observando que la respuesta de éstas es dependiente del elemento estudiado y no encuentran patrones generales de toxicidad. Arambašić et al. (1995) observan una mayor sensibilidad de *Allium cepa* respecto de *Lepidium sativum* al evaluar el efecto agudo del Cu(II), Zn(II) y Pb(II) en la elongación de la raíz. Deng et al. (2004) comparan la capacidad de acumular Zn, Pb, Cu y Cd en diferentes especies emergentes de humedales naturales contaminados por estos metales, observando una alta diversidad en la respuesta entre las especies, difiriendo ésta además, con el metal considerado.

Por otra parte, muchas plantas acuáticas poseen la capacidad de tolerar y absorber metales pesados, por lo cual se las ha estudiado como potenciales herramientas para el saneamiento de cuerpos de agua superficiales contaminados o en el tratamiento de efluentes industriales o líquidos cloacales. Entre las especies acuáticas que se han utilizado en estudios

de fitoacumulación de metales se encuentran *Eichhornia crassipes*, e *Hydrilla verticillata* (Jana,1987; Saltabaş & Akçin, 1994; Maine et al, 2001; Maine et al., 2009), *Scirpus lacustris* y *Bacopa monnieri* (Gupta et al.,1994), *Schoenoplectus californicus* (Villar et al.,1998), *Salvinia herzogii*, *Pistia stratiotes* e *Hydromistia stolonifera* (Maine et al, 2001; Moschione et al., 2002; Maine et al., 2004; Miretzky et al., 2004), *Nymphaea alba* (Vajpayee et al., 2000) *Typha domingensis* (Maine et al., 2009). Con relación a las Lemnáceas, varios autores citan la factibilidad del uso de diferentes especies de *Lemna* y *Spirodela* en procesos de depuración de aguas contaminadas por su capacidad de acumular metales, a niveles aceptables sin evidenciar toxicidad (Sajwan & Ornes 1994; Wahaab et al., 1995; Boniardi et al., 1998; Prasad et al., 2001; Moschione et al., 2002; Dirilgen & Dogan, 2002; Miretzky et al., 2004).

Los organismos, aún pertenecientes a la misma especie, han desarrollado durante su evolución y ciclo de vida (filogenia-ontogenia) mecanismos bioquímicos que resultan en la adaptación y tolerancia o en la sensibilidad frente a la exposición a elementos no esenciales o a elevadas concentraciones de nutrientes esenciales, manifestando efectos tóxicos. Las plantas poseen mecanismos constitutivos (presentes en la mayoría de los fenotipos) o adaptativos (solo en especies tolerantes) para contrarrestar las alteraciones en la homeostasis celular como consecuencia de la exposición a altas concentraciones de metales. No cabe duda que en ambientes con altos niveles de metales, éstos pueden actuar como importantes agentes de selección natural determinando que en estos sitios se desarrollen y dominen poblaciones de especies tolerantes. No obstante, la adquisición de tolerancia, es altamente específica para determinado elemento, y constituye una característica heredable sin importar si esta capacidad es constitutiva o ha sido inducida por exposición al metal (Gerloff & Gabelman, 1983; Barceló & Poschenrieder, 1989; Cunningham & Lee, 1995; Crawley, 1997). La tolerancia en una misma especie, variedad o clon a varios metales está muchas veces relacionada con la coocurrencia de los metales en el medio, como por ejemplo el caso del Cd y Zn o el Cu y Zn que se los encuentra asociados en suelos metalíferos (Gerloff & Gabelman, 1983; Van Steveninck et al., 1992).

Muchas especies poseen polimorfismo en la respuesta frente a metales, teniendo en general, el genotipo resistente una menor aptitud adaptativa respecto de los genotipos no tolerantes, cuando ambos se desarrollan en sitios menos contaminados (Kabata-Pendias & Pendias, 1985; Van Steveninck et al., 1992; Salisbury & Ross, 1994; Crawley, 1997). Las diferencias en la sensibilidad intraespecífica con relación a la toxicidad y acumulación por exposición a metales pesados ha sido citada por varios autores, observándose que esta variación es dependiente del tipo de metal considerado así como de la especie evaluada (Matt & Van Laerhoven, 1976; Hendry et al., 1992; Massot et al., 1992; Tan et al., 1992; Jalil et al,1994a; Jalil et al., 1994b; Kaplan et al., 1995; Wu & Zhang, 2002).

La variabilidad en la sensibilidad por exposición a metales pesados también se observa entre distintas especies y clones de Lemnáceas, siendo organismos que se han venido

utilizando, como ya se ha mencionado anteriormente, tanto en procesos de bioremediación – *especies tolerantes*- o como bioindicadoras y especies diagnóstico en bioensayos de toxicidad – *especies sensibles*- Son numerosos los trabajos en donde se evalúa y recomienda, dada su sensibilidad a los metales pesados y otros contaminantes, el uso de especies y clones de Lemnáceas como organismos diagnóstico en bioensayos de toxicidad (Landolt & Kandeler, 1987, Huebert & Shay, 1993b; Huebert et al., 1993; Lewis, 1995; Mohan & Hosetti, 1999; Lytle & Lytle, 2001; Li & Xiong, 2004a). Por otra parte, los resultados de la evaluación de la toxicidad de contaminantes utilizando semillas, también indican una amplia variedad en la respuesta a los metales (Wang, 1987; Wang, 1992; Mohan & Hosetti, 1999 Lytle & Lytle, 2001).

I.3 ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN, CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS Y EFECTOS BIOLÓGICOS DE METALES PESADOS: Cobre (II), Cromo (VI) y Cadmio (II).

Los distintos elementos minerales pueden ser para las plantas, nutrientes esenciales, elementos beneficiosos o tóxicos. Un elemento es considerado *esencial* cuando forma parte de una molécula constituyente de la planta o ésta lo requiere para realizar sus procesos metabólicos o de regulación necesarios para completar su ciclo de vida, sin que otro elemento pueda sustituirlo en sus funciones. Los elementos esenciales para un gran número de especies son: C, H, O, N, S, P, K, Ca, Mg, Fe, Mn, Cu, Zn, Mo, Cl, B y Ni. Un nutriente *beneficioso* es aquel que estimula el crecimiento y desarrollo de ciertas especies y en determinadas situaciones, siendo éste el caso del Cr, Na, Si, V, Co, Se y otros. No obstante, los elementos esenciales o beneficiosos, por encima de determinada concentración crítica, y otros aún en cantidades mínimas (ej. Cd, Pb, Hg, Ag), son elementos *tóxicos*, produciendo un efecto adverso, alterando el normal crecimiento y desarrollo del organismo (Marschner, 1983; Kabata-Pendias & Pendias, 1985; Barceló & Poschenrieder, 1989; Markert, 1992; Salisbury & Ross, 1994; Crawley, 1997; Taiz & Zeiger, 2002).

En base a la diversidad de datos registrados de toxicidad, se pueden considerar como los metales más tóxicos para las plantas vasculares y microorganismos al Hg, Cu, Ni, Pb, Co y Cd, y en menor medida al Cr, Sn, Ag y Be (Kabata-Pendias & Pendias, 1985; Barceló & Poschenrieder, 1989).

I.3.1 Cobre

I.3.1.1 Distribución, producción y usos

El cobre en la corteza terrestre es principalmente abundante en rocas máficas e intermedias, tendiendo a ser excluido de los carbonatos. Se encuentra en minerales formando sulfuros simples y complejos, los que son fácilmente liberados como iones por meteorización de las

rocas, especialmente en ambientes ácidos. El cobre es uno de los metales pesados más móviles, especialmente en procesos hipergénicos, siendo un catión muy versátil, interactuando químicamente con minerales y la materia orgánica de suelos y sedimentos. Sin embargo, también se puede encontrar inmovilizado formando precipitados con aniones como sulfuros, carbonatos e hidróxidos. Si bien la especie química más móvil corresponde al Cu(II), otras formas iónicas pueden también estar presentes en el suelo. La concentración media de cobre, considerando diferentes tipos de suelos, es de 23 mg/kg, considerando el peso seco (PS) del suelo (Kabata-Pendias & Pendias, 1985; Manahan, 2007).

El cobre en los cuerpos de agua superficiales existe en muchas formas diferentes, tales como ion libre en estado disuelto, o como complejos solubles con compuestos orgánicos o inorgánicos, o pudiendo estar adsorbido en el material particulado en suspensión. La biodisponibilidad del cobre dependerá de la especiación de este metal, determinando esto su toxicidad para la biota. Por lo tanto, cualquier cambio en las condiciones físico-químicas del cuerpo de agua, por ejemplo, el pH, dureza, oxígeno disuelto o contenido de materia orgánica, puede alterar rápidamente la proporción de las formas presentes, alterando el equilibrio dinámico de las mismas y, en consecuencia, su toxicidad. En medios con pH por encima de 7 a 8, la solubilidad de las especies aniónicas y catiónicas del cobre decrece, predominando los complejos hidróxido con este metal. Sin embargo, dada la gran afinidad de este metal con la materia orgánica, es que se lo encuentra principalmente formando complejos orgánicos solubles en un amplio intervalo de pH. Tanto en suelos como en aguas superficiales, la presencia de ácidos fúlvicos y húmicos determina en gran medida la biodisponibilidad del cobre, debido a la formación de complejos muy estables con estos ácidos orgánicos (Kabata-Pendias & Pendias, 1985; Gerzabek & Ullah, 1990a; Ullah & Gerzabek, 1991; Turner, 1992; Porta & Ronco, 1993; Newman & Jagoe, 1996).

Las principales fuentes de ingreso antrópico del cobre a los diferentes compartimentos ambientales provienen de la actividad agraria, mediante la aplicación de productos fitosanitarios y el uso de fertilizantes, además de la aplicación de distintos tipos de residuos orgánicos o la utilización de lodos cloacales o efluentes domiciliarios en sistemas agrícolas. En la actividad industrial, el cobre es de muy amplia aplicación por lo que ésta constituye una importante fuente de éste contaminante, ya sea a través del vertido de efluentes o mediante la disposición de residuos sólidos. Una forma de incorporación del cobre es a partir de la corrosión de materiales de la construcción que posean este metal en su composición, tales como tuberías, cables, etc. Además es incorporado a partir del material particulado en aire de emisiones provenientes de fundiciones no ferrosas, depositándose en suelos y cuerpos de agua cercanos a los sitios de producción (Kabata-Pendias & Pendias, 1985; Tölgyessy, 1993; Manahan, 2007).

I.3.1.2 Absorción, translocación y acumulación del cobre en plantas vasculares.

El contenido de cobre en las plantas vasculares depende en gran medida de la concentración del medio en donde ésta se esté desarrollando, variando además según la especie vegetal y el tipo de órgano que se esté analizando, siendo su concentración media de 6 mg/kg PS. Este microelemento se absorbe principalmente como ion cúprico Cu(II), en medios con buena oxigenación, o como ion cuproso Cu(I), si las condiciones ambientales son anóxicas, siendo el Cu(II) el de mayor facilidad de absorción. La absorción es principalmente activa, aunque también se ha demostrado la incorporación pasiva del cobre, principalmente en medios con concentraciones tóxicas del metal. Una vez absorbido, el cobre, al igual que otros metales divalentes como el Zn, Fe, Mn y Ni, se mantiene soluble de manera parcial por quelación por ciertos ligandos celulares. La movilidad del cobre es intermedia y se transporta en el xilema principalmente por unión con aminoácidos, siendo baja la posibilidad de retraslocarse a otros órganos desde las hojas (Marschner, 1983; Kabata-Pendias & Pendias, 1985; Salisbury & Ross, 1994; Taiz & Zeiger, 2002).

La acumulación del cobre varía según la especie. El cobre acumulado en las raíces puede estar asociado a la pared celular, teniendo de esta forma baja movilidad hacia otros órganos de la planta. Si bien se moviliza de la raíz hacia la parte aérea de la planta, la acumulación en la raíz es mayor (Wheeler & Power, 1995; Deng et al., 2004). Por otra parte, la presencia de cobre en algunas especies tolerantes, induce la producción de péptidos ricos en cisteína, ácido glutámico y glicina (fitoquelatinas) que mantienen al metal complejoado dentro de la célula, reduciendo así su toxicidad (Rauser, 1990; Salisbury & Ross, 1994; Rauser & Meuwly, 1995; Ramírez et al., 1999a). En las hojas el cobre se halla principalmente asociado a la plastocianina y otras fracciones protéicas. También se lo encuentra en mayores concentraciones en los órganos reproductivos y en las semillas (Kabata-Pendias & Pendias, 1985; Kubota et al., 1992; Moral et al., 1994).

Para especies acuáticas, la capacidad de acumular cobre es muy variada dependiendo de la especie y el órgano analizado. La bioconcentración de un contaminante se expresa como Factor de Bioconcentración (FBC), el cual depende de la tasa de incorporación y de la tasa de eliminación en el organismo. El FBC de un tóxico determinado está dado por la concentración del mismo en el organismo respecto de su concentración en el medio (Newman & Jagoe, 1996). Los valores de FBC para cobre en las plantas acuáticas se encuentran entre 36 y 691250 (Stefani et al., 1991; Lewis, 1995; Deng et al., 2004).

I.3.1.3 Funciones del Cu(II) en el metabolismo vegetal

El cobre interviene principalmente como forma iónica en numerosas reacciones redox (Marschner, 1983; Kabata-Pendias & Pendias, 1985; Salisbury & Ross, 1994; Taiz & Zeiger, 2002) tales como:

- Interviene en la síntesis de la lignina mediante su participación en la actividad de la enzima polifenol oxidasa, teniendo un papel importante en el metabolismo de la pared celular.
- Participa de muchas metaloenzimas que intervienen en procesos metabólicos de oxidación y reducción, como son la citocromo oxidasa presente en mitocondrias, superóxido dismutasa (SOD Cu-Zn), ascorbato oxidasa, galactosa oxidasa, monoamino oxidasa y otras.
- Participa de muchas metaloproteínas como la plastocianina, proteína móvil presente en los tilacoides y que interviene en procesos de transporte de un electrón entre el citocromo f y el fotosistema I (FSI) durante la fotosíntesis.
- Interviene en mantener la viabilidad de los granos de polen.

I.3.1.4 Efectos fitotóxicos del Cu(II).

Si bien el cobre es un micronutriente esencial para especies animales y vegetales, en concentraciones levemente superiores a los requerimientos esenciales para el metabolismo celular, constituye un elemento muy tóxico para la biota. Los efectos fitotóxicos descritos para el cobre, en diferentes procesos fisiológicos son los siguientes:

- Alteraciones en la fotosíntesis (Sandmann & Böger, 1983; Kabata-Pendias & Pendias, 1985; Gupta et al., 1994; Maksymiec et al., 1994; Salisbury & Ross, 1994; Chatterjee & Chatterjee, 2000; Frankart et al., 2002; Liu et al., 2004), tales como:
 - Genera síntomas de clorosis similar a la inducida por deficiencia de Fe.
 - Inhibición en el transporte de electrones hacia el FSI, posiblemente por competencia con el Fe. Reducción de la actividad fotoquímica del FSII.
 - Alteraciones en la estructura y composición de las membranas tilacoidales y peroxidación lipídica de las mismas.
 - Disminución en la fijación de CO₂.
- Retraso en la germinación y desarrollo de las plántulas (Kabata-Pendias & Pendias, 1985; Liu et al., 2004).
- Inhibición en la expansión foliar (Maksymiec et al., 1994; Weckx & Clijster, 1996).
- Efecto en el crecimiento y desarrollo de raíces (Kabata-Pendias & Pendias, 1985; Stefani et al., 1991; Lidon & Henriques, 1992; Kahle, 1993; Arduini et al., 1996; Liu et al., 2004):
 - Inhibición de la elongación celular

- Inhibición mitótica en el meristema apical.
 - Desarrollo de raíces cortas y gruesas.
 - Reducción de la biomasa radical.
 - Necrosis radical y en la zona de transición raíz-tallo.
 - Inhibición de la formación de raíces laterales.
- Disminución en el contenido de proteínas en hojas (Barua & Jana, 1986; Gupta et al., 1996).
 - Aumento de la permeabilidad de la membrana plasmática (Levitt, 1980; Barua & Jana, 1986; Kahle, 1993; Liu et al., 2004) y daño en el sistema de endomembranas (Levitt, 1980) debido a la peroxidación lipídica de las membranas (Weckx & Clijster, 1996; Gupta et al., 1996).
 - Efecto en la actividad de las enzimas antioxidantes peroxidasas y superóxido dismutasa (Chatterjee & Chatterjee, 2000; Liu et al., 2004)
 - Disminución del contenido de Fe y Mn en raíz y alteraciones en la translocación hacia el tallo (Lidon & Henriques, 1992; Chatterjee & Chatterjee, 2000).

Con relación a la evaluación de la fitotoxicidad del cobre, los antecedentes bibliográficos evidencian una gran diversidad en la sensibilidad entre las especies vegetales, tanto terrestres (Wang, 1987; Fiskesjö, 1988; Arambašić et al., 1995; Weckx & Clijsters, 1996; Chatterjee & Chatterjee, 2000; Liu et al., 2004) como entre especies acuáticas (Stefani et al., 1991; Huebert et al., 1993; Gupta et al., 1994; Wahaab et al., 1995; Prasad et al., 2001; Frankart et al., 2002).

I.3.2 Cromo

I.3.2.1 Distribución, producción y usos

En la corteza terrestre, el cromo se ubica en el 21º lugar en el orden de abundancia respecto de los otros elementos, con una concentración media en el suelo de 100 mg/kg. En las rocas se lo encuentra con un promedio que va de 5 mg/kg en rocas graníticas a 3600 mg/kg en rocas ultramáficas y serpentinas. En los depósitos más importantes de la tierra se encuentra en su forma elemental o en el estado de oxidación trivalente principalmente en la forma del mineral cromita FeCr_2O_4 . En suelos de uso agrícola, el contenido de cromo total se halla entre 5 y 350 mg/kg, existiendo algunos suelos con concentraciones aún mayores, sin que se observe en ellos efectos fitotóxicos o reducción en la productividad de los cultivos (Kabata-Pendias & Pendias, 1985; Harrison, 1992).

Las formas más estables del cromo son el cromo metálico, el Cr(III) y el Cr(VI) siendo estas dos últimas las más relevantes en los sistemas biológicos. El Cr(IV) y Cr(V) son inestables y raramente se encuentran en el suelo y el agua (Taylor et al., 1979; Kabata-Pendias & Pendias, 1985; Barlett, 1997; Silva et al., 1997; Hossner et al., 1998).

En el suelo y en ambientes acuáticos el comportamiento de ambas formas de cromo es diferente, teniendo el Cr(VI) mayor movilidad. El Cr(III) es muy estable y sólo es levemente móvil en medios muy ácidos, hallándose a pH entre 4,5 y 10 totalmente precipitado como Cr(OH)₃. El Cr(VI) se halla como anión y, dependiendo del pH, se encuentra como las especies iónicas cromato (CrO₄⁻²), cromato ácido (HCrO₄⁻) o dicromato (Cr₂O₇⁻²). A pH alcalino y neutro la forma predominante es el CrO₄⁻². Cuando el pH se reduce a valores cercanos a 6, se incrementa la concentración de HCrO₄⁻ y Cr₂O₇⁻² existiendo un equilibrio, dependiente de la concentración, de ambas formas de Cr(VI). A concentraciones altas de Cr(VI) predomina el Cr₂O₇⁻². Por otra parte, el Cr(III) puede ser parcialmente oxidado a Cr(VI) en determinadas condiciones de pH, humedad y presencia de óxidos de Mn, aumentando de esta manera su biodisponibilidad. No obstante esto, la presencia de materia orgánica favorece la reducción del Cr(VI) a Cr(III), disminuyendo así la probabilidad de encontrar Cr(VI) en condiciones ambientales. La materia orgánica favorece a la formación del Cr(III) por dos motivos: su oxidación aporta electrones para la reducción del Cr(VI) y disminuye la posibilidad de oxidación del Cr(III) mediante la formación de complejos (Barlett, 1997; Bories, 1997; Brooks, 1997; Hossner et al., 1998; USEPA, 1998).

El cromo no es un elemento esencial para los organismos vegetales pero, en su forma reducida -Cr(III)-, sí lo es para los animales, ya que interviene en el metabolismo de hidratos de carbono de los vertebrados. El Cr(VI) es altamente tóxico, tanto para plantas como para animales, siendo además carcinogénico. Al ser el Cr(VI) más móvil que la forma reducida, en suelos con altos niveles de cromo, y en donde las condiciones de pH y potencial redox sean favorables, este puede lixiviar a las napas subterráneas o a cuerpos de agua superficiales constituyendo un riesgo para salud humana y para la biota (Kabata-Pendias & Pendias, 1985; Barceló & Poschenrieder, 1997; Hossner et al., 1998; USEPA, 1998).

En contraste con el Cr(III), casi todo el Cr(VI) proviene de la actividad humana y solo raras veces se lo encuentra en la naturaleza. Las principales fuentes antropogénicas de cromo provienen de la actividad industrial a partir de efluentes de establecimientos de curtido de cuero, la industria petroquímica, además de procesos de cromado y electroplateado. Es importante considerar la incorporación de este metal por el uso de combustibles fósiles así como de las emisiones al aire y vertido en cuerpos de agua por actividades relacionadas a la minería y fundiciones de metales. Por otra parte, los desechos sólidos de la industria de manufactura del cuero, constituyen grandes reservorios de Cr(III) en el suelo. La aplicación en agricultura de barros y efluentes cloacales, fertilizantes orgánicos e inorgánicos y productos

fitosanitarios que contienen cromo en su composición, constituyen una fuente importante de incorporación de este metal a los diferentes compartimentos ambientales (Kabata-Pendias & Pendias, 1985; Laws, 1993; Tölgyessy, 1993; Silva et al., 1997; Hossner et al., 1998).

I.3.2.2 Absorción, translocación y acumulación del cromo en plantas vasculares.

En general, las plantas tienen poca capacidad para absorber y translocar cromo, encontrándose concentraciones muy bajas en los tejidos, aún en algunas plantas de suelos serpentinos (45 a 100 mg/kg PS). Las plantas pueden incorporar Cr(VI) o Cr(III), aunque los mecanismos de transporte no están claramente establecidos. El Cr(VI) incorporado de manera activa a través de los transportadores de sulfatos mientras que la incorporación de Cr(III) se cree que es de forma pasiva (posiblemente utilizando fitosideróforos, de manera similar a la incorporación del Fe(III)). En la mayoría de los estudios realizados con relación a la incorporación de Cr(III) a la raíz, no se discrimina que proporción de metal queda retenida en el apoplasto y cuál atraviesa la membrana celular efectivamente, por lo que el Cr(III) podría quedar retenido en la pared celular. Por otra parte, la interacción del cromo con los exudados o reductasas de la raíz, modifica la forma del cromo en la membrana celular, interviniendo en la incorporación del metal (Kleiman et al., 1992; Barceló & Poschenrieder, 1997; Bories, 1997). La absorción de cromo depende del pH, del potencial de oxidación y del contenido de materia orgánica del medio, factores que determinan la especiación y movilidad del cromo modificando la biodisponibilidad y consecuente incorporación en la planta. La formación de complejos insolubles de alto peso molecular del cromo con ácidos húmicos, mantiene al metal inmovilizado y no disponible para la planta, disminuyendo además su lixiviación. Cuando se aplican residuos orgánicos contaminados con cromo como fertilizante, se observa que no hay gran incorporación del metal ya que este se encuentra principalmente inmovilizado como Cr(III). Por otra parte, el pH de la rizósfera determinado por la incorporación de nutrientes, puede promover la formación de hidróxidos insolubles, bloqueando de esta manera la incorporación del metal a la planta (Kleiman et al., 1992; Barceló & Poschenrieder, 1997; Bories, 1997; Santoprete, 1997; Silva et al., 1997; Hossner et al., 1998).

Una vez absorbido, el cromo se concentra principalmente en las raíces y aún si parte de éste es complejado en compuestos orgánicos, la migración hacia otros órganos de la planta está muy limitada (Moral et al., 1995; Bories, 1997; Chatterjee & Chatterjee, 2000; Sobrero & Moschione, 2001; Maine et al., 2004; Singh & Sinha, 2005). La translocación del cromo de la raíz a frutos y semillas de cereales es muy baja, indicando que la raíz se comporta como una barrera eficiente disminuyendo el transporte a órganos aéreos. El cromo, reducido a Cr(III) luego de ser incorporado a la célula, estaría asociado principalmente a las vacuolas de las células corticales de la raíz (Moral et al., 1994; Barceló & Poschenrieder, 1997; Silva et al., 1997).

Existen evidencias de la reducción del Cr(VI) a Cr(III) por tioles celulares como el glutatión y la cisteína, produciéndose en este proceso, radicales de especies de Cr(V). El incremento de niveles de radicales libres de $RS\cdot$ y $\cdot OH$, podría causar daño en las membranas celulares. Dentro de la célula, el Cr(III) tiene leve afinidad por los grupos sulfhidrilo y una mayor afinidad por el N y O, formando complejos hexacordinados con diferentes grupos de moléculas orgánicas. Además, el radio iónico del Cr(III) es muy similar al del Fe(III), lo que determina que en muchas metaloproteínas el Fe(III) sea reemplazado por el Cr(III), alterando la funcionalidad de las mismas. El Cr(VI) constituye la forma de cromo más oxidada, móvil, reactiva y, consecuentemente, más tóxica, encontrándose principalmente como cromato (CrO_4^{2-}) y dicromato ($Cr_2O_7^{2-}$) (Barceló & Poschenrieder, 1997; Bories, 1997, Brooks, 1997; Briat & Leburn, 1999; Samantary, 2002).

I.3.2.3 Efectos beneficiosos del cromo

Si bien el cromo no constituye un elemento esencial en los vegetales, a bajos niveles de exposición a este metal (0,05-0,1 mgCr(VI)/L), se han observado efectos beneficiosos o estimulación en algunos parámetros, tanto en ensayos de crecimiento en suelo como en aquellos en solución nutritiva. Los principales efectos beneficiosos observados son (Bollard, 1983; Barceló & Poschenrieder, 1997; Samantary, 2002; Singh & Sinha, 2005):

- Aumento de la elasticidad de la pared celular.
- Aumento del crecimiento radical.
- Incremento en la resistencia al estrés hídrico y otras situaciones de estrés. Retraso en los procesos de senescencia foliar.
- Mejora en la nutrición mineral e incremento en la translocación de asimilados
- Niveles de 0,052 mg Cr(III)/L mejoran el crecimiento (área y peso seco foliar) y la ultraestructura de cloroplastos en plantas con deficiencia de Fe, incrementando en la planta la proporción de Fe biológicamente activo.
- Aumento en el contenido de Cla y Clb y contenido de proteínas en cultivares resistentes al metal.

I.3.2.4 Efectos fitotóxicos del Cr(III) y Cr(VI)

Ambas especies de cromo son fitotóxicas, siendo el Cr(VI) el de mayor toxicidad debido a las siguientes razones (Liu et al, 1992; Barceló & Poschenrieder, 1997; Bories, 1997):

- Mayor velocidad de incorporación del Cr(VI) respecto del Cr(III).

- La reducción intracelular del Cr(VI) a Cr(III) produce intermediarios inestables de Cr(V) y Cr(IV) que inducen la formación de radicales libres que promueven el daño en las membranas, además de alteraciones metabólicas.

La principal causa de toxicidad del Cr(III) es la formación de complejos inertes con sustancias orgánicas de importancia fundamental para el metabolismo celular: ácidos nucleicos, proteínas y compuestos orgánicos que normalmente se complejan con Fe (Barceló & Poschenrieder, 1997; Bories 1997).

Los síntomas visibles y los efectos ultraestructurales producidos por la toxicidad del cromo, además de la baja translocación de este metal desde las raíces al tallo, sugieren que los principales efectos tóxicos se producen en raíces, mientras que los daños observados en los órganos aéreos son consecuencia del efecto del cromo en las células de la raíz. La inhibición en la eliminación de H⁺ y de la incorporación de K⁺ en células de raíz, sin observarse cambios en el potencial de membrana, sugieren que el efecto tóxico del cromo se debe al aumento del pH intracelular causado posiblemente por la reducción del Cr(VI) a Cr(III). Por otra parte, en este proceso de reducción del cromo, como se mencionó anteriormente, se producen radicales libres que pueden reaccionar directamente con las moléculas de ADN. El Cr(III) generado se une irreversiblemente a los grupos fosfato del ADN o de los nucleótidos libres interfiriendo en su funcionamiento. Como consecuencia de las alteraciones en la división celular en el meristema radical, se evidencia la inhibición del crecimiento de la raíz (Liu et al, 1992; Barceló & Poschenrieder, 1997).

Los efectos fitotóxicos del cromo se resumen en:

- Inhibición de la germinación (Samantary, 2002)
- Efecto en raíces ((Kabata-Pendias & Pendias, 1985; Kleiman & Cogliatti, 1992; Liu et al, 1992; Jayaprakash et al., 1994; Barceló & Poschenrieder, 1997; Samantary, 2002)
 - Inhibición en el crecimiento por efecto en la división celular y en el desarrollo de raíces laterales.
 - Daño en los pelos radicales y en las células epidérmicas y corticales de las raíces.
 - Alteración en la absorción de agua y de nutrientes como el P, Mn, Mg, Fe y Mo.
- Reducción del área foliar (Kleiman & Cogliatti, 1992; Chatterjee & Chatterjee, 2000; Sobrero & Moschione, 2001).
- Efecto en la translocación de nutrientes como el N, P, Ca, Mg, K, Zn, Cu y Fe (Kabata-Pendias & Pendias, 1985; Moral et al., 1995; Barceló & Poschenrieder, 1997; Chatterjee & Chatterjee, 2000).

- Alteraciones en la fotosíntesis (Kabata-Pendias & Pendias, 1985; Barua & Jana, 1986; Kleiman & Cogliatti, 1992; Gupta et al., 1994; Barceló & Poschenrieder, 1997; Chatterjee & Chatterjee, 2000; Vajpayee et al., 2000; Sobrero & Moschione, 2001; Samantary, 2002; Singh & Sinha, 2005):
 - Alteraciones en la síntesis y disminución en el contenido de clorofila en hojas jóvenes
 - Inhibición en el transporte de electrones, Inhibición en la reacción de Hill, efecto en el PSI y PSII.
 - Alteraciones en la ultraestructura de cloroplastos.
 - Inhibición en la actividad de las enzimas del ciclo de Calvin.
 - Incremento de la resistencia estomática.
- Alteraciones en la permeabilidad de las membranas celulares, en especial en tonoplasto de células radicales y de zonas basales del tallo. (Barua & Jana, 1986; Barceló & Poschenrieder, 1997).
- Disminución en el contenido de proteínas en hojas (Barua & Jana, 1986; Vajpayee et al., 2000; Singh & Sinha, 2005).
- Inhibición en la evolución del etileno en la planta por la baja disponibilidad de ACC (ácido 1-amino ciclopropano-1-carboxílico, precursor de la síntesis del etileno) (Barceló & Poschenrieder, 1997).
- Peroxidación lipídica y aumento de carotenoides, ac. ascórbico y prolina (indicadores de la producción de especies reactivas de oxígeno) (Singh & Sinha, 2005)
- Inhibición en la actividad de nitrogenasas y de la nodulación (Barceló & Poschenrieder, 1997).

Con relación a la evaluación de la fitotoxicidad del cromo, los antecedentes bibliográficos evidencian una gran diversidad en la sensibilidad entre las especies vegetales, tanto terrestres (Wang, 1987; Kleiman & Cogliatti, 1992; Chatterjee & Chatterjee, 2000; Samantary, 2002) como entre especies acuáticas (Jana, 1987; Gupta et al., 1994; Wahaab et al., 1995; Boniardi et al., 1998, Mohan & Hosetti, 1999; Vajpayee et al., 2000).

I.3.3 Cadmio

I.3.3.1 Distribución, producción y usos

En la corteza terrestre el cadmio se ubica en el 64º lugar en el orden de abundancia respecto de los otros elementos, con una concentración en el suelo de entre 0,07 y 0,5 mg/kg, lo cual es menor que el promedio para cromo, zinc, cobre y plomo. Concentraciones mayores, se corresponden con la incorporación antropogénica de Cd. En general, el Cd se lo halla como

CdS, asociado a minerales con Zn, Zn-Pb o Zn-Pb-Cu. La obtención de Cd se realiza de forma paralela y como subproducto del refinado de minerales con Zn, determinando que su producción esté íntimamente relacionada a las demandas de Zn. Además, se lo puede encontrar en concentraciones altas (100 mg/kg) en rocas fosfóricas, muchas veces utilizadas como fertilizante. La acumulación de cadmio en concentraciones potencialmente peligrosas en hidrocarburos, carbón mineral y lignita es importante al considerar la incorporación antropogénica de este metal por utilización de combustibles fósiles o por la industria petroquímica. La principal forma en que se encuentra el cadmio es como Cd(II), formando compuestos inorgánicos (haluros, óxidos, sulfuros, etc.) y orgánicos (dialquil y difenil). Los carbonatos, hidróxidos y sulfuros de cadmio tienen muy baja solubilidad, por la cual, en los cuerpos de agua superficiales, a este metal se lo asocia principalmente a los sedimentos. Los principales factores que determinan la movilidad del cadmio son el potencial de oxidación y el pH, siendo en medio alcalino poco soluble por precipitación de $\text{Cd}(\text{OH})_2$ y CdHCO_3 . En condiciones reductoras, la disponibilidad del cadmio está disminuida por la reducción de sulfatos a sulfuros menos solubles. En los cuerpos de agua al cadmio se lo encuentra en forma iónica o ligado a la materia orgánica disuelta o particulada, siendo de esta última forma, menos tóxico para la biota (Marschner, 1983; Kabata-Pendias & Pendias, 1985; Gerzabek & Ullah, 1990b; Laws, 1993; Tölgyessy, 1993; Newman & Jagoe, 1996; Manahan, 2007).

Las principales fuentes antropogénicas de este metal están constituidas por (Laws, 1993; Baird, 2001): 1- Las emisiones al aire y vertido en cuerpos de agua por actividades relacionadas a la minería, fundiciones de metales (Zn, Pb y Cu) e industrias relacionadas con la producción de pinturas, baterías, plásticos y aleaciones, además de los residuos de imprentas y la industria fotográfica; 2- La aplicación en agricultura de barros cloacales, fertilizantes y productos fitosanitarios que contienen Cd en su composición; 3- El uso de combustibles fósiles.

I.3.3.2 Absorción, translocación y acumulación del Cd(II) en plantas vasculares.

A pesar de que el cadmio no es un elemento esencial para las plantas vasculares, su absorción se realiza fácilmente a través de las raíces y las hojas, pudiendo ser ésta de manera pasiva o activa. La circulación dentro de la planta se cree que ocurre, al igual que con otros metales pesados, por formación de complejos metaloorgánicos (Kabata-Pendias & Pendias, 1985; Kahle, 1993; Salisbury & Ross, 1994; Sanitá di Toppi & Gabrielli, 1999; Wu & Zhang, 2002).

Una característica importante del Cd(II), al igual que lo mencionado para el Cu(II), es su fuerte afinidad por los grupos sulfhidrido de péptidos ricos en cisteína, ácido glutámico y glicina (fitoquelatinas) y de otros residuos laterales de proteínas y grupos fosfato que mantienen al metal complejado dentro de la célula, reduciendo así su toxicidad. Se ha observado en muchas especies de algas y plantas vasculares tolerantes al cadmio, que la exposición a este metal, produce el aumento de cisteína y metionina y de la síntesis de fitoquelatinas, dependiendo el

nivel de inducción del grado de resistencia de las plantas al metal. Por otra parte, el cadmio puede también quedar retenido en la pared celular, favoreciendo estos mecanismos a una mayor acumulación de este metal en las raíces respecto del tallo, hojas y frutos, órganos hacia donde la movilidad está mas restringida (Kabata-Pendias & Pendias, 1985; Van Assche et al., 1988; Greger & Johansson, 1992; Kneer & Zenk, 1992; Kubota et al., 1992; Salisbury & Ross, 1994; Rauser & Meuwly, 1995; Salt et al., 1995; Sanità di Toppi & Gabbrielli, 1999). Salt et al. (1995) determinaron para *Brassica juncea*, factores de bioconcentración (FBC) de Cd(II) de 1100 en tallos y 6700 en raíces, en plantas expuestas a niveles no tóxicos (0,1 mgCd(II)/L), estando la acumulación en las raíces asociada a la presencia de fitoquelatinas. Jalil et al. (1994b) estudiaron la acumulación del cadmio en plántulas de *Triticum turgidum* expuestas durante 12 días a concentraciones entre 0,06 y 0,22 mgCd(II)/L, observando una mayor incorporación al aumentar la concentración externa de metal. En todos los casos, la acumulación en raíz fue mayor respecto de la parte aérea, dependiendo los porcentajes de translocación de la concentración de cadmio externa. Coincidentemente con los resultados obtenidos por Jalil et al. (1994b), Kovačević et al. (1999) describen mayor acumulación de cadmio en raíz respecto de las hojas en plantas de *Triticum aestivum* expuestas durante 5 días a 112,4 mgCd(II)/L. Para el caso de macrófitas, se describen FBC de 20000 y 21000 para raíz y tallo de *Elodea*, respectivamente; 9500 para el helecho acuático *Salvinia natans*, 6030 para *Lemna valdiviana* y entre 100 y 150 en raíces de *Lemna minor*. Stefani et al. (1991), describen en plántulas de *Juncus acutus* expuestas durante 10 días a 4,4 mgCd(II)/L, un FBC de 240. Deng et al. (2004) comparan la capacidad de acumular Cd en diferentes especies emergentes de humedales naturales contaminados por este metal, observando una mayor acumulación en raíces además de una alta diversidad en la respuesta entre las especies.

I.3.3.3 Efectos fitotóxicos del Cd(II)

El cadmio no es un elemento esencial en animales ni en vegetales, constituyendo un contaminante de muy alta toxicidad y de gran peligrosidad tanto para la biota como para la salud humana (Markert, 1992). Muchas enzimas que poseen metales en su composición pueden ser inhibidas por sustitución de uno de esos iones metálicos por otro ion con igual carga y tamaño similar. Este es el caso del cadmio, donde su toxicidad se debe a la sustitución del zinc, el cual es componente de muchas metaloenzimas. Los iones de Zn(II) y Cd(II) son químicamente similares pero las enzimas que poseen Cd(II) como metal sustituto, difieren en su actividad biológica. Por otra parte, la afinidad del Cd(II) a las proteínas es mayor, por lo que se dificulta el reemplazo por zinc (Laws, 1993; Tölgyessy, 1993). En especies vegetales, la interacción del Cd-Zn es muchas veces controvertida, ya que se describen casos tanto de antagonismo como de sinergismo entre los dos elementos, en los procesos de absorción y transporte, dependiendo este comportamiento de la especie estudiada y de las

concentraciones relativas de ambos metales (Kabata-Pendias & Pendias, 1985; Huebert & Shay, 1992; Van Steveninck et al., 1992; McKenna et al., 1993).

En general, la fitotoxicidad del cadmio se evidencia a concentraciones más bajas que para otros metales como el cobre, cromo, zinc o plomo, siendo la causa primaria de toxicidad la alteración en la actividad enzimática, efecto sobre las membranas celulares y la pared celular (Kabata-Pendias & Pendias, 1985; Barceló & Poschenrieder, 1989; Newman & Jagoe, 1996).

Entre los efectos fitotóxicos del cadmio, se describen alteraciones en diferentes procesos fisiológicos:

- Alteraciones en la fotosíntesis (Kabata-Pendias & Pendias, 1985; Barua & Jana, 1986; Gupta & Devi, 1994; Jalil et al., 1994a; Gil et al., 1995; Skórzyńska-Polit et al., 1995; Singh et al., 1996; Sanità di Toppi & Gabbrielli, 1999; Wu & Zhang, 2002) tales como:
 - Inhibición en la síntesis de antocianinas y clorofila
 - Disminución en el contenido de clorofila a y b.
 - Aumento en el contenido de carotenoides.
 - Inhibición en la reacción de Hill, efecto en PSII.
 - Reducción en el tamaño y alteraciones en la ultraestructura de cloroplastos.
 - Disminución de la concentración de la enzima RubisCo.
 - Inhibición de la Fe(III) reductasa en raíces generando deficiencia al Fe(II) y su consecuente efecto en la fotosíntesis.
- Efecto inhibitorio en la elasticidad de la pared celular (Barceló & Poschenrieder, 1989).
- Aumento de la permeabilidad de membranas (Barua & Jana, 1986)
- Disminución en el contenido de proteínas totales en hojas (Barua & Jana, 1986; Gil et al., 1995; Mohan & Hosetti, 1997).
- Alteración en la absorción, contenido y metabolismo de nutrientes (Kabata-Pendias & Pendias, 1985; Breckle & Kahle 1992; Kahle, 1993; Jalil et al., 1994b; Gil et al., 1995; Singh et al., 1996; Sanità di Toppi & Gabbrielli, 1999).
- Alteraciones en la actividad enzimática: inhibición de amilasas, adenosin trifosfatasa, alcohol deshidrogenasa, glutamato-oxalacetato transaminasa, anhidrasa carbónica y peptidasas. Aumento de la actividad de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, glutamato deshidrogenasa, isocitrato deshidrogenasa, enzima málica, glutamato-oxalacetato transaminasa, peroxidasa (Van Assche et al., 1988; Kneer & Zenk, 1992; Kahle, 1993; Mohan & Hosetti, 1997).
- Alteración en el balance hídrico de la planta (Kabata-Pendias & Pendias, 1985; Barceló & Poschenrieder, 1989; Greger & Johansson, 1992; Kahle, 1993; Gupta & Devi, 1994; Kovačević et al., 1999):

- Efecto en la regulación de la apertura y cierre de estoma y en el tamaño, densidad y morfología estomática.
 - Disminución de la turgencia celular.
 - Reducción en el transporte de agua hacia los órganos aéreos de la planta por disminución en el número y diámetro de vasos y traqueidas además del bloqueo parcial por restos celulares y gomas.
 - Aumento de la suberización de las células radicales.
- Inhibición en el crecimiento y daño en las raíces (Wang, 1987; Stefani et al., 1991; Kahle, 1993; Jalil et al., 1994b).
 - Inhibición en crecimiento de tallo (Van Assche et al., 1988; Stefani et al., 1991; Breckle & Kahle 1992; Jalil et al., 1994b; Wu & Zhang, 2002)
 - Inhibición en el área, biomasa y anatomía foliar (Jalil et al., 1994b; Skórzyńska-Polit et al., 1995; Sanitá di Toppi & Gabbrielli , 1999; Wu & Zhang, 2002)
 - Retraso y alteraciones en la formación de estructuras reproductivas en Pteridofitas. Inhibición en la germinación de esporas (Gupta & Devi, 1994).

I.4 CARACTERÍSTICAS, USOS, DISTRIBUCIÓN Y EFECTOS BIOLÓGICOS DEL HERBICIDA GLIFOSATO

El glifosato es un herbicida no selectivo que se ha venido utilizando mundialmente desde hace más de 30 años. Se lo aplica tanto como herbicida preemergente en el control de malezas en cultivos intensivos como en cultivos extensivos de algodón, soja, maíz, trigo, avena, centeno y papa y como herbicida desecante de precosecha en cultivos de trigo, centeno, canola, soja, lentejas, etc. También se lo utiliza en el control de malezas de los costados de los caminos, en forestaciones, en áreas industriales, recreacionales, públicas y domésticas así como para el control de malezas acuáticas en canales, estanques o cuerpos de agua naturales.

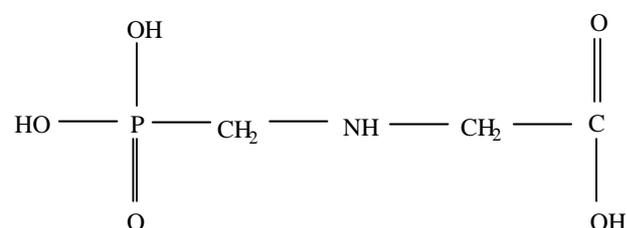
En los últimos años se han desarrollado cultivos genéticamente modificados resistentes a este herbicida por lo que su uso se ha incrementado ampliamente (Pengue, 2000; Mentaberry, 2001; Blackburn & Butin, 2003; Poverene & Cantamutto, 2003). Como se ha mencionado anteriormente, en Argentina la implementación de cultivos genéticamente modificados, y en particular el cultivo de soja RR (Roundup Ready[®] resistente al formulado de glifosato Roundup), se incrementó notablemente durante los últimos 20 años, creciendo la superficie sembrada en forma sostenida y alcanzando en la actualidad a más de 16 millones de hectáreas (Pengue, 2000; Mentaberry, 2001; Satorre, 2005; SAGPyA, 2009). A esto se suma, más recientemente, la incorporación de otros cultivos resistentes al glifosato (ej. maíz) produciendo un consecuente aumento del uso del herbicida glifosato y de otros agroquímicos

incluidos en el paquete tecnológico para el manejo de los cultivos (Pengue, 2000; Mentaberry, 2001; Satorre, 2005; Trigo, 2005).

Muchos estudios ecotoxicológicos del herbicida glifosato están predominantemente orientados a la evaluación del riesgo para las especies animales (WSSA, 1994; Cox, 2003; Tsui & Chu, 2003; Howe et al.; 2004; Couble & Wagner, 2005). Existen diversos antecedentes bibliográficos sobre el impacto de los herbicidas sobre comunidades vegetales en el contexto de cultivos genéticamente modificados que usan glifosato, además de estudios de laboratorio con especies vegetales no blanco (Peterson et al, 1994; Paradiso Giles, 2000; Ralph, 2000; Blackburn & Boutin, 2003; Michel et al., 2004). Varios autores evaluaron además, los efectos subletales de los residuos de glifosato en el suelo en la germinación y desarrollo de plántulas, no sólo en especies de interés agronómico sino considerando además el impacto del herbicida en los bancos de semillas de especies de la flora ruderal en agroecosistemas (Boutin et al., 1993; Boutin & Rogers, 2000; Pline et al., 2002; Martin & Ronco, 2006; Ronco et al., 2008). Los efectos fitotóxicos en ambientes acuáticos han sido considerados además en especies algales y plantas vasculares (Peterson et al., 1994; Paradiso Giles, 2000; Martin et al., 2003; SRHN, 2003a; Tsui & Chu, 2003; Michel et al., 2004, Martin et al., 2005). Según los resultados obtenidos por diferentes autores, que evaluaron la toxicidad en las Lemnáceas, el glifosato es de baja fitotoxicidad en comparación a otros herbicidas y/o plaguicidas pertenecientes a diferentes familias químicas o con otro modo de acción (Peterson et al., 1994; Paradiso Giles, 2000; Michel et al., 2004). Ralph (2000) observa lo mismo para la especie halófila *Halophila ovalis* con respecto a los herbicidas DCMU, atrazina y simazina.

I.4.1 Características fisicoquímicas, comportamiento en el ambiente, modo de acción y efectos fitotóxicos del glifosato.

Glifosato (N-(fosfonometil) glicina) PM 169,07



Algunas de las características físico químicas ambientalmente mas relevantes del ácido puro son: solubilidad en agua 15,7 g/L a pH 7 y 25 °C; presión de vapor $1,84 \times 10^{-4}$ mmHg a 45 °C; densidad 1,74 g/ml; k_{ow} 0,0006-0,0017; pK_3 2,6, 5,6 y 10,3; estabilidad por 30 d a 25 °C a pH 5, 7 y 9. Muchos herbicidas contienen en sus formulados la sal isopropilamina de glifosato (IPA, PM 227,2), por ser una forma aún mas soluble que el ácido, además de que es mas fácilmente

absorbida por el vegetal que el ácido. En el suelo el glifosato se mantiene generalmente inactivo, adsorbido a la materia orgánica y la arcilla por lo que no es fácilmente absorbido por los vegetales. Además, la presencia de metales catiónicos en las arcillas del suelo aumenta la adsorción al mismo, mientras que ésta disminuye con la reducción del pH (Giesy et al., 2000; Tsui & Chu, 2004). Esto determina que sea bajo el riesgo de lixiviación a las aguas subterráneas o migración por escorrentía a cuerpos de agua superficiales. No obstante, el glifosato puede incorporarse a los ríos y arroyos a través de las partículas de suelo a las que está adsorbido cuando estas son arrastradas en la escorrentía superficial, además del glifosato proveniente por deriva de la aplicación que ingresa a la columna de agua directamente. Si bien el glifosato es de alta solubilidad, en los cuerpos de agua superficiales se adsorbe fuertemente a la arcilla, limo y materia orgánica del sedimento y del material particulado en suspensión, disminuyendo de esta manera la biodisponibilidad para los vegetales y por lo tanto su efecto herbicida (WSSA, 1994; Giesy et al., 2000; Morillo et al., 2000; Information Ventures, Inc., 2002; Cox, 2003; Camilión et al., 2006). Los valores informados de vida media del glifosato varían ampliamente, encontrándose entre 1,3 a 141 días para el suelos agrícolas y hasta 335 días en suelos forestales, 12 a 60 días para el agua y en sedimentos entre 120 días a más de un año. El principal metabolito intermediario de degradación es el ácido aminometilfosónico (AMPA), siendo transformado finalmente por los microorganismos mayoritariamente en dióxido de carbono. Si bien algunos microorganismos pueden degradar el glifosato, varios estudios demuestran que este herbicida puede tener efectos adversos en las poblaciones microbianas, en la actividad enzimática del suelo y en el desarrollo de hongos micorrízicos (Chakravarty & Chatarpaul, 1990; Araujo et al., 2003; Ronco et al., 2008). Por otra parte, a partir de exudados de raíces de plantas senescentes y de restos de plantas en descomposición, que han recibido aplicaciones de glifosato, se liberan residuos del herbicida al suelo, siendo absorbido por otras plantas causándoles efectos tóxicos subletales como la reducción en la producción de biomasa (Pline et al., 2002, Neumann et al., 2006). Es por ello que las plantas terrestres no sólo están en contacto con este herbicida por vía aérea (contacto superficial directo) sino que además están expuestas a los residuos de glifosato en el suelo proveniente de las mismas aplicaciones y de los exudados de raíces de malezas y cultivos resistentes, además del barbecho de los mismos.

En el control de malezas, luego de una aplicación del producto formulado, se observan signos de clorosis luego de 4 -7 días, en gramíneas muy susceptibles, y entre 10 y 20 días en las especies menos sensibles. El glifosato es un herbicida sistémico que ingresa a la planta principalmente por las hojas (en la aplicación a campo por contacto superficial directo) y es translocado principalmente por vía simplástica desde el sitio de contacto, migrando a otras partes de la planta principalmente a través del floema, acumulándose en órganos subterráneos, hojas jóvenes y meristemas. A partir del suelo el glifosato se absorbe fácilmente por las raíces,

translocándose a los sitios de crecimiento activo a través del xilema (WSSA, 1994; Giesy et al., 2000).

En las aplicaciones a campo del glifosato (contacto superficial directo), la absorción del herbicida es a través de la cutícula cerosa de las hojas, siendo la matriz del polímero de cutina la principal barrera para la transferencia de moléculas polares como el glifosato a través de la cutícula vegetal (WSSA, 1994; Santier & Chamel, 1998; Blackburn and Boutin, 2003). La sal isopropilamínica del glifosato se absorbe más fácilmente que el ácido, mientras que el agregado de surfactantes y de sulfato de amonio (coadyuvante presente en muchos formulados de glifosato) favorece aún más la entrada del producto a través de la cutícula. El pasaje al interior de la célula a través de la membrana plasmática es muy lento debido posiblemente a las cargas negativas del glifosato a pH fisiológico, estando este transporte favorecido por un transportador fosfato (WSSA, 1994).

El glifosato inhibe la síntesis de los aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina y triptofano interfiriendo, consecuentemente, en la síntesis de proteínas o de otras biomoléculas que requieran de estos aminoácidos como precursores (Ej. AIA) o como constituyentes, alterando además las rutas metabólicas de las que son intermediarios. Inhibe además la fotosíntesis pero no por interferencia en el transporte de electrones en los fotosistemas sino afectando la síntesis de clorofilas y carotenos, además de la actividad de enzimas relacionadas. El sitio de acción bioquímico del glifosato es la enzima 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintetasa (EPSP sintetasa), ubicada principalmente en los cloroplastos, interfiriendo en la síntesis del 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato, intermediario del ciclo del ácido shiquímico. El ciclo del ácido shiquímico, presente en vegetales, hongos y bacterias, constituye la ruta metabólica de síntesis no sólo de los aminoácidos aromáticos sino también de otros compuestos fenólicos simples como los ácidos cinámico, p-cumárico, cafeico, ferúlico y clorogénico, además de diversos compuestos relacionados como la lignina, fitoalexinas, sustancias alelopáticas y diversos flavonoides. El glifosato además interfiere en la actividad de la enzima fenilalanina amonio-liasa, responsable del metabolismo secundario de los aminoácidos aromáticos. El aumento de la actividad de esta enzima afecta la conversión de los aminoácidos aromáticos a diferentes compuestos fenólicos (Amrhein et al., 1980; Holländer & Amrhein, 1980; Salisbury & Ross, 1994; WSSA, 1994; Ralph, 2000; Blackburn & Boutin, 2003; Lydon & Duke, 2006).

Entre las biomoléculas relevantes para las plantas, cuyo precursor de síntesis es el triptofano, se encuentra el fitoregulator AIA (ácido indol acético). Éste se sintetiza principalmente en los meristemas vegetales, en zonas de activo crecimiento, estimulando la formación de yemas. Actúa promoviendo el crecimiento por elongación celular, al aumentar la extensibilidad de la pared celular, en tallos, hojas y raíces, estimulando además la síntesis de etileno en muchos tipos celulares, entre otros efectos. El etileno, entre numerosas funciones,

promueve la abscisión y los procesos de senescencia e inhibe la elongación de entrenudos en los tallos y raíces (Salisbury & Ross, 1994; Taiz & Zeiger, 2002; Blackburn & Boutin, 2003).

La separación o abscisión de las frondes hijas en Lemnáceas se estimula mediante la aplicación de ABA (ácido abscísico) y etileno mientras que bajos niveles de ABA promueven la formación de colonias con mayor número de frondes, observándose además que la aplicación de sustancias que inhiben la producción de auxinas, promueven la formación de colonias más numerosas en *Spirodela punctata* (Landolt, 1986; Landolt & Kandeler, 1987; Li & Xiong, 2004a). Con relación a los factores que afectan el crecimiento de las frondes, Landolt (1986) cita el aumento de la elongación de las frondes en *L. trisulca* por el agregado de AIA.

Los diferentes efectos fitotóxicos descritos para el glifosato son los siguientes:

- Reducción en la producción de biomasa seca aérea e inhibición en las curvas de crecimiento (Paradiso Giles, 2000; Martin et al., 2003; Ronco et al., 2008).
- Disminución en el número de hojas; inhibición en el crecimiento de hojas y cotiledones (Pline et al., 2002; Michel et al., 2004; Ronco et al., 2008).
- Reducción en la producción de biomasa radical, inhibición en la elongación de la raíz, alteraciones en la arquitectura radical, necrosis en ápices radicales (Pline et al., 2002; Martin & Ronco, 2006; Ronco et al., 2008).
- Inhibición en la actividad mitótica y elongación celular en meristemas apicales radicales, (Ronco et al., 2008).
- Efectos en la fotosíntesis y contenido de clorofila (Ralph, 2000; Martin et al., 2003; Martin et al., 2005; Ronco et al., 2008)
- Alteraciones en la actividad enzimática y producción de metabolitos secundarios (Amrhein et al., 1980; Holländer & Amrhein, 1980; Salisbury & Ross, 1994; Lydon & Duke, 2006)
- Inhibición en el desarrollo y la colonización de micorrizas (Chakravarty & Chatarpaul, 1990; Ronco et al., 2008).

Por otra parte, este herbicida se utiliza en combinaciones comerciales asociado a productos coadyuvantes que le otorgan características toxicológicas diferentes. Los surfactantes son coadyuvantes que incorporados en los formulados comerciales, facilitan la eficiencia en la aplicación, incrementando el contacto e ingreso del principio activo a la planta (aumentan la biodisponibilidad del principio activo). Entre los diferentes compuestos que se utilizan como coadyuvantes en diferentes productos formulados del glifosato se encuentran: NH_4SO_4 , Na_2SO_3 , KOH, 2-iodo-2-propinil butilcarbamato (IPBC), isobutano, metil pirrolidinona, ácido pelargónico, polioxietilen amina (POEA), ácido sórbico e isopropil amina (Giesy, et al., 2000; Cox, 2003). El POEA es un surfactante muy utilizado en los distintos formulados de Roundup, constituyendo entre el 10 y 20% del producto (Blackburn & Boutin, 2003; Tsui & Chu, 2004). En

presencia de arcillas y/o material orgánico soluble o particulado, el surfactante POEA se adsorbe al material particulado orgánico y a arcillas siendo esto mayor cuando se encuentra en su forma química catiónica, a pH ácido o neutro (Krogh et al., 2003; Tsui & Chu, 2003; Tsui & Chu, 2004). Si bien está muy estudiada la toxicidad del principio activo glifosato, son pocos los trabajos en los que se evalúa el efecto de los diferentes formulados comerciales de este herbicida, discriminando el aporte de los coadyuvantes, generalmente considerados como compuestos 'inertes', en la toxicidad total del producto (Cox, 2003; Tsui & Chu, 2003; Tsui & Chu, 2004; Wang et al, 2005; Martin et al, 2008). Se debe destacar que además, los herbicidas en sus diferentes formulados comerciales, muchas veces, dependiendo del estado fenológico del cultivo, no se aplican solos sino que se utilizan en mezclas combinándolos con diferentes insecticidas utilizados en el manejo de las plagas de los cultivos. Entre los insecticidas utilizados en los cultivos de soja RR se encuentran el endosulfán, clorpirifos y cipermetrina, cada uno de ellos con sus correspondientes coadyuvantes en los diversos productos formulados comerciales (Pengue, 2000; Martin & Ronco, 2006; Mugni, 2009). Es importante considerarlos en las evaluaciones de riesgo del uso de productos fitosanitarios en los agroecosistemas, que muchos de estos productos no se utilizan solos sino en mezclas de formulados de herbicidas e insecticidas, pudiendo generar efectos fitotóxicos aditivos, antagónicos o sinérgicos (Martin & Ronco, 2006).

El nivel de tolerancia al glifosato en las plantas terrestres no resistentes es muy variable y depende de la especie y de la edad de las mismas, observándose diferentes efectos en los distintos tejidos y órganos vegetales (Pline et al., 2002; Martin & Ronco, 2006; Ronco et al., 2008). Martin & Ronco (2006) evaluaron el efecto del Roundup, en la germinación y crecimiento de plántulas de diferentes especies hortícolas y forrajeras observando una alta variabilidad en la sensibilidad de las especies, siendo en algunos casos las diferencias en los valores de CI50 de hasta tres órdenes de magnitud.

Para el caso de la fitotoxicidad del glifosato en especies acuáticas, los datos bibliográficos indican un amplio intervalo de sensibilidad a este herbicida, tanto en especies algales (Peterson et al., 1994; Tsui & Chu, 2003; SRHN, 2003a) como en Lemnáceas y otras macrófitas (Lockhart et al., 1989; Peterson et al., 1994; SRHN, 2003a; Michel et al., 2004) dependiendo esta variabilidad de la especie, tiempo de exposición y del punto final considerado en la evaluación de efectos, además de considerar la exposición al principio activo glifosato o un formulado comercial (Ej. Roundup®).

Como se puede observar, existe una amplia diversidad en la respuesta de los vegetales frente al estrés generado por la presencia de metales pesados así como por el herbicida glifosato. El efecto fitotóxico de estos contaminantes no puede ser definido o predicho de manera generalizada, por lo que es necesario el estudio comparativo en las diferentes especies diagnóstico y evaluando puntos finales que abarquen distintas respuestas fisiológicas. No es de menor importancia aclarar que la sensibilidad en la respuesta se halla íntimamente vinculada al

estadio de desarrollo de los individuos expuestos, así como también al tiempo de exposición al contaminante. Son estos, entonces, aspectos relevantes a evaluar en estudios ecotoxicológicos y, obviamente, en la selección de una especie como organismo de diagnóstico.

El trabajo de tesis doctoral aquí presentado se centrará en el estudio de la fitotoxicidad de los dos grupos de contaminantes mencionados relevantes en los cuerpos de agua superficiales de nuestro país: los metales pesados, asociados a área urbana industrial, y el herbicida glifosato con relación a su impacto en los agroecosistemas.

En este estudio se consideraron tres metales pesados: cobre, cromo y cadmio, estableciendo como criterio de selección, su importancia como elementos contaminantes y si constituyen o no, nutrientes esenciales para la biota. Los tres son metales ampliamente distribuidos como contaminantes ambientales, tanto del compartimiento acuático como terrestre. En cuanto a su participación como nutrientes, el cobre es un elemento esencial en vegetales y animales, el cromo está demostrado ser esencial sólo en especies animales y el cadmio no lo es para ningún organismo, siendo además altamente tóxico.

En este trabajo de tesis se considerará la respuesta de tres clones de Lemnáceas pertenecientes, uno a la especie *L. minor* y dos a *L. gibba*. Dado que *L. minor* no es una especie nativa de Argentina pero está entre las especies más utilizadas y además recomendadas en los protocolos de ensayo para Lemnáceas (USEPA, 1996; Lytle & Lytle, 2001; Environment Canada, 2007), es relevante comparar su sensibilidad con la especie *L. gibba*, también de uso muy difundido, pero de amplia distribución en Argentina y, consecuentemente de mayor representatividad para nuestros sistemas acuáticos (Boutin et al., 1993; OECD, 2002). Por otra parte, comparar la respuesta en dos clones de *L. gibba* de diferente origen geográfico (clon local y clon proveniente de Europa), aporta información relevante respecto de la variabilidad intraespecífica.

Dada la variabilidad inter e intraespecífica de las Lemnáceas, y siendo que no existe una tendencia general en la respuesta, conocer la sensibilidad de los tres clones de *Lemna* spp. frente a la exposición a metales pesados y al herbicida glifosato, permite establecer potenciales aplicaciones, ya sea como especies sensibles aplicables en bioensayos de toxicidad o en procesos de bioremediación como bioacumuladoras de metales. Por otra parte, los resultados de la evaluación de la toxicidad de contaminantes utilizando semillas, también muestran una amplia variedad en la respuesta, como lo indican los trabajos de Wang, 1987; Wang, 1992; Mohan & Hosetti, 1999; Lytle & Lytle, 2001. Esto amerita el estudio de la respuesta de *Lactuca sativa* a los metales pesados como tóxicos de referencia comparando la sensibilidad en diferentes puntos finales de toxicidad.

La aplicación de los bioensayos de toxicidad con Lemnáceas y con semillas de *L. sativa* para la evaluación del efecto de metales pesados en plantas vasculares, permite obtener información complementaria acerca de la fitotoxicidad de estos contaminantes, abarcando no sólo distintos estadios de desarrollo (semilla-plántula-planta), sino evaluando también puntos

finales de respuesta en los que se consideran diferentes procesos fisiológicos (germinación-crecimiento-fotosíntesis). Estos dos bioensayos se complementan además con relación al compartimiento ambiental que representan así como con las vías de exposición a los contaminantes. El bioensayo con semillas es más indicado para estimar el daño en especies terrestres de la flora riparia y evaluar la probabilidad de desarrollo de las plántulas en un medio con contaminantes, además de la permitir la exposición tanto a muestras líquidas (compuestos puros, muestras de aguas superficiales, efluentes, lixiviados) como sólidas (suelo y sedimentos). El bioensayo con Lemnáceas es más representativo para la evaluación de los efectos fitotóxicos de muestras líquidas.

Más allá de conocer la sensibilidad de estas especies, es importante conocer las condiciones óptimas de obtención y producción en laboratorio de material biológico, ejecución de los ensayos y medición de puntos finales de toxicidad, a fin de establecer y estandarizar protocolos de ejecución de ensayo de fitotoxicidad que puedan ser aplicados, ya sea para el control ambiental, evaluaciones ecotoxicológicas o en la certificación de productos nuevos, de acuerdo a las exigencias legales vigentes para nuestro país.

Se considera relevante considerar en este estudio, aspectos vinculados con la representatividad de los bioensayos y la toxicidad de los diferentes contaminantes, cuando la exposición se realiza considerando condiciones experimentales, aunque en laboratorio, similares o al menos más representativas de la exposición en el medio natural, en cuanto a lo que respectan las características fisicoquímicas del ambiente natural y su influencia en la biodisponibilidad y consecuente toxicidad en un sistema biológico. Otro aspecto que se ha tenido en cuenta en este trabajo, es la evaluación de la capacidad que poseen las especies de recuperación de un nivel de daño generado por la exposición a una concentración determinada de contaminante.

I HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

II HIPOTESIS Y OBJETIVOS

En la realización de este trabajo se plantean las siguientes hipótesis:

Los efectos de compuestos tóxicos contaminantes en vegetales pueden ser evaluados y cuantificados utilizando bioensayos estandarizados de laboratorio como metodología de diagnóstico.

El conocimiento de la variabilidad en la sensibilidad de respuesta de diversas especies vegetales, considerando además diferentes parámetros indicadores de fitotoxicidad, aporta información complementaria y permite una mejor interpretación de los efectos nocivos de los contaminantes en las plantas vasculares.

Los metales pesados y el herbicida glifosato producen fitotoxicidad a las concentraciones de exposición registradas en los ambientes acuáticos.

Los efectos de la contaminación sobre vegetales en ambientes naturales pueden ser interpretados por medio de bioensayos a escala de laboratorio.

Las mismas se desarrollarán cubriendo los siguientes objetivos:

- Selección de diferentes especies de Lemnáceas y de semillas para su aplicación en bioensayos estandarizados de toxicidad como metodología de evaluación de efectos tóxicos en vegetales.
- Análisis de distintos indicadores de respuesta a considerar como puntos finales de medición de la fitotoxicidad para cada bioensayo seleccionado (porcentaje de germinación, tasa de crecimiento, número de hojas, peso seco, contenido de clorofila, etc.).
- Estudio de la sensibilidad de las especies vegetales seleccionadas, considerando la respuesta en los distintos puntos finales de toxicidad, frente a la exposición a los metales pesados y al herbicida glifosato.
- Comparación de la toxicidad de los metales pesados, cobre (II), cromo (VI) y cadmio (II), y estimación de las concentraciones umbrales de toxicidad, en las especies de Lemnáceas y semillas seleccionadas.
- Evaluación del efecto del tiempo de exposición en los niveles de inhibición de los parámetros considerados como punto final de respuesta.
- Evaluación comparativa de la fitotoxicidad del herbicida glifosato (principio activo) y de un formulado comercial del mismo.
- Estudio de la capacidad de recuperación de los efectos fitotóxicos, luego de la exposición subletal a diferentes concentraciones de los metales.
- Aplicación de los bioensayos de toxicidad estandarizados para la evaluación de la biodisponibilidad de los metales pesados y del herbicida glifosato en cuerpos de agua superficial con características fisicoquímicas diferentes.

III.1 BIOENSAYO DE TOXICIDAD AGUDA CON SEMILLAS DE *Lactuca sativa* L. OBTENCIÓN DE MATERIAL BIOLÓGICO Y PROTOCOLO DE ENSAYO DE TOXICIDAD AGUDA

III.1 BIOENSAYO DE TOXICIDAD AGUDA CON SEMILLAS DE *Lactuca sativa* L. OBTENCIÓN DE MATERIAL BIOLÓGICO Y PROTOCOLO DE ENSAYO DE TOXICIDAD AGUDA

III.1 BIOENSAYO DE TOXICIDAD AGUDA CON SEMILLAS DE *Lactuca sativa* L. OBTENCIÓN DE MATERIAL BIOLÓGICO Y PROTOCOLO DE ENSAYO DE TOXICIDAD AGUDA

III.1.1 Características generales de las semillas de *Lactuca sativa* L y su aplicación en bioensayos de toxicidad

El ensayo de toxicidad con semillas de *Lactuca sativa* L. ha sido recomendado y aplicado por diferentes organismos de protección ambiental para la evaluación ecotoxicológica de muestras ambientales, compuestos puros y para la evaluación del efecto fitotóxicos de pesticidas sobre especies no blanco necesarios para el registro de pesticidas (OECD, 1984b, Wang, 1987; USEPA, 1989; Boutin et al., 1993).

En el bioensayo con semillas de lechuga se evalúan los efectos fitotóxicos de un compuesto puro o de una mezcla compleja en el proceso de germinación de las semillas y en el desarrollo de las plántulas durante los primeros días de crecimiento. Es un ensayo estático de toxicidad aguda (96 h de exposición) y como puntos finales para la evaluación de los efectos fitotóxicos, se determina la inhibición en la germinación y la inhibición en la elongación de la radícula y del hipocótilo. Es importante destacar que durante el período de germinación y los primeros días de desarrollo de la plántula, ocurren numerosos procesos fisiológicos en los que la presencia de una sustancia tóxica puede interferir alterando la supervivencia y desarrollo normal de la planta, siendo por lo tanto una etapa de gran sensibilidad frente a factores externos adversos. Por otra parte, muchas de las reacciones y procesos involucrados en la germinación son generales para la gran mayoría de las semillas, por lo que la respuesta de esta especie y los datos obtenidos a partir de la aplicación de este ensayo, son en gran medida, representativos de los efectos en semillas o plántulas en general. El éxito o aptitud de una plántula para establecerse en un ambiente determinado es de importancia relevante para garantizar la supervivencia de la especie. La evaluación del desarrollo de la radícula y del hipocótilo son indicadores representativos para determinar la capacidad de establecimiento y desarrollo de la planta (Wang, 1987; Boutin et al., 1993; Wang & Freemark, 1995; Sobrero & Ronco, 2004)

A diferencia de la prueba tradicional de germinación de semillas que evalúa la emergencia de la plántula del suelo (USEPA, 1989; ASTM, 1991a), la evaluación del efecto en la elongación de la radícula y del hipocótilo permiten evaluar el efecto tóxico de compuestos solubles presentes en concentraciones tan bajas que no son suficientes para inhibir la germinación, pero que sí pueden retardar o inhibir completamente los procesos de elongación de la radícula o del hipocótilo, dependiendo esto del modo y sitio de acción de los contaminantes. De esta manera, la inhibición en la elongación de la radícula e hipocótilo constituyen indicadores subletales muy sensibles para la evaluación de efectos biológicos en

vegetales aportando información complementaria a la proporcionada al estudiar los efectos en la germinación. Esta prueba puede ser aplicada en la evaluación de la toxicidad tanto de compuestos puros como de muestras de aguas superficiales (lagos, ríos), aguas subterráneas, aguas para consumo humano, aguas residuales domésticas e industriales además de eluriados y lixiviados de suelos, sedimentos u otras muestras sólidas (Cheung et al., 1989; Dutka, 1989; Bowers et al., 1997; Grassi et al., 2000; Sobrero & Ronco, 2004). A diferencia de otros ensayos de toxicidad en los que se consideran algas o plantas acuáticas sumergidas como organismo diagnóstico, el bioensayo con semillas permite evaluar de manera directa la fitotoxicidad de muestras coloreadas o con elevada turbiedad y sin necesidad de filtración previa, reduciéndose así las interferencias debidas al pretratamiento además de simplificar el procedimiento de ensayo.

Si bien *L. sativa* no es una especie representativa de ecosistemas acuáticos, ni tampoco es una especie nativa o naturalizada en nuestros ambientes, la información generada a partir de este ensayo de toxicidad proporciona datos sobre el posible efecto de los contaminantes sobre las comunidades vegetales cercanas a las márgenes de cuerpos de agua contaminados, siendo también una especie interesante de considerar por su importancia desde el punto de vista hortícola. Por otra parte, esta especie es de fácil y rápida germinación por lo que es posible desarrollar la prueba en pocos días. El ensayo de toxicidad con semillas de lechuga es de muy bajo costo, simple ejecución y no requiere del uso de equipamiento costoso o sofisticado para la evaluación de los puntos finales de toxicidad.

En Argentina, el ensayo de toxicidad con semillas de *L. sativa* se ha intercalibrado como especie integrante de una batería de ensayos, conjuntamente con el ensayo con cebollas (*Allium cepa*) y otros con algas y especies animales, en el marco de un proyecto de intercalibración de bioensayos (WaterTox Network) coordinado por el International Development Research Centre (IDRC) y el National Water Research Institute (NWRI) de Environment Canada (Ronco et al., 2000; Ronco et al., 2001; Castillo 2004; Ronco et al., 2005a). Además, en Argentina este bioensayo ha sido considerado por el IRAM entre los bioensayos estandarizados para su uso como herramienta de control de la calidad ambiental (IRAM, 2008).

III.1.2. Obtención, selección y conservación de las semillas

Las semillas de lechuga (*L. sativa* var. mantecosa) se obtienen en semilleras locales, procurando que sean semillas sin curar (sin fungicidas o plaguicidas).

Previo a la implementación del ensayo, se verifica que cada lote de semillas utilizado tenga un porcentaje de germinación superior al 90%, sincronización en la germinación y baja variabilidad de la elongación de la radícula e hipocótilo (CV <30%). Es necesario además, cuando se utilice un lote o cultivar nuevo de semillas, caracterizar las condiciones de

germinación, la respuesta frente a la luz (fotoblastismo positivo o negativo: germinación en presencia o ausencia de luz, respectivamente) y la temperatura óptima de germinación.

Las semillas seleccionadas se almacenan fraccionadas a 4 °C, en oscuridad y en ambiente seco. Las semillas conservadas en estas condiciones mantienen su vigor al menos durante 2 años. Un indicador de la reducción de la vitalidad y envejecimiento de las semillas es la reducción en el poder germinativo (< 90%) y el aumento en la variabilidad de las medidas de elongación de radícula e hipocótilo en el control negativo. En este caso se recomienda realizar las pruebas de toxicidad utilizando un nuevo lote de semillas.

Con el fin de reducir la variabilidad en los resultados, para el caso de algunos lotes de semillas no seleccionadas y que presentaron gran heterogeneidad en el tamaño, se realizó una selección previa por tamaño descartando las fracciones de mayor y menor tamaño y utilizando solamente la fracción más numerosa y de tamaño intermedio (entre 840 y 500 µm). La fracción de menor tamaño presenta un alto porcentaje de semillas vanas, mientras que las semillas de mayor tamaño son más vigorosas y la sensibilidad frente a los tóxicos es menor.

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

Para la determinación de la viabilidad de las semillas, se utilizaron técnicas convencionales de germinación en cajas de Petri con temperatura, humedad e iluminación controladas, así como la prueba del tetrazolio. El análisis de la viabilidad con la prueba del tetrazolio, es un método bioquímico que utiliza el 2,3,5-trifeniltetrazolio como reactivo indicador. Luego que la solución de tetrazolio es absorbida por la semilla, en las células vivas se llevan a cabo reacciones de óxido-reducción en la cuál participan las enzimas deshidrogenasas. En esta reacción, los protones liberados en el proceso de respiración reducen el trifeniltetrazolio a trifenilformazan. El trifenilformazan es una sustancia estable, no difusible, de coloración rojiza, que permite distinguir las áreas vivas de las semillas (áreas de color rojo o rosado) de las zonas muertas sin coloración (Ellis et al., 1985)."

III.1.3 Protocolo del ensayo de toxicidad aguda

En la Figura III.1.1 se resume el protocolo del ensayo de toxicidad con semillas. El ensayo de toxicidad aguda (96h) con semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L. var. mantecosa) se realiza en cajas de Petri (100 mm de diámetro) utilizando papel de filtro Whatman N° 3 (o equivalente), como soporte y medio de imbibición. El volumen de muestra para el ensayo es de 4-5 ml por caja, empleando agua destilada en los controles negativos y como medio de dilución. Por cada caja de Petri, y una vez embebido el papel de filtro, se colocan 20 semillas, teniendo en cuenta

de dejar espacio suficiente entre las semillas para permitir la elongación de las raíces. Las cajas se tapan y se colocan en bolsas plásticas para evitar la pérdida de humedad. Dado que algunas variedades de semillas de lechuga requieren oscuridad para que se produzca la germinación (semillas fotoblásticas negativas), las cajas de Petri deben cubrirse de la luz inmediatamente después de iniciada la imbibición y durante el periodo de ensayo. Incubar por un periodo de 96 h a 22 ± 2 °C. Se realiza al menos 3 repeticiones para cada dilución ensayada.

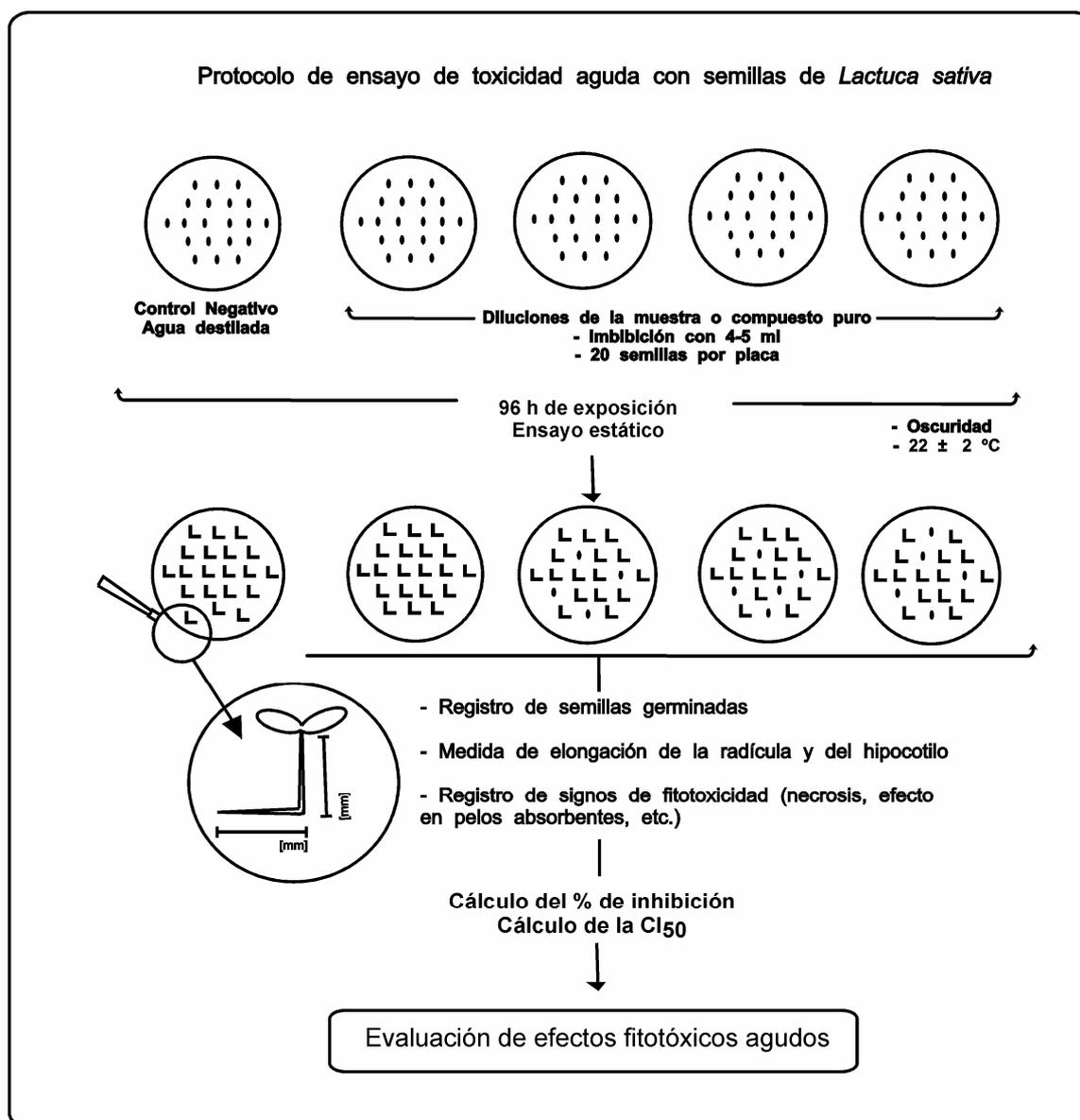


Figura III.1.1 Protocolo de ensayo de toxicidad agudo con semillas de *Lactuca sativa*

III.1.4 Puntos finales de evaluación de la toxicidad

Como puntos finales de evaluación de la toxicidad se consideran el efecto en la germinación y la elongación de la radícula e hipocótilo (USEPA, 1989; Sobrero & Ronco, 2004).

Efecto en la germinación: se registra el número de semillas que germinaron normalmente, respecto del total de semillas colocadas al inicio del ensayo, considerando como criterio de germinación la aparición visible de la radícula.

Efecto en la elongación de la radícula e hipocótilo: utilizando una regla se mide cuidadosamente la longitud de la radícula y del hipocótilo de cada una de las plántulas correspondientes a los controles y a cada concentración de tóxico. La medida de elongación de la radícula se considera desde el nudo (región más engrosada de transición entre la radícula y el hipocótilo) hasta el ápice radicular. La medida de elongación del hipocótilo se considera desde el nudo hasta la inserción de los cotiledones (Figura III.1.2).

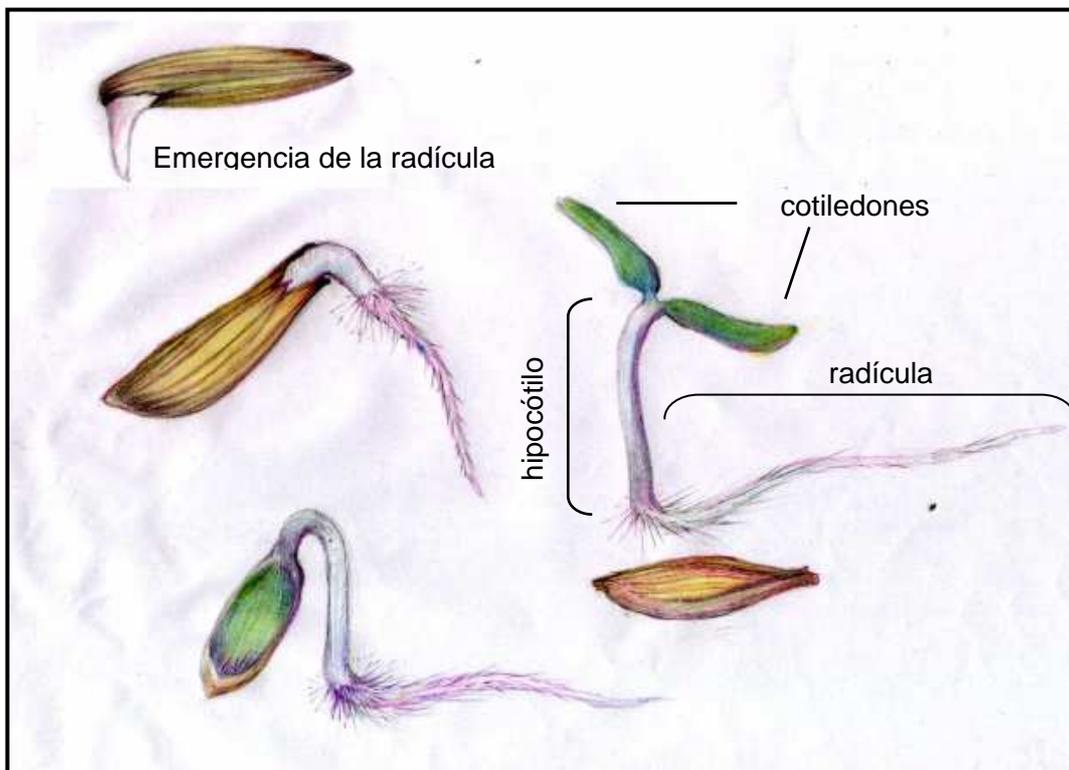


Figura III.1.2 Germinación y estadios de desarrollo por los que atraviesa la semilla y la plántula durante las 96h del ensayo de toxicidad.

Antes de retirar las plántulas de las cajas de Petri para evaluar el efecto en los puntos finales anteriormente mencionados, es importante realizar una observación detallada del estado general de las mismas y del crecimiento de la radícula sobre el papel de filtro. Informar cualquier indicador de fitotoxicidad o de crecimiento anormal en las plántulas tratadas y en los controles (ápices radiculares con necrosis, pelos absorbentes poco desarrollados, radículas con crecimiento ensortijado, necrosis en los cotiledones, etc.). Al evaluar el efecto en la germinación, se debe consignar además, aquellas semillas con germinación anormal (emergencia de cotiledones o cotiledones e hipocótilo solamente, pero sin emergencia de la radícula) o con desarrollo de hongos.

Una vez finalizado el periodo de exposición, un procedimiento factible de realizar para facilitar la medición de la radícula e hipocótilo, es proceder a congelar en freezer las cápsulas de Petri correspondientes a todos los tratamientos y descongelarlas a medida que se van midiendo. De esta manera las plántulas descongeladas adquieren una consistencia blanda que favorece la realización de las medidas con mayor precisión. Si se procede a evaluar el efecto sobre las plantas descongeladas es importante proceder de igual manera con todas las réplicas del ensayo. Esta metodología permite trabajar con numerosas muestras simultáneamente, conservándolas una vez finalizada la exposición, permitiendo así cuantificar el efecto en los puntos finales por etapas, en momentos diferentes.

En la Tabla III.1.1 se indica el poder germinativo y las condiciones de germinación, consignándose el intervalo de temperatura donde se obtienen los valores óptimos de germinación así como la temperatura a partir de la que se genera termodormancia, de los diferentes cultivares de *Lactuca sativa* var. mantecosa evaluados para su uso en bioensayos de toxicidad y utilizados en este trabajo de tesis. La Tabla III.1.1 muestra también la variabilidad en la elongación de la radícula y del hipocótilo y la sensibilidad frente a un tóxico de referencia ($K_2Cr_2O_7$), luego de las 96h de crecimiento en condiciones estandarizadas de ensayo de toxicidad.

Tabla III.1.1 Condiciones de germinación, variabilidad en la elongación de la radícula e hipocótilo y sensibilidad de dos cultivares de *Lactuca sativa* var. mantecosa

Características del cultivar de <i>L. sativa</i> var. mantecosa						
Cultivar	% de germinación	Longitud de la radícula [#] (mm)	Longitud del hipocótilo [#] (mm)	Temperatura de germinación* (°C)	Fotoblastismo	Sensibilidad al Cr(VI) Cl_{50} **
Maravilla de Invierno	96	22,8 ± 0,55	9,9 ± 0,46	22±2 (27)	negativo	5,1 (4,59-5,69)
Elsa	98	23,4 ± 0,75	11,5 ± 0,78	22±2 (25)	negativo	4,9 (4,31-5,44)

Los valores corresponden a la Media ± error estándar de las medidas de las plántulas en los controles negativos luego de 96h de crecimiento en condiciones estandarizadas de bioensayo. * Se indica entre paréntesis la temperatura mínima a la que se verifica termodormancia. **Los valores corresponden a mgCrVI/L, indicándose entre paréntesis el intervalo de confianza (95%).

En los dos cultivares seleccionados para este trabajo, las condiciones de germinación son muy similares, así como los valores promedio y la variabilidad de elongación de la radícula e hipocótilo de las plántulas en los controles negativos. Con relación a la sensibilidad al tóxico de referencia, se observa que el cultivar Elsa es levemente más sensible que el cultivar Maravilla de Invierno.

III.1.5 Expresión de los resultados de toxicidad

La respuesta tóxica en los diferentes puntos finales por exposición a los contaminantes se expresa como CI_{10} , CI_{25} o CI_{50} (concentración de tóxico que produce el 10, 25 o 50 % de inhibición en el parámetro considerado como punto final, respectivamente). También es posible informar los valores correspondientes al NOEC (No Observed Effect Concentration: máxima concentración ensayada a la que no se verifica efecto tóxico estadísticamente significativo), LOEC (Lowest Observed Effect Concentration: mínima concentración ensayada a la que se verifica efecto tóxico estadísticamente significativo) y TOEC (Threshold Observed Effect Concentration: concentración umbral a la que se verifica efecto tóxico). Dado que el uso de las siglas NOEC, LOEC y TOEC se encuentra muy difundido en idioma inglés, se mantienen las siglas de las mismas en ese idioma, sin traducirlas al castellano.

Los valores de NOEC y LOEC se verifican mediante el ANOVA aplicando el método de Dunnett o el de Williams para la comparación múltiple de medias, cuando se verifica la normalidad y homogeneidad de la varianza de los datos, o mediante análisis no paramétrico con el método de Wilcoxon. El valor del TOEC se calcula como la media geométrica de los valores del NOEC y LOEC. Los valores correspondientes a la CI_{10} , CI_{25} y CI_{50} se estiman mediante un método no paramétrico de interpolación lineal, obteniéndose los límites de confianza mediante "bootstrapping" por remuestreos al azar de los datos experimentales (Environment Canada, 1999b). La CI_{10} , CI_{25} y CI_{50} se calcularon sólo para aquellos puntos finales donde la inhibición fue superior al 10, 25 y 50%, respectivamente, para alguna de las concentraciones de metal ensayadas. En aquellos parámetros para los que no es posible calcular la CI, o cuando se compara la respuesta en varios puntos finales, el efecto inhibitorio se expresó como porcentaje (Sokal & Rohlf, 1979; Boutin et al., 1993; Zar, 1996; Environment Canada, 1999a; 1999b; 2005).

Si bien en protocolos más recientes se recomienda el cálculo de la CI por estimación inversa a partir de la de regresión lineal o no lineal de los datos de las curvas de toxicidad (Environment Canada, 2005), se informan en este trabajo, tanto para los ensayos con semillas como para aquellos con Lemnáceas, los resultados de las estimaciones de CI calculados mediante la metodología descrita en el párrafo anterior utilizando un método no paramétrico de interpolación lineal. Se han realizado para numerosos ensayos los cálculos por ambas metodologías (regresión lineal o no lineal e interpolación lineal), encontrándose en la mayoría de los casos dificultades para la linearización de los datos o para la estimación inversa y cálculo de los intervalos de confianza a partir de modelos no lineales, obteniendo ajustes con coeficientes de correlación muy bajos. Mediante el uso del método no paramétrico de interpolación lineal se pretende unificar la metodología utilizada a la hora de comparar los valores de CI, así como facilitar el cálculo de los intervalos de confianza para dichas estimaciones, evitando forzar el ajuste de los datos a un modelo determinado y priorizando el uso de datos sin transformar (Dr. Maronna, comunicación personal). No obstante esto, si bien

no se informa en este trabajo, en aquellos casos en los que se estimaron las CI mediante estimación inversa a partir de curvas linearizadas (a partir de transformaciones log-probit, logarítmica, inversa, etc), los valores obtenidos son muy similares, y siempre dentro de los intervalos de confianza, a los obtenidos mediante interpolación lineal. Por ejemplo, para el caso del efecto de metales pesados en Lemnáceas, mediante la aplicación de las transformaciones probit y logarítmica en los porcentajes de efecto inhibitorio y concentración de tóxico, respectivamente, se obtuvieron los mejores coeficientes de determinación (R^2) en el ajuste de la regresión lineal, así como estimaciones de los valores de CI e intervalos de confianza coincidentes a las obtenidas mediante el método no paramétrico de interpolación lineal (Sobrero, 1996; 1997; 2000; Sobrero & Ronco, 2000).

El análisis estadístico de los datos de toxicidad se realizó utilizando los programas de computación Systat (Systat, Inc., 1993), Statistica (StatSoft, Inc., 1996) y Toxstat, Version 3,5 (West Inc., 1996).

Con el fin de establecer el intervalo de concentraciones finales de exposición en el cual se verifique efecto inhibitorio y así poder elaborar las curvas de toxicidad, se realizan ensayos preliminares seleccionando concentraciones de exposición según escala logarítmica. A partir de estos resultados, se realizan las exposiciones definitivas, ajustando el intervalo de concentraciones en el diseño experimental, según la sensibilidad de la especie estudiada. Este procedimiento se aplica de manera general a la evaluación de la toxicidad, no sólo de compuestos puros, sino también a mezclas complejas, lixiviados o muestras ambientales.

III.1.6 Interferencias posibles en el proceso normal de germinación o desarrollo de las plántulas.

Los aspectos que se consideran a continuación son algunas de las interferencias metodológicas más comunes en el proceso normal de germinación o desarrollo de las plántulas en el procedimiento del ensayo de toxicidad:

- Toxicidad del sustrato: cuando se reemplaza el papel corrientemente utilizado por otras marcas más económicas o se utiliza papel de filtro cualitativo en planchas, hay que tener en cuenta posibles efectos tóxicos del papel. Si se han tenido buenos resultados con una marca o calidad determinada de papel, es conveniente no variar el sustrato de ensayo. El papel de filtro que se seleccione como sustrato de germinación debe tener las siguientes características:
 - Trama amplia y porosa que asegure una buena capacidad de retención de líquido.
 - Resistencia de la fibra del papel para que las radículas crezcan por su superficie y sin atravesarlo, lo que dificultaría sacar las plántulas sin dañarlas.
 - Carecer de residuos tóxicos (ej. blanqueadores) y que no desarrolle hongos (no asociados a las semillas).

- Exceso de agua de imbibición o de muestra lo que determina una baja disponibilidad de oxígeno necesario para el normal desarrollo del proceso de germinación. El papel de filtro utilizado como sustrato de germinación debe estar bien mojado, con sobrante de líquido para evitar la desecación de las plántulas en crecimiento, pero en ningún caso las semillas deben quedar sumergidas.
- Déficit hídrico durante el periodo de exposición: se recomienda envolver las placas con una bolsa plástica para evitar que el papel de filtro de las mismas pierda agua durante el ensayo. No deben colocarse en una misma bolsa, placas que correspondan a diferentes tratamientos. También se puede colocar dentro de la cámara de cultivo un recipiente con agua para generar un ambiente húmedo, reduciéndose así la evaporación. Hay que tener en cuenta que la pérdida de humedad de las cápsulas genera una concentración del tóxico cuyo efecto está siendo evaluado, y por lo tanto, las conclusiones a las que se arribe serían erróneas.
- Exposición a la luz durante el proceso de imbibición de las semillas: inmediatamente después de colocar las semillas sobre el papel de filtro, se recomienda tapar y envolver las cápsulas de Petri cubriéndolas de la luz (para el caso de semillas fotoblásticas negativas).
- Temperatura de ensayo: las semillas de *L. sativa* expuestas a una temperatura superior (apenas unos grados) a la óptima para la germinación, no germinarán aunque se las coloque posteriormente a temperaturas inferiores (termodormancia o dormancia inducida por la temperatura).

*Si bien en este capítulo del trabajo de tesis se ha desarrollado la metodología del ensayo de toxicidad aguda con *Lactuca sativa*, en el capítulo siguiente, los diferentes estudios realizados con esta especie ameritan el desarrollo de un apartado metodológico específico, en el que se consideran aspectos puntuales concernientes a cada experiencia, además de los vinculados al diseño experimental y análisis estadístico de los resultados.*

**III.2 EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DE *Lactuca sativa* L.
A LOS METALES Cu(II), Cr(VI) y Cd(II). ESTUDIO
COMPARATIVO DE LOS EFECTOS AGUDOS Y
SUBCRÓNICOS Y EVALUACIÓN DE LA RECUPERACIÓN.**

III.2 EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DE *Lactuca sativa* L. A LOS METALES Cu(II), Cr(VI) y Cd(II). ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS EFECTOS AGUDOS Y SUBCRÓNICOS Y EVALUACIÓN DE LA RECUPERACIÓN.

III.2.1 INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

De acuerdo a los antecedentes descriptos acerca de la aplicación de las plantas vasculares para la evaluación ecotoxicológica de contaminantes ambientales, y en particular de metales pesados (Capítulos I.2 y I.3), si bien los efectos fitotóxicos del cobre, cromo y cadmio han sido bien documentados en numerosas investigaciones, existe un amplio espectro de sensibilidad en la respuesta, tanto en especies acuáticas como terrestres (Cheung et al., 1989, Hendry et al., 1992; Lewis, 1995; Gupta et al., 1996; Crawley, 1997; Wu & Zhang, 2002; Miretzky et al., 2004). Esta gran diversidad en la fitotoxicidad se manifiesta no solamente entre especies diferentes, sino que además varía según el parámetro evaluado como punto final de respuesta y el tiempo de exposición al contaminante (Barceló & Poschenrieder, 1989; Gupta et al., 1994; Sinha et al., 1994; Gupta et al., 1996; Prasad et al., 2001; Liu et al., 2004).

Como se ha mencionado en los capítulos anteriores, la evaluación de efectos fitotóxicos agudos con semillas en ensayos de laboratorio constituye una herramienta relevante en estudios ecotoxicológicos de contaminantes en ambientes acuáticos (Wang, 1987; USEPA, 1988; Boutin et al., 1993; Boutin et al., 1995; Wang & Freemark, 1995; Lytle & Lytle, 2001). Conocer la sensibilidad en la respuesta del ensayo de semillas de *L. sativa* en los diferentes puntos finales de exposición aguda, aporta información relevante para su uso como especie diagnóstico en aplicaciones ambientales.

No obstante la utilidad y relevancia del ensayo de toxicidad aguda con semillas, es importante también considerar la respuesta luego de períodos de exposición más extensos, más representativos del ciclo biológico de la especie, y considerando otros puntos finales de evaluación. Si bien existen numerosos trabajos en los que se evalúan en plantas vasculares efectos subcrónicos de contaminantes orgánicos, así como estudios de fitotoxicidad y bioacumulación de metales pesados (Kleiman & Cogliatti, 1992; Lidon y Henriques, 1992; Kummerová & Brandejsová, 1994; Moral et al., 1994; Kovačević et al., 1999; Singh & Sinha, 2005), son pocos los que utilizan plántulas de *L. sativa* como organismo diagnóstico considerando períodos de exposición prolongados (Matt & van Laerhoven, 1976; McKenna et al., 1992; Hulzebos et al., 1993; McKenna et al., 1993, Sobrero & Moschione, 2001). Esta especie, así como otras representantes de diferentes familias botánicas, se ha recomendado para la evaluación de efectos fitotóxicos en plantas terrestres, y durante períodos de exposición mayor al del ensayo de germinación y elongación de radícula con semillas, para el registro de pesticidas y otras sustancias tóxicas, además de aplicaciones al monitoreo ambiental (Boutin et al., 1993; OECD, 1984b; ASTM, 1991a; Wang & Freemark, 1995).

Es en este marco que se encaró el estudio comparativo de las respuestas agudas y subcrónicas en *L. sativa*. Considerando al Cr(VI) como metal de referencia, se complementa el estudio de los efectos de los metales pesados en *L. sativa*, orientando la evaluación a los efectos que producen bajas concentraciones de tóxico en tiempos de exposición prolongados y comparando la respuesta y sensibilidad en diferentes puntos finales. Conocer los umbrales de respuesta para los diferentes puntos finales tanto para exposiciones agudas o subcrónicas, aporta información relevante para el establecimiento de niveles guía de protección ambiental (SRHN, 2003b; SRHN, 2004; SRHN, 2005).

Otro aspecto importante a considerar en estudios de fitotoxicidad, es la evaluación de la capacidad de recuperación que poseen las plántulas previamente expuestas a dosis efectivas de tóxicos, cuando éstas continúan su desarrollo en medios no contaminados. En la evaluación de los resultados de toxicidad, cuando se consideran puntos finales subletales en ensayos agudos o subcrónicos, muchas veces es difícil interpretar y extrapolar las consecuencias que tendrán estos efectos en las poblaciones de los organismos estudiados, luego de la exposición a un tóxico determinado. A diferencia de los efectos letales, el significado y la importancia de la reducción en un parámetro subletal no sólo dependerá del valor de inhibición producido por la exposición al tóxico, sino también de la relevancia fisiológica que este parámetro tenga en la aptitud del organismo para sobrevivir (Wang & Freemark, 1995).

Si bien los ensayos de recuperación permiten estimar las consecuencias de los efectos fitotóxicos agudos de un contaminante para el establecimiento y desarrollo posterior de las plántulas, y así facilitar la interpretación de su peligrosidad sobre los sistemas biológicos, no son aspectos evaluados corrientemente en estudios ecotoxicológicos por lo que ameritan una consideración especial. Es por esto que en este trabajo se propone además, evaluar la capacidad de recuperación de *L. sativa* luego de exposiciones al cromo (VI) a concentraciones que producen efecto agudo (CI₅₀).

Se proponen como objetivos de este trabajo:

- *Estudiar la sensibilidad de L. sativa a la exposición aguda (96h) a los metales pesados Cu(II), Cr(VI) y Cd(II).*
- *Comparar la sensibilidad de diferentes puntos finales de respuesta para la evaluación de efectos fitotóxicos agudos en L. sativa.*
- *Compara la sensibilidad de L. sativa en condiciones subcrónicas de exposición al Cr(VI) en relación a la respuesta aguda a 96h de exposición.*
- *Evaluar la respuesta subcrónica de L. sativa L. a concentraciones de Cr(VI) que no producen efecto tóxico agudo y a concentraciones que producen efecto agudo menor a 40 % de inhibición.*

- *Analizar comparativamente la sensibilidad y representatividad de diferentes punto final de respuesta subcrónica.*
- *Establecer los umbrales de respuesta al Cu(II), Cr(VI) y Cd(II) para los puntos finales de exposición aguda y subcrónica.*
- *Evaluar la capacidad de recuperación de plántulas previamente expuestas a concentraciones de Cr(VI) que generan toxicidad aguda significativa.*

III.2.2 METODOLOGÍA

III.2.2.1 Evaluación de la toxicidad aguda de los metales Cu(II), Cr(VI) y Cd(II) en *L. sativa*

El ensayo de toxicidad aguda (96h) se realizó según la metodología descrita en el Capítulo III.1, utilizándose en este estudio el cultivar Maravilla de Invierno de *L. sativa*. Los ensayos se realizaron por triplicado, cada uno con 3 repeticiones y con 20 semillas cada una, para cada metal evaluado. Los parámetros medidos como punto final fueron la inhibición en la elongación y en el peso seco de la radícula y del hipocótilo, expresando los efectos como porcentaje de inhibición respecto del control. El peso seco de la radícula y del hipocótilo se determinó luego de 72 h de secado a 80 °C, expresando los resultados como el valor promedio de las plántulas por repetición.

A partir de los resultados de los ensayos preliminares, se realizaron las exposiciones definitivas, ajustando el intervalo de concentraciones utilizadas con cada metal de acuerdo a la sensibilidad de la especie. El intervalo de concentraciones de exposición ensayados fue de 0,25 a 7 mgCu(II)/L, 0,75 a 7 mgCr(VI)/L y 0,1 a 10 mgCd(II)/L.

Los resultados de los efectos del Cu(II), Cr(VI) y Cd(II) en los diferentes puntos finales se analizaron mediante ANOVA simple, comparándose las medias mediante el método de LSD (Fisher's Least Significant Difference Test). Para los efectos en la elongación de la radícula e hipocótilo se estimaron los valores de la CI_{25} y CI_{50} a partir de las correspondientes curvas concentración-respuesta. Se calculó además los valores de NOEC, LOEC y TOEC. Los valores de NOEC, LOEC y TOEC y las estimaciones de la CI_{25} y CI_{50} se calcularon de acuerdo a lo especificado en el Capítulo III.1.5.

Los patrones de metales, para este ensayo así como para los ensayos de toxicidad subcrónica y recuperación, se prepararon a partir de sales de Cd y Cu metálico en HNO₃ y de K₂Cr₂O₇, todos de calidad analítica, en agua nanopura, verificándose su concentración final por espectrofotometría de absorción atómica (Varian Spectra AA) por aspiración directa en llama (APHA-AEEA-WPCF, 1992).

III.2.2.2 Evaluación de la toxicidad subcrónica del Cr(VI) en *L. sativa*

Este ensayo de laboratorio se realizó en dos etapas sucesivas abarcando los dos períodos de exposición (Figura III.2.1):

- 1- Primer etapa: **ensayo de exposición aguda (96 h).**
- 2- Segunda etapa: **ensayo de exposición subcrónica (21 días).**

1- Ensayo de exposición aguda (96 h)

Este ensayo fue realizado según la metodología descrita en el Capítulo III.1. En este estudio, así como en el ensayo de recuperación, se utilizó el cultivar Elsa de *L. sativa*. Las semillas fueron expuestas durante 96 h a las siguientes concentraciones de cromo: 0; 0,05; 0,10; 0,25; 0,75 y 1,25 mg(VI)/L. Para la elección del intervalo de concentraciones de Cr(VI) a ensayar, se consideraron los resultados obtenidos en el ensayo de toxicidad aguda con Cr(VI) (Capítulo III.2.3.1), seleccionándose concentraciones que no producen efecto agudo significativo ($p \leq 0,05$), para esta especie en la elongación de la radícula (0,05, 0,10, 0,25 y 0,75 mgCr(VI)/L) y aquella que producen efecto $<40\%$ (1,25 mgCr(VI)/L). Se realizaron 6 repeticiones con 20 semillas cada una. El parámetro medido como punto final del período de exposición aguda, fue la inhibición en la elongación de la radícula, expresando los efectos como porcentaje de inhibición respecto del control.

Luego del período de exposición aguda, el 50% de las plántulas, para cada tratamiento, fue separado para medir la elongación de la raíz. El resto de las plántulas fue utilizado para continuar con la segunda etapa del ensayo (exposición subcrónica; Figura III.2.1).

2- Ensayo de exposición subcrónica (21 días).

Las plántulas previamente expuestas en el ensayo de exposición aguda (4 d), continúan el crecimiento durante los siguientes 21 d, en condiciones de hidroponía. Las plántulas fueron transferidas a potes de plástico conteniendo 300 ml de solución Hoagland, (Hoagland & Arnon, 1950) diluida (1/5). Como soporte de las plántulas en los potes, se utilizó tela de gasa. Las concentraciones de Cr(VI) ensayadas fueron las mismas del periodo agudo de exposición: 0; 0,05; 0,10; 0,25; 0,75 (concentraciones que no producen efecto agudo significativo) y 1,25 mg/l (inhibición $<40\%$ en ensayo de toxicidad aguda), utilizando 15 plántulas por pote y 4 repeticiones por nivel del tratamiento. Las condiciones de exposición subcrónica fueron $32 \pm 2 / 24 \pm 2$ °C de temperatura día/noche, fotoperíodo de 16 h y $300 \mu\text{M}/\text{m}^2\text{s}$ de irradiancia. A los 10 d de ensayo, se renovó el 50 % de la solución en todos los tratamientos, controlándose el pH de las mismas.

Los parámetros medidos como punto final del ensayo subcrónico (4+21 d de exposición), fueron: contenido de clorofila ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$), área foliar (cm^2) peso seco total (mg) y número de hojas, expresando la inhibición como porcentaje respecto del control. Los resultados se analizaron mediante ANOVA simple, comparándose las medias mediante el método de LSD (Fisher's Least

Significant Difference Test). Se calculó la CI_{25} y CI_{50} de acuerdo a la metodología descrita en el Capítulo III.1.5.

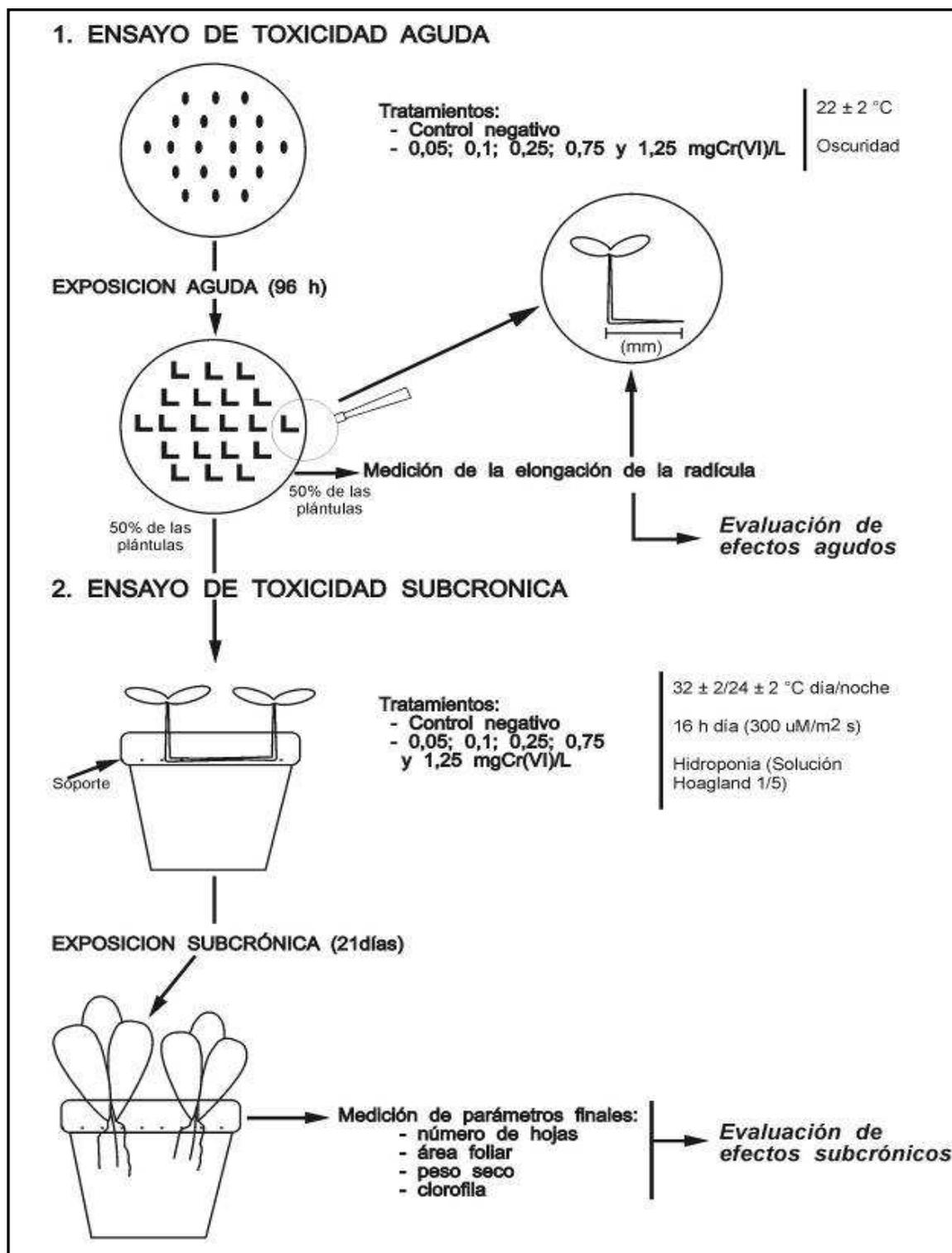


Figura III.2.1: Procedimiento de ensayo para la evaluación de la toxicidad subcrónica del cromo(VI) en *L. sativa*.

Luego del período de exposición subcrónica en hidroponía (21 d), se recogieron las plántulas correspondientes a cada tratamiento, se midió el área foliar y se contó el número de hojas por

plántula. El 20 % de las plántulas se separó para la determinación de clorofila y el resto del material se utilizó para la determinación del peso seco total (Figura III.2.1).

La determinación de clorofila se realizó según la técnica de Zscheile & Comar, (1941), utilizando Dimetilformamida como solvente de extracción (5 ml). Se midió la absorbancia en un espectrofotómetro Shimadzu UV-160A, UV-visible a 661 y 644 nm. El contenido de clorofila se expresó respecto del área foliar de las hojas sometidas a la extracción y se calculó con las siguientes formulas:

$$\text{Clorofila Total} = [(Cl\ a + Cl\ b) \times vol] / \text{área foliar}$$

$$Cl\ a = (12,7 \times \text{abs. } 661) - (2,79 \times \text{abs. } 644)$$

$$Cl\ b = (20,7 \times \text{abs. } 644) - (4,62 \times \text{abs. } 661)$$

El peso seco se determinó según lo indicado para el ensayo de toxicidad aguda (Capítulo III.2.2.1), expresando los resultados como peso seco promedio por plántula. La medición del área foliar se realizó utilizando un medidor de área foliar (LI-3100 Area Meter, LI-COR.). En las mediciones de peso seco, área foliar y número de hojas se incluyen los cotiledones.

III.2.2.3 Evaluación de la recuperación de *L. sativa* luego de la exposición aguda al Cr(VI).

Este ensayo de laboratorio se realizó en dos etapas sucesivas (Figura III.3.2):

- 1- Primer etapa: **ensayo de exposición aguda (96 h).**
- 2- Segunda etapa: **ensayo de recuperación (21 d).**

1. Ensayo de exposición aguda (96 h).

De acuerdo a la metodología descrita en el Capítulo III.1, las semillas fueron expuestas durante 96 h al control negativo y a 5 mgCr(VI)/L (concentración correspondiente a la Cl_{50-96h} , Capítulo III.2.3.1). Se realizaron 6 repeticiones con 20 semillas cada una. Como punto final del período de exposición aguda, se evaluó la inhibición en la elongación de la radícula.

Luego del período de exposición aguda, el 50% de las plántulas, para cada tratamiento, fue separado para medir la elongación de la raíz. El resto de las plántulas fue utilizado para continuar con la segunda etapa (Ensayo de recuperación, Figura III.2.2).

2. Ensayo de recuperación (21 días). Las plántulas expuestas a 5 mgCr(VI)/L durante el período de exposición agudo, así como aquellas del control negativo, fueron utilizadas para evaluar el nivel de recuperación luego de 21 días de crecimiento en ausencia de tóxico (Figura III.2.2). Este ensayo se realizó en hidroponia en las mismas condiciones de crecimiento utilizadas para el ensayo de exposición subcrónica (Capítulo III.2.2.2). Al día 10 del ensayo de recuperación, se renovó el 50% de la solución de crecimiento en ambos tratamientos. Como

puntos finales de respuesta se evaluó el contenido de clorofila ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$), el área foliar (cm^2), el peso seco total (mg) y el número de hojas, expresando la recuperación como porcentaje respecto del control. La comparación de cada punto final en ambos tratamientos se realizó mediante el método de Dunnett de comparación de los valores medios (Montgomery, 1991).

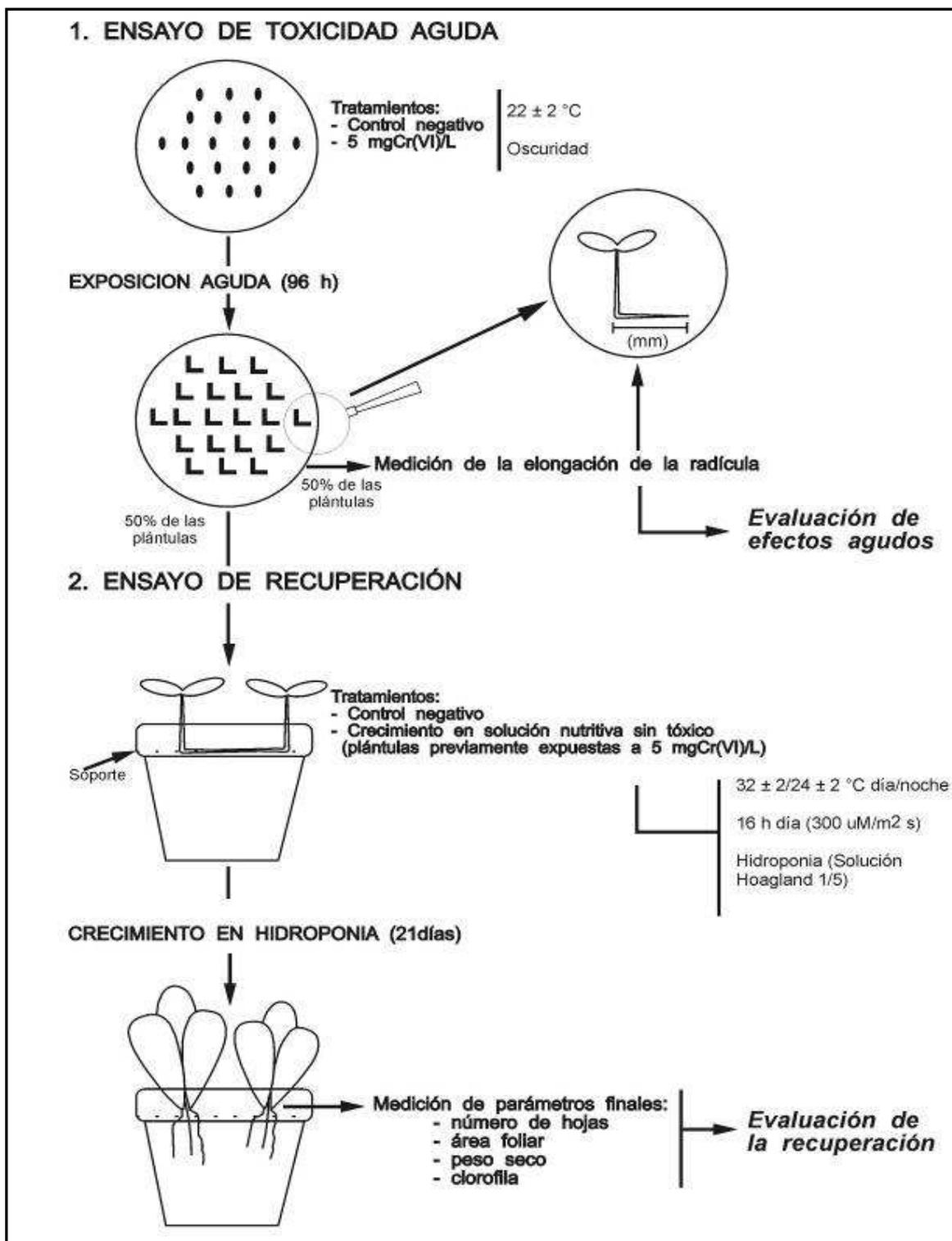


Figura III.2.2: Procedimiento de ensayo para la evaluación de la recuperación de los efectos fitotóxicos por la exposición aguda al cromo (VI) en *L. sativa*.

III.2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III.2.3.1 Evaluación de la toxicidad aguda de los metales Cu(II), Cr(VI) y Cd(II) en *L. sativa*

En la Tabla III.2.1 se presentan los resultados del ANOVA simple de la respuesta en los puntos finales elongación y peso seco de la radícula y del hipocótilo, luego de 96h de exposición de semillas de *L. sativa* al cobre, cromo y cadmio. La Figura III.2.3 muestra las curvas concentración-respuesta para los puntos finales elongación de radícula y elongación de hipocótilo en *L. sativa*, luego de 96h de exposición a los tres metales. En la Tabla III.2.2 se indican las concentraciones de cobre, cromo y cadmio correspondientes a la NOEC, LOEC, TOEC, CI_{25} y CI_{50} , para la elongación de la radícula y la elongación de hipocótilo, obtenidos a partir de las curvas concentración-respuesta.

Los resultados del ANOVA indican que, para el intervalo de concentraciones ensayadas, los tres metales generan inhibición significativa en la elongación de la radícula y del hipocótilo mientras que el peso seco de ambos no se ve afectado, durante el período agudo de exposición, por ninguno de los metales estudiados.

Tabla III.2.1: Toxicidad aguda del Cu(II), Cr(VI) y Cd(II) en *L. sativa*. ANOVA de las variables elongación y peso seco de la radícula y del hipocótilo, se luego de 96h de exposición.

Fuente de variación	Cobre (II)			Cromo (VI)			Cadmio (II)		
	GL	F	p	GL	F	P	GL	F	p
Elongación de radícula									
Concentración	6	299,6	0,000	6	237,69	0,000	6	279,5	0,000
Error	360	-	-	335	-	-	345	-	-
Elongación de hipocótilo									
Concentración	6	197,4	0,000	6	142,4	0,000	6	188,4	0,000
Error	360	-	-	335	-	-	345	-	-
Peso seco de radícula									
Concentración	6	2,52	0,073	6	0,99	0,467	6	1,73	0,187
Error	14	-	-	14	-	-	14	-	-
Peso seco de hipocótilo									
Concentración	6	1,19	0,363	6	0,29	0,936	6	0,46	0,825
Error	14	-	-	14	-	-	14	-	-

GL: grados de libertad; F: razón de los cuadrados medios; p: probabilidad.

Si se evalúa la sensibilidad de la especie a cada metal, vemos que es el cobre el que genera mayor toxicidad, obteniéndose luego de la exposición al mismo, los menores valores de CI , NOEC y LOEC, tanto para los efectos en la elongación de la radícula como del hipocótilo. De los metales evaluados, el menos tóxico para *L. sativa* es el Cr(VI), en el que se evidencian los mayores valores de CI_{50} y LOEC. No obstante estas diferencias en sensibilidad, los valores de CI y LOEC son para los tres metales del mismo orden de magnitud (Tabla III.2.2).

Al comparar la sensibilidad de respuesta en la elongación de la radícula respecto de la elongación del hipocótilo, se observa que para los tres metales estudiados, los efectos fueron mayores en la radícula (Figura III.2.3; Tabla III.2.2). Cuando se comparan los valores

Tabla III.2.2: *Toxicidad aguda del Cu(II), Cr(VI) y Cd(II) en L.sativa. NOEC, LOEC, TOEC, CI₂₅ y CI₅₀, en mg/L, para la respuesta en la elongación de la radícula (ER) y del hipocótilo (EH), luego de 96h de exposición.*

Metal	Punto final	NOEC	LOEC	TOEC	CI ₂₅	CI ₅₀
Cu(II)	ER	0,1	0,25	0,16	0,79 (0,65-0,95)	1,99 (1,55-2,18)
	EH	0,5	1	0,71	1,82 (1,32-2,04)	CI₅₀ > 7,00*
Cr(VI)	ER	0,75	1,00	0,87	1,53 (1,05-1,69)	5,09 (4,59-5,69)
	EH	4,00	5,00	4,47	6,5 (6,02-7,13)	CI₅₀ > 7,00*
Cd(II)	ER	0,10	0,50	0,22	1,75 (1,54-2,03)	3,72 (3,36-4,08)
	EH	2,50	5,00	3,53	8,05	CI₅₀ > 10,00*

Los valores indicados entre paréntesis corresponden al intervalo de confianza (95%).

* No es posible la estimación de la CI₅₀ debido a que la inhibición en este punto final fue inferior al 50% para la máxima concentración de tóxico ensayada.

correspondientes a la CI₂₅ y CI₅₀ (CI_{hipocótilo}/CI_{radícula}) se observa que estos son, para el Cu(II), Cr(VI) y Cd(II) respectivamente, hasta 3,5, 4 y 5 veces menores para la elongación de la radícula. Al considerar la mínima concentración ensayada que produce efecto significativo (LOEC), estas son, para el Cu(II), Cr(VI) y Cd(II) respectivamente, 4, 5 y 10 veces menores en la elongación de la radícula respecto del hipocótilo, siendo con el cobre donde los efectos en el hipocótilo son mayores. La menor inhibición en el hipocótilo respecto de la radícula, observada principalmente para el cromo y el cadmio, inhibiendo en menor medida la elongación y división celular en el hipocótilo, podrían deberse a la dificultad de traslocación de estos dos metales de la radícula a los órganos aéreos de la plántula (Kabata-Pendias & Pendias, 1985; Barceló & Poschenrieder, 1997; Sanità di Toppi & Gabrielli, 1999).

La inhibición significativa en la elongación de la radícula y del hipocótilo por los metales estaría relacionada con alteraciones en los procesos normales de división y elongación celular durante la germinación en los primeros días de crecimiento de la plántula (Liu et al, 1992; Hendry et al., 1992; Jayaprakash et al., 1994; Barceló & Poschenrieder, 1997; Samantary, 2002). Durante este breve período de 96h, el crecimiento de la plántula en oscuridad, sin actividad fotosintética, implica el crecimiento del embrión a expensas de las reservas de la semilla por lo que no se verifica inhibición en el peso seco por efecto de los metales, aunque la

elongación de la radícula y del hipocótilo se vea inhibida (Taiz & Zeiger, 2002). En ensayos control (sin tóxico) de *L. sativa*, durante las 96 h de germinación y crecimiento de las plántulas, se observa que el peso seco de las mismas se mantiene constante durante ese período (Sobrero, 1997 datos no informados en este trabajo de Tesis). Esto indicaría que, al menos

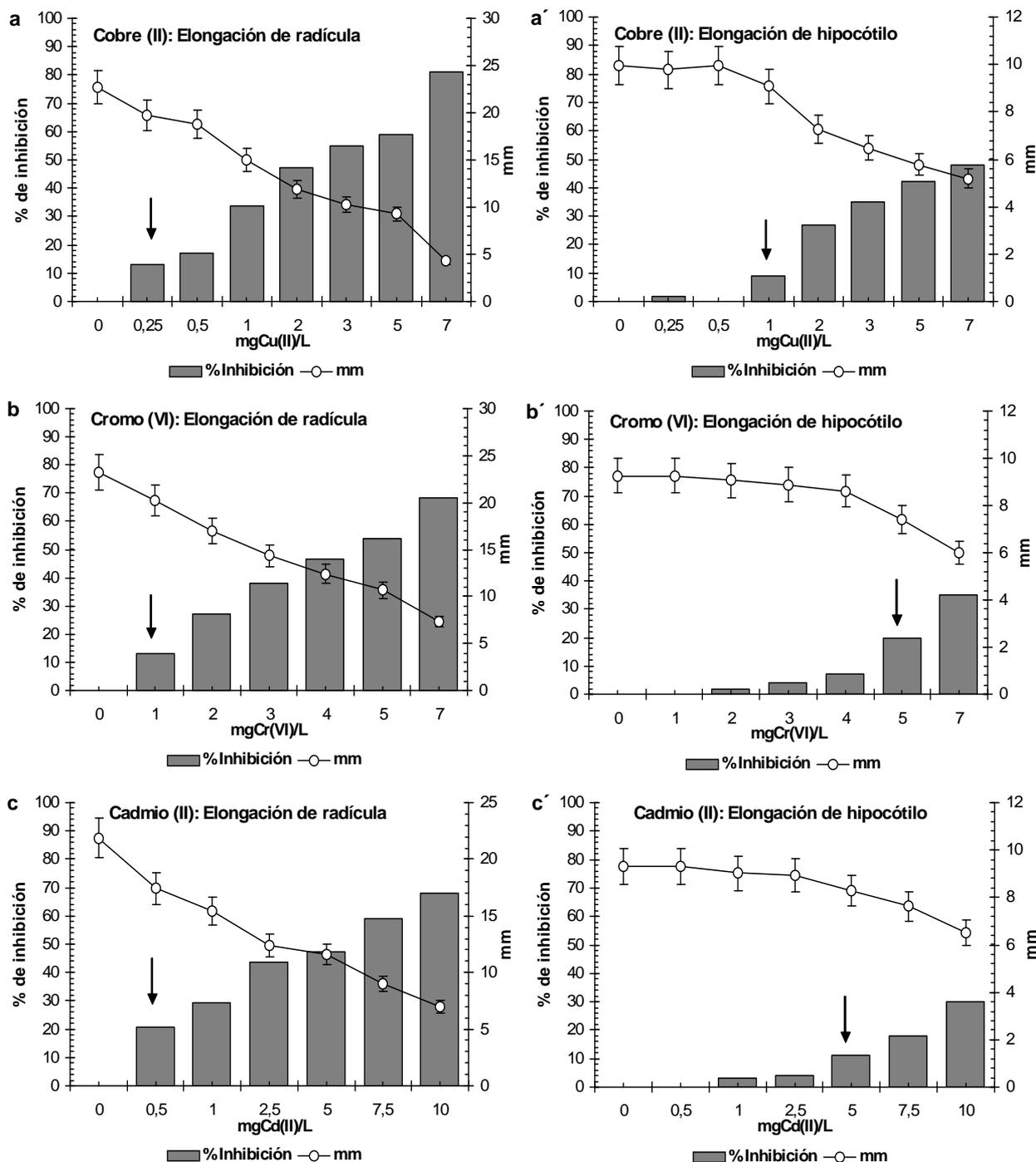


Figura III.2.3: Toxicidad aguda de metales pesados en *L. sativa*. Efecto del Cu(II), Cr(VI) y Cd(II) en la elongación de la radícula (a, b y c, respectivamente) y del hipocótilo (a', b' y c', respectivamente), luego de 96h de exposición.

Las flechas indican la menor concentración de metal ensayada a la que se observa efecto significativo (LOEC; $p \leq 0,05$).

hasta las 96 h de iniciada la imbibición de las semillas, existe un predominio de procesos de elongación celular respecto de un incremento neto de biomasa en las plántulas, por lo que la medida de la variación del peso seco de la radícula y del hipocótilo no constituyen puntos finales de relevancia en el ensayo agudo con semillas.

Otro aspecto relevante de mencionar con relación a la elongación de la radícula y del hipocótilo, es que la respuesta en estos puntos finales no siempre es inhibitoria (Environment Canada, 1999a; Sobrero & Ronco, 2004). Si bien la exaltación en la respuesta (mayor crecimiento de las plántulas con tóxico respecto del control negativo u hormesis), no se evidenció en la exposición a metales pesados, ni siquiera a las menores concentraciones ensayadas, esto sí se observa como un comportamiento frecuente en la exposición de *L. sativa* a muestras con contaminantes orgánicos y en muestras complejas en aplicaciones ambientales de este ensayo (Ronco et al., 1995; Sobrero & Ronco, 1998; Grassi et al., 2000; Ronco et al., 2001). La exaltación en la elongación de la radícula y/o del hipocótilo ha sido interpretada como una respuesta tóxica cuando se evalúan estos efectos dentro de la respuesta general de varias especies diagnóstico de una batería de bioensayos (Ronco et al., 1995; Grassi et al., 2000; Ronco et al., 2001; Ronco et al., 2005a). En las evaluaciones ecotoxicológicas realizadas por Ronco et al. (2000, 2001, 2005a) y Grassi et al. (2000) de muestras ambientales (agua superficial o subterránea, efluentes industriales, eluriados o extractos de muestras suelos o sedimentos contaminados), aplicando baterías de bioensayos de toxicidad, se observó que en todas las muestras donde se evidenció exaltación en la respuesta de la radícula y/o del hipocótilo en *L. sativa*, se verifican conjuntamente efectos letales y subletales en especies animales o microorganismos. Estos autores observan además, que en muchas de las muestras que generan exaltación en la elongación de la radícula e hipocótilo, se verifica conjuntamente efectos inhibitorios en la germinación, lo cual avalaría aún más la interpretación de la exaltación como indicador de toxicidad y no como un efecto favorable para los organismos.

Otros indicadores de toxicidad observados en las plántulas finalizada la exposición aguda, son el desarrollo de ápices necróticos en las radículas a partir de la exposición a 5, 7 y 8 mg/L de Cu(II), Cr(VI) y Cd(II), respectivamente, así como la ausencia o inhibición en la elongación de los pelos absorbentes.

Es importante mencionar que no se verifica inhibición en la germinación de las semillas a ninguna de las concentraciones evaluadas, tanto para el cobre, cromo o cadmio, manteniéndose en todos los tratamientos realizados el porcentaje de germinación superior al 90%. De los resultados obtenidos a partir de los ensayos preliminares realizados para establecer el intervalo de concentraciones a ensayar con cada metal, se observa que, al menos a la exposición a 40 mgCu(II)/L, 35 mgCr(VI)/L y 20 mgCd(II)/L, no se verifica inhibición en la germinación de las semillas de *L. sativa*. A estas concentraciones, se observa inhibición total en el crecimiento de la radícula, emergiendo los cotiledones normalmente a pesar de verificarse además inhibición marcada en el crecimiento del hipocótilo.

Si bien la exposición a los metales Cu(II), Cr(VI) y Cd(II) no generan efecto en la germinación en el intervalo de concentraciones ensayadas, se ha observado en aplicaciones de este ensayo a muestras ambientales complejas (cuerpos de agua superficial, efluente industriales, eluriados o extractos de muestras suelos o sedimentos contaminados, etc.), que este punto final es relevante y complementario a la respuesta en la elongación de la radícula o del hipocótilo. Además, se observa en muchos casos inhibición en la germinación cuando la elongación no se ve afectada, evidenciando la toxicidad de la muestra, o situaciones en donde todos los parámetros se ven inhibidos en diferente grado, dependiendo esto del tipo y modo de acción del contaminante o mezcla de contaminantes, además de la concentración de los mismos (Ronco et al., 1995; Sobrero & Ronco, 1998; Grassi et al, 2000; Ronco et al., 2001).

Son numerosos los antecedentes bibliográficos que evidencian una gran diversidad en la sensibilidad de las especies vegetales al cobre. Wang (1987) evaluó el efecto del Cu(II) en la elongación de raíces en plántulas de *Cucumis sativus*, *Lactuca sativa* y *Panicum miliaceum*, obteniendo valores de $CI_{50-120h}$ de 2,8; 2,4 y 2,8 mgCu(II)/L, respectivamente, siendo la sensibilidad de estas tres especies, y en este punto final, muy similar. La sensibilidad al Cu(II) observada por Wang (1987) en *L.sativa* es muy similar a la respuesta obtenida con la misma especie en este trabajo (Tabla III.2.2). La CI_{50-96h} para la elongación de raíces en bulbos de *Allium cepa*, corresponde a 0,17 mgCu(II)/L (Fiskesjö, 1988), siendo esta especie un orden de magnitud más sensible que las anteriormente mencionadas. Para la elongación de la radícula, los valores de CI_{50} obtenidos por Cheung et al. (1989) en plántulas de especies comestibles expuestas al cobre durante 6 días fueron 4; 5; 6,1; 7,1; 10,3; 11 y 12,6 mgCu(II)/L para *Brassica chinensis*, *B. parachinensis*, *Oryza sativa*, *Raphanus sativus*, *Phaseolus mungo*, *Glycine max*, *Hordeum vulgare* y *Daucus carota*, respectivamente. Arambašić et al. (1995) comparan el efecto del cobre en la elongación de las raíces de *A. cepa* y *Lepidium sativum*, observando una gran diferencia en la sensibilidad de ambas especies, siendo la CI_{50} para *A. cepa* de 5 órdenes de magnitud inferior a la de *L. sativum* (0,071 y 154,37 mgCu(II)/L, respectivamente). La elongación de la raíz de plántulas de *O. sativa* no se ve inhibida en exposiciones durante 30 días a 0,002 y 0,01 mgCu(II)/L, mientras que a valores entre 0,05 y 6,25 mgCu(II)/L la inhibición fue significativa (Lidon & Henriques, 1992). En este intervalo de exposición al cobre, la sensibilidad de respuesta de *O. sativa* en la producción de biomasa seca de raíz y tallo fue menor, registrándose inhibición solamente a 1,25 mgCu(II)/L (46% en raíz y 72% en tallo) y 6,25 mgCu(II)/L (92% raíz y 73% en tallo). Maksymiec et al. (1994) observan baja sensibilidad en plántulas de *Phaseolus coccineus* expuestas 10 días en hidroponía a 20 mgCu(II)/L, registrando solamente 30 y 35 % inhibición en el área y peso fresco de las hojas, respectivamente. Varios autores evaluaron la toxicidad aguda del Cu(II) en plántulas de especies arbóreas, observando una alta variabilidad interespecífica en la sensibilidad, inhibiéndose las radículas de las más sensibles a partir de 0,03 mgCu(II)/L (Kahle, 1993; Arduini et al., 1996).

Con relación al efecto en la elongación de raíces por efecto del cromo, estudios con plántulas de *C. sativus*, *L. sativa* y *P. miliaceum* muestran valores de $CI_{50-120\text{ h}}$ de 44; 3,7 y 17 mgCr(VI)/L, respectivamente (Wang, 1987), indicando una elevada sensibilidad de *L. sativa* al cromo con relación a las otras especies ensayadas, a diferencia de lo observado por este mismo autor para el cobre. Samantary (2002) observa en cultivares sensibles de *Vigna radiata*, inhibición total en la elongación de la radícula a las 48h de exposición a 5 y 10 mgCr(VI)/L, evidenciando una mayor sensibilidad respecto a la respuesta en *L. sativa*. Este autor observa además, que en los cultivares sensibles de *V. radiata*, las concentraciones entre 2,5 y 10 mgCr(VI)/L, inhiben la germinación (entre 15% y 80%, respectivamente) mientras que en los cultivares resistentes al cromo, igual a lo registrado en *L. sativa*, este parámetro no se vio afectado para dichos valores de metal.

Para el caso del cadmio, la evaluación de la fitotoxicidad en plántulas de *C. sativus*, *L. sativa* y *P. miliaceum*, muestran valores de $CI_{50.(120\text{h})}$ para la elongación de la radícula de 15; 2,4 y 11 mgCd(II)/L, respectivamente, indicando mayor sensibilidad de *L. sativa* respecto de las otras especies estudiadas (Wang, 1987). La CI_{50} para la elongación de raíces en bulbos de *Allium cepa*, durante 96h de exposición, corresponde a 3,5 mgCd(II)/L, siendo la sensibilidad al cadmio de esta especie del orden de la mencionada para *L. sativa* (Fiskesjö, 1988). Para el caso de un clon de *Holcus lanatus* sensible al cadmio, el valor de $CI_{50(7\text{d})}$ para la elongación de la raíz es de 5,96 mgCd(II)/L (Hendry et al., 1992). No obstante la sensibilidad de este clon respecto de otros de la misma especie, los resultados obtenidos indican que *L. sativa* es más sensible, incluso a menor tiempo de exposición al metal. Stefani et al. (1991) observan que en plántulas de *Juncus acutus* expuestas durante 7 días a 0,13 y 2,2 mg Cd(II)/L, si bien no se producen efectos en la germinación, se detecta inhibición marcada en la elongación de la raíz (70%) y en la elongación del tallo (37%), a partir de 0,13 mg Cd(II)/L.

En comparación con la sensibilidad de las plantas vasculares anteriormente mencionadas, *L. sativa* presenta buena sensibilidad al Cu(II), Cr(IV) y Cd(II), estando los valores de CI o LOEC en el orden de lo citado en la bibliografía para diferentes especies terrestres y puntos finales.

III.2.3.2 Evaluación de la toxicidad subcrónica del Cr(VI) en *L. sativa*

Los resultados del ANOVA obtenidos luego de 96h de exposición aguda, indican que los efectos en la elongación de la radícula no fueron significativos cuando la exposición fue a 0,05; 0,1; 0,25 y 0,75 mgCr(VI)/L, mientras que se observó que el crecimiento de la radícula se inhibe significativamente (31 %) por exposición a 1,25 mgCr(VI)/L (LSD; $p \leq 0,05$).

La Tabla III.2.3 muestra los resultados del ANOVA simple de las variables área foliar, peso seco, número de hojas y contenido total de clorofila luego del periodo de 4+21 d de exposición subcrónica. En la Tabla III.2.4 se indican los valores de inhibición y los resultados de la comparación de medias en los diferentes puntos finales luego de la exposición subcrónica al cromo. En la Tabla III.2.5 se informan los valores de la CI_{25} y la CI_{50} correspondientes a los

diferentes puntos finales evaluados. En la Figura III.2.4 se observa el estado general de las plántulas de *L. sativa* luego del período de exposición en hidroponia y en la Figura III.2.5 se comparan las curvas dosis- respuesta para los diferentes puntos finales.

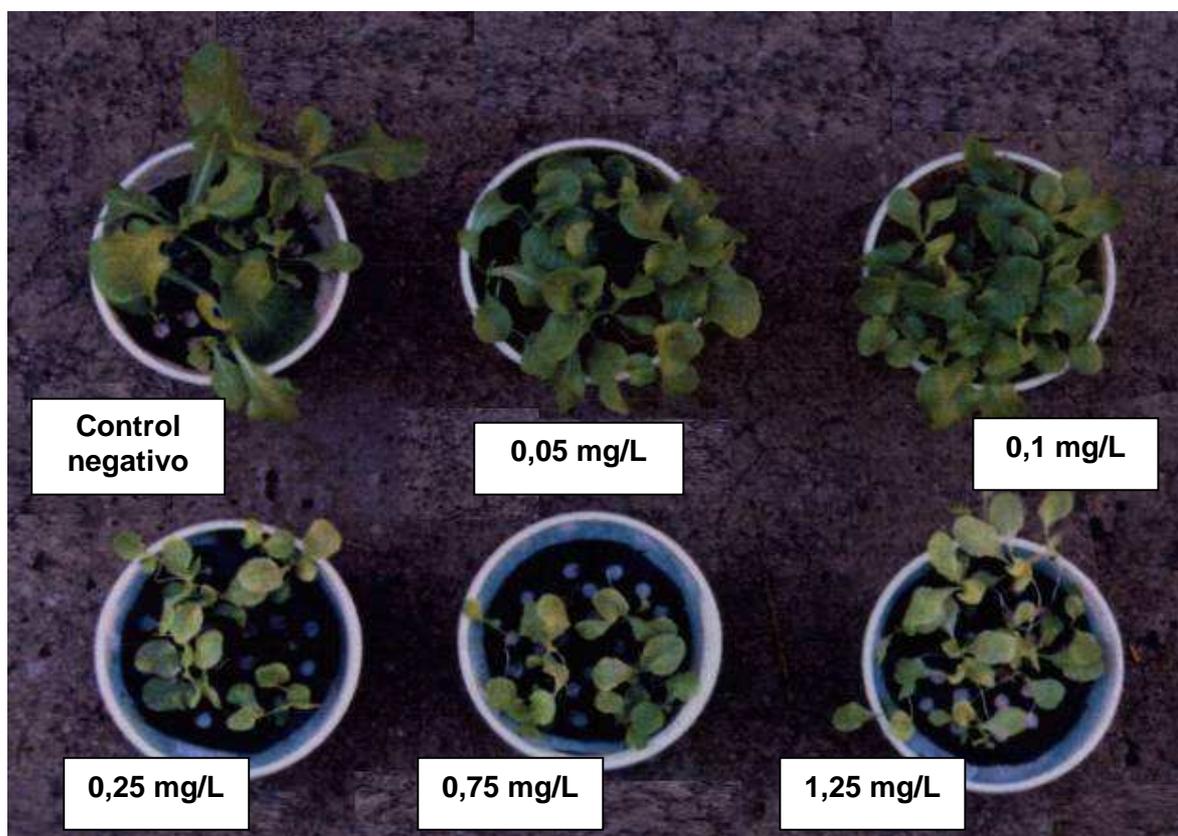


Figura III.2.4: Toxicidad subcrónica del cromo (VI). Aspecto general de las plántulas de *L.sativa* luego de 21 días de exposición en hidroponia.

Los resultados del ANOVA indican que luego de la exposición subcrónica (4+21 d), hay efecto inhibitorio significativo en todos los puntos finales evaluados (Tabla III.2.3). Se observa que la inhibición se manifiesta aún a partir de la exposición a los niveles más bajos de cromo ensayados (0,05 mgCr(VI)/L) y en todos los puntos finales considerados en la exposición subcrónica (Figura III.2.4). En la Figura III.2.5 se puede ver la reducción en el

Tabla III.2.3: Toxicidad subcrónica del Cr(VI) en *L.sativa*. ANOVA simple de las variables área foliar, peso seco, número de hojas y contenido total de clorofila luego de 4+21 d de exposición.

Fuente de variación	GL	F	p
Area foliar			
Concentración de Cr(VI)	6	37,69	0,000
Error	305	-	-
Peso seco			
Concentración de Cr(VI)	6	12,42	0,000
Error	21	-	-
Número de hojas			
Concentración de Cr(VI)	6	13,53	0,000
Error	305	-	-
Contenido de clorofila			
Concentración de Cr(VI)	6	9,61	0,000
Error	21	-	-

GL: grados de libertad; F: razón de los cuadrados medios; p: probabilidad.

área foliar y clorosis en las plantas expuestas al cromo. Los valores de inhibición para el peso seco y el área foliar son similares para las diferentes concentraciones de cromo evaluadas, siendo estos los dos parámetros en los que los efectos fueron mayores, principalmente a la menor concentración de exposición. El número de hojas por plántula fue el parámetro de menor sensibilidad, observándose solo un 25 % de inhibición para el tratamiento correspondiente a 1,25 mg/l de Cr(VI) (Tabla III.2.4 y Figura III.2.5). Los valores de CI registrados en el área foliar y peso seco son similares, siendo significativamente inferiores a los valores de CI estimados para el contenido de clorofila y el número de hojas (Tabla III.2.5).

Tabla III.2.4: Efectos subcrónicos del cromo (VI) luego de 4+21 días de exposición. Porcentaje de inhibición en los diferentes puntos finales de ensayo.

Tratamientos (mgCr(VI)/L)	Area foliar (%)	Peso seco (%)	Número de hojas (%)	Contenido de clorofila (%)
0,00	0 a	0 a	0 a	0 a
0,05	44 b	45 b	10 b	21 b
0,10	57 b c	51 b	16 b c	28 b
0,25	65 c	59 b c	17 c	42 b c
0,75	64 c	63 c	18 c	58 c
1,25	80 d	72 c	26 d	71 d

* Para cada columna, los valores seguidos por la misma letra no difieren significativamente entre sí (LSD; $p < 0.05$).

Tabla III.2.5: **Toxicidad subcrónica del cromo(VI) en L. sativa CI_{25} y CI_{50} , en mg/L, para los diferentes puntos finales.**

Punto Final	CI_{25}	CI_{50}
Area foliar	$CI_{25} < 0,05$ #	0,09 (0,052-0,175)
Peso seco	$CI_{25} < 0,05$ #	0,12 (0,055-0,259)
Número de hojas	1,09 (0,922-1,234)	$CI_{50} > 1,25$ *
Contenido de clorofila	0,09 (0,062-0,165)	0,38 (0,202-0,607)

Los valores indicados entre paréntesis corresponden al intervalo de confianza (95%).

* No es posible la estimación de la CI_{50} debido a que la inhibición en este punto final fue inferior al 50% para la máxima concentración de tóxico ensayada. # No es posible la estimación de la CI_{25} debido a que la inhibición en este punto final fue superior al 25% para la mínima concentración de tóxico ensayada en la que se verifica inhibición significativa.

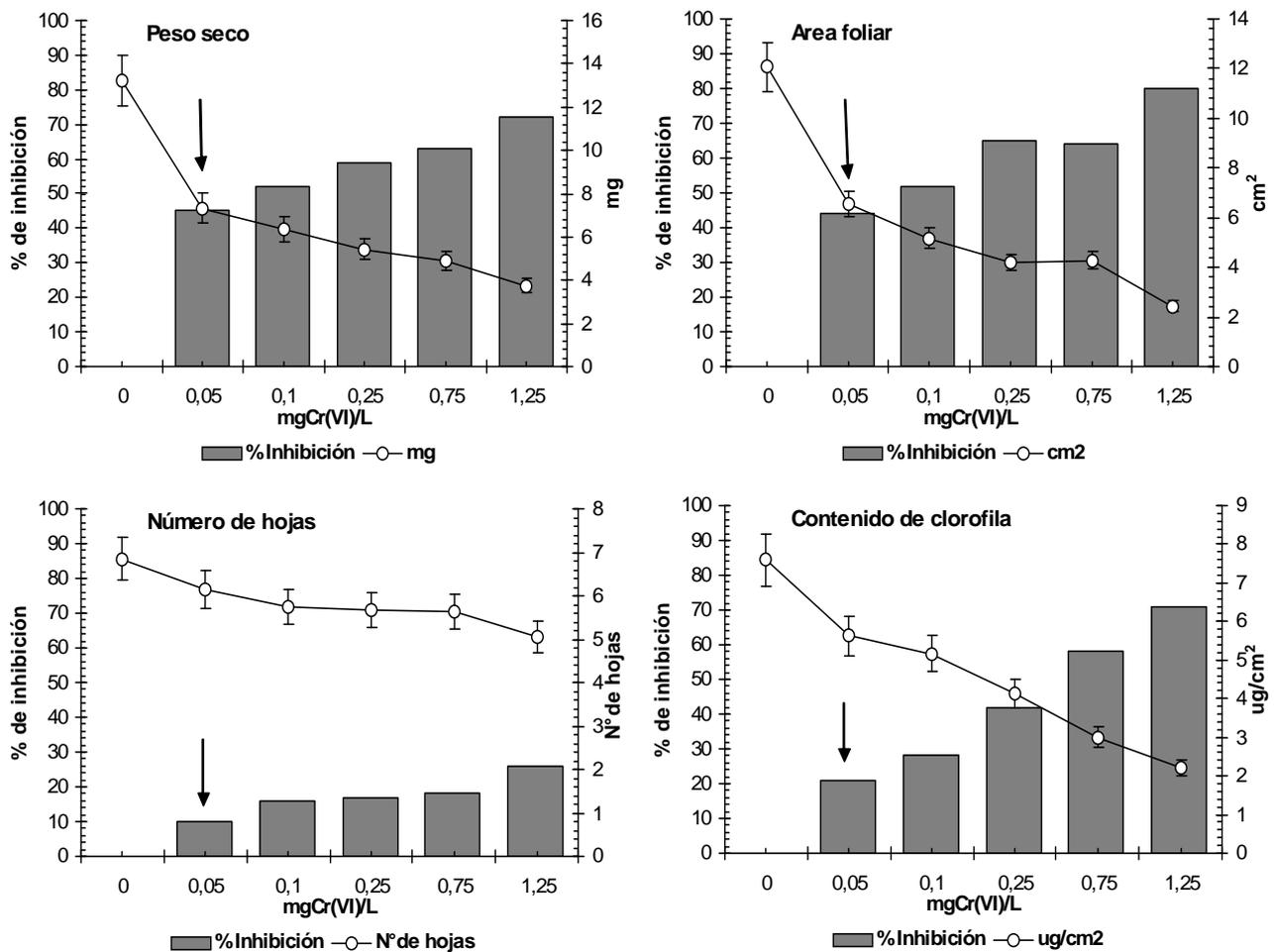


Figura III.2.5: Toxicidad subcrónica del cromo (VI) en *L. sativa*. Efecto en el peso seco, área foliar, número de hojas y contenido de clorofila, luego de 4+21 d de exposición.

Las flechas indican la menor concentración de metal ensayada a la que se observa efecto significativo (LOEC; $p \leq 0,05$).

Si comparamos la respuesta de esta especie frente al cromo (VI) cuando la exposición es de sólo 96 h (CI_{50} : 5 mgCr(VI)/L) respecto de la exposición subcrónica (4+21 d), se observa un incremento significativo de la sensibilidad de la especie, siendo los valores de CI de un orden de magnitud inferior, al prolongar el tiempo de exposición (Tabla III.2.5).

Como se ha indicado en el Capítulo I.3.2.4, los antecedentes bibliográficos para diferentes especies vegetales indican que el Cr(VI) afecta al crecimiento de vegetales mediante distintos mecanismos, interfiriendo en diferentes procesos fisiológicos, como ser efectos en la fotosíntesis y clorosis en hojas jóvenes, daño en el sistema radicular, interferencia en la obtención de nutrientes, reducción del área foliar, etc. (Taylor et al, 1979; Kleiman & Cogliatti, 1992; Jayaprakash et al, 1994; Barceló & Poschenrieder, 1997; Chatterjee & Chatterjee, 2000; Samantary, 2002; Singh & Sinha, 2005). En las condiciones de ensayo, con una irradiancia de $300 \mu M/m^2 \cdot sec$, una reducción del 20% en el contenido de clorofila a 0,05 mgCr(VI)/L, sumado al daño en el sistema radicular, estarían determinando la disminución en la producción de

biomasa observada. En los resultados obtenidos en la aplicación del ensayo de toxicidad subcrónica con *L. sativa* en la evaluación de la fitotoxicidad de barros industriales contaminados con cromo, también se observó que el área foliar fue el parámetro más afectado, siendo menores los efectos en el contenido de clorofila y número de hojas, registrándose efectos significativos en estos parámetros a partir de la exposición a 7,7 mg/K de cromo total (Sobrero & Moschione, 2001).

Si se compara la respuesta de *L. sativa* con datos bibliográficos de otras especies, analizando los efectos subcrónicos del Cr(VI) y considerando los mismos puntos finales, se observa que ésta presenta elevada sensibilidad para este metal. Kleiman & Cogliatti (1992) observaron, en plántulas de *Triticum aestivum*, que la exposición a 5 y 26 mgCr(VI)/L durante 14 d, produce efecto significativo en la elongación de las raíces (47% y 55% de inhibición, respectivamente) y en el área foliar (52% y 84% de inhibición, respectivamente).

Como se ha mencionado en el capítulo I.3.2.3, varios autores observan efectos beneficiosos o de estimulación en algunos parámetros por exposición a concentraciones entre 0,05 y 0,1 mgCr(VI)/L, tanto en ensayos de crecimiento en suelo como en solución nutritiva (Bollard, 1983; Barceló & Poschenrieder, 1997; Samantary, 2002). No obstante estos antecedentes bibliográficos, los resultados obtenidos en este trabajo, a partir de la exposición subcrónica de plántulas de *L. sativa*, indican que esos valores de Cr(VI) son altamente tóxicos para esta especie, observándose inhibición significativa en más de un parámetro de crecimiento.

III.2.3.3 Evaluación de la recuperación de *L. sativa* luego de la exposición aguda al Cr(VI).

En la Figura III.2.6 se puede ver el aspecto general de las plántulas de *L. sativa* finalizada la etapa de recuperación, luego de 21 días de crecimiento en hidroponia, luego de la exposición aguda al Cr(VI). En la Tabla III.2.6 se muestran los resultados del ensayo de recuperación, indicándose los valores de área foliar, peso seco, número de hojas y contenido de clorofila de las plantas previamente expuestas al Cr(VI) y del control luego de 21 d de crecimiento en hidroponia en ausencia de tóxico. Se indica además, para cada punto final, el porcentaje de recuperación respecto del control (Tabla III.2.6).

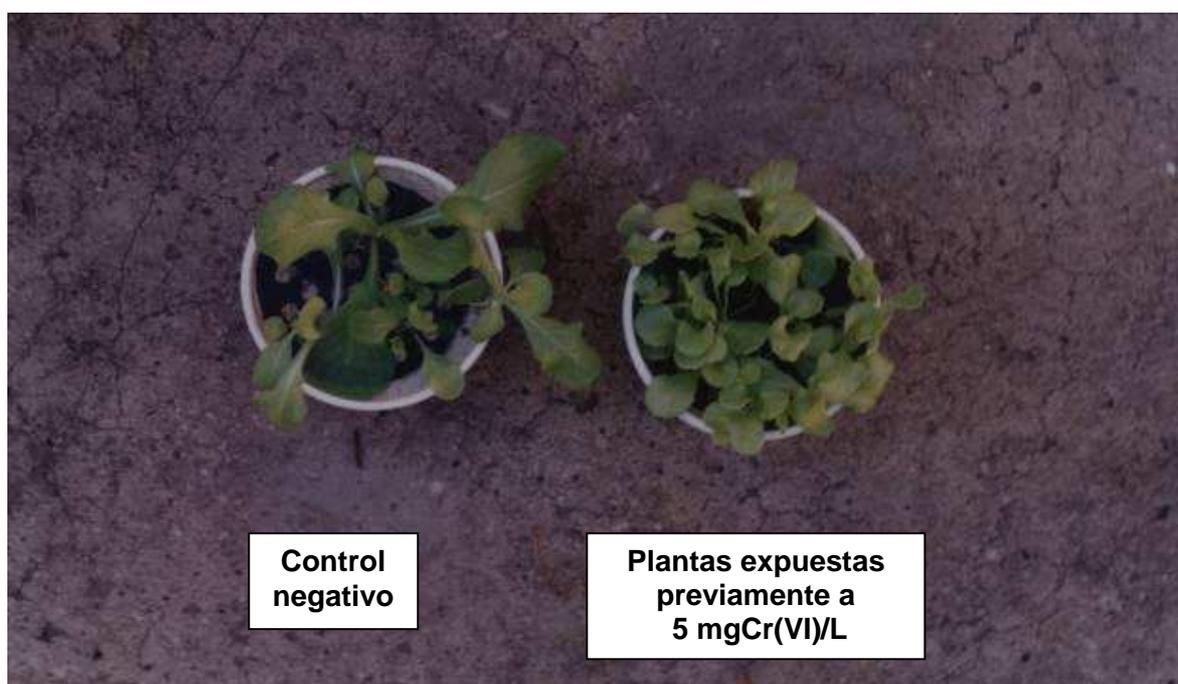


Figura III.2.6: Aspecto general de las plántulas de *L. sativa* luego de 21 días de recuperación en hidroponia. Las plántulas fueron previamente expuestas durante 96h a la CI_{50} (5 mgCr(VI)/L).

Tabla III.2.6: Recuperación de plántulas de *L. sativa* previamente expuestas durante 96 h a 5 mgCr (VI)/L.

	Control*	Plántulas expuestas*	% de recuperación [#]
Area foliar (cm ²)	12,05 ± 0,55 a	6,32 ± 0,27 b	53
Peso seco (mg)	13,20 ± 0,41 a	7,73 ± 0,61 b	59
Nº de hojas	6,85 ± 0,07 a	5,87 ± 0,07 b	86
Contenido de clorofila (µg/cm ²)	7,14 ± 0,12 a	7,56 ± 0,33 a	106

* Media ± Error Estandar. Para cada fila, los valores seguidos por la misma letra no difieren significativamente entre sí (Dunnett; $p < 0.05$). [#] % respecto del tratamiento control

Luego de 21 días de crecimiento en solución hidropónica sin tóxico (período de recuperación), las plantas no alcanzaron altos niveles de recuperación, observándose diferencias significativas respecto del control, para área foliar, peso seco y número de hojas, con excepción del contenido de clorofila (Tabla III.2.6 y Figura III.2.6). Considerando el área foliar y el peso seco, sólo se observa aproximadamente un 50 % de recuperación, siendo del 86 % la recuperación para el número de hojas respecto del tratamiento control. De los puntos finales considerados, el contenido de clorofila fue el parámetro de recuperación más rápida, alcanzando valores que no difieren significativamente respecto de los controles, para el período de recuperación ensayado.

Si bien la recuperación no fue del 100% para todos los puntos finales considerados, se observa que existe cierta reversibilidad de los efectos agudos. Los bajos valores de área foliar y

peso seco podrían deberse al daño ocasionado en el sistema radicular durante el período de exposición aguda al cromo (50 % de inhibición en la elongación de la radícula), habiéndose afectado los mecanismos de obtención de nutrientes por medio de las raíces (Cary et al., 1977; Taylor et al., 1979; Liu et al., 1992; Barceló & Poschenrieder, 1997; Samantary, 2002).

Se han realizado ensayos de recuperación por exposición al cromo con Lemnáceas (Sobrero & Rimoldi, 2002, datos no informados en este trabajo de Tesis), comparándose además la variación inter e intraespecífica en la capacidad de revertir los efectos tóxicos. Se observa que en Lemnáceas tampoco se logra recuperación inmediata en todos los parámetros en los que se evidenció toxicidad, verificándose además variación en la capacidad de recuperación entre los clones de *Lemna gibba* (clones LgP y LgJ) entre sí y respecto del de *L. minor* (clon LmJ). De manera general, igual a lo registrado para *L. sativa*, se observó que los efectos en el contenido de clorofila son los que se revierten con mayor velocidad y en mayor proporción respecto de la tasa de multiplicación y el crecimiento foliar. Es importante remarcar que la tasa de multiplicación se recupera más lentamente e incluso, en la especie más sensible (*Lemna gibba*, clon LgJ), los efectos perduran durante la etapa de recuperación aumentando la toxicidad aún después de 8 días de finalizada la exposición (Sobrero & Rimoldi, 2002). En ensayos de recuperación con Lemnáceas a la exposición al herbicida glifosato (Sobrero et al., 2006, datos no informados en este trabajo de Tesis), también se observó no sólo que la recuperación es parcial en algunos parámetros (tasa de multiplicación), sino que en otros (número de frondes, crecimiento foliar) se evidencia que la inhibición se incrementa, aunque las plantas continúan su crecimiento en ausencia de tóxico, de igual manera a lo observado para el cromo.

De los resultados obtenidos con *L. sativa* y con Lemnáceas, se observa que la capacidad de recuperación depende de la concentración de exposición al contaminante, así como del parámetro afectado y niveles de inhibición alcanzados. Por otra parte, así como existe una gran variabilidad en la sensibilidad inter e intraespecífica, también es de esperar que estas diferencias se manifiesten en la capacidad de detoxificación y, consecuentemente, en la velocidad de recuperación (Barceló & Poschenrieder, 1997; Crawley, 1997; Sanità di Toppi & Gabrielli, 1999).

Si comparamos la sensibilidad de *L. sativa* al Cu(II), Cr(VI) y Cd(II), con los valores de los niveles guía de protección de la vida acuática establecidos por la SRHN y otros organismos (Capítulo VI.1, Tabla VI.11), se observa que las concentraciones que no producen efecto agudo (NOEC) para estos tres metales, así como las que generan efectos por exposición subcrónica al cromo, están entre 1 a 3 órdenes de magnitud por encima de dichos niveles guía. Esto indica que, al menos para el desarrollo de plántulas de *L. sativa*, existe un intervalo de seguridad amplio para su protección. Con relación a las concentraciones de estos metales en cuerpos de agua superficial, algunos antecedentes bibliográficos para Argentina indican que los valores registrados no serían fitotóxicos para plántulas de *L. sativa* en exposiciones agudas aunque sí lo

serían los niveles de cromo citados en algunos sitios, si se prolonga la exposición de esta especie al metal (Colombo et al., 1996; AA-AGOSBA-ILPLA-SHN, 1997; Villar et al., 1998; Gagneten et al., 2007; SADS-PNA-OPS-UNLP, 2007).

No obstante esto, los valores de metales registrados en efluentes y sitios de vuelco de éstos en aguas superficiales, están muchas veces en el orden de la sensibilidad, observada para *L. sativa*, ya sea para los niveles de toxicidad por exposición aguda como por subcrónica (Cattogio, 1991; Ronco et al., 1992; Cataldo et al., 2001). De acuerdo a la legislación vigente para la provincia de Buenos Aires (Ley Provincial 5965, Decreto 2009/60 3970/90, Resolución 336/03), los límites admisibles en efluentes para el vertido en agua superficial o conducto pluvial son: ≤ 1 mg Cu(II)/L, $\leq 0,2$ mg Cr(VI)/L y $\leq 0,1$ mg Cd(II)/L. Aunque el efluente se diluya al incorporarse en el cuerpo de agua, los niveles admisibles para el cobre se corresponden con el valor de la CI_{25} y para el cadmio con el de la LOEC, en la elongación de la radícula a las 96h (Tabla III.2.2). Los límites admitidos de cromo en efluentes son un orden de magnitud superior a las concentraciones que inhiben significativamente el crecimiento de plántulas de *L. sativa* en exposiciones subcrónicas

De acuerdo a lo citados para muestras de sedimentos de cuerpos de agua superficiales en áreas urbano industriales (Colombo et al., 1996; AA-AGOSBA-ILPLA-SHN, 1997; Manassero et al., 1998), los valores de cromo total se encuentran en el orden de las concentraciones fitotóxicas para *L. sativa* para exposiciones subcrónicas (Sobrero & Moschione, 2001).

De acuerdo a la sensibilidad evaluada para *L. sativa*, vemos que el ensayo de toxicidad aguda con semillas constituye una herramienta adecuada para el control de los niveles de cobre y cadmio en efluentes y sitios de vuelco de los mismos, mientras que el control de los niveles de cromo es factible de realizar también con esta especie pero mediante exposiciones subcrónicas a la muestra.

III.2.4 CONCLUSIONES

- Los resultados de la exposición aguda de *L. sativa* a metales pesados, evidencian que el cobre es el metal más tóxico, seguido del cadmio, siendo el cromo el de menor toxicidad.
- En el ensayo de toxicidad aguda con *L. sativa*, la elongación de la radícula constituye un punto final de gran sensibilidad para evaluar la fitotoxicidad del Cu(II), Cr(VI) y Cd(II).
- Las concentraciones de cromo entre 0,05 y 0,75 mgCr(VI) que no producen efecto fitotóxico a las 96h de exposición, inducen inhibición significativa en el área foliar, peso seco, número de hojas y contenido de clorofila, cuando el tiempo de exposición se extiende a 25 días.
- La respuesta fitotóxica por exposición subcrónica al Cr(VI) no se manifiesta con igual intensidad en los diferentes parámetros de respuesta considerados, siendo significativamente superior la inhibición observada en el área foliar y en el peso seco.
- Considerando la fitotoxicidad del Cr(VI), la sensibilidad del ensayo con *L. sativa* se incrementa significativamente al prolongar el tiempo de exposición. Los valores de CI para

la exposición subcrónica se reducen en un orden de magnitud respecto de la exposición aguda, permitiendo detectar fitotoxicidad aún a 0,05 mgCr(VI)/L.

- La respuesta observada en el bioensayo con semillas de *L. sativa* en la exposición aguda y subcrónica al cobre, cromo y cadmio, sugieren el posible uso de esta especie como herramienta de control en muestras ambientales, presentando buena sensibilidad para detectar los niveles de metales posibles de encontrar en efluentes industriales o en sitios de vuelco de los mismos, siendo relevante y factible su empleo como especie diagnóstico representativa en estudios ecotoxicológicos en la región.
- Los efectos agudos por exposición al Cr(VI) no se revierten totalmente luego de transcurrido un período de crecimiento en ausencia de tóxico
- Los ensayos de recuperación aportan información relevante para la interpretación de las consecuencias de los efectos fitotóxicos subletales de los contaminantes en los individuos y poblaciones, necesario de considerar en estudios ecotoxicológicos.

IV.1 BIOENSAYO CON LEMNÁCEAS: METODOLOGÍA PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA VEGETAL EN LABORATORIO Y PROTOCOLO DE ENSAYO DE TOXICIDAD SUBCRÓNICA.

IV.1 BIOENSAYO CON LEMNÁCEAS: METODOLOGÍA PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA VEGETAL EN LABORATORIO Y PROTOCOLO DE ENSAYO DE TOXICIDAD SUBCRÓNICA.

IV.1.1 Características generales de las Lemnáceas y su aplicación en bioensayos de toxicidad

Entre las plantas vasculares acuáticas, los antecedentes bibliográficos indican que varias especies de Lemnáceas se han venido utilizando desde hace más de 20 años para la realización de estudios fisiológicos así como toxicológicos (Landolt & Kandeler, 1987; Wang, 1990; Subhandra et al., 1991; Huebert et al., 1993a,b; Sinha et al., 1994; Lewis, 1995; Mazzeo et al., 1998; Samardakiewicz & Woźny, 2005). Organismos oficiales de protección ambiental, tanto europeos como americanos, sugieren el uso de las especies de Lemnáceas en la aplicación de protocolos estandarizados de ensayos para la evaluación de efectos fitotóxicos de compuestos puros y de muestras ambientales complejas, además de su uso en la certificación y registro de nuevas sustancias (USEPA, 1985; ASTM, 1991b; Boutin et al., 1993; Boutin et al., 1995; AFNOR, 1996; USEPA, 1996; Environment Canada, 1999b; OECD 2002; Environment Canada, 2007).

Las comúnmente denominadas “lentejas de agua”, son plantas vasculares acuáticas pertenecientes a la familia Lemnaceae S. F. Gray. En esta familia encontramos diferentes especies de los géneros *Spirodela*, *Lemna*, *Wolffiella* y *Wolffia*, siendo las del género *Lemna* las más utilizadas en bioensayos estandarizados de toxicidad.

Las Lemnáceas se caracterizan por ser plantas pequeñas (intervalo de tamaño entre 1 a 60 mm²), no arraigadas (flotantes o sumergidas), y de crecimiento rápido, duplicando su biomasa por multiplicación vegetativa cada 1 a 3 días, dependiendo de las condiciones del medio (Landolt, 1986). Estas características hacen a estos organismos ideales para su cultivo en el laboratorio en condiciones controladas de intensidad de luz, fotoperíodo y temperatura, utilizando medios nutritivos de composición definida. Esto posibilita mantener poblaciones clonales indefinidamente permitiendo disponer de manera continua de material homogéneo para la realización de bioensayos. Por otra parte, al ser plantas de tamaño tan reducido, los requerimientos de espacio y volumen de solución necesarios para el mantenimiento de biomasa y para la realización de los ensayos de toxicidad, son mínimos. Esto se traduce en la reducción de costos de cultivo y en la ejecución de los bioensayos y posibilita realizar un mayor número de repeticiones (Landolt, 1986; Wang, 1990; Huebert & Shay, 1993a; Lewis, 1995).

Desde el punto de vista ecológico, la importancia del uso de Lemnáceas radica en la variedad de ambientes acuáticos en los que estas plantas vasculares se desarrollan, abarcando desde lagos, lagunas, charcas y otros cuerpos de agua lénticos con diferentes estados tróficos, así como en las márgenes más protegidas en ambientes lóticos como ríos y

arroyos, encontrándose también en aguas estuariales salobres. Por otro lado, es una familia de distribución geográfica mundial, desde zonas tropicales hasta zonas templadas (Hillman & Culley, 1978; Wetzel, 1981; Landolt, 1986; Landolt, 1996).

Las poblaciones de "lentejas de agua" crecen cubriendo la superficie de los cuerpos de agua desarrollando densas carpetas vegetales que modifican las características fisicoquímicas de la columna de agua al reducir el paso de luz y limitar la actividad fotosintética, produciendo, consecuentemente, la disminución de la concentración de oxígeno disuelto. Debajo de la cobertura de Lemnáceas la cantidad materia orgánica es mayor, ya que los procesos de degradación están retrasados por la baja concentración de oxígeno. Por otra parte, estas plantas segregan hidratos de carbono, taninos y fenoles quedando éstos incorporados a la columna de agua. Como consecuencia de esto, se desarrollan comunidades particulares de "lentejas de agua" donde predominan como organismos productores, quedando limitado, en la columna de agua, el crecimiento de poblaciones algales o de otras macrófitas y produciéndose además, un mayor desarrollo de organismos detritívoros y carnívoros que los encontrados en ambientes sin Lemnáceas. Las Lemnáceas sirven de alimento y refugio para muchos organismos del pleuston, principalmente artrópodos y gasterópodos, siendo además consumidas por diferentes grupos de peces, anfibios y aves acuáticas. Por otra parte, el desarrollo de biomasa vegetal en la superficie, actúa como reguladora de la temperatura, la evaporación y el flujo de agua en ecosistemas acuáticos (Wetzel, 1981; Margalef, 1983; Landolt, 1986).

Otro aspecto a considerar cuando se analizan las ventajas del uso de estos organismos como especie diagnóstico en bioensayos de toxicidad, es que, al ser plantas flotantes, son especialmente susceptibles a sustancias tensoactivas, compuestos hidrofóbicos o toda aquella sustancia concentrada en la interfase aire-agua. Por otro lado, este bioensayo, a diferencia de otros con microalgas o especies sumergidas, es posible aplicarlo a muestras con gran turbidez o coloreadas, así como a extractos de suelo o sedimentos.

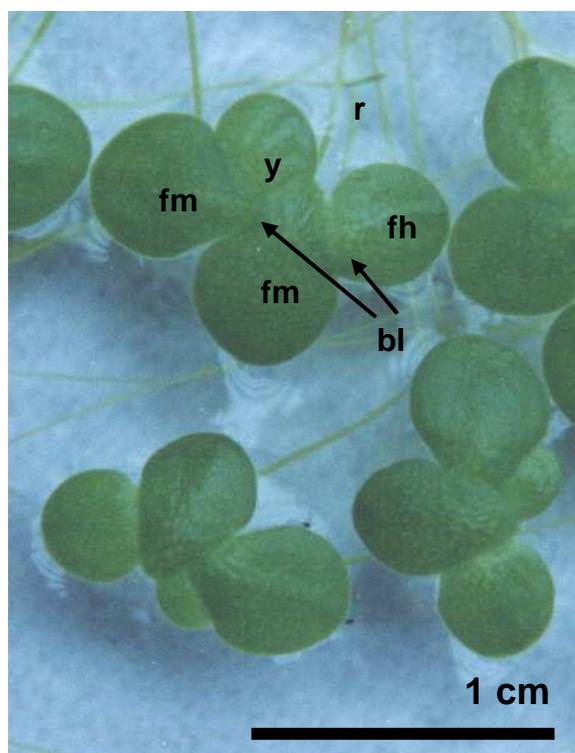
Dentro del género *Lemna*, las especies más difundidas y recomendadas para el uso en los bioensayos de toxicidad son *Lemna minor* y *Lemna gibba*, entre las flotantes (ASTM, 1991b, Wang, 1992; Boutin et al., 1993; Peterson et al., 1994; Singh et al., 1994b; Lewis, 1995; USEPA, 1996; Mazzeo et al., 1998; Environment Canada, 1999b; Lytle & Lytle, 2001; OECD, 2002; Environment Canada, 2007) y *Lemna trisulca* como especie sumergida (Huebert & Shay, 1993a; Huebert et al., 1993; Lewis, 1995; Prasad et al., 2001). Otras especies como *L. perpusilla*, *L. paucicostata*, *L. valdiviana* y *L. polyrrhiza* también se han aplicado a estudios ecotoxicológicos aunque su uso no se encuentra ampliamente difundido (Wang, 1992; Lewis, 1995). La especie *L. gibba* es de amplia distribución mundial, habitando principalmente zonas de clima mediterráneo tanto en América, Europa, sur y oeste de Asia y África (Landolt, 1986). En Argentina, existen 4 especies del género *Lemna* (*L. gibba*, *L. aequinoctialis*, *L. valdiviana* y *L. minuta*), siendo *L. gibba* de distribución muy amplia estando citada para casi todo el país,

con excepción del nordeste y el extremo austral (Landolt, 1986; Cabrera & Zardini, 1993; Landolt 1996). *L. minor* no es una especie nativa de Argentina, distribuyéndose en regiones frescas con clima oceánico de América del Norte, Europa, África y oeste de Asia (Landolt, 1986).

IV.1.2 Estructura y organización de las frondes de Lemnáceas

Las Lemnáceas son las plantas vasculares de menor tamaño, constituidas por una estructura muy peculiar con aspecto de hoja denominada fronde. Una fronde es un complejo de tejidos con muy poca diferenciación, tipo taloide, y se la interpreta como constituida por una porción basal correspondiente al tallo, donde se ubican los bolsillos laterales y el nudo, y otra distal, con nervaduras, correspondiente a una hoja. Los individuos del género *Lemna*, están constituidos por frondes con una única raíz adventicia, la cual posee una cofia en su extremo distal y una vaina en la zona de unión con la fronde. Este órgano tiene como principal función proporcionar estabilidad a la fronde ya que la principal vía de absorción de nutrientes es la superficie abaxial de la misma, que está en contacto directo con el medio (Landolt, 1986; Landolt & Kandeler, 1987).

El crecimiento de las Lemnáceas se produce por formación de yemas hijas a partir de cada uno de los dos bolsillos o cavidades laterales ubicados en la región basal de la fronde. En condiciones óptimas de concentración de nutrientes en el medio, la producción de nuevas



frondes es exponencial, llegando, en algunas especies de crecimiento muy rápido, a duplicar el número de frondes en 24 h. Las frondes hijas permanecen conectadas a la fronde progenitora por medio de un talluelo o estipe formando grupos clonales o colonias de número variable de frondes dependiendo de la especie y condiciones de cultivo (Figura IV.1.1).

Figura IV.1.1 *Lemna gibba* (clon LgJ). Características generales del talo de *Lemna*. Fronde madre (fm), fronde hija (fh), yema (y), bolsillos laterales (bl), raíz (r).

El estipe se origina en la base de la pared inferior del bolsillo lateral a partir de la fronde hija, donde se producen divisiones celulares, generando nuevas células que se elongan hacia la

fronde madre. Cuando las frondes hijas se separan de la fronde madre, el estipe se desprende en un punto cercano a la fronde madre, reduciéndose en tamaño y haciéndose imperceptible (Landolt, 1986; Landolt & Kandeler, 1987). La separación o abscisión de las frondes hijas se estimula mediante la aplicación de ABA (ácido abscísico) y etileno. Con relación al tamaño y forma de las frondes, mas allá de las diferencias genéticas que determinan la variabilidad entre clones diferentes, la respuesta en éstos parámetros es muy variable para un mismo clon, dependiendo marcadamente de las condiciones de cultivo u otros factores externos (Landolt, 1986; Taiz & Zeiguer, 2002).

Para la evaluación de efectos fitotóxicos en Lemnáceas, cuando se mencionan las frondes madres, se hace referencia a toda fronde bien desarrollada que posea una yema o fronde hija unida a ella. Una fronde hija es aquella fronde desarrollada, aunque mas pequeña, que ha emergido completamente del bolsillo lateral de la fronde que la originó pero permanece unida a ella y no posee yemas o frondes hijas unidas (Figura IV.1.1.).

IV.1.3 Obtención e identificación de los clones de Lemnáceas utilizados en los bioensayos de toxicidad

Para los bioensayos de toxicidad con Lemnáceas, se utilizaron tres clones diferentes pertenecientes a las especies *L. minor* y *L. gibba*. Dos de ellos fueron proporcionados por el Instituto de Botánica General de la Universidad Friedrich Schiller de Jena (Alemania), siendo clones correspondientes a las especies *L. minor* (clon LmJ, Figura IV.1.2, c) y *L. gibba* (clon LgJ, Figura IV.1.2, b). Con el fin de comparar la sensibilidad de los clones mencionados con otro de distribución local, se trabajó con un tercer clon obtenido a partir de

Metodología de clarificado y coloración de preparados permanentes (Landolt, 1986):

- Hervir el material fresco 2 minutos en etanol 70%.
- Clarificar el material: sumergir unos minutos en NaOCl al 14% (frondes transparentes).
- Teñir el material durante 12 h utilizando carmín-aluminio como colorante (Preparar el colorante hirviendo, durante 1h, 1g de carmín en una solución al 5% de $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 24\text{H}_2\text{O}$).
- Enjuagar con agua destilada y deshidratar el material pasándolo, 15 a 30 min, por soluciones seriadas de etanol de 70%, 80%, 95% y etanol absoluto. Para montar el material, pasarlo además por soluciones seriadas de 2/3 etanol absoluto + 1/3 xileno, 1/3 etanol absoluto + 2/3 xileno y xileno absoluto.
- Montar en bálsamo de Canadá.

material colectado en el Arroyo El Pescado (Partido de La Plata, Pcia. de Buenos Aires; Figura IV.1.3). Se aislaron ejemplares del género *Lemna*, los que fueron clonados con el fin de obtener biomasa genéticamente homogénea (Figuras IV.1.2, a). Para la identificación de este clon, se utilizaron diferentes claves dicotómicas (Landolt, 1986; Watson & Dallwitz, 1992; Cabrera & Zardini, 1993). La observación de los diferentes caracteres morfológicos necesarios para la determinación de la especie, requirió de la aplicación de técnicas especiales de

coloración, a partir de material fresco, según la metodología de clarificado y coloración propuesta por Landolt (1986) para la elaboración de preparados permanentes. La identificación taxonómica del material se realizó con la colaboración de la Profesora Nuncia M. Tur (Departamento Científico de Plantas Vasculares, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, UNLP).

De las observaciones realizadas se identificó al clon LgP como perteneciente a la especie *Lemna gibba* L. Si bien el clon LgP corresponde a la especie *L. gibba*, al compararlo con el otro clon de la misma especie, -clon LgJ- vemos que no existe gran similitud en el tamaño y aspecto de las frondes entre el clon proveniente de Alemania y el aislado en la región, no siendo así con los otros caracteres taxonómicos analizados (Figura IV.1.2, a b). Landolt (1986) analizó la dificultades en la identificación de esta especie, haciendo especial referencia a la gran variabilidad en el tamaño de las frondes, citando para Argentina y California variedades de *L. gibba* de frondes pequeñas y con giba (gran desarrollo de aerénquima en la superficie abaxial de la fronde) poco desarrollada. Para la provincia de Buenos Aires y otras localidades del país, Giardelli (1937) describe una especie similar a *L. gibba* a la que denomina *L. parodiana* –con frondes pequeñas más aplanadas, manchas de antocianinas en los ápices de las frondes jóvenes y 1-2 semillas por fruto-, especie a la cual correspondería el clon aislado (Cabrera & Zardini, 1993). No obstante, Landolt (1986 y 1996) no considera a *L. parodiana* como una especie diferente sino como una variedad pequeña de *L. gibba* y es este criterio el que se ha considerado en este trabajo. Por otro lado, los cultivos en laboratorio no han florecido por lo que el número de óvulos no se ha considerado como carácter taxonómico para la identificación de la especie. En el Herbario de Facultad de Ciencias Naturales y Museo, UNLP, se encuentra material herborizado correspondiente al clon local de *L. gibba* (LgP) (C. Sobrero 1).

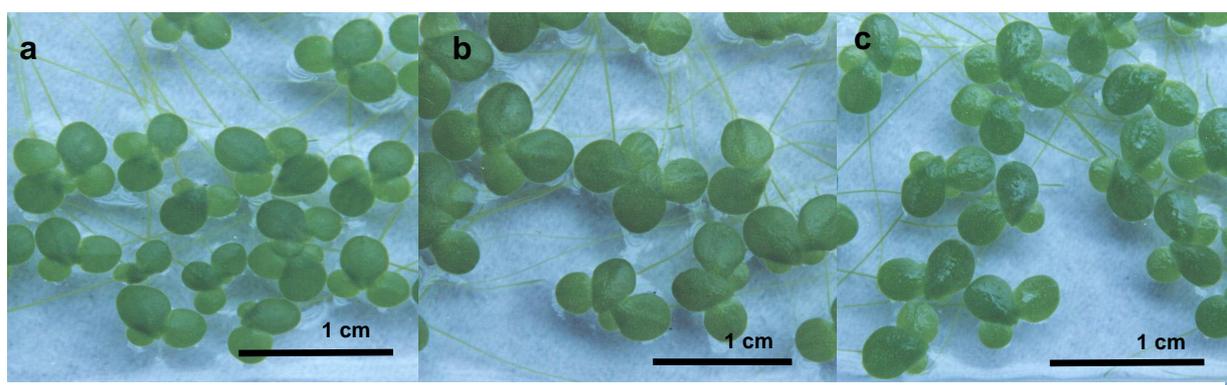


Figura IV.1.2 Aspecto general de los tres clones de Lemnáceas. a- *L. gibba*, clon LgP, obtenido a partir de ejemplares colectados en el Arroyo El Pescado (Bs. As.) b- *L. gibba* clon LgJ y c- *L. minor* clon LgJ proporcionados por el Instituto de Fisiología Vegetal de la Universidad de Jena (Alemania).



Figura IV.1.3 Arroyo El Pescado, a la altura de la localidad de Ignacio Correa, Provincia de Buenos Aires. Desarrollo de Lemnáceas en un ambiente natural. Este arroyo atraviesa una región de actividad agrícola-ganadera y reducido desarrollo urbano.

IV.1.4 Producción de biomasa de Lemnáceas en laboratorio y conservación de los clones.

La producción de biomasa en el laboratorio se realiza a 22 ± 2 °C, en condiciones de esterilidad, en Erlenmeyers de 1L utilizando inicialmente como medio nutritivo, el recomendado por Huebert et al. (1993). Dados algunos inconvenientes en la regulación del pH utilizando este medio nutritivo, en particular en la realización de los bioensayos, se evaluó el crecimiento de los clones realizando algunas modificaciones en la composición del mismo (Capítulo IV.2), estableciéndose como solución nutritiva para el mantenimiento de los clones y para la

Solución nutritiva (medio de Huebert et al., 1993, modificado)

Concentración de nutrientes:

125 μ M NH₄NO₃, 110 μ M CaCl₂, 203 μ M MgSO₄, 15 μ M K₂HPO₄, 250 μ M NaHCO₃.

Concentración de micronutrientes: 0,9 μ M EDTA-FeCl₃, 8,9 μ M H₃BO₃, 0,9 μ M MnCl₂, 0,04 μ M CoCl₂, 0,08 μ M ZnSO₄, 0,04 μ M CuSO₄, 0,7 μ M Na₂MoO₄.

Autoclavar a 1 atm durante 15 min. La solución de EDTA-Fe se esteriliza por filtración (nitrocelulosa 0,2 μ M) y se almacena en oscuridad.

pH de la solución autoclavada: 7,4

ejecución de los bioensayos, la solución de Huebert et al. (1993), con modificaciones. Estas modificaciones implican el uso de NH_4NO_3 ($125\mu\text{M}$) como fuente de nitrógeno y la reducción en la concentración de NaHCO_3 utilizada ($250\mu\text{M}$).

Algunos micronutrientes catiónicos como el Fe, y en menor medida el Cu, Mn y Zn, tienden a ser insolubles en la solución nutritiva principalmente a pH mayor que 5. Para el caso del hierro, la formación de $\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (óxido color café-rojizo) constituye una forma insoluble y por lo tanto no disponible para las plantas. A causa de ésta y otras reacciones, es necesario el uso de agentes quelantes como el EDTA (ácido etilen-diaminotetracético), tartrato, citrato, etc., para mantener la solubilidad, y así asegurar la disponibilidad, de algunos micronutrientes en las soluciones nutritivas (Landolt & Kandeler, 1987; Salisbury & Ross, 1994; Taiz & Zeiger, 2002). Sin embargo, la presencia de quelantes en el medio de ensayo, interfiere en la evaluación de la toxicidad de los metales disminuyendo la toxicidad de los mismos al reducir la concentración de iones libres (Landolt & Kandeler, 1987; Huebert & Shay, 1992; Huebert & Shay, 1993a; Lewis, 1994; Salisbury & Ross, 1994). Es por ello que es importante establecer una relación correcta entre la incorporación de EDTA y de Fe en el medio nutritivo. La relación EDTA-Fe 1:1, recomendada por Huebert et al. (1993), permite un buen crecimiento de los clones, sin interferir en la evaluación de la toxicidad de metales (Huebert & Shay, 1992; Huebert & Shay, 1993a; Huebert et al., 1993). Dado que el EDTA se descompone por acción del calor y la luz, la mezcla EDTA-Fe se esteriliza por filtración ($0,2\ \mu\text{M}$) y se incorpora posteriormente a la solución nutritiva ya autoclavada.

Los cultivos de Lemnáceas se mantienen con fotoperíodo (16 h luz- 8 h oscuridad) y con una irradiancia de $70\text{-}80\ \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ utilizando como fuente de luz, tubos fluorescentes (Osram luz día) o lámparas de mercurio halogenado. Previo a la realización de los bioensayos, los cultivos a ser utilizados en los mismos, se someten a un período de aclimatación de 20 a 30 días de crecimiento en condiciones de iluminación continua y con la frecuencia de renovación de nutrientes de acuerdo con el protocolo de ensayo.

La utilización de Lemnáceas en ensayos de toxicidad, requiere del mantenimiento de las mismas en cultivos estériles, a fin de lograr estimaciones reales de la toxicidad de las muestras a evaluar, evitando cualquier interferencia producida por el desarrollo de algas u otros organismos no deseados, los que además compiten por la utilización de nutrientes. Debido a este requerimiento, la producción de biomasa y los ensayos de toxicidad se realizan en condiciones axénicas, libre de otros organismos (Ej. algas, hongos o bacterias).

Para obtener frondes no contaminadas a partir del material de campo (ej, aislamiento del clon LgP) o como metodología de limpieza en caso de contaminaciones no deseadas, se realiza el siguiente procedimiento: se obtienen yemas con poco desarrollo a partir de los bolsillos laterales de frondes bien desarrolladas y vigorosas y se las enjuaga con solución de hipoclorito de sodio ($55\ \text{mgCl/L}$, 0,5%) durante 5 min agitando en vortex. Se realizan 3 enjuagues con

agua destilada estéril (c/u 5 min en vortex). Las yemas se colocan en solución nutritiva estéril realizándose repiques y enjuagues sucesivos hasta lograr cultivos sin desarrollo de algas u otros organismos.

IV.1.5 Cultivo de Lemnáceas en condiciones limitantes para el crecimiento.

Para mantener los clones conservados durante períodos de tiempo prolongados sin la necesidad de la renovación periódica de la solución nutritiva y requiriendo de menor espacio, éstos se pueden mantener vivos en condiciones de crecimiento limitadas en oscuridad y a baja temperatura.

El cultivo se realiza a $4\pm 2^{\circ}\text{C}$, en esterilidad, utilizando medio sólido de agar al 1% y solución nutritiva para desarrollo heterotrófico (Liebert, 1986, modificado).

Las frondes desarrolladas en las condiciones de cultivo anteriormente mencionadas, se mantienen con tasas de crecimiento limitada hasta seis meses. Se observan etioladas pero sin perder la capacidad de multiplicarse. Al transferir las frondes a condiciones estandarizadas de crecimiento, se verifica una rápida recuperación de los cultivos. A partir de séptimo día de haber sido transferidas, se restablece el crecimiento y la síntesis de clorofila, observándose un adecuado desarrollo de las frondes.

Medio de cultivo para desarrollo heterotrófico en oscuridad (Liebert, 1986, modificado).

Concentración de nutrientes: 3,96 mM KNO_3 , 1,47 mM KHPO_4 , 1,22 mM $\text{SO}_4\text{Mg}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2,78 mM $\text{Cl}_2\text{Ca}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 38 mM Glucosa anhidra y Agar (1%). La composición y concentración de micronutrientes corresponde a la de la

IV.1.6 Bioensayo de toxicidad subcrónica con Lemnáceas: establecimiento de las condiciones óptimas de crecimiento a lo largo del período de ensayo

Existen diferentes protocolos para la aplicación de Lemnáceas como especie diagnóstico en bioensayos de toxicidad (ASTM, 1991b, Boutin et al, 1993; Huebert et al., 1993; USEPA, 1996; Environment Canada, 1999b; OECD, 2002; Environment Canada, 2007). Sin embargo no hay uniformidad en la metodología aplicada para la realización de los mismos, ya sea en el establecimiento de variables como la temperatura, iluminación, volumen, composición y frecuencia de renovación de la solución nutritiva, número de réplicas y número inicial de frondes, así como en la selección de los puntos finales de evaluación de efectos, tiempo de exposición y controles del ensayo (Wang, 1990; ASTM, 1991b; Boutin et al, 1993; Huebert & Shay, 1993a; Lewis, 1995; USEPA, 1996; Environment Canada, 1999b, 2007).

Para que este bioensayo de toxicidad proporcione información comparable con la bibliografía, y que la inhibición del crecimiento de los clones no sea debida a factores limitantes

de las condiciones de cultivo, es necesario garantizar que el incremento del número de frondes en los controles sea exponencial a lo largo del tiempo de exposición (Landolt & Kandeler, 1987; Hubert & Shay, 1993a; Vermaat & Hanif, 1998). Este incremento en el número de frondes se describe de la siguiente manera:

$$F_t = F_0 \cdot e^{TM \cdot t} \quad (1)$$

donde F_0 es el número de frondes al día 0, F_t es el número de frondes luego de un tiempo t de días de exposición y TM es la tasa de multiplicación. La ecuación 1 puede expresarse del siguiente modo:

$$\ln F_t = \ln F_0 + TM \cdot t \quad (2)$$

Esto indica que cuando el crecimiento es exponencial existe una relación lineal entre el log F_t y el tiempo de ensayo, correspondiendo el valor de la TM (fronde/día) a la pendiente de regresión. Si las condiciones de ensayo (luz, temperatura, nutrientes) son limitantes, la TM no es constante durante el ensayo, indicando que el crecimiento está ocurriendo en situaciones de estrés. Cuando esto ocurre, el crecimiento de las frondes es lineal, por lo que la estimación de la toxicidad de una muestra estará confundida con la reducción relativa de la TM de los controles en relación a los tratamientos y por el estrés de las plantas (Hillman & Culley, 1978; Landolt & Kandeler, 1987; Huebert & Shay, 1993a).

Por lo tanto, para garantizar que el efecto inhibitorio observado en los diferentes niveles de exposición a un compuesto puro o muestra compleja, sea causada solo por la toxicidad de los mismos y no esté incrementado por condiciones limitantes de crecimiento, la concentración, volumen y frecuencia de recambio de la solución nutritiva, así como número de frondes iniciales, temperatura, intensidad de luz y tiempo de exposición, deben ser ajustados de modo que se mantenga el crecimiento exponencial en los controles durante el período de ensayo. Estas condiciones sólo son consideradas en algunos de los protocolos anteriormente mencionados (Huebert & Shay, 1993a; Vermaat & Hanif, 1998). Durante la estandarización de la metodología de ensayo se evaluaron diferentes aspectos con el objetivo de establecer las condiciones de crecimiento adecuadas durante el período de ensayo.

Por otra parte, se realizaron diversos estudios con relación a la composición de la solución nutritiva empleada, tanto en el bioensayo como en el mantenimiento de los clones en el laboratorio, con el fin de lograr una menor variabilidad en el pH debido al aumento de biomasa y de reducir la concentración de bicarbonatos (Capítulo IV.2).

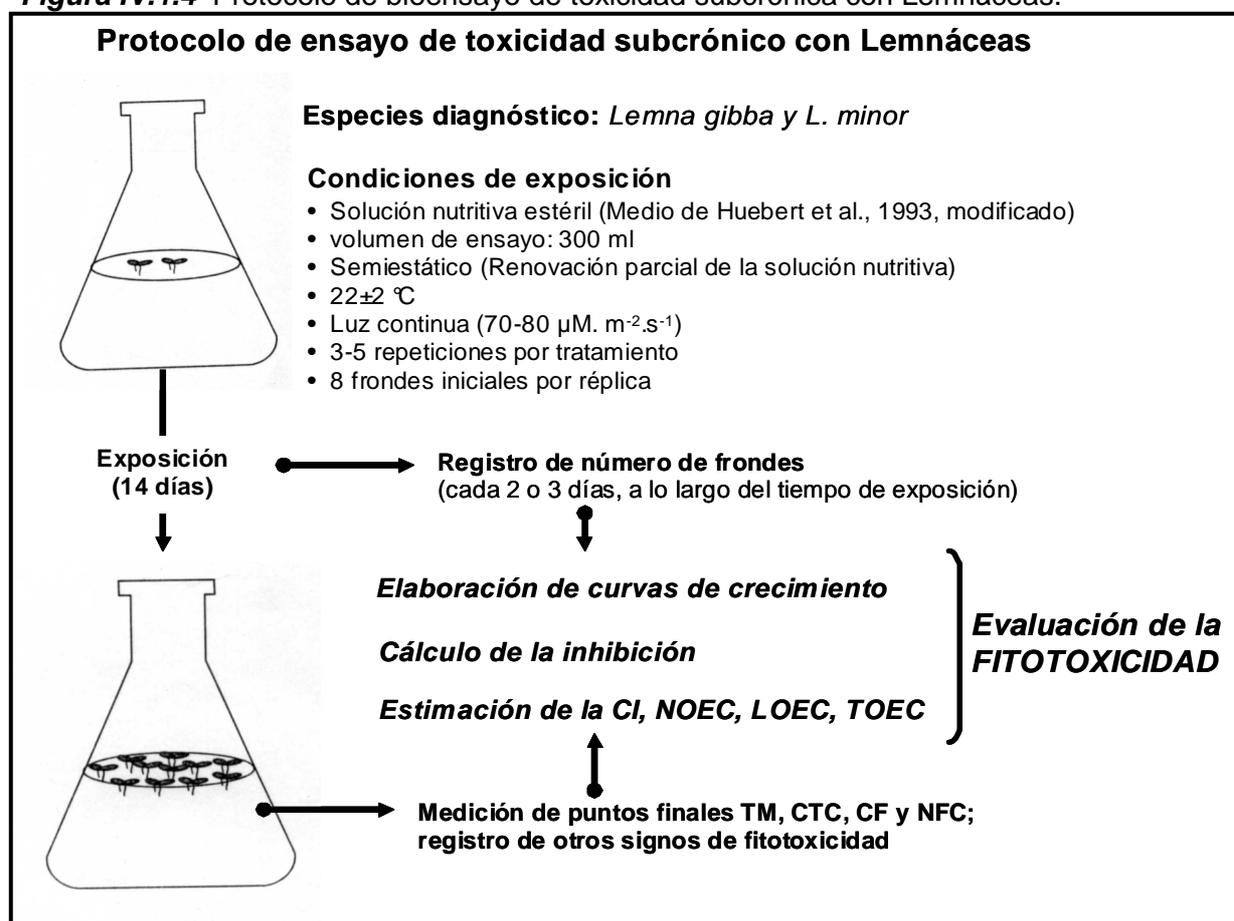
Las sales utilizadas en las soluciones nutritivas y los reactivos utilizados en las diferentes experiencias, son de calidad analítica y el agua de dilución es agua destilada.

IV.1.7 Protocolo de ensayo de toxicidad subcrónica con Lemnáceas.

El protocolo establecido para la ejecución del bioensayo subcrónico con Lemnáceas (Figura IV.1.4), se aplica en la evaluación de la toxicidad de compuestos puros, de muestras ambientales de agua superficial o subterránea, muestras de efluentes o de elutriados y lixiviados de muestras sólidas.

Este es considerado un bioensayo estático con renovación, siendo 14 días el tiempo de exposición. El volumen final de medio de cultivo es de 300 ml, y se realizan renovaciones parciales del medio a lo largo del período de ensayo (50 –100 ml al día 4, 100-200 ml al día 7 y 200-300 ml al día 11). La solución nutritiva que se utiliza para el crecimiento de los controles y como medio de dilución en cada tratamiento es el medio estéril modificado (Capítulo IV.1.4) de Huebert et al. (1993, modificado), ajustando a pH 7 luego de autoclavar (1 atm, 15 minutos).

Figura IV.1.4 Protocolo de bioensayo de toxicidad subcrónica con Lemnáceas.



El ensayo se realiza a 22±2 C°, en condiciones de iluminación constante y con una irradiancia de 70-80 $\mu\text{M} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ utilizando como fuente de luz tubos fluorescentes (Osram luz día) o lámparas de mercurio halogenado.

El número de frondes iniciales es de 2 a 8, seleccionando para cada repetición, individuos de tamaño similar, con buen aspecto y buen estado sanitario. Durante el mes previo a la

realización del ensayo, los clones se repican semanalmente a solución nutritiva estéril, en las condiciones de temperatura, irradiancia y fotoperíodo del ensayo. Cada 2-3 días desde el inicio del ensayo, se registra el número de frondes y yemas desarrolladas, analizando, a partir de estos datos, el modelo de crecimiento mediante análisis de regresión. Finalizado el período de ensayo se evalúan los diferentes puntos finales de fitotoxicidad. La Figura IV.1.4 resume el protocolo de ensayo de toxicidad subcrónica con Lemnáceas.

De igual manera a lo mencionado para el bioensayo con semillas (Capítulo III.1.5), se realizan ensayos preliminares seleccionando concentraciones de exposición según escala logarítmica. A partir de estos resultados, se realizan las exposiciones definitivas, ajustando el intervalo de concentraciones en el diseño experimental, según la sensibilidad de la especie estudiada. Este procedimiento se aplica de manera general a la evaluación de la toxicidad no sólo de compuestos puros, sino también a mezclas complejas, lixiviados o muestras ambientales, utilizando para ello número de replicas reducido y pocos puntos en la curva de toxicidad.

IV.1.8 Puntos finales de evaluación de la toxicidad

Para la evaluación de los efectos fitotóxicos en Lemnáceas se utilizan diferentes puntos finales tales como: el contenido de clorofila, la fijación de C_{14} , el contenido de ATP, el peso seco y fresco, el área foliar, el número de frondes finales, la integridad de la colonia, la elongación de la raíz, etc. Entre los parámetros más utilizados, se encuentra el recuento del número de frondes producidas y el cálculo de la tasa de multiplicación (ASTM, 1991b; Boutin et al., 1993; Huebert & Shay, 1993a; Huebert et al., 1993; Sinha et al., 1994; Lewis, 1995; Lytle & Lytle, 2001; OECD, 2002; Environment Canada, 2007). La medición de estos dos parámetros es muy simple, rápida, precisa y no destructiva, pero posee la desventaja de que el número de frondes producido es irrelevante en relación al área foliar o producción de biomasa. En determinadas condiciones de estrés, la tasa de multiplicación no se altera pero sí se observa una marcada reducción en el área foliar de las frondes, por lo que el sólo recuento de las mismas estaría subestimando la cuantificación del efecto. Es por ello que la evaluación del efecto en el área foliar constituye un punto final relevante y complementario a la estimación del efecto en la tasa de multiplicación (Landolt & Kandeler, 1987; Wang, 1990; Lewis, 1995). Como se ha mencionado anteriormente (Capítulos I.3 y I.4), tanto los metales pesados como el herbicida glifosato generan clorosis y alteraciones en la fotosíntesis por lo que, más allá de su relevancia como indicador del estado fisiológico de la planta, el contenido de clorofila es un parámetro a considerar como punto final de evaluación de la toxicidad de estos contaminantes (USEPA, 1996; Mohan & Hosetti, 1997; Prasad et al, 2001).

En los ensayos de toxicidad subcrónica con Lemnáceas, el efecto tóxico de los contaminantes estudiados, se evaluó considerando las siguientes respuestas subletales como puntos finales

luego de 14 días de exposición: *tasa de multiplicación, número de frondes por colonia, área folia, crecimiento foliar, contenido de clorofila y relación cla/clb.*

Tasa de multiplicación (TM)

Este parámetro, considerado como punto final del ensayo, se calcula a partir del número de frondes producidas al finalizar el período de exposición, respecto del número de individuos iniciales. En el recuento de frondes se consideran además, las yemas desde el momento en que estas asoman de los bolsillos laterales de las frondes madres. A partir de la ecuación 2 (pág. 78), la TM se expresa como:

$$TM = 1000 \cdot (\text{Log}F_t - \text{Log}F_0) / t$$

donde F_0 es el número de frondes al día 0, F_t es el número de frondes al final de la experiencia, y t es el tiempo de cultivo en días (Hillman & Culley, 1978; Landolt & Kandeler, 1987; Huebert & Shay, 1993a).

Número de frondes por colonia (NFC)

Se determina mediante el recuento de las frondes producidas que se mantienen unidas formando cada unidad clonal o colonia. De la misma manera a lo descrito para la TM, en el recuento de frondes se incluyen las yemas desde el momento en que estas asoman de los bolsillos laterales de las frondes madres (Li & Xiong, 2004a).

Área foliar (AF) y crecimiento foliar (CF)

Para la medición del área foliar se utiliza un medidor de área foliar (LI-3100 Area Meter, LICOR). Dado el pequeño tamaño de las frondes de Lemnáceas, además del desarrollo de aerénquima, principalmente en *L. gibba*, la medición del área foliar se realiza a partir de la imagen fotográfica ampliada de las frondes. Siendo que a lo largo del período de ensayo el número de individuos en cada tratamiento se va incrementando, al final del mismo se cuenta con una población de individuos de distinto tiempo de crecimiento y, consecuentemente, distinta área foliar (Figura IV.1.2. a, b, c). Es por ello que, para disminuir la variabilidad en la medición del área foliar, se consideran, en la cuantificación del efecto, solo aquellas frondes con un crecimiento tal que hallan desarrollado yemas hijas (frondes madres). Esta metodología para la estimación del CF se ha aplicado en el capítulo IV.3..

Otra manera de expresar el crecimiento de las frondes sin recurrir a la medida del área foliar, dado su tamaño reducido y a la dificultad e imprecisión de utilizar un medidor de área foliar, es mediante la medida del eje transversal y longitudinal de la misma. El CF se cuantifica considerando las medidas del eje longitudinal mayor (EL) y del eje transversal mayor (ET), considerando por separado la medida de las yemas y frondes hijas y la de las frondes madres.

Además, mediante la relación EL/ET, es posible estimar cambios en la morfología normal de las frondes (frondes más anchas o más angostas). Esta metodología para la estimación del CF se ha aplicado en los capítulos IV.4 y IV.5.

Contenido de clorofila y relación cla/clb

Para la determinación de clorofila total en el ensayo subcrónico con Lemnáceas, se utiliza la técnica de Zscheile & Comar (1941) mencionada en el Capítulo III.2.2.2 para el ensayo de toxicidad subcrónica y recuperación con *L. sativa*. Se utilizan 5 ml de Dimetilformamida como solvente de extracción para 0,1g de tejido fresco, realizándose la misma a temperatura ambiente durante 24 hs en oscuridad y sin necesidad de maceración previa de las frondes. El contenido de clorofila se expresa respecto del peso fresco de las frondes sometidas a la extracción y se calcula del siguiente modo:

$$\text{Contenido Total de Clorofila} = [(CI\ a + CI\ b) \times vol] / \text{peso fresco}$$

Peso seco (PS) o (PST)

Se determinó por secado en estufa a 70 °C hasta peso constante y se expresa como peso seco promedio por fronde (PS) o como peso seco total (PST: peso seco del total de frondes producidas al final del ensayo).

En la Tabla IV.1.1 se indican los valores promedio de la tasa de multiplicación (TM), número de frondes por colonia (NFC), área foliar (AF), contenido total de clorofila (CTC) y relación clorofila

Tabla IV.1.1 Valores correspondientes a los puntos finales medidos en los controles luego de 14 días de crecimiento en las condiciones del ensayo de toxicidad.

	Puntos Finales				
	TM (d ⁻¹)	NFC	AF (mm ²)	CTC µg/mg(PF)	Cla/Clb
Clon LgP	103,6 ± 11,49 (11)	4,2 ± 1,23 (29)	5,9 ± 0,32 (5)	939,3 ± 50,20 (5)	3,90 ± 0,21 (5)
Clon LgJ	99,4 ± 13,05 (13)	3,8 ± 0,79 (21)	11,4 ± 1,04 (9)	854,0 ± 52,65 (6)	3,95 ± 0,28 (7)
Clon LmJ	117,8 ± 23,16 (20)	3,6 ± 0,78 (22)	13,8 ± 1,78 (13)	971,2 ± 76,92 (8)	3,79 ± 0,19 (5)

TM: tasa de multiplicación; NFC: número de frondes por colonia; AF: área foliar; CTC: contenido total de clorofila; Cla/Clb: relación clorofila a/clorofila b. Los valores corresponden a la Media ± desvío estándar de los puntos finales medidos en los controles negativos de los bioensayos realizados en condiciones estandarizadas de crecimiento. Se indica entre paréntesis el coeficiente de variación.

a/clorofila b (Cl_a/Cl_b) de los tres clones de Lemnáceas utilizados. Estos valores corresponden a los parámetros normales alcanzados luego del crecimiento durante 14 días en las condiciones del ensayo de toxicidad mencionadas anteriormente (Capítulo IV.1.7; Figura IV.1.4).

IV.1.9 Expresión de los resultados de toxicidad

La respuesta tóxica de las Lemnáceas en los diferentes puntos finales por exposición a los contaminantes se expresa como la concentración inhibitoria (CI₁₀, CI₂₅ o CI₅₀) o como los valores correspondientes al NOEC, LOEC y TOEC, los que se estiman de acuerdo a la metodología estadística mencionada en el protocolo de toxicidad aguda con semillas (Capítulo III.1.5). En aquellos parámetros para los que no es posible calcular la CI, o cuando se compara la respuesta en varios puntos finales, el efecto inhibitorio se expresa como porcentaje (Zar, 1996; Environment Canada, 1999a; 1999b, 2007).

Si bien en este capítulo del trabajo de tesis se ha desarrollado la metodología del ensayo de toxicidad subcrónica con Lemnáceas, en los capítulos siguientes los diferentes estudios realizados con estos organismos, ameritan el desarrollo de un apartado metodológico específico en cada uno de ellos, en el que se consideran aspectos puntuales concernientes a cada experiencia, además de los vinculados al diseño experimental y análisis estadístico de los resultados.

IV.2 CONTROL DE LA VARIACIÓN DE pH DEL MEDIO NUTRITIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA VEGETAL EN LABORATORIO Y EN EL ENSAYO DE TOXICIDAD CON LEMNÁCEAS.

IV.2 CONTROL DE LA VARIACIÓN DE pH DEL MEDIO NUTRITIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA VEGETAL EN LABORATORIO Y EN EL ENSAYO DE TOXICIDAD CON LEMNÁCEAS.

IV.2.1 INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Los cambios de pH del medio modifican la toxicidad de un compuesto puro o una mezcla de contaminantes, dependiendo del nivel de esta variación y de las características químicas de cada compuesto (Newman & Jagoe, 1996; Manahan, 2007). Para el caso particular de los metales, la toxicidad dependerá de la especie química en la que estos se encuentren, determinando esto su biodisponibilidad: en general, si el medio se acidifica, muchos de los metales se hallan como iones libres, siendo ésta la forma de mayor toxicidad para la biota (Huebert & Shay, 1992; Huebert et al., 1993; Kahle, 1993; Gupta et al., 1996; Bowers et al., 1997). Para el caso del cromo, la solubilidad de las especies químicas de Cr(III) y Cr(VI) depende del pH del medio. El Cr(III) se halla solubilizado en medios muy ácidos, hallándose a pH entre 4,5 y 10 totalmente precipitado como $\text{Cr}(\text{OH})_3$. El Cr(VI), a pH >6, se halla solubilizado como anión CrO_4^{-2} mientras que a menor pH el CrO_4^{-2} incorpora protones predominando las formas HCrO_4^- y $\text{Cr}_2\text{O}_7^{-2}$, también solubles (Barlett, 1997; Bories, 1997; Hossner et al., 1998; USEPA, 1998). Para el caso del herbicida glifosato y algunos de los componentes presentes en los productos formulados, el pH del medio condiciona su biodisponibilidad y, consecuentemente, su toxicidad (Tsui & Chu, 2003).

Por otro lado, a valores elevados de pH, el Fe y otras sales nutritivas precipitan como hidróxidos dejando de estar disponible para las raíces, disminuyendo además, la velocidad de absorción de otros nutrientes (Salisbury & Ross, 1994; Taiz & Zeiguer, 2002). Es por ello que se recomienda que los bioensayos de toxicidad se realicen manteniendo el pH del medio constante durante el período de ensayo (APHA, 1998; USEPA, 1994; Gupta et al., 1996).

La solución nutritiva utilizada inicialmente para la producción de biomasa y en la ejecución del bioensayo de toxicidad con Lemnáceas es la propuesta por Huebert et al. (1993). Esta tiene en su composición NaHCO_3 (500 μM) y, como fuente de nitrógeno, KNO_3 (250 μM).

La presencia de NaHCO_3 en el medio nutritivo puede modificar la disponibilidad de algunos iones e interferir en la evaluación de toxicidad de determinados contaminantes, por lo que es preferible reducir su concentración. Si bien algunas especies de Lemnáceas requieren de bicarbonatos como fuente de carbono inorgánico, en particular especies sumergidas (Landolt et al., 1986, Huebert et al, 1993), es conveniente la reducción de los mismos en el medio nutritivo, para evitar interferencias en la evaluación de la toxicidad de algunos metales por problemas de precipitación al modificar el pH del medio (Tölgyessy, 1993; Newman & Jagoe, 1996).

Por otro lado, durante el transcurso del ensayo, la incorporación selectiva de iones por las plantas, determina la variación del pH del medio haciendo que éste se torne levemente alcalino a medida que aumenta el número de frondes, durante los 14 días de crecimiento. La absorción de iones NO_3^- y de otros aniones, va acompañada de la incorporación de H^+ o la eliminación de OH^- para mantener el balance de cargas interno. El NO_3^- se incorpora con gran velocidad contribuyendo con el rápido aumento del pH de la solución nutritiva. Contrariamente, la absorción de NH_4^+ y otros cationes, es simultánea al ingreso de OH^- o a la liberación de H^+ , produciendo la disminución del pH del medio (Landolt & Kandeler, 1987; Kahle, 1993; Salisbury & Ross, 1994; Crawley, 1997; Taiz & Zeiger, 2002).

Los valores de pH alcanzados luego de 14 días de crecimiento de las Lemnáceas en la solución nutritiva de Huebert et al. (1993), con 250 μM de KNO_3 y 500 μM de NaHCO_3 , son: (Media \pm ee, n=8): clon LgP 8,18 \pm 0,04; clon LgJ 8,31 \pm 0,08 y clon LmJ 8,29 \pm 0,03.

Los objetivos planteados en este trabajo son

- *Evaluar la variación del pH del medio de Huebert et al. (1993), a lo largo del período de ensayo, modificando dos componentes de este medio nutritivo:*
 1. *La reducción de la concentración de NaHCO_3*
 2. *Modificación de la fuente de nitrógeno (NH_4NO_3 vs KNO_3)*
- *Evaluar el efecto de estas modificaciones de la composición del medio nutritivo de Huebert et al. (1993), en el crecimiento de los tres clones de Lemna spp.*

IV. 2. 2 METODOLOGÍA

IV.2.2.1 Modificación de la concentración de NaHCO_3 en la solución nutritiva: efecto sobre el crecimiento de Lemnáceas y variación del pH del medio a lo largo del período de ensayo.

Se estudió el crecimiento de los clones de Lemnáceas, clones LgP, LgJ y LmJ, en la solución nutritiva (Huebert et al., 1993) modificando, de su composición original, sólo la concentración de NaHCO_3 . La composición de la solución de Huebert et al. (1993) es: 250 μM KNO_3 , 110 μM CaCl_2 , 203 μM MgSO_4 , 15 μM K_2HPO_4 , 500 μM NaHCO_3 , 0,9 μM EDTA-FeCl_3 , 8,9 μM H_3BO_3 , 0,9 μM MnCl_2 , 0,04 μM CoCl_2 , 0,08 μM ZnSO_4 , 0,04 μM CuSO_4 , 0,7 μM Na_2MoO_4 .

Se evaluó el crecimiento en medios con las siguientes concentraciones de NaHCO_3 : 500 μM -concentración original del medio nutritivo-, 375 μM , 250 μM y 125 μM . El protocolo de ensayo se realiza según lo descrito en el Capítulo IV.1.7 y los puntos finales evaluados al final del mismo (14 días) fueron: peso seco total (PST) y tasa de multiplicación (TM), medidos de acuerdo a lo descrito en el Capítulo IV.1.8. Durante el período de ensayo se registró cada 3 días el número de frondes producidas a fin de verificar el modelo de crecimiento. El efecto de la concentración de bicarbonato sobre la producción de PST y en la TM, se evaluó mediante

ANOVA, (Fisher, LSD) y el modelo de crecimiento durante el período de ensayo, mediante análisis de regresión. A lo largo del periodo de exposición se registró la variación del pH del medio nutritivo.

IV.2.2.2 Modificación de la fuente de nitrógeno en la solución nutritiva (KNO_3 a NH_4NO_3): efecto sobre el crecimiento de Lemnáceas y variación del pH del medio a lo largo del período de ensayo.

Con el fin de minimizar las variaciones de pH a lo largo del período de ensayo con Lemnáceas, se reemplazó la fuente de nitrógeno de la solución nutritiva original (Huebert et al., 1993), utilizándose NH_4NO_3 en reemplazo del KNO_3 .

Se evaluó el crecimiento de los clones, durante un período de 14 días, en solución nutritiva con 250uM KNO_3 y 125uM NH_4NO_3 , correspondiendo estas concentraciones a 3,5 mgN/L. El ensayo de crecimiento se realizó según el protocolo descrito en el Capítulo IV.1.7, en la solución nutritiva original (Huebert et al., 1993) pero utilizando 250µM NaHCO_3 , de acuerdo a los resultados obtenidos de la evaluación del crecimiento y variación del pH con diferentes concentraciones de NaHCO_3 en el medio (Capítulo IV.2.3.1). Se determinó el efecto en la tasa de multiplicación y el peso seco al final del período de ensayo, analizando los resultados mediante el método de 't Student' de comparación de medias. El crecimiento de los clones se evaluó mediante análisis de regresión. A lo largo del periodo de exposición se registró la variación del pH del medio nutritivo.

IV.2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.2.3.1 Modificación de la concentración de NaHCO_3 en la solución nutritiva: efecto sobre el crecimiento de Lemnáceas y variación del pH del medio a lo largo del período de ensayo.

La Tabla IV.2.1 muestra el efecto de la variación de la concentración de NaHCO_3 del medio nutritivo, en el peso seco total y la tasa de multiplicación de los tres clones de Lemnáceas. En la Tabla IV.2.2 se indican los resultados del análisis de regresión de las curvas de crecimiento de las Lemnáceas en medios con diferente concentración de NaHCO_3 .

De los resultados obtenidos se observa que, luego de los 14 días de crecimiento en solución nutritiva con diferentes concentraciones de NaHCO_3 , la TM no se modificó significativamente en ninguno de los niveles ensayados, observándose igual respuesta en los tres clones utilizados (Tabla IV.2.1). Por otra parte, a lo largo del período de ensayo, se verifica que los tres clones siguen un modelo de crecimiento exponencial en todos los niveles del tratamiento (Tabla IV.2.2). Sin embargo, sí se evidencian diferencias significativas en la producción de biomasa, modificándose el peso seco final con la concentración de NaHCO_3 del medio de ensayo (Tabla IV.2.1).

Tabla IV.2.1: Peso seco total (PST) y tasa de multiplicación (TM) de tres clones de Lemnáceas luego de 14 días de crecimiento en solución nutritiva con 4 niveles de NaHCO₃.

NaHCO ₃	Clon LgP		Clon LgJ		Clon LmJ	
	PST	TM	PST	TM	PST	TM
500µM	11,5±0,96 a	134±3	22,2±0,32 a	131±1	26,4±1,22 a	136±1
375µM	13,4±0,88 a b	138±2	20,6±3,00 a	130±2	19,7±2,13 b	127±2
250µM	15,3±0,36 b	137±1	21,8±1,23 a	131±1	21,5±2,56 a b	127±4
125µM	12,1±0,67 a b	124±3	12,1±3,47 b	127±3	13,2±1,55 c	128±2

PST: peso seco (mg) del total de las frondes desarrolladas al final del ensayo. Los valores de peso seco y tasa de multiplicación corresponden al promedio de cuatro repeticiones ± ee.

* Los niveles que poseen igual letra, no difieren significativamente entre si ($p \leq 0,05$).

Tabla IV.2.2: Crecimiento de tres clones de Lemnáceas, luego de 14 días, en solución nutritiva con diferentes concentraciones de NaHCO₃.

NaHCO ₃	Clon LgP		Clon LgJ		Clon LmJ	
	b	R ²	b	R ²	b	R ²
500µM	0,620**	0,988	0,675**	0,994	0,687**	0,993
375µM	0,661**	0,993	0,665**	0,994	0,683**	0,989
250µM	0,696**	0,996	0,716**	0,993	0,655**	0,980
125µM	0,538**	0,990	0,691**	0,990	0,781**	0,989

La relación entre el ln del número de frondes (NF_t) y el tiempo de cultivo (t) transcurrido es lineal, lo que indica que el crecimiento fué exponencial durante los 14 días de ensayo. b: coeficiente de regresión; R²: coeficiente de correlación. ** diferencias significativas ($p \leq 0,01$).

El peso seco del clon LgP es significativamente mayor en el medio con 250µM y 375µM de NaHCO₃, respecto de aquellos con 500µM y 125µM.

En los ensayos con el clon LgJ, el peso seco acumulado en un medio con 125µM de NaHCO₃ es significativamente menor al obtenido cuando el crecimiento se realiza en medios con 500µM, 375µM o 250µM de NaHCO₃.

El clon LmJ es el que mostró mayor variación del PST al reducir la concentración de NaHCO₃ en el medio, obteniéndose la menor biomasa con 125µM de NaHCO₃. La biomasa desarrollada es la misma si el crecimiento ocurre en soluciones con concentración de NaHCO₃ de 500µM y 250µM, siendo los valores de peso seco, en estas concentraciones significativamente mayores a los observados en los otros niveles ensayados.

Con relación a la modificación del pH del medio durante el transcurso del ensayo, se observa que las tendencias son similares cuando el crecimiento ocurre en soluciones nutritivas

con diferente concentración de NaHCO_3 (Figura IV.2.1). Además se puede observar que no se registraron grandes variaciones de pH a lo largo del período de ensayo, excepto para el medio con $375\mu\text{M}$ de NaHCO_3 . Los valores máximos de pH alcanzados fueron (Media \pm ee, n=4): $8,2 \pm$

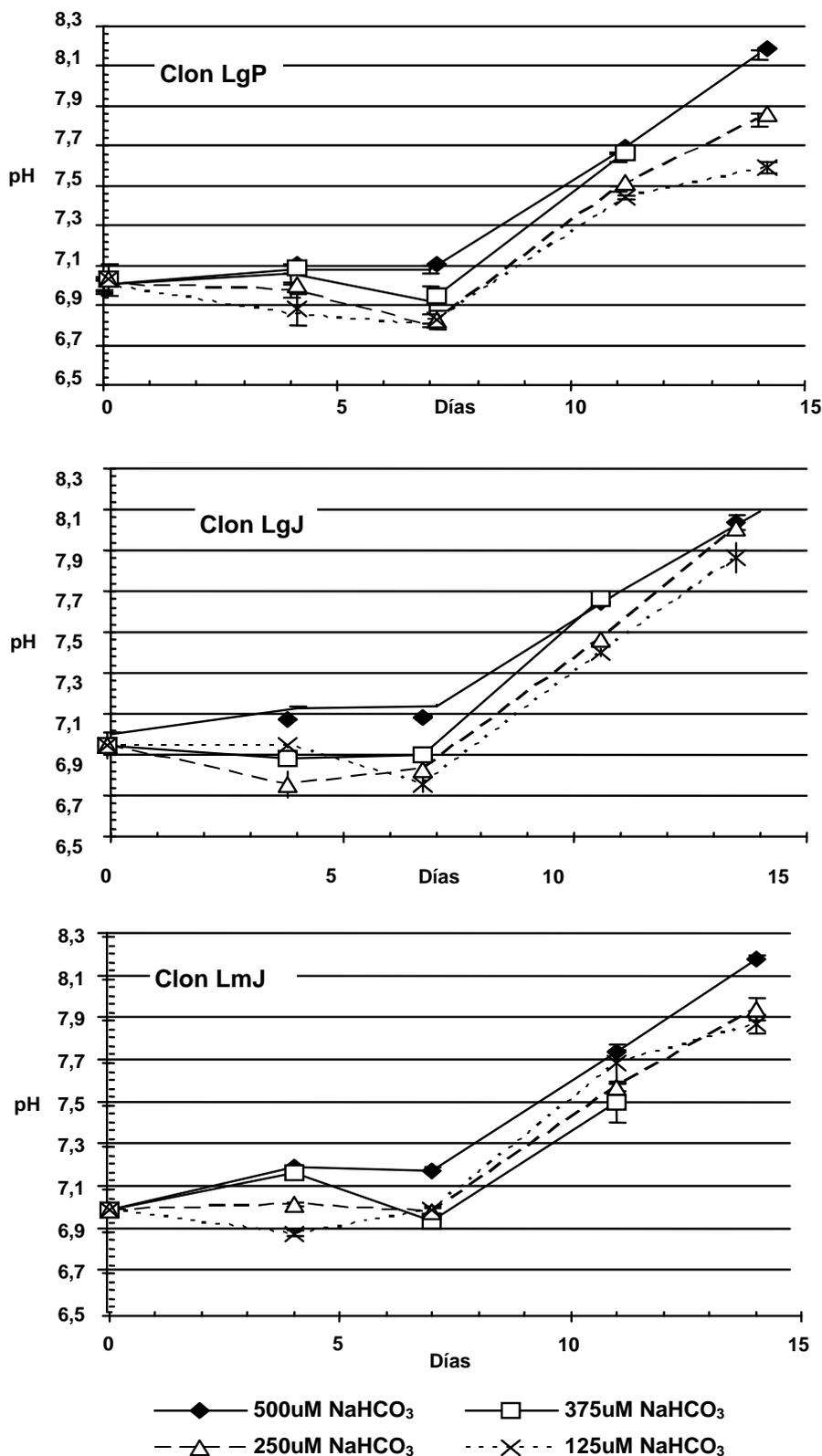


Figura IV.2.1: Efecto de la concentración de NaHCO_3 en la variación del pH en cultivos de Lemnáceas durante el período de ensayo.

0,01 (500 μ M), 7,5 \pm 0,13 (375 μ M), 8,06 \pm 0,05 (250 μ M) 7,9 \pm 0,07 (125 μ M), no observándose diferencias entre los tres clones.

Por lo tanto, siendo que en los tres clones se observa buena producción de biomasa y crecimiento exponencial de la población cuando la concentración de NaHCO₃ en el medio de crecimiento es de 250 μ M, y con el fin de reducir la cantidad de este componente en la solución nutritiva de ensayo, se modifica su concentración, utilizándose 250 μ M en lugar de los 500 μ M originales (Huebert et al., 1993).

IV.2.3.2 Modificación de la fuente de nitrógeno en la solución nutritiva (KNO₃ a NH₄NO₃): efecto sobre el crecimiento de Lemnáceas y variación del pH del medio a lo largo del período de ensayo.

En la Tabla IV.2.3 se muestran los resultados de los efectos en el crecimiento de los tres clones de Lemnáceas en solución nutritiva con KNO₃ o NH₄NO₃ como fuente de N, indicándose los efectos en el peso seco total (PST) y en la tasa de multiplicación (TM). En la Tabla IV.2.4 se indican los resultados de las curvas de crecimiento de las Lemnáceas en solución nutritiva con KNO₃ y NH₄NO₃. En la Figura IV.2.2 se representa la variación de pH en la solución nutritiva con diferente fuente de nitrógeno, a lo largo de los 14 días de crecimiento.

Tabla IV.2.3: Crecimiento de los clones de Lemnáceas en solución nutritiva con KNO₃ o NH₄NO₃ como fuente de nitrógeno. Evaluación del efecto en el peso seco (PS) y en la tasa de multiplicación (TM).

Fuente de N (3,5 mg/L)	Clon LgP		Clon LgJ		Clon LmJ	
	TM	PST	TM	PST	TM	PST
KNO ₃ 250 μ M	126 \pm 3	0,060 \pm 0,007	121 \pm 1**	0,105 \pm 0,021	145 \pm 1**	0,096 \pm 0,015
NH ₄ NO ₃ 125 μ M	130 \pm 3	0,043 \pm 0,006	129 \pm 1**	0,117 \pm 0,008	152 \pm 1**	0,116 \pm 0,008

PS: peso seco (mg) por fronde desarrollada al final del ensayo. Los valores de peso seco y tasa de multiplicación corresponden al promedio de 5 repeticiones \pm ee. ** $p \leq 0,01$

Tabla IV.2.4: Crecimiento de los tres clones de Lemnáceas, durante 14 días, en solución nutritiva con KNO_3 o NH_4NO_3 como fuente de nitrógeno.

Fuente de N (3,5 mg/l)	Clon LgP		Clon LgJ		Clon LmJ	
	b	R ²	b	R ²	b	R ²
KNO₃ 250μM	0,280**	0,986	0,268**	0,990	0,323**	0,992
NH₄NO₃ 125μM	0,293**	0,981	0,288**	0,990	0,338**	0,992

La relación entre el ln del número de frondes (NF_t) y el tiempo de cultivo (t) transcurrido es lineal, lo que indica que el crecimiento fue exponencial durante los 14 días de ensayo. b: coeficiente de regresión; R²: coeficiente de correlación. ** $p \leq 0,01$

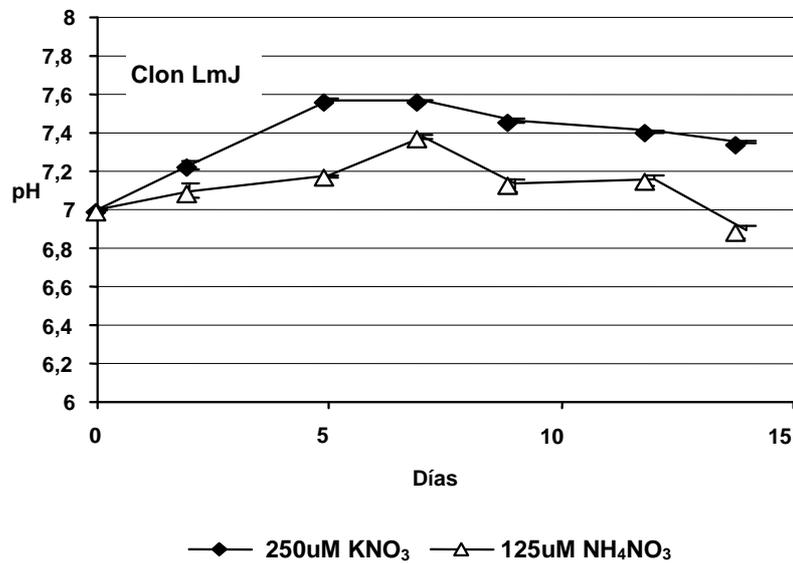
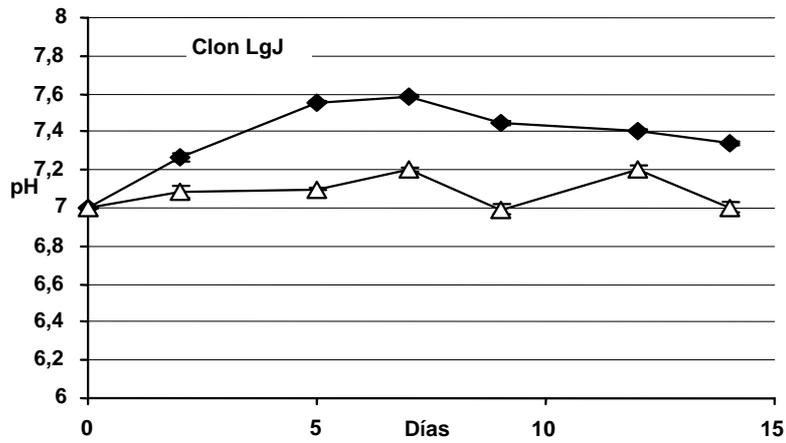
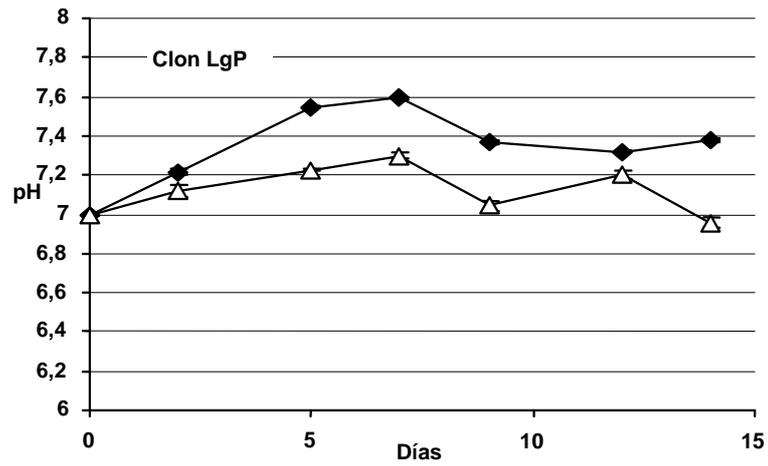


Figura IV.2.2: Variación del pH en cultivos de Lemnáceas. Crecimiento durante 14 días en soluciones nutritivas conteniendo KNO₃ o NH₄NO₃ como fuente de nitrógeno.

En los clones LgJ y LmJ, la tasa de multiplicación difiere significativamente dependiendo de la fuente de N del medio, siendo mayor cuando crecen en medio conteniendo NH_4NO_3 . Sin embargo, la tasa de multiplicación en el clon LgP no varió al modificar la composición del medio, siendo el crecimiento similar en ambas soluciones ensayadas.

En ninguno de los tres clones se observaron modificaciones significativas en el peso seco, al cambiar la fuente de nitrógeno de la solución (Tabla IV.2.3).

Es de destacar que al sustituir el KNO_3 por NH_4NO_3 , se logra una menor variabilidad del pH a lo largo del período de ensayo (Figura IV.2.2), observándose además un mejor crecimiento del clon LgP (frondes más vigorosas).

Debido a la importancia de lograr la mayor estabilidad posible del pH durante los ensayos de toxicidad, y dados los resultados expuestos anteriormente, se considera conveniente el reemplazo de la fuente de nitrógeno del medio propuesto por Huebert et al., (1993), utilizándose en posteriores ensayos, el NH_4NO_3 en la solución nutritiva a una concentración de $125\mu\text{M}$.

IV.2.4 CONCLUSIONES

- En los tres clones se observa buena producción de biomasa y crecimiento exponencial de la población en el medio de crecimiento con menor concentración de NaHCO_3 ($250\mu\text{M}$) y con $125\mu\text{M}$ de NH_4NO_3 .
- El reemplazo de la fuente de nitrógeno (KNO_3 por NH_4NO_3) produce una mayor estabilidad en el pH del medio de crecimiento de los clones de Lemnáceas durante el periodo de ensayo, sin afectar la tasa de multiplicación y producción de biomasa seca de los mismos.
- Se establece como medio nutritivo para el crecimiento de Lemnáceas en laboratorio y para la ejecución de los bioensayos de toxicidad subcrónica, la solución nutritiva propuesta por Huebert et al. (1993) modificada, cuya composición es la siguiente:

Nutrientes: $125\mu\text{M}$ NH_4NO_3 , $110\mu\text{M}$ CaCl_2 , $203\mu\text{M}$ MgSO_4 , $15\mu\text{M}$ K_2HPO_4 , $250\mu\text{M}$ NaHCO_3 .

Micronutrientes: $0,9\mu\text{M}$ EDTA-FeCl_3 , $8,9\mu\text{M}$ H_3BO_3 , $0,9\mu\text{M}$ MnCl_2 , $0,04\mu\text{M}$ CoCl_2 , $0,08\mu\text{M}$ ZnSO_4 , $0,04\mu\text{M}$ CuSO_4 , $0,7\mu\text{M}$ Na_2MoO_4 .

IV.3 EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DE LEMNÁCEAS A LA EXPOSICIÓN SUBCRÓNICA A COMPUESTOS PUROS: EFECTO COMPARATIVO DEL Cu(II), Cr(VI) Y Cd(II).

IV.3 EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DE LEMNÁCEAS A LA EXPOSICIÓN SUBCRÓNICA A COMPUESTOS PUROS: EFECTO COMPARATIVO DEL Cu(II), Cr(VI) Y Cd(II).

IV.3.1 INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Como ya se ha mencionado en el capítulo III.2.1, existe un amplio espectro de sensibilidad en la respuesta fitotóxica al cobre, cromo y cadmio, dependiendo esta diversidad en, no sólo de la especie sino que también del punto final de toxicidad evaluado y del tiempo de exposición al contaminante (Hendry et al., 1992; Lewis, 1995; Gupta et al., 1996; Crawley, 1997; Mohan & Hosetti, 1999; Prasad et al., 2001; Wu & Zhang, 2002; Liu et al., 2004; Miretzky et al., 2004).

Cuando se selecciona una especie como organismo diagnóstico para ser utilizado en un bioensayo de toxicidad, es de gran relevancia evaluar su sensibilidad frente a la exposición a compuestos puros, analizando además la respuesta en diferentes puntos finales. Para el caso de las Lemnáceas, también se observa esta variabilidad inter e intraespecífica (Wang, 1992; Huebert & Shay, 1993b; Mohan & Hosetti, 1999; Paradiso Giles, 2000; Lytle & Lytle, 2001; Li & Xiong, 2004a), no existiendo una tendencia general en la respuesta, por lo que es relevante conocer la sensibilidad de los tres clones de *Lemna* spp. seleccionados, a la exposición a metales pesados.

Por otra parte, este tipo de información, de igual manera a los resultados obtenidos con el ensayo con *L. sativa*, constituye un aporte original al conocimiento de mecanismos de acción de contaminantes en plantas vasculares, estableciéndose los umbrales de respuesta y niveles de daño en distintos parámetros, frente a la exposición a diferentes concentraciones de metales (Environment Canada, 1999a; Castillo, 2004). Este conocimiento permitirá establecer potenciales aplicaciones, ya sea como especies sensibles en bioensayos de toxicidad o, para el caso de las especies tolerantes, en procesos de bioremediación como bioacumuladoras de metales. Además, la generación de datos de fitotoxicidad del cobre, cromo y cadmio, es necesaria para su incorporación en cálculos de estimación de riesgo de ecosistemas acuáticos, así como para el establecimiento de niveles guía para la protección de ambientes acuáticos (van Leeuwen, 1990; Suter, 1993; SRHN, 2003b; SRHN, 2004; SRHN, 2005).

Los objetivos planteados en este trabajo fueron los siguientes:

- *Evaluar la sensibilidad de los clones de Lemnáceas (Lemna gibba clones LgP y LgJ; L. minor clon LmJ) frente a la exposición subcrónica a los metales pesados Cu(II), Cr(VI) y Cd(II).*
- *Comparar la sensibilidad entre poblaciones clonales de la especie L. gibba con diferente origen geográfico: clon local (LgP) y clon de Alemania (LgJ).*

- Comparar la sensibilidad de diferentes puntos finales de respuesta para la evaluación de efectos fitotóxicos en Lemnáceas.
- Establecer los umbrales de respuesta por exposición al Cu(II), Cr(VI) y Cd(II), para cada uno de los clones y cada punto final.

IV. 3. 2 METODOLOGÍA

Se estudió de manera comparativa la fitotoxicidad de tres metales pesados – Cobre (II), Cromo (VI) y Cadmio (II)-. Para cada uno de estos metales, se analizó la sensibilidad de los tres clones de Lemnáceas (*L. gibba*, clones LgP y LgJ; *L. minor*, clon LmJ) considerando como puntos finales de evaluación de la toxicidad, el efecto en la tasa de multiplicación (TM), en el área foliar (AF), en el contenido total de clorofila (CTC) y en la relación clorofila a/clorofila b (Cla/Clb). La metodología de ensayo utilizada corresponde a la descrita en el Capítulo IV.1.7 y los puntos finales se midieron según lo especificado en el Capítulo IV.1.8. Previo a la realización de los ensayos las plantas se aclimataron durante un mes en las condiciones de exposición, en laboratorio.

Los bioensayos se realizaron por duplicado, con 4 repeticiones por cada concentración del metal estudiada, trabajando simultáneamente con los tres clones y analizando la toxicidad de cada metal independientemente. En todos los ensayos realizados, se verificó que la producción de biomasa en los controles negativos siguiera un modelo de crecimiento exponencial, siendo éste un requisito del control durante el desarrollo del bioensayo (Huebert & Shay, 1993a).

A partir de los resultados de los ensayos preliminares con los tres metales y tres clones, se realizaron las exposiciones definitivas, ajustando el intervalo de concentraciones utilizadas con cada metal de acuerdo a la sensibilidad de la especie considerada. El intervalo de concentraciones de exposición ensayados para cada metal fue de 0,1 a 1,25 mgCu(II)/L, 0,1 a 5 mgCr(VI)/L, para los clones LgP y LgJ, y 0,05 a 3 mgCr(VI)/L para el clon LmJ y 0,01 a 0,35 mgCd(II)/L para los tres clones.

Los patrones de metales se prepararon a partir de sales de Cd y Cu metálico en HNO₃ y de K₂Cr₂O₇, todos de calidad analítica, en agua nanopura, verificándose su concentración final por espectrofotometría de absorción atómica (Varian Spectra AA) por aspiración directa en llama (APHA-AEEA-WPCF, 1992).

Se evaluó la toxicidad de estos metales exponiendo los tres clones a las distintas concentraciones, realizándose las correspondientes curvas concentración-respuesta y el respectivo análisis de regresión y la estimación de la CI₂₅ y CI₅₀. Se calculó además los valores de NOEC, LOEC y TOEC. Los valores de NOEC, LOEC y TOEC y las estimaciones de la CI₂₅ y CI₅₀ se calcularon de acuerdo a lo especificado en el Capítulo III.1.5.

Dada la variabilidad en la respuesta de los clones entre las repeticiones de los ensayos, el análisis estadístico de los resultados se realizó considerando un grupo de 2 experimentos,

analizado a través del ANOVA, para una estructura de tratamientos en esquema factorial, utilizándose en cada uno de ellos un diseño enteramente casualizado (Carranza, 1998). Este análisis se realizó para cada metal estudiado, evaluando la respuesta de los tres clones en cada uno de los puntos finales anteriormente mencionados (TM, AF, CTC y Cla/CIb). Todos los cuadros de ANOVA se muestran resumidos, presentando solamente los valores correspondientes a los efectos principales y a las interacciones, aún en aquellos casos en que éstas no sean significativas.

A fin de visualizar comparativamente la respuesta de los tres clones en la TM, AF y CTC al aumentar la concentración de metal, se realizó el ajuste de cada variable a un modelo de regresión. Por otro lado, se realizó un análisis de comparación de pendientes de las ecuaciones de regresión lineal correspondiente a cada punto final, comparándose la respuesta de los tres clones a cada uno de los metales estudiados. Para ello, dado que la relación entre el aumento de la concentración de metal y la respuesta en los puntos finales no es lineal, se trabajó con diferentes transformaciones de los datos de manera de lograr el ajuste a un modelo de regresión lineal, manteniendo la normalidad y homogeneidad de la varianza de los valores transformados. Para el caso de los puntos finales CTC o el AF, que presentan exaltación o inversión en la respuesta a bajas concentraciones de exposición a algunos de los metales, el ajuste al modelo de regresión se realizó considerando solamente el intervalo de respuesta en el cual se verifica toxicidad (inhibición respecto del tratamiento control). Las comparaciones múltiples de las pendientes se realizaron con el método de Tukey (Sokal & Rohlf, 1979; Zar, 1996).

IV. 3. 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV. 3. 3. 1 TOXICIDAD SUBCRONICA DEL COBRE (II)

Los efectos fitotóxicos del Cu(II) en los clones de *Lemna* spp., luego de la exposición durante 14 días, pueden verse en la Figura IV.3.1.. Se compara las plantas expuestas al metal con aquellas del tratamiento control (Figura IV.3.1. clon LgP: a, b, c; clon LgJ: d, e, f; Clon LmJ: g, h, i), indicándose solamente los efectos de la exposición a tres concentraciones de metal correspondientes a la curva concentración-respuesta: 0,5 (Figura IV.3.1: a, d, g), 0,75 (Figura IV.3.1: b, e, h) y 1 mgCu(II)/L (Figura IV.3.1: c, f, i). Se evidencia el efecto de este metal en la reducción del área foliar y en el contenido de clorofila. De manera general, en las plantas expuestas a 0,75 y 1 mg/l se observa clorosis, siendo este efecto más pronunciado en las frondes de mayor tiempo de crecimiento (frondes con yemas y con mayor área foliar), observándose en las yemas y frondes jóvenes un mayor contenido de clorofila (Figura IV.3.1: b, c, e, f, h, i).

La reducción en el área foliar de las frondes es significativo, manifestándose en los tres clones, aún a la concentración de 0,5 mgCu(II)/L. Además, en la Figura IV.3.1 puede verse el efecto del cobre en el crecimiento de las raíces de las plantas expuestas a 0,5 mgCu(II)/L Figura

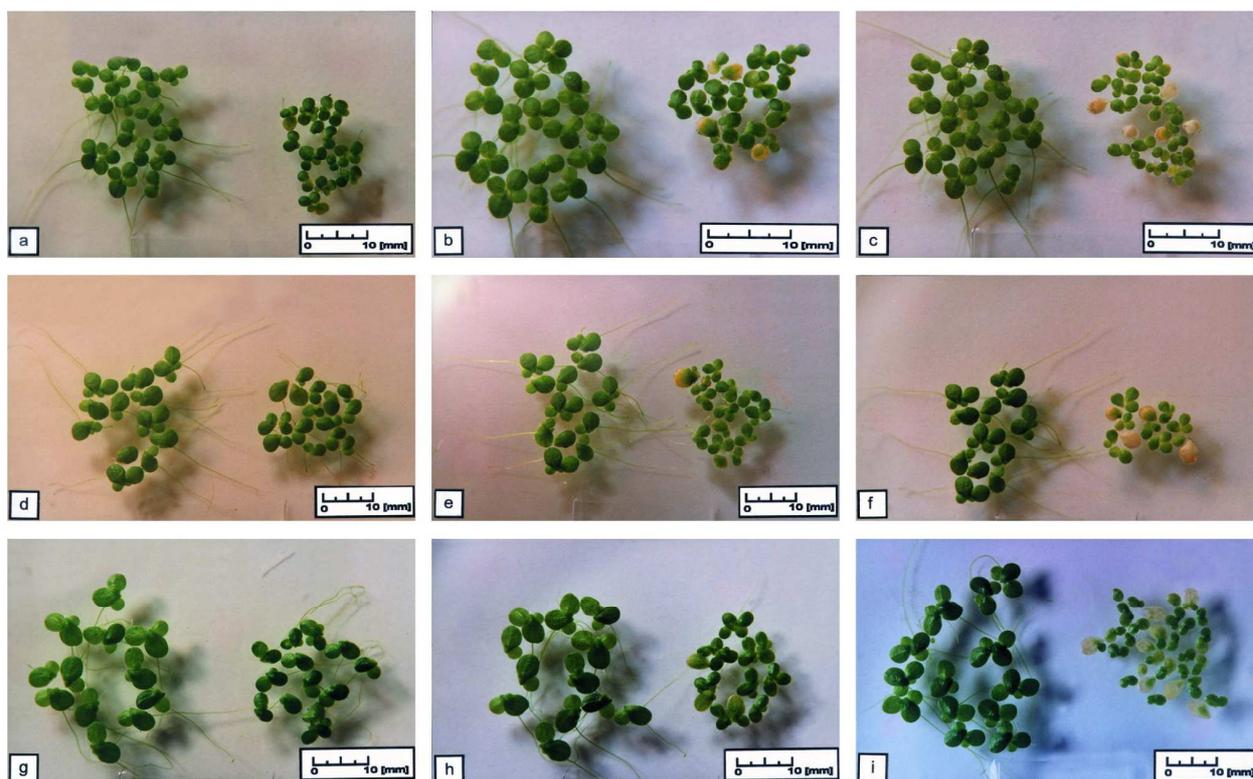


Figura IV.3.1: Toxicidad del Cu(II) en Lemnáceas: efectos en el desarrollo del área foliar y en el contenido total de clorofila luego de 14 días de exposición.

a, b, c: *L. gibba* (clon LgP), plantas expuestas a 0,5, 0,75 y 1 mgCu(II)/L, respectivamente; d, e, f: *L. gibba* (clon LgJ), plantas expuestas a 0,5, 0,75 y 1 mgCu(II)/L, respectivamente; g, h, i: *L. minor* (clon LmJ), plantas expuestas a 0,5, 0,75 y 1 mgCu(II)/L, respectivamente. En cada fotografía, el grupo de plantas ubicado a la izquierda corresponde al control y a la derecha al

(Figura IV.3.1:a, d, g), siendo la inhibición significativa (frondes sin raíces o raíces de algunos milímetros solamente) luego de la exposición a 0,75 y 1 mgCu(II)/L (Figura IV.3.1:b, c, e, f, h, i). Otro efecto observado, es la abscisión temprana de las frondes hijas, lo que se manifiesta por la tendencia de las frondes jóvenes y yemas a separarse de las frondes progenitoras, con una reducción en el número de frondes-yemas por colonia con el aumento de la concentración de exposición al metal (Figura IV.3.1: c, e, f).

En la Tabla IV.3.1 se indica el ANOVA de los resultados obtenidos, en los diferentes puntos finales, luego de la exposición de los tres clones de Lemnáceas al cobre. Los resultados del ANOVA muestran que la fitotoxicidad del cobre fue altamente significativa en los cuatro puntos finales (Tabla IV.3.1) para los tres clones evaluados. Si bien existen diferencias significativas en la respuesta al cobre en la TM, CTC y Cla/Clb entre los dos ensayos, el análisis de la varianza se realiza considerando un grupo de dos experimentos, por lo que las conclusiones para cada factor (punto final) continúan siendo válidas. Para el caso del análisis de los efectos del cobre en el AF, no existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos en los dos ensayos.

La Tabla IV.3.2 muestra los resultados del análisis de regresión y comparación de pendientes de las curvas concentración-respuesta para los puntos finales AF, TM y CTC, de los clones de Lemnáceas luego de 14 días de exposición al Cu(II).

En la Tabla IV.3.3 se indican las concentraciones de cobre correspondientes al NOEC, LOEC y TOEC, y en la Tabla IV.3.4 los valores de las Cl_{25} y Cl_{50} , para los puntos finales AF, TM, CTC y Cla/Clb obtenidos a partir de las curvas concentración-respuesta de los clones de Lemnáceas expuestos al cobre.

Tabla IV.3.1: Toxicidad subcrónica del Cu(II) en Lemnáceas. ANOVA de un grupo de dos experimentos. Análisis de la respuesta en la TM, AF, CTC y relación Cla/Clb.

<i>Tasa de Multiplicación</i>			
Fuente de variación	GL	F	p
Ensayo	1	79 1,1	0,000
Clon	2	1,3	0,436
Cobre	5	19,4	0,003
Clon*Cobre	10	4,6	0,012
Error	95		

Area Foliar

Fuente de variación	GL	F	p
Ensayo	1	0,0	0,888
Clon	2	285,4	0,000
Cobre	5	547,1	0,000
Clon*Cobre	10	289,0	0,000
Error	683		

Clorofila Total

Fuente de variación	GL	F	p
Ensayo	1	46,3	0,000
Clon	2	4,1	0,174
Cobre	6	61,9	0,000
Clon*Cobre	9	0,8	0,628
Error	96		

Relación Cla/Clb

Fuente de variación	GL	F	p
Ensayo	1	275,4	0,000
Clon	2	0,8	0,553
Cobre	6	13,9	0,003
Clon*Cobre	9	0,7	0,062

Tabla IV.3.2: Toxicidad subcrónica del Cu(II) en Lemnáceas. Análisis de regresión de las curvas de toxicidad para la respuesta en la tasa de multiplicación (TM), área foliar (AF) y contenido total de clorofila (CTC).

	TM ¹			AF			CTC ¹		
	a	b*	R ²	a	b*	R ²	a	b*	R ²
Clon LgP	10,86	-2,706 a	0,818	3,498	-2,133 a	0,962	1,298	-0,528 ab	0,918
Clon LgJ	10,53	-2,374 a	0,844	6,613	-5,916 b	0,969	1,092	-0,471 a	0,889
ClonLmJ	12,09	-4,204 b	0,848	8,340	-8,074 c	0,965	1,371	-0,726 b	0,850

Todas las regresiones fueron estadísticamente significativas ($p \leq 0,01$). 1: Variable dependiente con transformación raíz cuadrada. a: ordenada al origen; b: coeficiente de regresión (pendiente); R²: coeficiente de determinación.

* Pendientes estadísticamente diferentes ($p \leq 0,01$): los valores seguidos por igual letra no difieren entre sí.

Tabla IV.3.3: Toxicidad subcrónica del cobre en Lemnáceas: NOEC, LOEC, TOEC para los diferentes puntos finales.

Punto Final	L.gibba (clon LgP)			L.gibba (clon LgJ)			L.minor (clon LmJ)		
	NOEC	LOEC	TOEC	NOEC	LOEC	TOEC	NOEC	LOEC	TOEC
TM	0,25	0,50	0,35	0,10	0,25	0,16	0,25	0,50	0,35
AF	0,10	0,25	0,16	0,10	0,25	0,16	0,10	0,25	0,16
CTC	0,75	1	0,87	0,50	0,75	0,61	0,75	1	0,87
Cla/Clb	0,75	1	0,87	0,50	0,75	0,61	0,75	1	0,87

Los valores corresponden a mgCu(II)/L

Tabla IV.3.4: Toxicidad subcrónica del cobre en Lemnáceas: CI_{25} y CI_{50} , en mgCu(II)/L, para los diferentes puntos finales.

Punto	L.gibba (clon LgP)		L.gibba (clon LgJ)		L.minor (clon LmJ)	
	CI_{25}	CI_{50}	CI_{25}	CI_{50}	CI_{25}	CI_{50}
Final						
TM	0,87 (0,73-0,99)	1,19 (1,15-1,23)	0,82 (0,64-0,91)	1,23 (1,18-1,25)	0,67 (0,40-0,83)	0,97 (0,89-1,04)
AF	0,10 > CI_{25} < 0,25 [#]	1,05 (0,91-1,32)	0,10 > CI_{25} < 0,25 [#]	0,68 (0,66-0,72)	0,33 (0,29-0,37)	0,81 (0,68-0,93)
CTC	0,93 (0,90-0,96)	1,15 (1,12-1,18)	0,74 (0,71-0,77)	0,93 (0,89-0,97)	0,85 (0,79-0,91)	0,99 (0,92-1,08)
Cla/CIb	1,08 (1,04-1,11)	1,21 (1,16-1,25)	0,90 (0,87-0,95)	> 1,25 *	0,81 (0,74-0,89)	1,10 (1,06-1,13)

Los valores indicados entre paréntesis corresponden al intervalo de confianza (95%).

* No es posible la estimación de la CI_{50} debido a que la inhibición en este punto final fue inferior al 50% para la máxima concentración de tóxico ensayada. [#]No es posible la estimación de la CI_{25} debido a que la inhibición en este punto final fue superior al 25% para la mínima concentración de tóxico ensayada en la que se verifica inhibición significativa.

VI. 3. 3. 1.1 Efecto del Cu(II) en la Tasa de Multiplicación (TM)

Al evaluar la respuesta tóxica en la TM frente a la exposición subcrónica al cobre, vemos que existe interacción significativa entre el efecto del metal y el comportamiento de los clones, indicando que la respuesta de los clones en este punto final es diferente (Tabla IV.3.1).

La curva concentración-respuesta (Figura IV.3.2), muestra el efecto fitotóxico del cobre con un decaimiento leve en la TM, de modo similar en los clones LgP y LgJ, principalmente a bajos niveles de exposición al metal, evidenciándose un mayor efecto al aumentar la concentración. Se observa además, que la respuesta varía en los tres clones, verificándose en el Clon LmJ que la TM disminuye de manera más pronunciada en el intervalo de concentraciones ensayado. Esta diferencia en el comportamiento de los clones se verificó al realizar el análisis de regresión y la comparación de las pendientes de las curvas de toxicidad correspondiente a cada uno de ellos (Tabla IV.3.2), encontrándose, que los dos clones de L. gibba (LgP y LgJ) no difieren significativamente entre sí, siendo las pendientes de ambos diferentes de la del clone de L. minor (Clon LmJ).

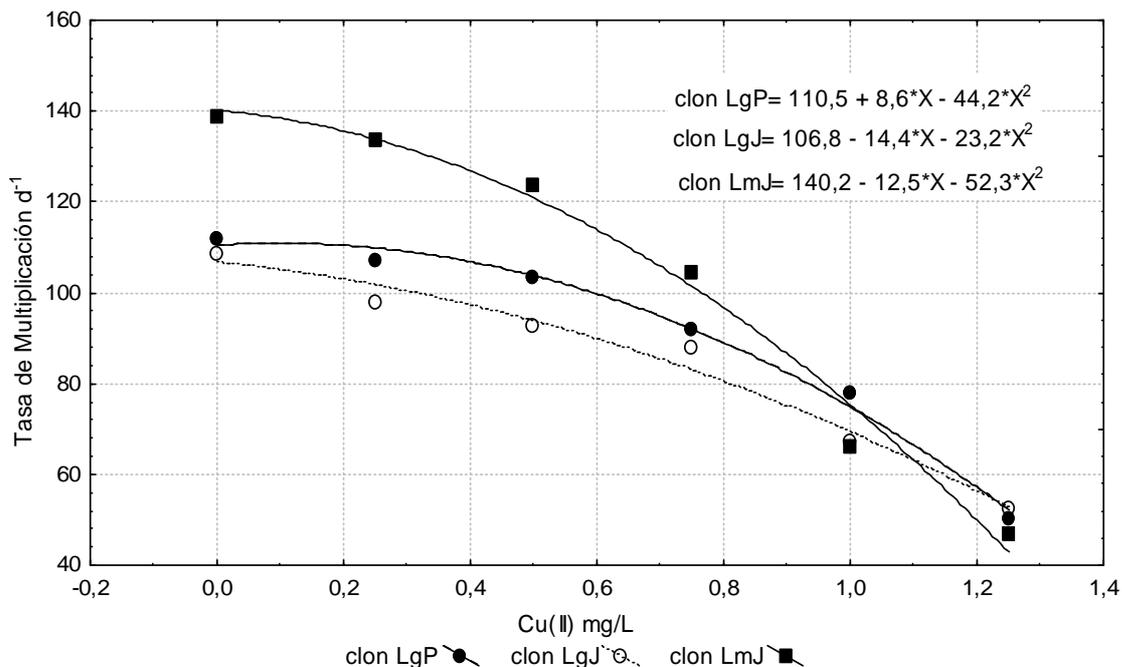


Figura IV.3.2: Toxicidad subcrónica del Cu(II) en Lemnáceas. Efecto en la tasa de multiplicación. Los valores corresponden al promedio de las repeticiones de ambos ensayos.

Al evaluar el efecto inhibitorio en la TM (Tabla IV.3.4; Figura IV.3.2), observamos que los valores de la CI_{25} y CI_{50} , son similares en los tres clones siendo el clon LmJ levemente más sensible. El orden de sensibilidad de los clones al evaluar la TM es: clon LmJ > clon LgP > clon LgJ.

No obstante esto, en exposiciones a bajas concentraciones de metal, vemos que la mayor sensibilidad se manifiesta en el Clon LgJ, siendo 0,25 mgCu(II)/L la mínima concentración ensayada en la que se detecta efecto (LOEC) en la TM y 0,1 mgCu(II)/L el valor mínimo de exposición en donde no se detectó inhibición significativa (NOEC). Para los clones LgP y LmJ, el valor de LOEC y NOEC es de 0,25 y 0,50 mgCu(II)/L, respectivamente (Tabla IV.3.3).

VI.3.3.1.2 Efecto del Cu(II) en el Área Foliar (AF)

En la Figura IV.3.3 se muestran las curvas concentración-respuesta de los tres clones de Lemnáceas, considerando el efecto en el área foliar como punto final para la evaluación de la fitotoxicidad del cobre. Al evaluar comparativamente la respuesta de los clones, se ve que la inhibición en el área foliar no se manifestó de la misma manera en los tres, encontrándose interacción significativa entre éstos y el efecto de los diferentes tratamientos con cobre (Tabla IV.3.1). De manera general, se observa que el mayor efecto en este punto final se manifiesta en los clones LgJ y LmJ mientras que el clon LgP es el menos afectado (Figura IV.3.3). Al realizar el análisis de regresión y la comparación de las pendientes de las curvas de toxicidad correspondiente a cada uno de los clones, se verificó que las mismas difieren significativamente (Tabla IV.3.2), comportándose cada clon de manera diferente. El orden de sensibilidad de los

clones, al evaluar los valores correspondientes a la Cl_{50} (Tabla IV.3.4, Figura IV.3.3), es: clon LgJ > clon LmJ > clon LgP

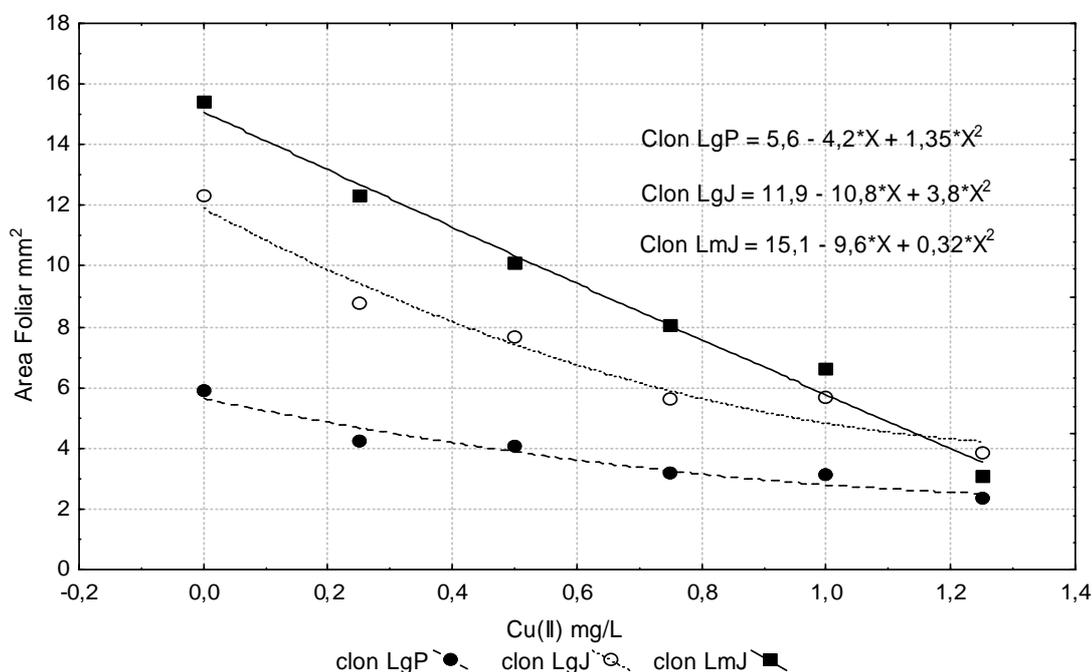


Figura IV.3.3: Toxicidad subcrónica del Cu(II) en Lemnáceas. Efecto en el área foliar. Los valores corresponden al promedio de las repeticiones de ambos ensayos.

Para los tres clones el valor del LOEC es 0,25 mgCu(II)/L (Tabla IV.3.3), siendo similar la sensibilidad de estos clones para detectar efectos en el área foliar por exposición a bajas concentraciones del metal. Las diferencias entre los clones en la respuesta inhibitoria en el área foliar se manifiestan al incrementarse los niveles de exposición al metal.

VI.3.3.1.3 Efecto del Cu(II) en el Contenido Total de Clorofila (CTC).

Al evaluar la respuesta en el CTC frente a la exposición subcrónica a concentraciones de cobre entre 0,1 y 1,25 mg/l, el ANOVA indica, que el comportamiento de los tres clones es similar, no existiendo interacción entre el efecto del metal y la respuesta de los mismos (Tabla IV.3.1). En la curva dosis respuesta (Figura IV.3.4) se puede ver que, en los tres clones de Lemnáceas estudiados, el Cu(II) produce dos tipos de efectos en el CTC: exaltación o inhibición, dependiendo de la concentración de exposición considerada. Se observa un leve incremento en el CTC en exposiciones a 0,25 y 0,5 mgCu(II)/L, registrándose toxicidad a partir de 0,75 mgCu(II)/L (Figura IV.3.4, Tabla IV.3.3).

Al considerar solamente la respuesta fitotóxica vemos que el comportamiento de los clones es diferente (Tabla IV.3.2, Figura IV.3.4). Si comparamos los valores correspondientes a

la Cl_{25} y Cl_{50} (Tabla IV.3.4, Figura IV.3.4) estos no difieren en gran medida entre los tres clones. No obstante esto, el orden de sensibilidad de los clones es igual al observado para el efecto en el AF: clon LgJ > clon LmJ > clon LgP

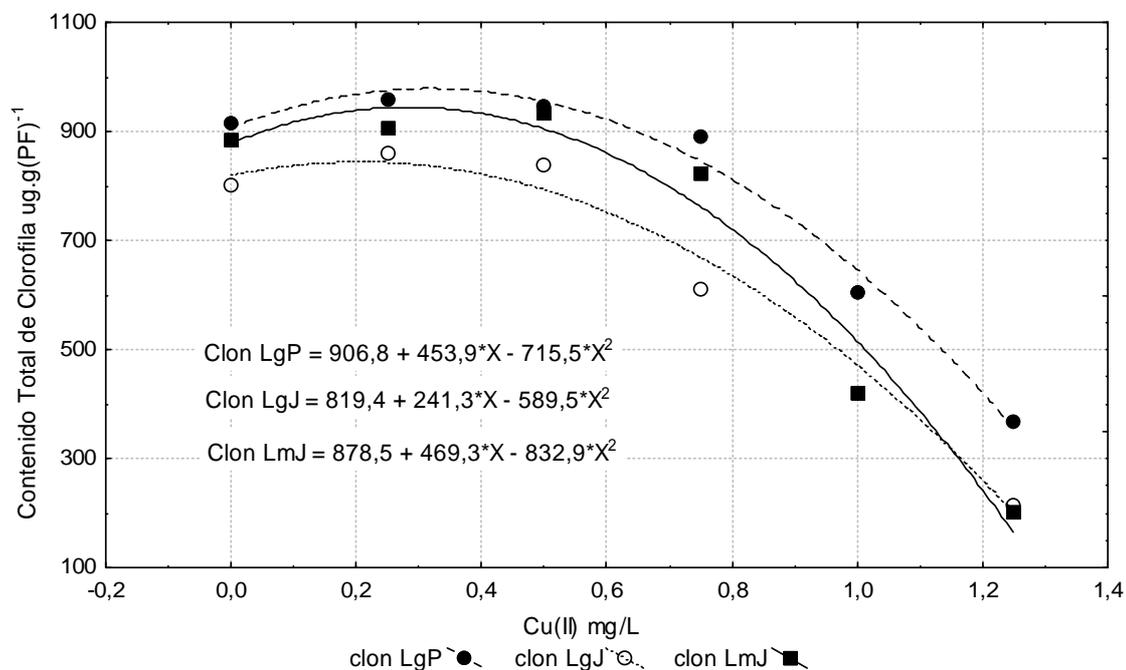


Figura IV.3.4: Toxicidad subcrónica del Cu(II) en Lemnáceas. Efecto en el contenido total de clorofila. Los valores corresponden al promedio de los valores de las repeticiones de ambos ensayos.

El clon LgJ, igual a lo observado para la TM, también muestra alta sensibilidad para detectar efecto en el contenido total de clorofila a bajas concentraciones de exposición (Tabla IV.3.3).

Al comparar la respuesta de los tres clones de Lemnáceas expuestos al cobre, el clon LgJ es el más sensible al evaluar los efectos en CTC y AF, no sólo al considerar la Cl_{50} sino también en la respuesta observada en exposiciones a bajas concentraciones del metal. Al evaluar la toxicidad en la TM, la mayor sensibilidad se observa en el clon LmJ.

VI. 3. 3.1.4 Efecto del Cu(II) en la relación clorofila a/clorofila b (Cl_a/Cl_b).

La evaluación de la respuesta de las Lemnáceas en éste parámetro, se analiza de manera comparativa con el efecto del cobre en el contenido total de clorofila (CTC). La variación de ambos puntos finales y la sensibilidad de cada clon se indican comparativamente en la Figura IV.3.5.

De manera general, se observa que en los tres clones expuestos al cobre, la relación Cl_a/Cl_b no se mantuvo constante sino que disminuye significativamente con el aumento de la

concentración (Tabla IV.3.1, Figura IV.3.5). Al comparar esta respuesta con la observada en el CTC, vemos que la relación Cla/Clb se modifica a las mismas concentraciones de exposición al Cu(II) en las que se verifica reducción significativa en el CTC. No obstante esto, los valores de inhibición en el CTC siempre fueron mayores a los observados en la relación Cla/Clb (Figura IV.3.5: a', b' y c'). Al comparar el comportamiento de los clones, vemos que si bien el menor valor de LOEC se registra en el clon LgJ, al evaluar la CI_{25} y la CI_{50} , el clon más sensible es el de L. minor (Tabla IV.3.3 y IV.3.4).

En la Figura IV.3.6 se grafica la variación de la relación Cla/Clb, para cada uno de los clones, comparativamente con la respuesta en el contenido de clorofila a (Cla) y clorofila b (Clb) (Figura IV.3.6: a, b, c) indicándose además el porcentaje de inhibición en cada parámetro (Figura IV.3.6: a', b', c').

Si analizamos el comportamiento del contenido de Cla y Clb en la reducción en el CTC y de la relación Cla/Clb, vemos que en los tres clones el aumento en la clorosis por efectos del cobre es debida en mayor medida a la reducción en el contenido de Cla (Figura IV.3.6). La reducción en la Cla respecto de la reducción en la Clb es mayor a concentraciones de cobre mayores, lo que se manifiesta en una mayor inhibición en la relación Cla/Clb. Esta variación en la respuesta con el aumento del nivel de exposición al cobre se manifiesta claramente en el clon de L. minor (Figura IV.3.6: c, c'), evidenciándose efectos similares en la Cla y la Clb a 0,75 mgCu(II)/L, sin alteración de la relación Cla/Clb, mientras que si la exposición es a concentraciones mayores la inhibición en la Cla es mayor, alterándose consecuentemente la relación Cla/Clb.

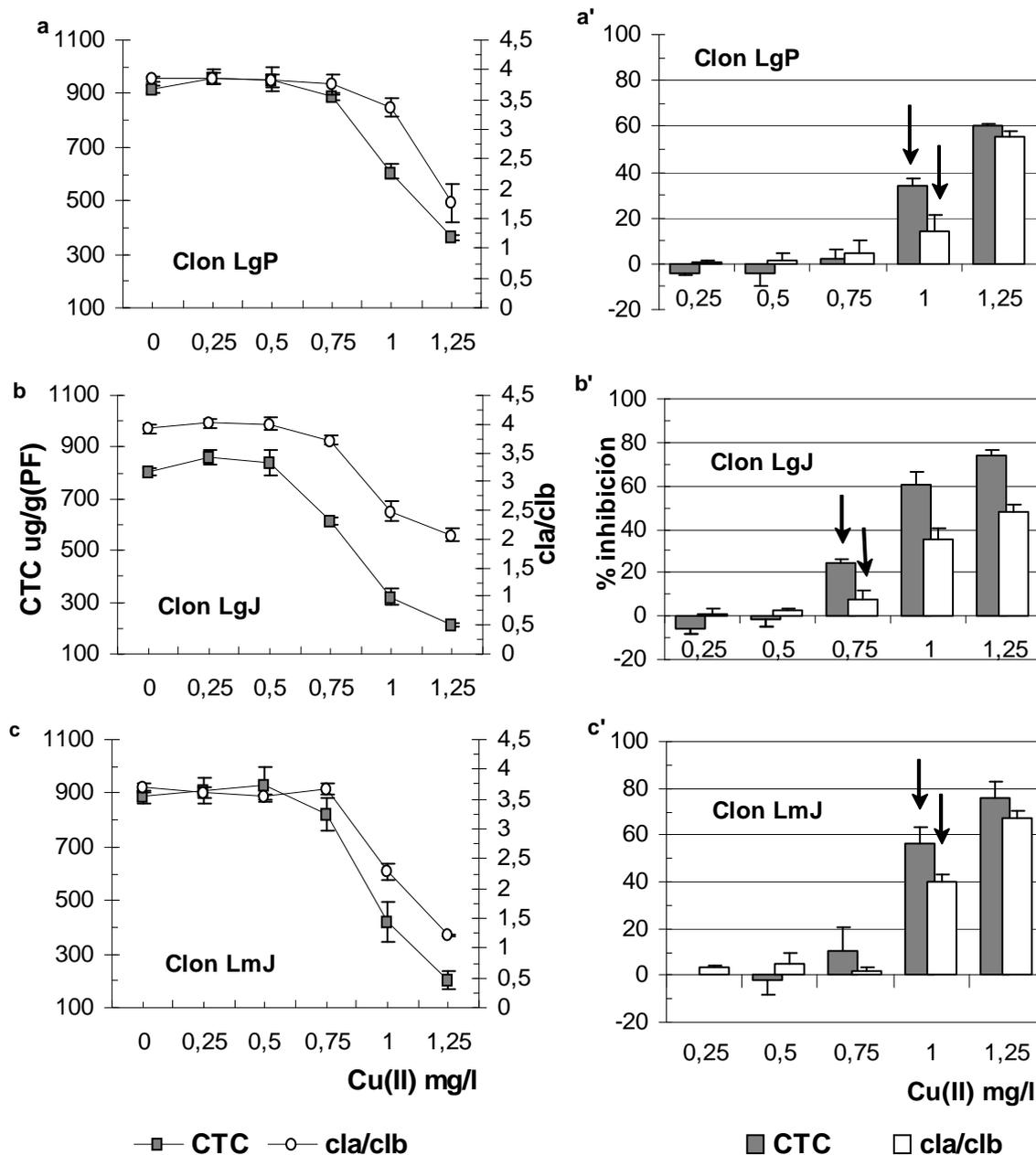


Figura IV.3.5: Toxicidad subcrónica del Cu(II) en Lemnáceas. Efecto en el contenido total de clorofila (CTC) y en la relación clorofila a/clorofila b (Cla/Clb).

a, b y c. CTC en $\mu\text{g}/\text{mg}$ (Peso Fresco) y relación Cla/Clb de los clones de Lemnáceas LgP, LgJ y LmJ, respectivamente) expuestos a diferentes concentraciones de Cu(II). Los valores corresponden al promedio de las repeticiones de ambos ensayos (Media \pm ee, n=7).

a', b' y c'. Porcentaje de inhibición en el CTC y Cla/Clb en los clones de Lemnáceas LgP, LgJ y LmJ, respectivamente. Los valores corresponden al promedio de la inhibición en ambos ensayos \pm error estándar (n=7). Las flechas indican la menor concentración de metal a la que se observa efecto significativo (LOEC; $p \leq 0,01$).

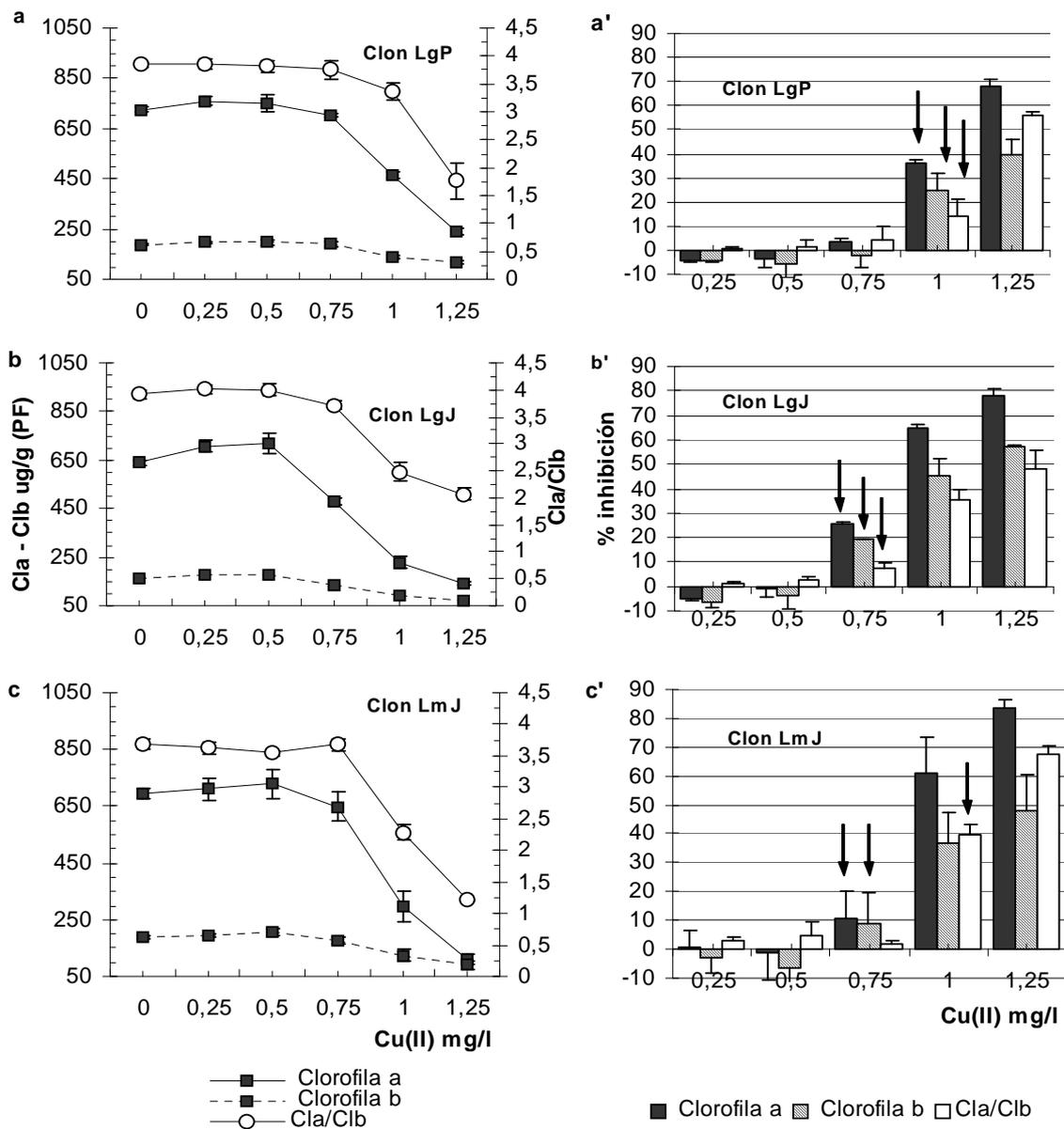


Figura IV.3.6: Toxicidad subcrónica del Cu(II) en Lemnáceas. Efecto en el contenido de clorofila a (Cla), clorofila b (Clb) y en la relación clorofila a/clorofila b (Cla/Clb).

a, b y c. Contenido de clorofila a (Cla) y clorofila b (Clb) en µg/g(Peso Fresco) y relación Cla/Clb en los clones de Lemnáceas LgP, LgJ y LmJ, respectivamente, expuestos a diferentes concentraciones de Cu(II). Los valores corresponden al promedio de las repeticiones de ambos ensayos (Media ± error estándar, n=7).

a', b' y c'. Porcentaje de inhibición en el contenido de clorofila a (Cla) y clorofila b (Clb) y en la relación Cla/Clb en los clones de Lemnáceas LgP, LgJ y LmJ, respectivamente. Los valores corresponden al promedio de la inhibición en ambos ensayos (Media ± error estándar, n=2). Las flechas indican la menor concentración de metal ensayada a la que se observa efecto significativo (LOEC; $p \leq 0,01$).

Frente a la exposición subcrónica de Lemnáceas al Cu(II), la reducción en el CTC constituye un punto final de sensibilidad similar a la variación en la relación Cla/Clb. La clorosis generada por el cobre es debida principalmente a la reducción en el contenido de Cla.

VI.3.3.1.5 Sensibilidad de la respuesta de los clones de Lemnáceas a la exposición subcrónica al Cu(II): comparación del efecto en el área foliar (AF), en la tasa de multiplicación (TM) y en el contenido total de clorofila (CTC) .

Cuando analizamos de manera general la respuesta de cada punto final considerado (TM, AF, CTC y relación Cla/Clb), se observa que si bien los efectos fitotóxicos del cobre se manifiestan en todos ellos, la sensibilidad de cada uno fue diferente. Dado que la sensibilidad en la respuesta en la variación de la relación Cla/Clb es baja, este punto final no se considerará en la siguiente discusión.

En la Figura IV.3.7 se indica de manera comparada, para cada uno de los tres clones de Lemnáceas, la respuesta inhibitoria en los puntos finales AF, TM y CTC. La figura muestra los porcentajes de inhibición alcanzados luego de la exposición durante 14 días a las diferentes concentraciones de cobre (Figura IV.3.7: a,b,c).

De manera general, al considerar los valores de CI_{50} , los clones responden con sensibilidad similar en los distintos puntos finales, manifestando el clon LgJ una mayor variabilidad en la respuesta, siendo el área foliar el punto final más sensible (Tabla IV.3.4). De acuerdo a los valores de CI_{50} obtenidos en los clones LgP, LgJ y LmJ, el orden de sensibilidad de los puntos finales evaluados es: AF > TM > CTC

La diferencia en la sensibilidad del área foliar respecto de los demás puntos finales se manifiesta con más intensidad a valores menores de inhibición, lo que se evidencia si se comparan los valores de CI_{25} o de LOEC (Tablas IV.3.3 y IV.3.4). Se observa que en los clones LgP y LmJ, la reducción en el AF, fue significativa en exposiciones a 0,25 mgCu(II)/L (Figura IV.3.7: a y c), siendo este punto final de mayor sensibilidad respecto de la TM y CTC, para detectar toxicidad a bajas concentraciones de metal. En el clon LgJ, la exposición a 0,25 mgCu(II)/L produjo inhibición significativa en el AF y TM. Los efectos en el CTC, si bien son severos cuando la exposición al Cu(II) es a concentraciones altas, empiezan a manifestarse recién a partir de 0,75 mg/L, valores de exposición mayores respecto de la sensibilidad para los demás puntos finales. En los clones LgP y LmJ los efectos en el CTC se manifiestan con valores de exposición al cobre 4 y 2 veces mayores a los necesarios para generar efectos significativos en el AF y TM, respectivamente (Figura IV.3.7).

Se observa en general que el AF es el punto final más sensible para evaluar la exposición a bajas concentraciones de Cu.

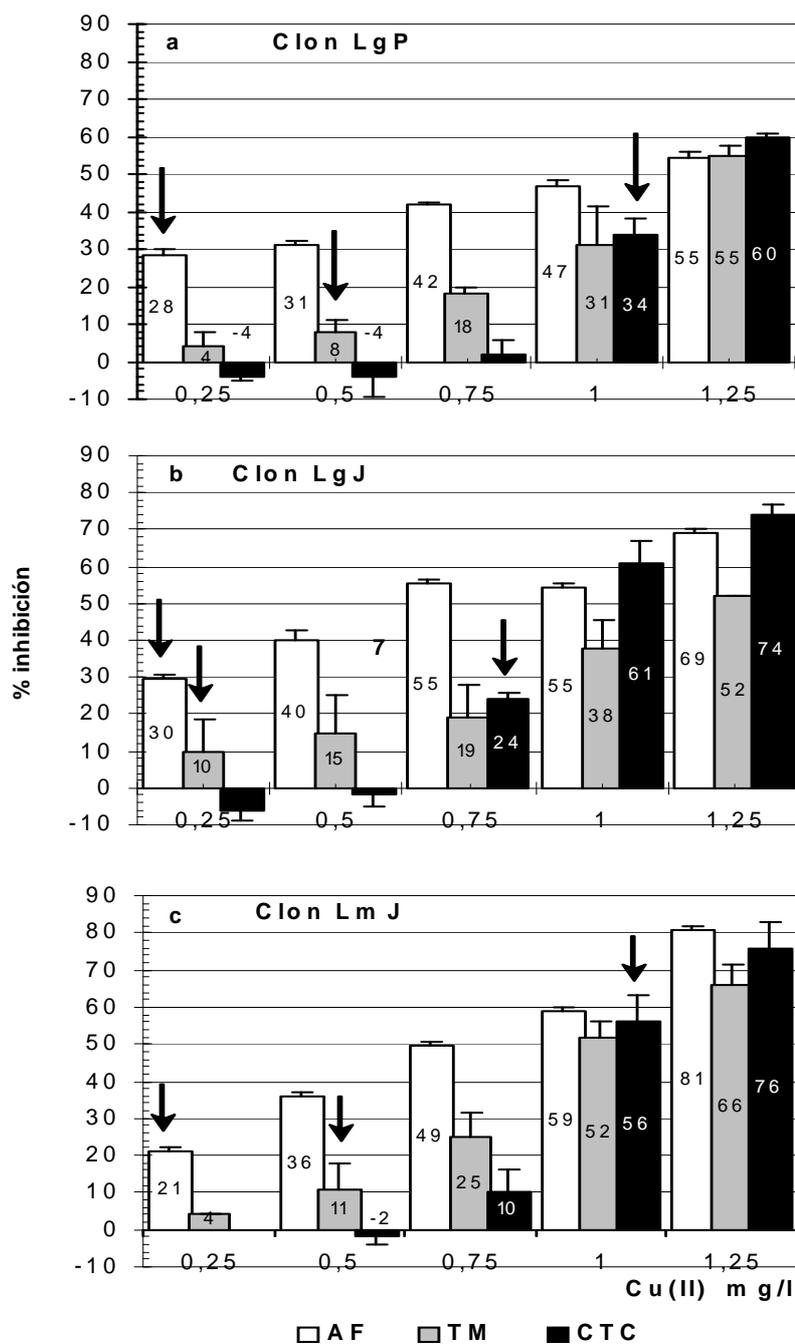


Figura IV.3.7: Toxicidad subcrónica del Cu(II) en Lemnáceas. Efecto comparativo en el área foliar (AF), en la tasa de multiplicación (TM) y en el contenido total de clorofila (CTC).

a, b y c. Porcentaje de inhibición en el AF, en la TM y en el CTC en los clones de Lemnáceas LgP, LgJ y LmJ, respectivamente. Los valores corresponden al promedio de la inhibición en ambos ensayos \pm error estándar (n=7). Las flechas indican la menor concentración de metal a la que se observa efecto significativo (LOEC; $p \leq 0,01$).

Es importante remarcar que si bien la exposición al cobre en el intervalo entre 0,25 y 0,5 mgCu(II)/L genera en los tres clones un leve incremento, aunque no significativo, en el contenido de clorofila, esta respuesta se la interpreta como un efecto no deseado, más aún cuando se evidencia inhibición en otros puntos finales a estos valores de exposición (Figura IV.3.7).

Si comparamos la sensibilidad de los clones estudiados con la respuesta de otras Lemnáceas a este metal, vemos que existen referencias de especies más y menos sensibles a lo observado para *L. gibba* y *L. minor* en este trabajo. La respuesta observada por Landolt & Kandeler (1987) en *L. minor* y *L. aequinoctialis* indican inhibición en el crecimiento a 0,051 y 0,095 mgCu(II)/L. Mohan & Hosetti (1999) informa valores en CI_{50} en el número de frondes producidas entre 0,1 y 1,1 mgCu(II)/L para *L. minor* y 0,1 mgCu(II)/L para *L. valdiviana* y entre 0,9 y 1,3 para *L. gibba*. Para la especie *L. trisulca* el valor de CE_{50} para la tasa de multiplicación, corresponde a 0,23 mgCu(II)/L, luego de 14 días de exposición (Huebert et al., 1993). Con relación a los efectos en el CTC Wahaab et al. (1995) observan en *L. minor* que a 0,25 mgCu(II)/L hay clorosis significativa luego de 10 días de exposición, mientras que a 1 mgCu(II)/L se produce la muerte de los individuos. Por otra parte, Boniardi et al. (1998) observan una alta tolerancia de *L. gibba* al cobre, informando valores de inhibición en la producción de biomasa del 35 y 73% luego de la exposición a 2,5 y 6,7 mgCu(II)/L, respectivamente, siendo estos niveles cobre no tolerados por los clones LgJ y LgP utilizados en este estudio. Prasad et al. (2001) estudiaron los efectos del cobre en *L. trisulca* observando que en esta especie la toxicidad (clorosis) es significativa recién cuando la exposición es a 1,5 y 3 mgCu(II)/L. Estos autores informan, de igual manera a lo observado en nuestros resultados, que los efectos del cobre son más marcados en la reducción del contenido de Cla respecto de la Clb. Con relación a la exaltación en el CTC, Prasad et al. (2001) también observan aumento en el contenido de Cla y Clb en *L. trisulca* por exposición al cobre pero a valores de 0,064 mgCu(II)/L, concentración de un orden de magnitud inferior a lo observado para los clones LgP, LgJ y LmJ en este trabajo. El estudio realizado por Frankart et al. (2002) en *L. minor* indica que la exposición a 0,2 y 0,4 mgCu(II)/L producen efecto significativo en la fotosíntesis a las 72 hs de exposición, observándose reducción en la capacidad fotosintética y en los mecanismos de "quenching" (extinción) fotoquímico y no fotoquímico. A estos valores de exposición, la respuesta observada en este trabajo para los clones de *L. gibba* y *L. minor*, es de exaltación en el CTC, observándose inhibición a concentraciones mayores (Figura IV.3.5).

Estudios realizados en otras especies acuáticas y palustres también indican una gran variación en la sensibilidad de respuesta en diferentes puntos finales de evaluación de la toxicidad. Por ejemplo, Stefani et al. (1991) evaluaron la sensibilidad de *Juncus acutus* considerando el efecto en la germinación y el crecimiento inicial durante 15 días de exposición. A las concentraciones ensayadas - 0,07 a 1,2 mgCu(II)/L – no hay efecto en la germinación. Sin

embargo, la radícula no se desarrolló en ninguno de los niveles de cobre ensayados, inhibiéndose además el crecimiento del tallo a partir de 0,3 mgCu(II)/L (35%), alcanzando el 70 % de inhibición a 1,2 mgCu(II)/L. Gupta et al. (1994) evaluaron los efectos subletales del Cu(II) – 0,1 a 5 mgCu(II)/L- en el contenido de clorofila en hojas y peroxidación lipídica en raíces en *Scirpus lacustris* y *Bacopa monnieri* luego de 7 días de exposición. Estos autores observan reducción en el CTC y efecto en la peroxidación lipídica sólo a 5 mgCu(II)/L, indicando una baja sensibilidad de ambas especies a este metal. Esto mismo se observa en ensayos con *Hydrilla verticillata* (7 días), con concentraciones de metal entre 0,1 y 5 mgCu(II)/L, donde se verifica efecto en el CTC a partir de exposiciones a 0,5 mgCu(II)/L, alcanzando la máxima inhibición (59%) a 5 mgCu(II)/L, mientras que la inhibición registrada en el contenido de proteínas fue de sólo el 23 % a 5 mgCu(II)/L (Gupta et al., 1996).

En comparación con la sensibilidad de otras plantas vasculares acuáticas o palustres anteriormente mencionadas, se evidencia que los tres clones utilizados presentan buena sensibilidad al cobre y los valores de CI o LOEC están en el orden de lo informado en la bibliografía para diferentes especies y puntos finales.

IV.3.3.2 TOXICIDAD SUBCRÓNICA DEL CROMO (VI)

En la Figura IV.3.8 se observan los efectos fitotóxicos en plantas de los tres clones de Lemnáceas expuestas durante 14 días al Cr(VI), en comparación con aquellas del tratamiento control (Clon LgP: Figura IV.3.8: a, b, c; clon LgJ: Figura IV.3.8: d, e, f; Clon LmJ: Figura IV.3.8: g, h, i). Se indican sólo los efectos de la exposición a tres concentraciones de metal correspondientes a la curva concentración-respuesta: 0,25 (Figura IV.3.8: a, d, g), 1,5 (Figura IV.3.8: b, e, h) y 3 mgCr(VI)/L (Figura IV.3.8: c, f, i). Al igual que lo descrito para el cobre, es significativo el efecto del cromo en la reducción en el área foliar y en el contenido de clorofila, observándose mayor clorosis en las plantas expuestas a 1,5 y 3 mg/L, particularmente en ambos clones de *L. gibba* (Figura IV.3.8: b, c, d, e y f). En la Figura IV.3.8 puede verse, de manera general en los tres clones el mismo patrón de clorosis descrito para el cobre: la reducción en el contenido de clorofila es mayor en las frondes de mayor edad, observándose que en las yemas y frondes hijas jóvenes la clorosis es menor.

La reducción en el área foliar de las frondes se manifiesta en los tres clones, aún a la concentración de 0,25 mg/L, evidenciándose además, la inhibición en el crecimiento de las raíces en las plantas expuestas a 1,5 y 3 mg/L Cr(VI) (Figura IV.3.8: b, c, e, f, h, i). Otro efecto observado, es la tendencia de las frondes jóvenes y yemas a separarse de las frondes progenitoras antes de completar su desarrollo, reduciéndose el número de frondes-yemas por colonia con el aumento de la concentración de exposición al metal (Figura IV.3.8: c, e, f).

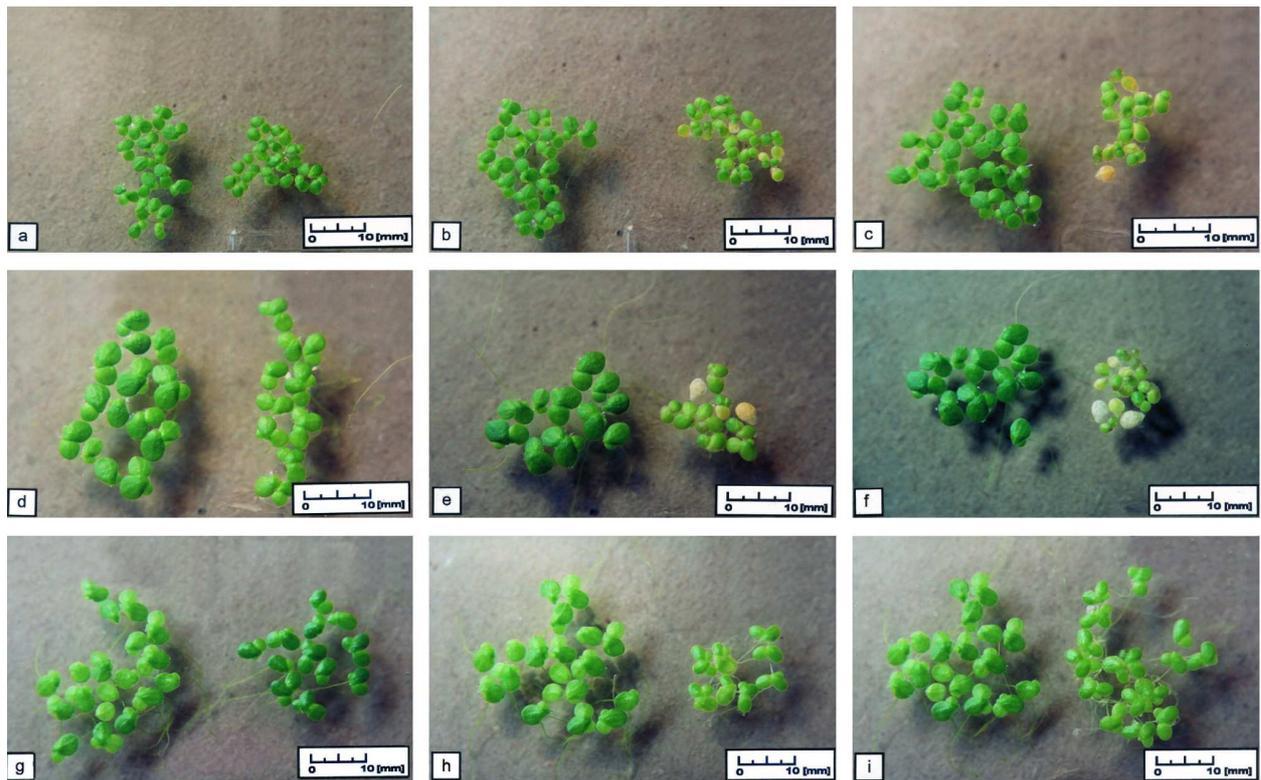


Figura IV.3.8: Toxicidad del Cr(VI) en Lemnáceas: efectos en el desarrollo del área foliar y en el contenido total de clorofila luego de 14 días de exposición.

a, b, c: *L. gibba* (clon LgP), plantas expuestas a 0,25, 1,5 y 3 mgCr(VI)/L, respectivamente; d, e, f: *L. gibba* (clon LgJ), plantas expuestas a 0,25, 1,5 y 3 mgCr(VI)/L, respectivamente; g, h, i: *L. minor* (clon LmJ), plantas expuestas a 0,25, 1,5 y 3 mgCr(VI)/L, respectivamente. En cada fotografía, el grupo de plantas ubicado a la izquierda corresponde al control y a la derecha al

En la Tabla IV.3.5 se indica el ANOVA de los resultados de la exposición de los clones de Lemnáceas al cromo. Analizando como las variables respuesta los puntos finales TM, CTC y Cla/Clb para este metal, se observa que existen diferencias significativas entre los dos ensayos, pero, dado que se realiza el análisis de la varianza considerando un grupo de dos experimentos, las conclusiones para cada factor (punto final) continúan siendo válidas. Con relación al análisis de los efectos del cromo en el AF, no existieron diferencias entre los resultados obtenidos en los dos ensayos.

Al analizar el efecto del cromo en los cuatro puntos finales considerados, los resultados del ANOVA muestran que éste fue altamente significativo en cada uno de ellos (Tabla IV.3.5).

La Tabla IV.3.6 muestra los resultados del análisis de regresión y comparación de pendientes de las curvas concentración-respuesta para los puntos finales AF, TM y CTC, de los tres clones de Lemnáceas luego de 14 días de exposición al Cr(VI).

En la Tabla IV.3.7 se indican los valores del NOEC, LOEC y TOEC y en la Tabla IV.3.8 los valores de las Cl_{25} y Cl_{50} para los puntos finales AF, TM, CTC y Cla/Clb correspondientes a las curvas concentración-respuesta de los tres clones de Lemnáceas expuestos al cromo.

Tabla IV.3.5: Toxicidad subcrónica del Cr(VI) en Lemnáceas. ANOVA de un grupo de dos experimentos. Análisis de la respuesta en la TM, AF, CTC y relación Cla/Clb.

Tasa de Multiplicación

Fuente	GL	F	p
Ensayo	1	49,9	0,000
Clon	2	4,7	0,174
Cromo	6	59,7	0,000
Clon*cromo	9	0,7	0,668
Error	9		

Area Foliar

Fuente	GL	F	p
Ensayo	1	0,2	0,645
Clon	2	1423,4	0,000
Cromo	6	59,2	0,000
Clon*cromo	9	8,6	0,002
Error	670		

Clorofila Total

Fuente	GL	F	p
Ensayo	1	46,3	0,000
Clon	2	4,1	0,174
Cromo	6	61,9	0,000
Clon*cromo	9	0,8	0,628
Error	96		

Relación Cla/Clb

Fuente	GL	F	p
Ensayo	1	275,4	0,000
Clon	2	0,8	0,553
Cromo	6	13,9	0,003
Clon*cromo	9	0,7	0,062
Error	88		

Tabla IV.3.6: Toxicidad subcrónica del Cr(VI) en Lemnáceas. Análisis de regresión de las curvas de toxicidad para la respuesta en la tasa de multiplicación (TM), área foliar (AF) y contenido total de clorofila (CTC).

	TM ¹			AF ¹			CTC ¹		
	a	b	R ²	a	b *	R ²	a	b	R ²
Clon LgP	440	-29,24	0,940	4,04	- 0,130 a	0,984	653	-36,52	0,880
Clon LgJ	440	-28,59	0,907	4,58	- 0,134 a	0,904	632	-48,06	0,951
ClonLmJ	445	-32,97	0,928	4,79	- 0,151 b	0,889	653	-47,24	0,897

Todas las regresiones fueron estadísticamente significativas ($p \leq 0,01$). 1: variable dependiente e independiente con transformación logarítmica. a: ordenada al origen; b: coeficiente de regresión

Tabla IV.3.7: Toxicidad subcrónica del cromo en Lemnáceas: NOEC, LOEC, TOEC para los diferentes puntos finales.

Punto Final	<i>L.gibba</i> (clon LgP)			<i>L.gibba</i> (clon LgJ)			<i>L.minor</i> (clon LmJ)		
	NOEC	LOEC	TOEC	NOEC	LOEC	TOEC	NOEC	LOEC	TOEC
TM	0,10	0,25	0,16	0,10	0,25	0,16	0,05	0,10	0,07
AF	0,25	0,75	0,43	0,10	0,25	0,16	0,10	0,25	0,16
CTC	0,25	0,75	0,43	0,10	0,25	0,16	0,25	0,75	0,43
Cla/Clb	0,25	0,75	0,43	0,25	0,75	0,43	0,75	1,5	1,1

Los valores corresponden a mgCr(VI)/L

Tabla IV.3.8: Toxicidad subcrónica del cromo en Lemnáceas: CI_{25} y CI_{50} , en mg/L, para los diferentes puntos finales.

Punto Final	<i>L.gibba</i> (clon LgP)		<i>L.gibba</i> (clon LgJ)		<i>L.minor</i> (clon LmJ)	
	CI_{25}	CI_{50}	CI_{25}	CI_{50}	CI_{25}	CI_{50}
TM	0,64 (0,52-0,78)	3,49 (2,72-4,62)	0,70 (0,51-0,98)	4,17 (3,63-4,77)	0,49 (0,25-0,69)	3,00 (2,55-3,60)
AF	1,00 (0,57-1,76)	> 5 *	0,1 > CI_{25} < 2,55 0,25 [#]	(2,05-3,24)	0,40 (0,25-0,69)	> 3 *
CTC	0,80 (0,61-1,29)	3,05 (2,52-3,73)	0,32 (0,15-0,49)	0,90 (0,75-1,04)	0,55 (0,44-0,64)	1,28 (1,06-1,46)
Cla/Clb	1,67 (0,61-3,22)	4,43 (3,75-4,96)	0,89 (0,61-1,12)	3,54 (1,50 -4,84)	2,12 (1,45-2,55)	> 3 *

Los valores indicados entre paréntesis corresponden al intervalo de confianza (95%). * No es posible la estimación de la CI_{50} debido a que la inhibición en este punto final fue inferior al 50% para la máxima concentración de tóxico ensayada. [#]No es posible la estimación de la CI_{25} debido a que la inhibición en

este punto final fue superior al 25% para la mínima concentración de tóxico ensayada en la que se verifica inhibición significativa.

IV.3.3.2.1. Efecto del Cr(VI) en la Tasa de Multiplicación (TM)

Al evaluar la respuesta de la TM frente a la exposición subcrónica al cromo, los tres clones responden de manera similar, no existiendo interacción entre el efecto del metal y el comportamiento de los clones (Tabla IV.3.5).

La Figura IV.3.9 muestra las curvas concentración-respuesta para el Cr(VI). El efecto fitotóxico de este metal se manifiesta con un marcado decaimiento en la TM, principalmente a bajas concentraciones de exposición al metal, siendo este comportamiento similar en los tres clones (Figura IV.3.9). Esta similitud en la respuesta se verificó al realizar el análisis de regresión y la comparación de las pendientes de las curvas de toxicidad correspondiente a cada uno de los clones, encontrándose que las mismas no difieren significativamente (Tabla IV.3.6). Al evaluar el efecto inhibitorio en la TM (Tabla IV.3.8; Figura IV.3.9), observamos que, si bien los valores son del mismo orden de magnitud, al comparar la Cl_{50} , la sensibilidad de los clones es: *clon LmJ* > *clon LgP* > *clon LgJ*.

Esta mayor sensibilidad del clon LmJ se manifiesta también en exposiciones a bajas concentraciones de metal, registrándose en este clon la menor concentración para la Cl_{25} (Tabla IV.3.8), siendo 0,1 mgCr(VI)/L el valor del LOEC obtenido para la TM (Tabla IV.3.7).

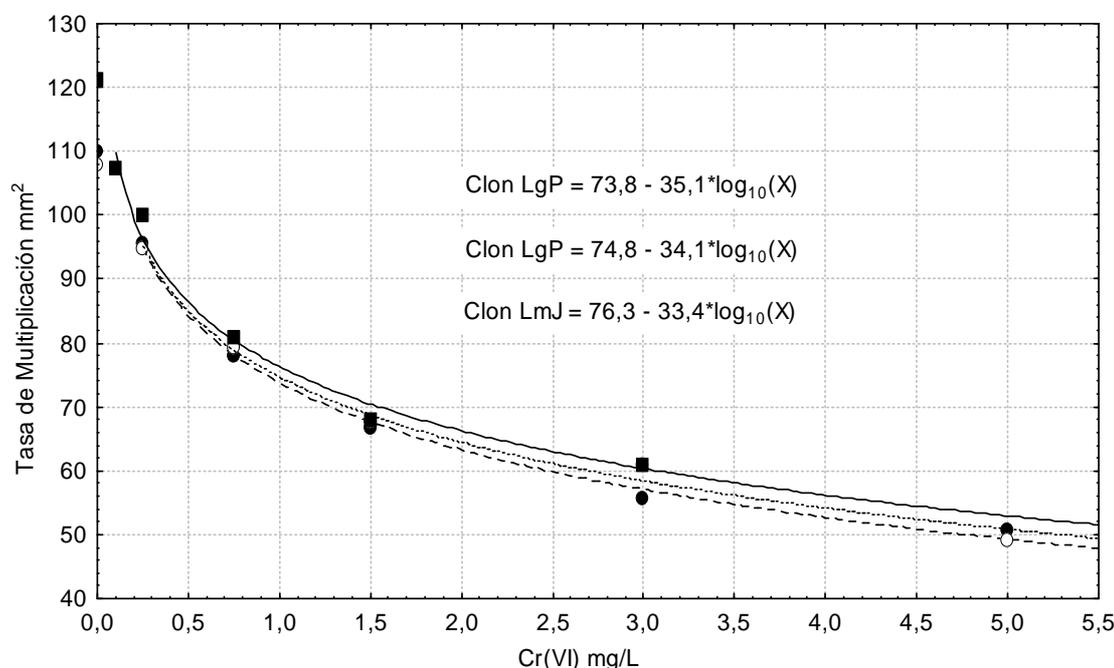


Figura IV.3.9: Toxicidad subcrónica del Cr(VI) en Lemnáceas. Efecto en la tasa de multiplicación. Los valores corresponden al promedio de las repeticiones de ambos ensayos.

IV.3.3.2.2. Efecto del Cr(VI) en el Area Foliar (AF)

En la Figura IV.3.10 se muestran las curvas concentración-respuesta de los tres clones de Lemnáceas, considerando el efecto en el área foliar como punto final de toxicidad del cromo. De manera general, se observa que el mayor decaimiento se produjo a bajas concentraciones de metal (entre 0,25 y 0,75 mg/L), mientras que los niveles de inhibición alcanzados a concentraciones mayores se mantuvieron sin grandes variaciones. Al evaluar comparativamente la respuesta de los clones, se comprobó que la reducción en el área foliar no se manifestó de la misma manera en los tres, encontrándose interacción significativa entre éstos y el efecto de los diferentes tratamientos con cromo (Tabla IV.3.5). Al realizar el análisis de regresión y la comparación de las pendientes de las curvas de toxicidad correspondiente a cada uno de los clones, se verificó que las mismas difieren significativamente (Tabla IV.3.6).

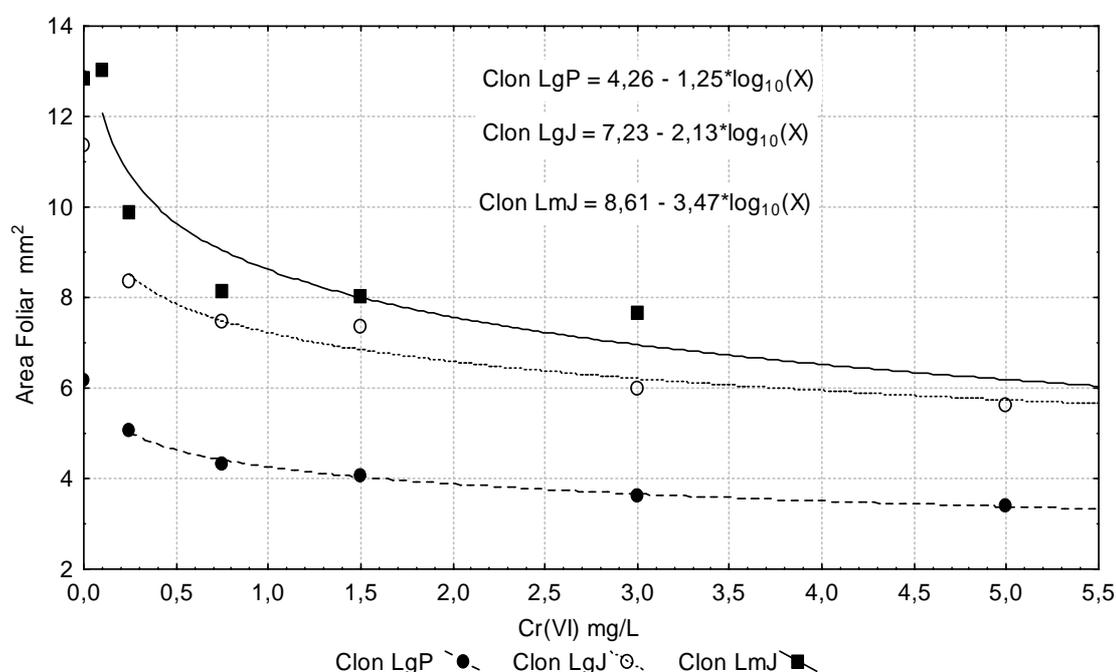


Figura IV.3.10: Toxicidad subcrónica del Cr(VI) en Lemnáceas. Efecto en el área foliar. Los valores corresponden al promedio de las repeticiones de ambos ensayos.

Frente al incremento en la concentración del cromo, se observa que el comportamiento del clon LmJ es diferente al de los clones LgP y LgJ, siendo similar la respuesta tóxica en estos dos clones de *L. gibba* (Tabla IV.3.6, Figura IV.3.10). Para los clones LgJ y LmJ el valor del LOEC es inferior al observado para el clon LgP (0,25 y 0,75 mgCr(VI)/L, respectivamente; Tabla IV.3.7). Si se comparan los valores de CI (Tabla IV.3.7; Figura IV.3.10), a bajos y altos niveles de inhibición (CI_{25} y CI_{50}) para la respuesta en el área foliar, vemos que la sensibilidad de los clones es la siguiente: *clon LgJ* > *clon LmJ* > *clon LgP*

IV.3.3.2.3. Efecto del Cr(VI) en el Contenido Total de Clorofila (CTC)

Al evaluar la respuesta en el CTC frente a la exposición subcrónica a distintas concentraciones de cromo, el ANOVA indica, que el comportamiento de los tres clones es similar, no existiendo interacción entre el efecto del metal y la respuesta de los mismos (Tabla IV.3.5). Por otra parte, la similitud en la reducción en el CTC de los clones se verificó al realizar el análisis de regresión y la comparación de las pendientes de las curvas de toxicidad correspondiente a cada uno de ellos, encontrándose que las mismas no difieren significativamente (Tabla IV.3.6). La Figura IV.3.11 muestra la curva de toxicidad al Cr(VI), manifestándose el efecto fitotóxico con una marcada disminución en la CTC en los tres clones de Lemnáceas estudiados (Figura IV.3.11). Para la especie *L. gibba* se observa una significativa diferencia en la sensibilidad de los dos clones, siendo el clon LgJ más afectado en el CTC ya sea a altas o bajas concentraciones de cromo (Tabla IV.3.7; Figura IV.3.11). Si bien, el clon de *L. minor* fue poco afectado a bajas concentraciones (LOEC: 0,75 mgCr(VI)/L; Tabla IV.3.7), la curva de toxicidad descrita presenta una pendiente muy marcada alcanzando altos valores de inhibición, superiores a los observados en el clon LgP, para la máxima concentración de cromo ensayada. Al comparar los valores de CI_{25} y CI_{50} (Tabla IV.3.8; Figura IV.3.11), vemos que la sensibilidad de los clones es: *clon LgJ* > *clon LmJ* > *clon LgP*.

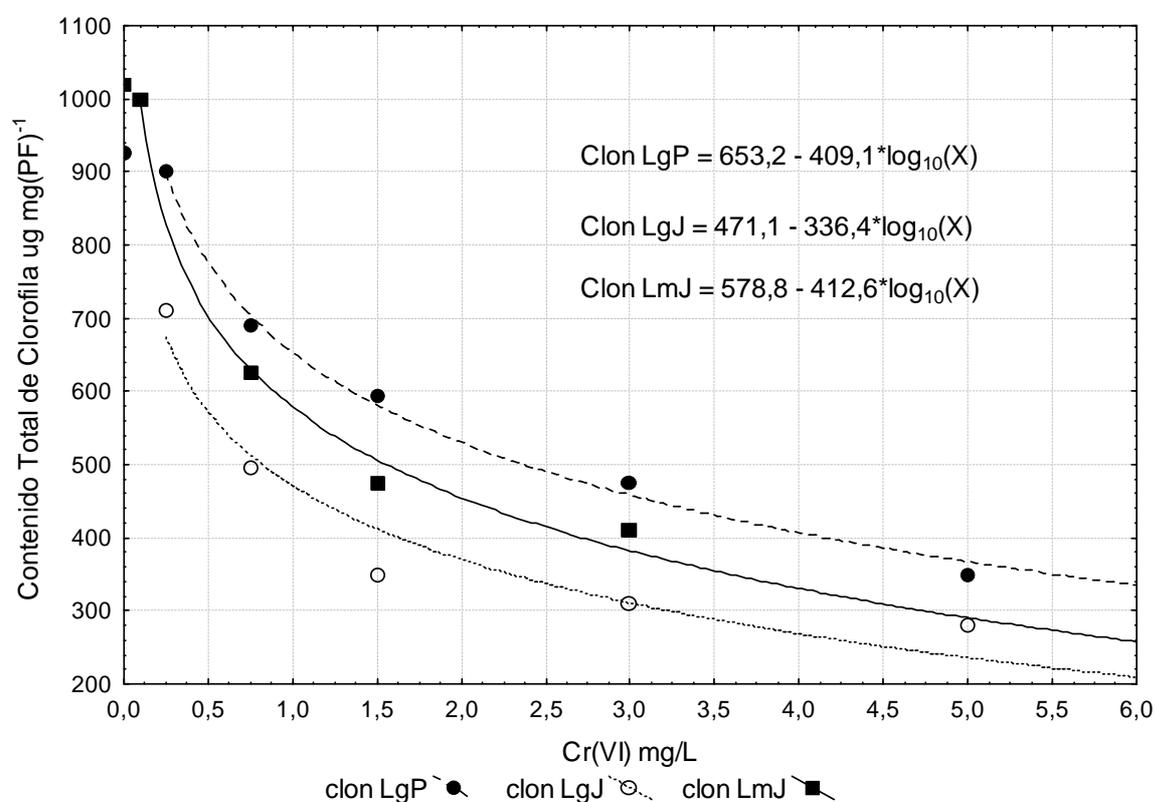


Figura IV.3.11: Toxicidad subcrónica del Cr(VI) en Lemnáceas. Efecto en el contenido total de clorofila. Los valores corresponden al promedio de las repeticiones de ambos ensayos.

Igual a lo registrado para el cobre, al comparar la respuesta de los tres clones de Lemnáceas expuestos al cromo, el clon LgJ es el más sensible al evaluar los efectos en CTC y AF, no sólo al considerar la CI_{50} sino también en la respuesta observada en exposiciones a bajas concentraciones del metal. Al evaluar la toxicidad en la TM, la mayor sensibilidad se observa en el clon LmJ.

IV.3.3.2.4. Efecto del Cr(VI) en la relación clorofila a/clorofila b (Cla/Clb)

En la Figura IV.3.12 se indica como se modifica la relación Cla/Clb de manera comparativa con la variación en el CTC en los tres clones de Lemnáceas expuestos al cromo.

De manera general, en los tres clones, la relación Cla/Clb no permanece constante sino que disminuye significativamente con el aumento de la concentración (Tabla IV.3.5, Figura IV.3.12). Sin embargo, al comparar esta respuesta con la observada en el CTC, vemos que la relación Cla/Clb no disminuye de manera significativa a las concentraciones de exposición al Cr(VI) más bajas, donde sí hay inhibición en el CTC. Por otra parte, la disminución del CTC siempre es mayor a lo observado para la relación Cla/Clb (Figura IV.3.12: a', b' y c'). Se observa que la inhibición en ambos puntos finales ha sido mayor en *L. gibba* respecto de *L. minor*. Al comparar el comportamiento de los clones de *L. gibba*, vemos que si bien la exposición a 0,25 mg/L Cr(VI) produjo inhibición significativa del CTC en el clon LgJ, no se observó el mismo efecto en el clon LgP, siendo menor la sensibilidad de éste en exposiciones a bajas concentraciones del metal (Figura IV.3.12: a', b'). Para el caso de la respuesta del clon LgP, al aumentar la concentración del metal, el efecto en la relación Cla/Clb sigue un comportamiento similar a la inhibición observada en el CTC (Figura IV.3.12: a, a') mientras que en el clon LgJ, se ve que a bajas concentraciones de exposición (0,25 y 0,75 mg/L Cr(VI)), los efectos, en relación a la inhibición en la relación Cla/Clb, son más marcados en el CTC (Figura IV.3.12: b, b'). En la especie *L. minor* (clon LmJ) no se verifica clorosis luego de la exposición a 0,1 mg/L Cr(VI), mientras que a 0,25 mg/L Cr(VI) se registra un aumento, aunque no significativo, en el CTC (Figura IV.3.8: a, d, g; Figura IV.3.12: c'). En este clon la diferencia en la sensibilidad de ambos puntos finales es mayor, siendo los porcentajes de efecto en la relación Cla/Clb muy bajos en comparación a los registrados en el CTC (Figura IV.3.12: c, c').

Frente a la exposición subcrónica de Lemnáceas al Cr(VI), la reducción en el CTC constituye un punto final de mayor sensibilidad si se la compara con la variación en la relación Cla/Clb.

Si analizamos el comportamiento del contenido de clorofila a (Cla) y clorofila b (Clb) en la reducción en el CTC y de la relación Cla/Clb, vemos que en el clon LgP el aumento en la clorosis es debida en mayor medida a la reducción en el contenido de Cla (Figura IV.3.13: a, a'). Si bien se observa una inhibición del 25% en el contenido de Clb a 5 mgCr(VI)/L, esta

reducción no es estadísticamente significativa. Para el caso del clon LgJ, también la reducción en el CTC y en la relación Cla/Clb se debe principalmente a una mayor incidencia del cromo en

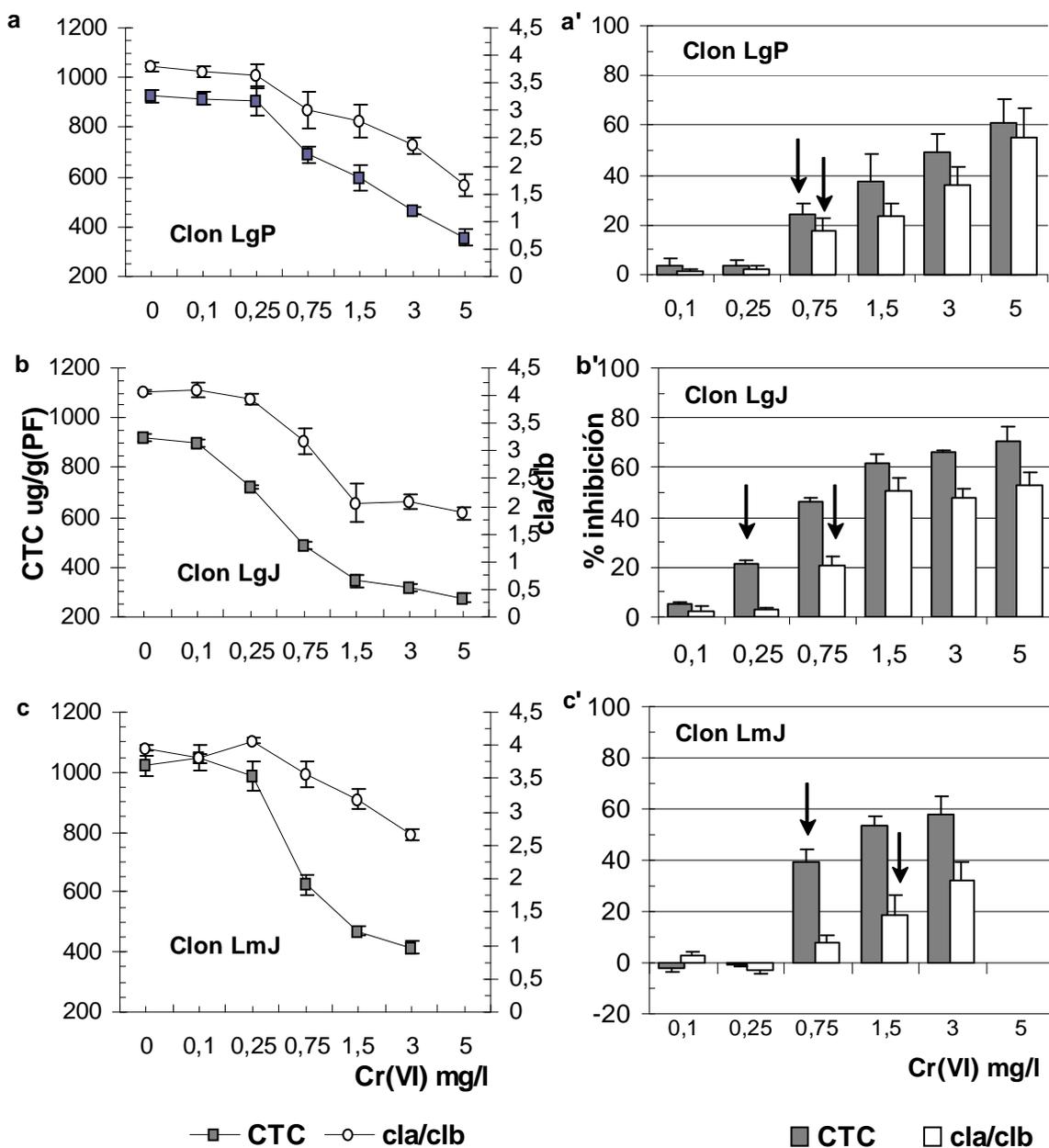


Figura IV.3.12: Toxicidad subcrónica del Cr(VI) en Lemnáceas. Efecto en el contenido total de clorofila (CTC) y en la relación clorofila a/clorofila b (Cla/Clb).

a, b y c. CTC en µg/g(Peso Fresco) y relación Cla/Clb de los clones de Lemnáceas LgP, LgJ y LmJ, respectivamente) expuestos al Cr(VI). Los valores corresponden al promedio de las repeticiones de ambos ensayos (Media ± error estándar, n=7).

a', b' y c'. Porcentaje de inhibición en el CTC y Cla/Clb en los clones de Lemnáceas LgP, LgJ y LmJ, respectivamente. Los valores corresponden al promedio de la inhibición en ambos ensayos ± error estándar (n=2). Las flechas indican la menor concentración de metal ensayada a la que se observa efecto significativo (LOEC; $p \leq 0,01$).

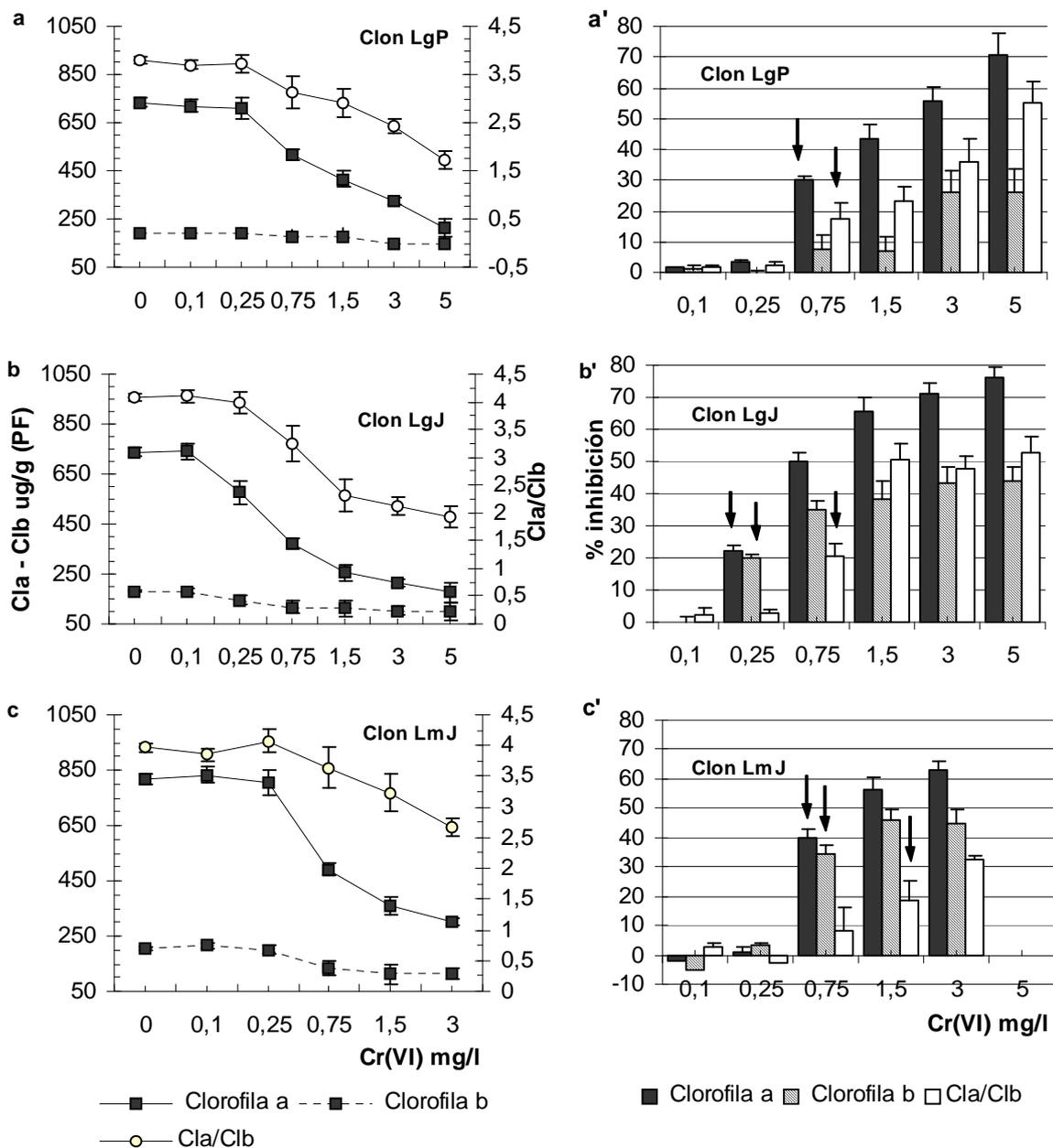


Figura IV.3.13: Toxicidad subcrónica del Cr(VI) en Lemnáceas. Efecto en el contenido de clorofila a (Cla), clorofila b (Clb) y en la relación clorofila a/clorofila b (Cia/Clb).

a, b y c. Contenido de clorofila a (Cla) y clorofila b (Clb) en µg/g(Peso Fresco) y relación Cia/Clb en los clones de Lemnáceas LgP, LgJ y LmJ, respectivamente, expuestos a diferentes concentraciones de Cr(VI). Los valores corresponden al promedio de las repeticiones de ambos ensayos (Media ± error estándar, n=7).

a', b' y c'. Porcentaje de inhibición en el contenido de clorofila a (Cla) y clorofila b (Clb) y en la relaciónCia/Clb en los clones de Lemnáceas LgP, LgJ y LmJ, respectivamente. Los valores corresponden al promedio de la inhibición en ambos ensayos (Media ± error estándar, n=2). Las flechas indican la menor concentración de metal ensayada a la que se observa efecto significativo (LOEC; $p \leq 0,01$).

el contenido de Cla. No obstante esto, en este clon el efecto en la Clb se manifiesta con una reducción significativa a partir de exposiciones a 0,25 mgCr(VI)/L, siendo además los niveles de inhibición en la Cla y Clb similar a este valor de cromo pero aumentando el efecto sobre la Cla con el incremento de la concentración del metal (Figura IV.3.13: b, b'). En el clon de *L. minor* (Figura IV.3.13: c, c'), si bien la mayor inhibición se manifiesta en la Cla, el efecto en la Clb fue alto por lo que se verifican bajos valores de inhibición en la relación Cla/Clb (30% a 3 mgCr(VI)/L). La reducción en la relación Cla/Clb registrada en los tres clones de Lemnáceas expuestas al cromo se debe a la mayor inhibición en la Cla respecto de la Clb.

IV.3.3.2.5. Sensibilidad de la respuesta de los clones de Lemnáceas a la exposición subcrónica al Cr(VI): comparación del efecto en el área foliar (AF), en la tasa de multiplicación (TM) y en el contenido total de clorofila (CTC) .

Cuando analizamos para cada uno de los clones la respuesta en todos los puntos finales (TM, AF, CTC y relación Cla/Clb) considerándolos de manera conjunta, se observa que, si bien en todos ellos se manifiestan efectos fitotóxicos por la exposición al cromo, la sensibilidad de cada uno fue diferente. Dado que la respuesta en la relación Cla/Clb es baja, este punto final no se considerará en la siguiente discusión.

En la Figura IV.3.14 se indica de manera comparada, para los tres clones de Lemnáceas, la respuesta inhibitoria en los puntos finales AF, TM y CTC. La figura muestra los porcentajes de inhibición alcanzados luego de la exposición durante 14 días a las diferentes concentraciones de cromo (Figura IV.3.14: a,b,c).

De manera general se observa que en los tres clones, el efecto del cromo en la reducción de la TM, fue significativo aún en exposiciones a 0,1 mg/L Cr(VI), en el clon LmJ (Figura IV.3.14 c), y a 0,25 mg/L Cr(VI), en los clones LgP y LgJ (Figura IV.3.14: a, b), siendo éste un punto final de mayor sensibilidad respecto del AF y CTC, para detectar toxicidad a bajas concentraciones de metal (Tabla IV.3.7). Por otra parte, al evaluar la toxicidad del cromo a altas concentraciones, el parámetro mas afectado en los tres clones es el CTC, registrándose en este punto final la máxima inhibición y, consecuentemente los valores de CI_{50} menores (Figura IV.3.14; Tabla IV.3.8).

En el caso del clon LgP, vemos que el cromo inhibe más la TM con respecto al AF, aumentando esta diferencia en la respuesta con el incremento de la concentración del metal. En comparación con los efectos en el CTC, la sensibilidad en la TM fue mayor a bajas concentraciones (0,25 y 0,75 mg Cr(VI)/L), mientras que a valores mayores la respuesta se iguala, siendo la inhibición en el CTC levemente mayor cuando la exposición al metal es a 5 mgCr(VI)/L (Figura IV.3.14 a).

El comportamiento del clon LgP frente al cromo, descrito en el párrafo anterior, se corresponde con los valores de CI_{50} obtenidos para cada punto final, observándose que la concentración de metal que produce el 50% de inhibición en la TM es similar a la necesaria

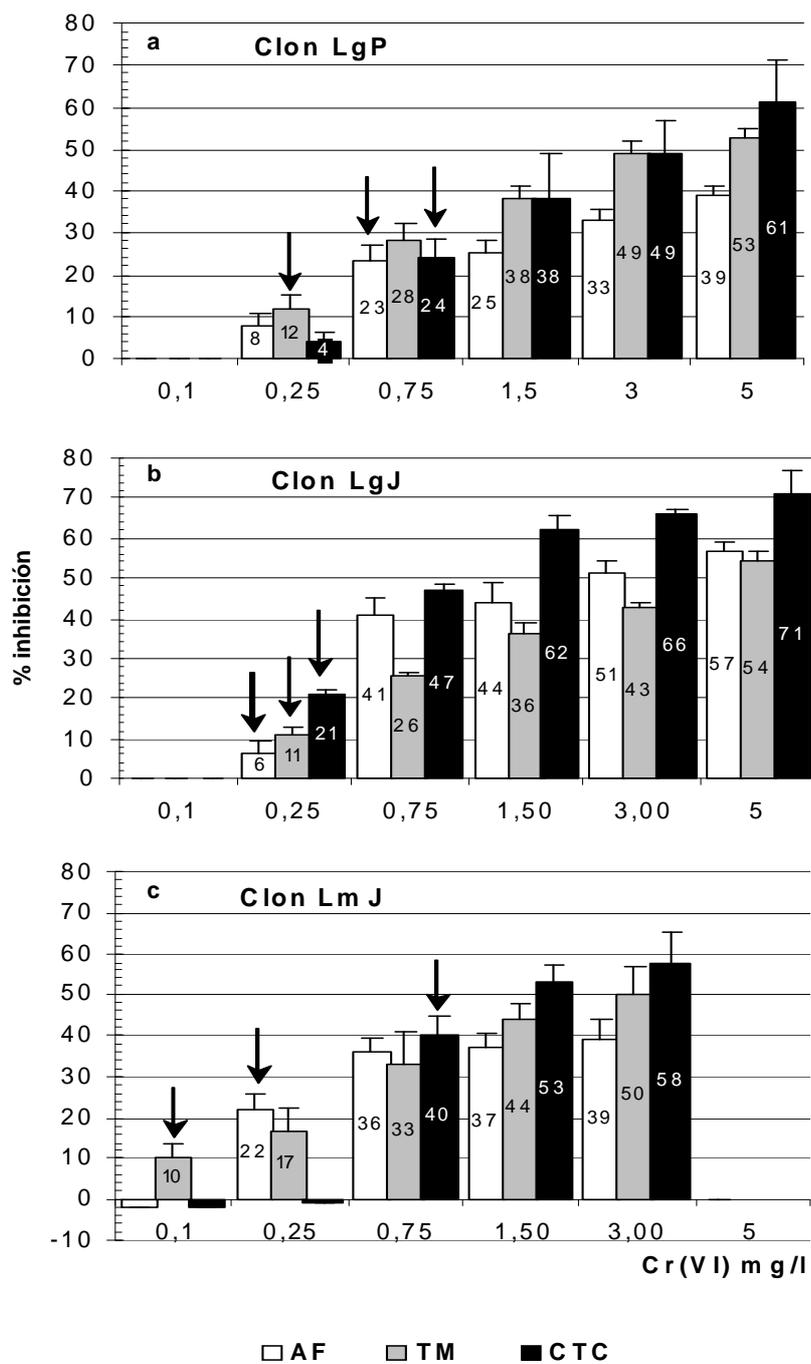


Figura IV.3.14: Toxicidad subcrónica del Cr(VI) en Lemnáceas. Efecto comparativo en el área foliar (AF), en la tasa de multiplicación (TM) y en el contenido total de clorofila (CTC).

a, b y c. Porcentaje de inhibición en el AF, en la TM y en el CTC en los clones de Lemnáceas LgP, LgJ y LmJ, respectivamente. Los valores corresponden al promedio de la inhibición en ambos ensayos \pm error estándar ($n=2$). Las flechas indican la menor concentración de metal a la que se observa efecto significativo (LOEC, $p \leq 0,01$).

para obtener igual inhibición en el CTC. Para el AF, el valor de la CI_{50} es mayor, indicando una menor sensibilidad de este punto final (Tabla IV.3.8). De acuerdo a los valores de CI_{50} obtenidos en el Clon LgP, el orden de sensibilidad de los puntos finales evaluados es el siguiente: $CTC > TM > AF$

Contrariamente a la respuesta observada en el clon LgP, en el clon LgJ el efecto del cromo en la TM es menor en relación a los otros parámetros estudiados, siendo el CTC el punto final de mayor sensibilidad frente a la exposición al cromo, registrándose inhibición altamente significativa aún a las concentraciones menores (0,25 mgCr(VI)/L: 20%). Por otra parte, si bien a 0,25 mg/L Cr(VI) la inhibición en el AF fue significativa pero inferior a la observada en la TM y en el CTC (6, 11 y 21 %, respectivamente) el efecto de la exposición a concentraciones mayores de cromo produjo en este punto final, mayor inhibición con relación a la TM (Figura IV.3.14b). Si se compara la CI_{50} del cromo en los tres puntos finales (Tabla IV.3.8), el orden de sensibilidad de los mismos en el clon LgJ es el siguiente: $CTC > AF > TM$

Al evaluar el efecto del cromo en el clon LmJ, vemos en la Figura IV.3.14c que la sensibilidad en la respuesta de cada uno de los puntos finales, en relación con los demás parámetros, es muy dependiente de la concentración de metal a la que las plantas han sido expuestas. Como se mencionó anteriormente, la TM se inhibe significativamente a 0,1 mgCr(VI)/L (10%) mientras que los valores de CTC y el AF no se ven afectados por esta concentración de metal. No obstante, al aumentar la concentración de metal, la mayor inhibición se registra en el CTC mientras que los efectos en el AF no son muy marcados, aún en las plantas expuestas a 3 mgCr(VI)/L (40%).

Si comparamos los valores correspondientes a la CI_{50} del cromo en los tres puntos finales (Tabla IV.3.8), el orden de sensibilidad para los mismos, en el clon LmJ, es el siguiente: $CTC > TM > AF$

Es de destacar que, si bien en los tres clones estudiados la sensibilidad es diferente según el punto final considerado, es en el clon LgJ donde las diferencias son más conspicuas siendo mayor el intervalo de concentraciones para el 50% de respuesta. Por ejemplo, la CI_{50} del punto final más sensible (CTC) y del menos sensible (TM) es 0,9 y 4,17 mgCr(VI)/L, respectivamente (Tabla IV.3.8).

Si bien al comparar los valores de CI_{50} en los tres clones de Lemnáceas el CTC es el punto final de mayor sensibilidad al cromo, a bajas concentraciones de exposición, la TM es el punto final mas apropiado para detectar fitotoxicidad.

En las plantas del clon LmJ expuestas a 0,1 mg/LCr(VI) se observó una leve exaltación, aunque no estadísticamente significativa ($p \leq 0,05$), tanto en el contenido de clorofila como en el área foliar. Estos resultados estarían avalando lo citado por otros autores (Bollard, 1983; Barceló & Poschenrieder, 1997; Vajpayee et al., 2000) quienes describen la estimulación de diferentes parámetros en exposiciones al cromo entre 0,05 y 0,1 mg/L. En coincidencia con el

aumento en el AF, se cita el efecto beneficioso en este mismo parámetro en exposiciones a 0,052 mg/LCr(VI). En relación al efecto en el contenido de clorofila, se describen el retraso en los procesos de senescencia foliar y la mejora en la ultraestructura de los cloroplastos (Barceló & Poschenrieder, 1997; Chatterjee & Chatterjee, 2000; Singh & Sinha, 2005). Sin embargo, al no existir estudios con períodos de exposición más prolongados, estas conclusiones deben limitarse al caso particular de las condiciones subcrónicas ensayadas. Por otra parte, al evaluar en el clon LmJ el efecto en la TM, se observó reducción significativa de este parámetro a 0,1 mg/L Cr(VI), lo que nos advierte, de igual manera a lo mencionado para el cobre, acerca de la interpretación y significado de la exaltación de algún punto final luego de la exposición a un contaminante.

Con relación a los efectos del Cr(VI) en el contenido total de clorofila, otros autores también observaron inhibición en este parámetro (Jana, 1987; Gupta et al., 1994; Vajpayee et al., 2000; Samantary, 2002). Estudios realizados por Vajpayee et al. (2000) indican, para *Nymphaea alba*, reducción en el CTC por inhibición en la biosíntesis de clorofila, observando que los efectos son mayores en la Cla respecto de la Clb. La exposición de *Nymphaea alba* a valores entre 0,5 y 10 mgCr(VI)/L produce reducción significativa en la actividad de una de las enzimas precursora de la síntesis de clorofila, la ácido δ -aminolevulinico deshidratasa y la consecuente inhibición en el CTC a esas concentraciones de exposición (Vajpayee et al., 2000). Por otro lado, Samantary (2002), contrariamente a lo observado en este trabajo, informa que la reducción en la Cla y en la Clb es muy similar, siendo incluso mayor el efecto en la Clb.

De igual manera a lo mencionado para el cobre, si comparamos la sensibilidad de los clones estudiados con la respuesta de otras Lemnáceas al cromo, se observa que existen referencias de especies más y menos sensibles en comparación a lo observado para *L. gibba* y *L. minor* en este trabajo. Para el caso de *Spirodela polyrrhiza* y *Lemna aequinoctialis*, Landolt & Kandeler (1987) citan inhibición del crecimiento a partir de exposiciones a 1 mgCr(VI)/L, mientras que para *L. minor* la sensibilidad es muy alta, reduciéndose el crecimiento a 0,001 mgCr(VI)/L y observándose a niveles de 0,052 mgCr(VI)/L, inhibición en el área foliar, contenido de clorofila a y b y alteraciones en los cloroplastos. Por otro lado, Wahaab et al. (1995) evaluaron la eficiencia de *L. minor*, expuestas a 0,25 y 1 mgCr(III)/L, en la remoción de este metal (75% y 100% de remoción, respectivamente), sin evidenciar efectos fitotóxicos, luego de 10 días de exposición a esas concentraciones. Boniardi et al. (1999) observaron valores de inhibición en la producción de biomasa de *L. gibba* del 43 y 65% luego de la exposición a 0,5 y 1 mgCr(II)/L, respectivamente. Mohan & Hosetti (1999) informan para *L. minor* valores de CI_{50} en el número de frondes producidas, entre 6 y 35 mgCr(VI)/L, para 7 y 14 días de exposición, respectivamente, siendo estos valores muy altos en relación a lo observado en este trabajo para los tres clones de *Lemna*.

Con relación a la toxicidad del cromo para otras especies acuáticas, Jana (1987) evaluó el efecto de 1 mgCr(VI)/L en las plantas vasculares *Hydrilla verticillata* y *Eichornia crassipes*,

además del alga *Oedogonium aerolatum*. La exposición a esta concentración de cromo, durante 28 días, no produjo efecto en ninguna de las tres especies al evaluar el contenido de clorofila, aminoácidos totales, proteínas totales, contenido de P, ADN y ARN, así como el efecto en la actividad de varias enzimas. Sin embargo, sí se observó acumulación de cromo en las tres especies, siendo en las raíces de *E. crassipes*, seguida por *H. verticillata*, donde se registra la máxima acumulación, sin generar efectos fitotóxicos (Jana, 1987). Para el caso de las especies palustres *Scirpus lacustris* y *Bacopa monnieri*, Gupta et al. (1994) evaluaron los efectos del 0,1 a 5 mgCr(VI)/L en el contenido de clorofila en las hojas y en la peroxidación lipídica en raíces, luego de 7 días de exposición. Estos autores observaron reducción significativa en ambos puntos finales y ambas especies, sólo a 5 mgCr(II)/L.

Para la especie terrestre *Vigna radiata*, Samantary (2002) compara la sensibilidad de cultivares resistentes y sensibles al cromo, informando, para los sensibles, inhibición significativa en el contenido de Cla, Clb y proteínas y en el crecimiento de raíces y tallo, luego de la exposición durante 96 hs a valores de cromo entre 1,4 y 10 mgCr(VI)/L. A este intervalo de concentraciones, los cultivares resistentes no sólo no se inhibieron en ninguno de estos parámetros sino que evidencian exaltación en el contenido de Cla, Clb y proteínas, indicando que la sensibilidad al cromo dentro de la especie puede variar en más de un orden de magnitud entre los cultivares sensibles y los resistentes (Samantary, 2002).

Como se puede observar, en comparación con la sensibilidad de otras plantas vasculares acuáticas, palustres o terrestres anteriormente mencionadas, se evidencia que los tres clones utilizados presentan buena sensibilidad al cromo, siendo los valores de CI o LOEC del mismo orden de magnitud, o incluso menores, a lo informado en la bibliografía para diferentes especies y puntos finales.

IV.3.3.3. TOXICIDAD SUBCRONICA DEL CADMIO (II)

En la Figura IV.3.15 se observan los efectos fitotóxicos en plantas de los tres clones de Lemnáceas expuestas durante 14 días al Cd(II), en comparación con el tratamiento control (Clon LgP: Figura IV.3.15: a, b, c; clon LgJ: Figura IV.3.15: d, e, f; Clon LmJ: Figura IV.3.15: g, h, i). Se indican solamente los efectos de la exposición a tres concentraciones de metal correspondientes a la curva concentración-respuesta: 0,075 (Figura IV.3.15: a, d, g), 0,125 (Figura IV.3.15: b, e, h) y 0,200 mgCd(II) /L (Figura IV.3.15:c, f, i). De la misma manera a lo mencionado para el cobre y el cromo, es evidente el efecto del cadmio en la reducción en el área foliar y en el contenido de clorofila. En las plantas expuestas a 0,125 y 0,200 mg/L, se observa marcada clorosis, siendo los clones LgP y LgJ los más afectados (Figura IV.3.15: b, c, e, f, i). Se evidencia, en los tres clones, que la clorosis es más marcada en las frondes de mayor tiempo de crecimiento (frondes con yemas y con mayor área foliar), observándose en las yemas y frondes jóvenes un mayor contenido de clorofila. Además, se ve que el aumento de la

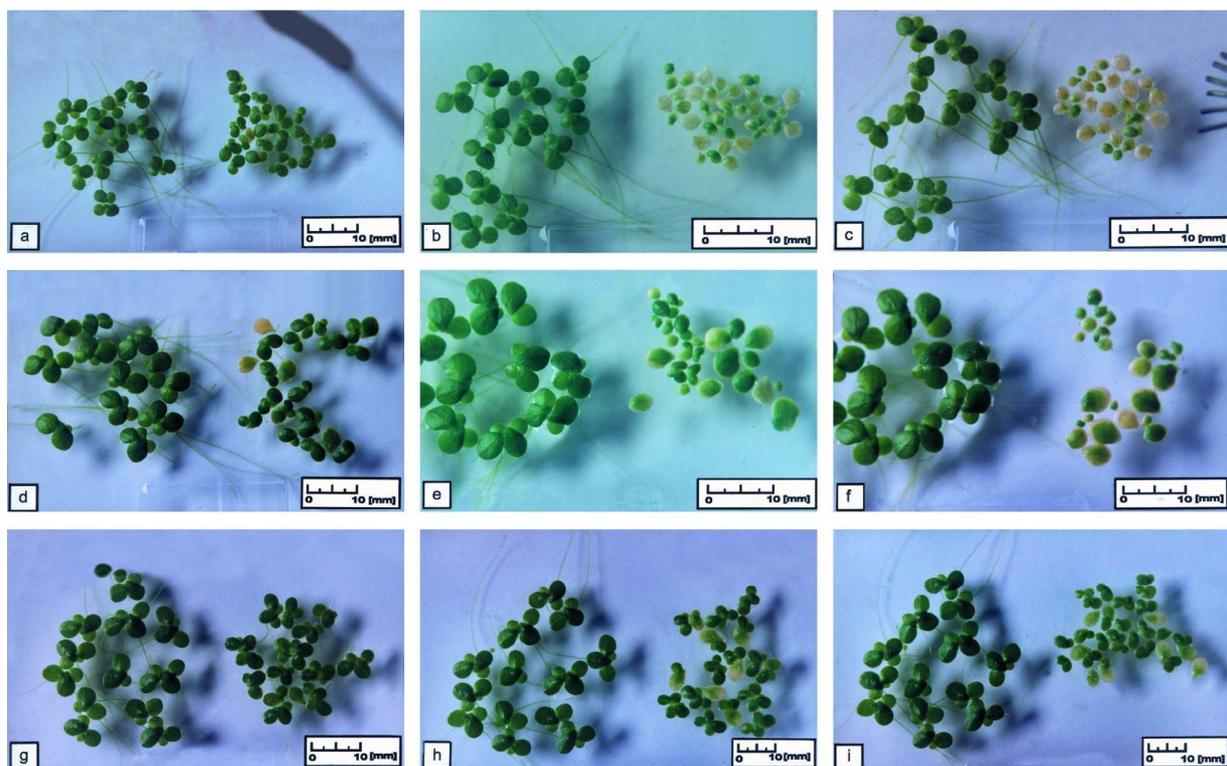


Figura IV.3.15: Toxicidad del Cd(II) en Lemnáceas: efectos en el desarrollo del área foliar y en el contenido total de clorofila luego de 14 días de exposición.
a, b, c: *L. gibba* (clon LgP), plantas expuestas a 0,075, 0,125 y 0,2 mgCd(II)/L, respectivamente; d, e, f: *L. gibba* (clon LgJ), plantas expuestas a 0,075, 0,125 y 0,2 mgCd(II)/L, respectivamente; g, h, i: *L. minor* (clon LmJ), plantas expuestas a 0,075, 0,125 y 0,2 mgCd(II)/L, respectivamente. En cada fotografía, el grupo de plantas ubicado a la izquierda corresponde al control y a la derecha al expuesto.

clorosis se verifica a partir del perímetro, extendiéndose desde el extremo distal de la fronde hacia la zona proximal en donde se hallan los bolsillos laterales. Así como se verificó con el cobre, y en menor medida con el cromo, es notable, particularmente en el clon LmJ (Figura IV.3.15: h, i), que si bien se observan frondes con una elevada clorosis, éstas son capaces de desarrollar yema hijas verdes.

Con relación a la reducción en el área foliar, este efecto se manifiesta en las frondes de los tres clones, aún a la concentración de 0,075 mg/L. En la Figura IV.3.15 puede verse además, al igual que lo observado para el cobre y el cromo, una severa inhibición en el crecimiento de las raíces en las plantas expuestas a 0,075 mgCd(II)/L, incrementándose este efecto a 0,125 y 0,200 mgCd(II)/L. Otro efecto detectado, es la tendencia de las frondes jóvenes y yemas a separarse de las frondes progenitoras (abscisión temprana), reduciéndose el número de frondes-yemas por colonia con el aumento de la concentración de exposición al metal (Figura IV.3.15: b,c, e, f, i).

En la Tabla IV.3.9 se indica el ANOVA de los resultados obtenidos luego de la exposición de los tres clones de Lemnáceas al cadmio. Analizando las variables respuesta TM y AF para este metal, se observa que no existen diferencias significativas entre los dos ensayos mientras que sí las hay al considerar la respuesta en el CTC y Cla/Clb. Dado que se realiza el análisis de la varianza considerando un grupo de dos experimentos, las conclusiones para cada factor (punto final) continúan siendo válidas aunque se evidencien diferencias en la respuesta entre los ensayos.

Al analizar el efecto del cadmio en los cuatro puntos finales considerados, los resultados del ANOVA muestran que éste fue significativo en cada uno de ellos (Tabla IV.3.9). Si bien no se evidencia diferencias significativas entre la respuesta de los tres clones al evaluar la relación Cla/Clb, si difiere significativamente el comportamiento de los mismos al evaluar la TM, el AF y el

Tabla IV.3.9: Toxicidad subcrónica del Cd(II) en Lemnáceas. ANOVA de un grupo de dos experimentos. Análisis de la respuesta en la TM, AF, CTC y relación Cla/Clb.

Tasa de Multiplicación			
Fuente	GL	F	p
Ensayo	1	3,8	0,055
Clon	2	9,7	0,009
Cadmio	5	30,8	0,001
Clon*cadmio	10	5,8	0,005
Error	108		

Area Foliar			
Fuente	GL	F	p
Ensayo	1	2,1	0,147
Clon	2	196,4	0,005
Cadmio	5	193,6	0,000
Clon*cadmio	10	16,3	0,000
Error	670		

Clorofila Total			
Fuente	GL	F	p
Ensayo	1	7,7	0,007
Clon	2	26,4	0,037
Cadmio	5	15,3	0,005
Clon*cadmio	10	4,8	0,011
Error	94		

Relación Cla/Clb			
Fuente	GL	F	p
Ensayo	1	86,9	0,000
Clon	2	1,0	0,499
Cadmio	5	7,3	0,024
Clon*cadmio	10	4,6	0,019
Error	78		

GL: grados de libertad; F: razón de los cuadrados medios; p: probabilidad.

CTC. Sí hay interacción significativa entre los factores clon*cadmio en los 4 puntos finales evaluados (Tabla IV.3.9).

En la Tabla IV.3.10 se indican los resultados del análisis de regresión y comparación de pendientes de las curvas dosis-respuesta para los puntos finales AF, TM y CTC, de los tres clones de Lemnáceas luego de 14 días de exposición al Cd(II). De igual manera a lo evidenciado a través del ANOVA, se observa que existen diferencias significativas en las pendientes de las curvas dosis-respuesta de los tres clones en los puntos finales considerados.

En la Tabla IV.3.11 se indican para los tres clones los valores del NOEC, LOEC y TOEC y en la Tabla IV.3.12 los valores de las Cl_{25} y Cl_{50} para los puntos finales AF, TM, CTC y Cla/Clb correspondientes a los tres clones de Lemnáceas expuestos al cadmio.

Tabla IV.3.10: Toxicidad subcrónica del Cd(II) en Lemnáceas. Análisis de regresión de las curvas de toxicidad para la respuesta en la tasa de multiplicación (TM), área foliar (AF) y contenido total de clorofila (CTC).

	TM ¹			AF ²			CTC ³		
	a	b*	R ²	a	b*	R ²	a	b*	R ²
Clon LgP	3,211	1,971 a	0,923	0,602	-1,203 a	0,924	0,988	-2,663 a	0,931
Clon LgJ	3,211	1,875 a	0,874	0,111	-2,280 b	0,945	0,950	-1,985 b	0,893
ClonLmJ	1,851	0,722 b	0,839	1,023	-1,313 a	0,906	1,009	-1,547b	0,867

Todas las regresiones fueron estadísticamente significativas ($p \leq 0,01$). a: ordenada al origen; b: coeficiente de regresión (pendiente); R² : coeficiente de determinación.* Pendientes estadísticamente diferentes ($p \leq 0,01$): los valores seguidos por igual letra no difieren entre sí.

1: variable dependiente con transformación inversa ($1/y*100$) y variable independiente con transformación logarítmica ($\log(x + 0,35)$). 2: variables dependiente e independiente con transformación logarítmica ($\log y$ y $\log(x + 0,35)$, respectivamente). 3: variable independiente con transformación logarítmica ($\log(x + 0,35)$).

Tabla IV.3.11: Toxicidad subcrónica del cadmio en Lemnáceas: NOEC, LOEC, TOEC para los diferentes puntos finales.

Punto Final	<i>L.gibba</i> (clon LgP)			<i>L.gibba</i> (clon LgJ)			<i>L.minor</i> (clon LmJ)		
	NOEC	LOEC	TOEC	NOEC	LOEC	TOEC	NOEC	LOEC	TOEC
TM	0,010	0,025	0,016	0,010	0,025	0,016	0,010	0,025	0,016
AF	0,025	0,075	0,043	0,010	0,025	0,016	0,010	0,025	0,016
CTC	0,025	0,075	0,043	0,075	0,125	0,097	0,075	0,125	0,097
Cla/Clb	0,125	0,200	0,158	0,125	0,200	0,158	0,200	0,350	0,265

Los valores corresponden a mgCd(II)/L

Tabla IV.3.12: Toxicidad subcrónica del cadmio en Lemnáceas: CI_{25} y CI_{50} , en mg/L, para los diferentes puntos finales.

Punto	<i>L.gibba</i> (clon LgP)		<i>L.gibba</i> (clon LgJ)		<i>L.minor</i> (clon LmJ)	
	CI_{25}	CI_{50}	CI_{25}	CI_{50}	CI_{25}	CI_{50}
Final						
TM	0,07 (0,05-0,08)	0,19 (0,16-0,25)	0,09 (0,06-0,11)	0,27 (0,23-0,31)	0,16 (0,10-0,21)	> 0, 35*
AF	0,11 (0,08-0,13)	0,19 (0,17-0,20)	0,04 (0,03-0,06)	0,13 (0,09-0,16)	0,04 (0,03-0,07)	0,15 (0,10-0,21)
CTC	0,09 (0,08-0,10)	0,13 (0,11-0,15)	0,16 (0,13-0,19)	0,26 (0,23-0,29)	0,15 (0,12-0,17)	0,32 (0,28-0,35)
Cla/CIb	0,13 (0,11-0,15)	0,21 (0,18-0,24)	0,24 (0,18-0,32)	> 0, 35*	> 0,35*	> 0, 35*

Los valores indicados entre paréntesis corresponden al intervalo de confianza (95%).

* No es posible la estimación de la CI_{25} o CI_{50} debido a que la inhibición en este punto final fue inferior al 25% o 50%, respectivamente, para la máxima concentración de tóxico ensayada.

IV.3.3.3.1 Efecto del Cd(II) en la Tasa de Multiplicación (TM)

Al evaluar la respuesta tóxica en la TM frente a la exposición subcrónica al cadmio, los tres clones responden de modo diferente, existiendo interacción entre el efecto del metal y el comportamiento de los clones (Tabla IV.3.9). La Figura IV.3.16 muestra la curva dosis-respuesta para el Cd(II), manifestándose el efecto fitotóxico con un marcado decaimiento en la TM, principalmente a bajas concentraciones de exposición al metal. En esta figura se observa además, que la respuesta no es similar en los tres clones, lo cual lo indica además el análisis de regresión y la comparación de pendientes de las curvas de toxicidad correspondiente a cada uno de ellos. Se observa en la Tabla IV.3.10 que las pendientes de las curvas difieren significativamente, siendo el comportamiento del clon LmJ diferente de los dos clones de *L. gibba* en que las curvas de toxicidad para la TM son similares.

En los tres clones los efectos en la TM no son significativos a la menor concentración ensayada (0,010 mgCd(II)/L) mientras que se observa inhibición significativa a partir de la exposición a 0,025 mgCd(II)/L (Tabla IV.3.11). Esto, indica que la respuesta de los tres clones para detectar niveles bajos de cadmio es similar y las diferencias en la sensibilidad de los mismos se observan a niveles mayores de inhibición. Los valores de CI_{25} y CI_{50} indican que el clon LgP es el más sensible de los tres, mientras que el clon LmJ es el de menor sensibilidad, con valores de CI_{25} y CI_{50} que duplican lo observado para LgP y LgJ (Tabla IV.3.12). El orden de sensibilidad de los clones, al evaluar los valores correspondientes a la CI_{50} para la TM es de: *clon LgP > clon LgJ > clon LmJ*

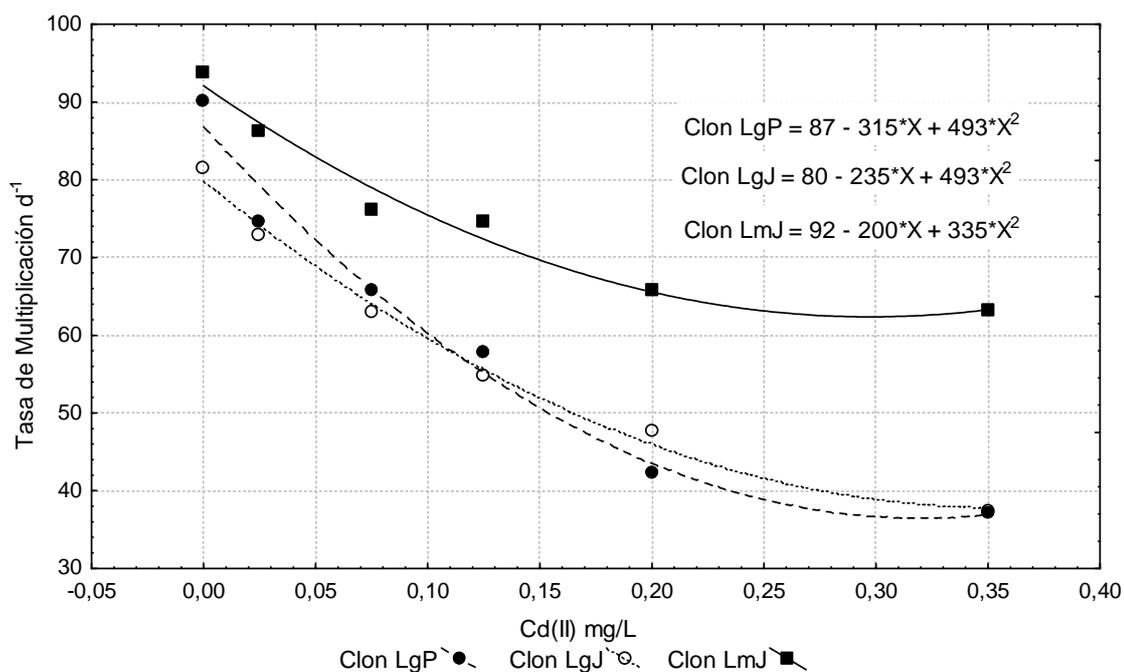


Figura IV.3.16: Toxicidad subcrónica del Cd(II) en Lemnáceas. Efecto en la tasa de multiplicación. Los valores corresponden al promedio de los valores de las repeticiones de ambos ensayos.

IV.3.3.3.2 Efecto del Cd(II) en el Area Foliar (AF)

En la Figura IV.3.17 se muestran las curvas dosis-respuesta de los tres clones de Lemnáceas, considerando el efecto en el área foliar como punto final para la evaluación de la fitotoxicidad del cadmio. De manera general, se observa que el mayor decaimiento se produjo a bajas concentraciones (entre 0,025 y 0,200 mgCd(II)/L), mientras que a las concentraciones mayores los efectos se acentúan pero con variaciones menores. Al evaluar comparativamente la respuesta de los clones, se comprobó que la inhibición en el área foliar no se manifestó de la misma manera en los tres, encontrándose interacción significativa entre éstos y el efecto de los diferentes tratamientos con cadmio (Tabla IV.3.9). Al realizar el análisis de regresión y la comparación de las pendientes de las curvas de toxicidad correspondiente a cada uno de los clones, se verificó que las mismas difieren significativamente (Tabla IV.3.10). Frente al incremento en la concentración del cadmio, se observa que el comportamiento del clon LgJ es diferente al de los clones LgP y LmJ, siendo similar la respuesta tóxica en estos dos clones (Tabla IV.3.10, Figura IV.3.17). Si comparamos la respuesta a los valores de exposición más bajos, en los clones LgJ y LmJ, el AF se inhibe significativamente a 0,010 mgCd(II)/L, mientras que el clon LgP se ve afectado en este punto final a partir de 0,025 mgCd(II)/L (Tabla IV.3.11). Los valores de CI_{25} y CI_{50} también evidencian la mayor sensibilidad de los clones LgJ y LmJ en el AF respecto del clon local, siendo menor esta diferencia a valores mayores de inhibición

(Tabla IV.3.12). El orden de sensibilidad de los clones, al evaluar los valores correspondientes a la CI_{25} y CI_{50} en el AF es: *clon LgJ = clon LmJ > clon LgP*

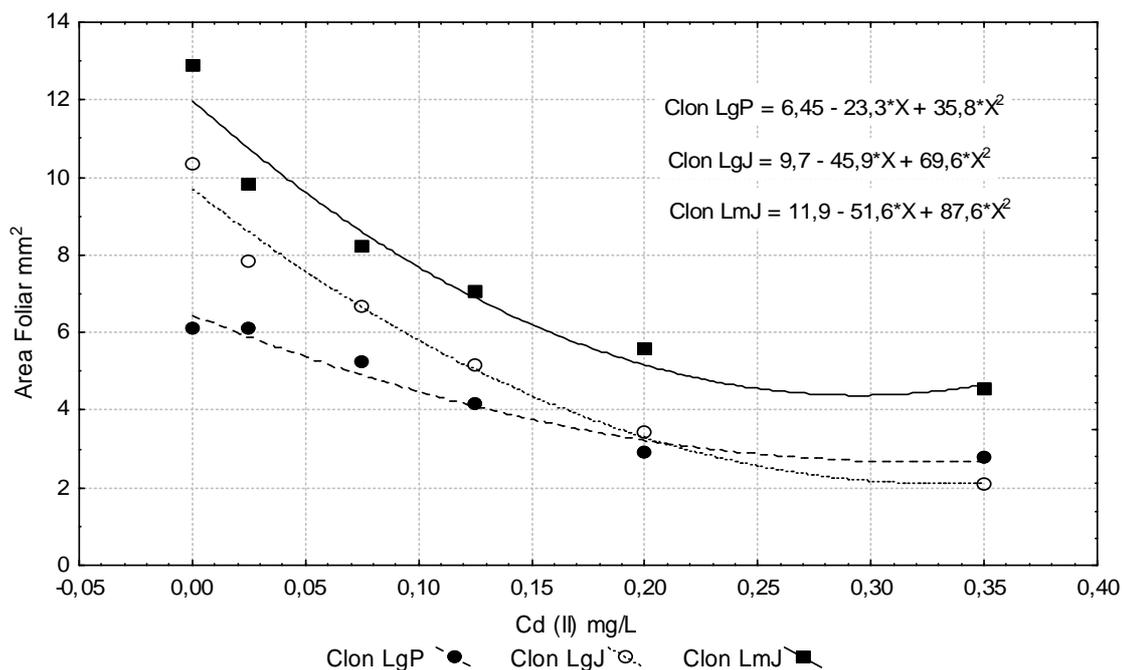


Figura IV.3.17: Toxicidad subcrónica del Cd(II) en Lemnáceas. Efecto en el área foliar. Los valores corresponden al promedio de los valores de las repeticiones de ambos ensayos.

IV.3.3.3.3 Efecto del Cd(II) en el Contenido Total de Clorofila (CTC)

Al evaluar la respuesta en el CTC de los tres clones al cadmio, el ANOVA indica que el comportamiento de los mismos no es similar, existiendo además interacción entre el efecto del metal y la respuesta de los mismos (Tabla IV.3.9). La Figura IV.3.18 muestra la curva de toxicidad del Cd(II), manifestándose efectos fitotóxicos en el clon LgP con una reducción marcada en la CTC, observándose que en los clones LgJ y LmJ, si bien también hay efecto en el CTC, el decaimiento la curva de toxicidad es más gradual. Por otra parte, el análisis de regresión y la comparación de las pendientes de las curvas de toxicidad en el CTC de los clones (Tabla 2), también indican que la respuesta del clon LgP difiere significativamente de la de los clones LgJ y LmJ, los que responden de manera similar.

En los tres clones los efectos en el CTC no son significativos a las concentraciones de exposición menores (0,010 y 0,025 mgCd(II)/L), mientras que se observa inhibición significativa a partir de la exposición a 0,075 mgCd(II)/L, en el clon LgP y a 1,25 mgCd(II)/L, en los clones LgJ y LmJ (Tabla IV.3.11). Esto, indica que la respuesta de los tres clones para detectar niveles bajos de cadmio no es similar y estas diferencias también se observan a niveles mayores de inhibición. Los valores de CI_{25} y CI_{50} indican que el clon LgP es el más sensible de los tres, mientras que el clon LmJ es el de menor sensibilidad, con valores de CI_{50} que triplican lo observado para el clon local (Tabla IV.3.12).

El orden de sensibilidad de los clones al evaluar el CTC, a niveles altos y bajos de exposición, es: *clon LgP* > *clon LgJ* > *clon LmJ*

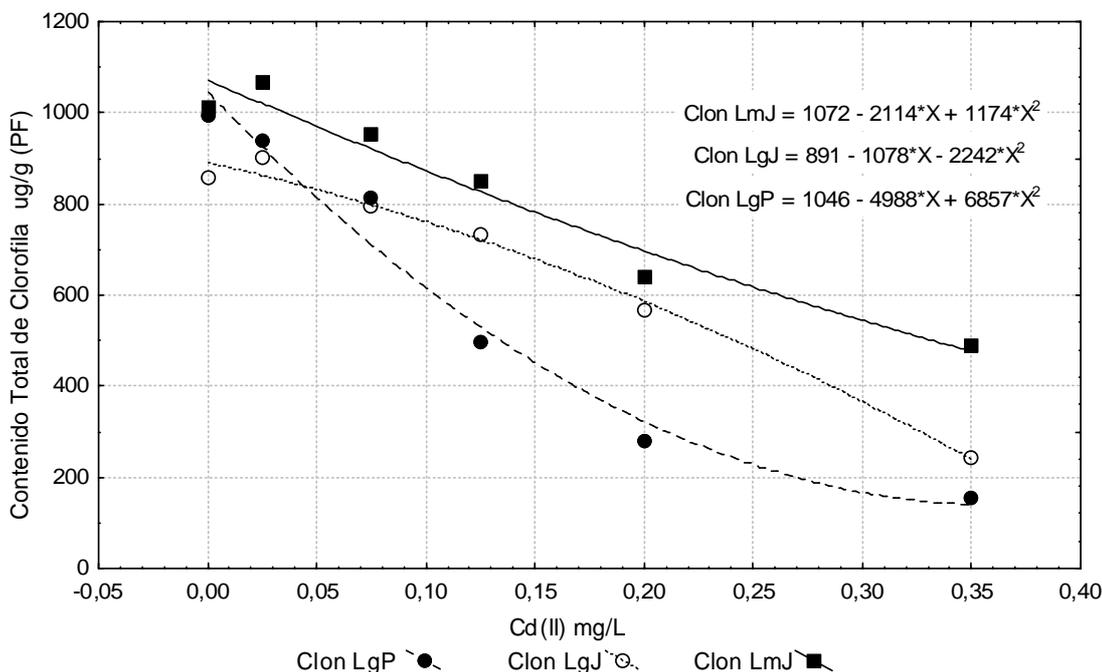


Figura IV.3.18: Toxicidad subcrónica del Cd(II) en Lemnáceas. Efecto en el contenido total de clorofila. Los valores corresponden al promedio de las repeticiones de ambos ensayos.

IV.3.3.3.4 Efecto del Cd(II) en la relación clorofila a/clorofila b (Cla/Clb):

En la Figura IV.3.19 se muestra la variación en la relación Cla/Clb, comparativamente con el efecto en el CTC, en los tres clones de Lemnáceas expuestos durante 14 días al cadmio. De acuerdo a lo que se observa en la Figura IV.3.19, y de igual manera a lo informado para los efectos fitotóxicos del cromo y del cobre, la sensibilidad de la respuesta en el CTC fue mayor en los tres clones, si se la compara con la relación Cla/Clb. De manera general, se observa que en los tres clones expuestos al cadmio, la relación Cla/Clb no se mantuvo constante, sino que se modifica significativamente con el aumento de la concentración (Tabla IV.3.9, Figura IV.3.19). Sin embargo, al comparar esta respuesta con la observada en el CTC, vemos que la relación Cla/Clb no disminuye de manera significativa a las concentraciones de exposición al Cd(II) más bajas, donde se verifica significancia en el efecto en el CTC, sino que por el contrario, aumenta cuando la exposición es a 0,025 y 0,075 mgCd(II)/L. Los efectos en la relación Cla/Clb comienzan a ser significativos recién a 0,2 mgCd(II)/L en el clon LgP y a 0,35 mgCd(II)/L en los clones LgJ y LmJ (Tabla IV.3.11, Figura IV.3.19: a', b' y c'). Por otra parte, los valores de inhibición en el CTC siempre fueron mayores a los registrados en la relación Cla/Clb, observándose que estas diferencias son máximas en el clon LmJ (Figura IV.3.19: a', b' y c').

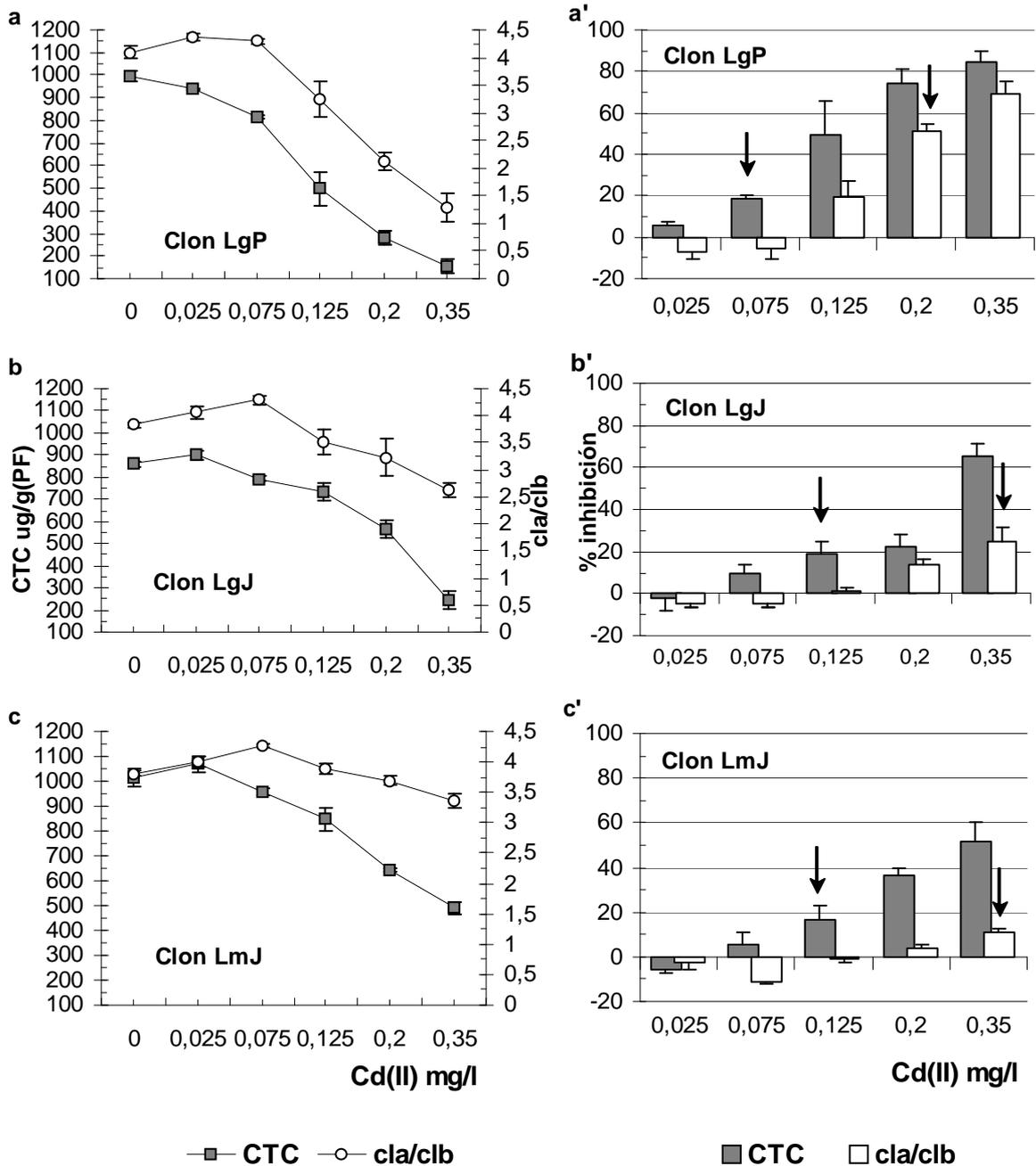


Figura IV.3.19: Toxicidad subcrónica del Cd(II) en Lemnáceas. Efecto en el contenido total de clorofila (CTC) y en la relación clorofila a/clorofila b (Cla/Clb).

a, b y c. CTC en µg/mg(PF) y relación Cla/Clb de los clones de Lemnáceas LgP, LgJ y LmJ respectivamente, expuestos al Cd(II). Los valores corresponden al promedio de las repeticiones de ambos ensayos (Media ± error estándar, n=7).

a', b' y c'. Porcentaje de inhibición en el CTC y Cla/Clb en los clones de Lemnáceas LgP, LgJ y LmJ, respectivamente. Los valores corresponden al promedio de la inhibición en ambos ensayos ± error estándar (n=7). Las flechas indican la menor concentración de metal a la que se observa efecto significativo ($p \leq 0,01$).

En la Figura IV.3.20 se grafica, para cada uno de los clones expuestos al Cd(II), la variación de la relación Cla/Clb comparativamente con la respuesta en el contenido de clorofila a (Cla) y clorofila b (Clb) (Figura IV.3.20: a, b, c). Se indica además, el porcentaje de inhibición en cada parámetro (Figura IV.3.20: a', b', c').

Si analizamos el comportamiento de la variación en el contenido de Cla y Clb en la reducción en el CTC y de la relación Cla/Clb, vemos que la respuesta no es similar en el intervalo de concentraciones de cadmio evaluadas (Figura IV.3.20: a', b', c'). Cuando la exposición a este metal ocurre a concentraciones altas, en los tres clones el aumento en la clorosis por efectos del cadmio es debido mayoritariamente a la reducción en el contenido de Cla (Figura IV.3.20). La reducción en la Cla respecto de la reducción en la Clb es mayor a las máximas concentraciones de cadmio ensayadas, lo que se manifiesta en una mayor inhibición en la relación Cla/Clb. No obstante esto, en los clones de *L. gibba* se observa que cuando la exposición se realiza a bajas concentraciones (0,025 y 0,075 mgCd(II)/L), la inhibición es mayor en el contenido de Clb, lo que explica el aumento de la relación Cla/Clb a esos niveles de exposición.

IV.3.3.3.5 Sensibilidad de la respuesta de los clones de Lemnáceas a la exposición subcrónica al Cd(II): comparación del efecto en el área foliar (AF), en la tasa de multiplicación (TM) y en el contenido total de clorofila (CTC) .

Si bien los efectos fitotóxicos de la exposición subcrónica al cadmio se manifiestan en todos los puntos finales considerados (TM, AF, CTC y relación Cla/Clb), la sensibilidad en la respuesta de cada uno fue diferente. Dado que, de igual manera a lo observado para el cobre y cromo, la respuesta en la variación de la relación Cla/Clb es de baja sensibilidad, este punto final no se considerará en la siguiente discusión.

En la Figura IV.3.21 se indica de manera comparada, para cada uno de los tres clones de Lemnáceas, la respuesta inhibitoria en los puntos finales AF, TM y CTC luego de la exposición durante 14 días a diferentes concentraciones de cadmio.

De manera general se observa que en los tres clones, el efecto del cadmio en la reducción de la TM, fue significativo a partir de la exposición a 0,025 mgCd(II)/L (Figura IV.3.21:a). A esta concentración de cadmio, en los clones LmJ y LgJ, también se inhibe significativamente el AF, mientras que en el clon LgP los efectos se evidencian a partir de 0,075 mgCd(II)/L. Si bien en los tres clones el CTC alcanza valores de inhibición muy altos, los efectos en este punto final comienzan a evidenciarse a partir de 0,075 mgCd(II)/L para el clon local y a 0,125 mgCd(II)/L para los clones LgJ y LmJ (Tabla IV.3.11; Figura IV.3.21), siendo el AF el parámetro que menor sensibilidad presenta a bajas concentraciones de cadmio.

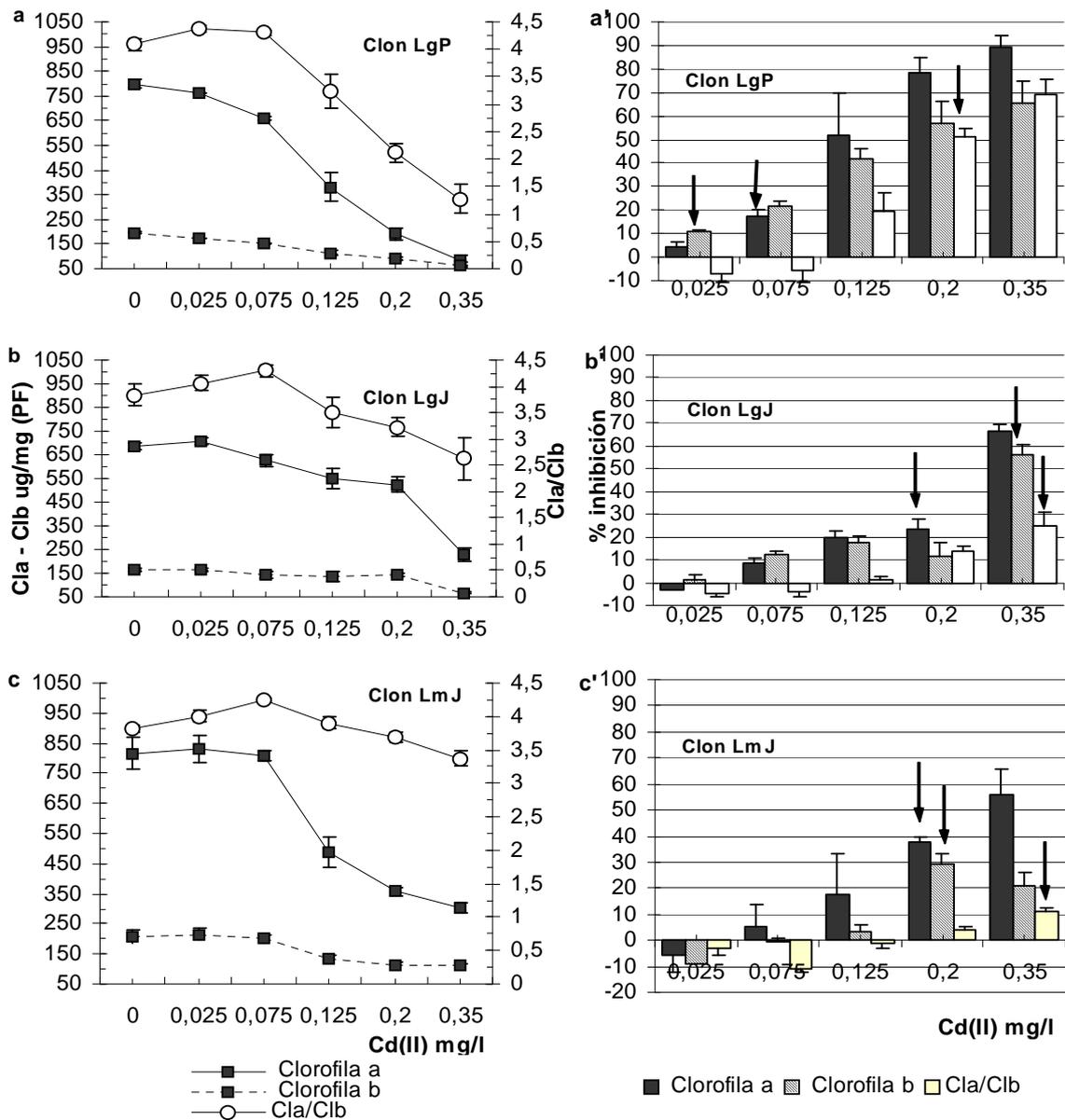


Figura 6: Toxicidad subcrónica del Cd(II) en Lemnáceas. Efecto en el contenido de clorofila a (Cla), clorofila b (Clb) y en la relación clorofila a/clorofila b (Cla/Clb).

a, b y c. Contenido de clorofila a (Cla) y clorofila b (Clb) en µg/g(Peso Fresco) y relación Cla/Clb en los clones de Lemnáceas LgP, LgJ y LmJ, respectivamente, expuestos a diferentes concentraciones de Cd(II). Los valores corresponden al promedio de las repeticiones de ambos ensayos (Media ± error estándar, n=7).

a', b' y c'. Porcentaje de inhibición en el contenido de clorofila a (Cla) y clorofila b (Clb) y en la relación Cla/Clb en los clones de Lemnáceas LgP, LgJ y LmJ, respectivamente. Los valores corresponden al promedio de la inhibición en ambos ensayos (Media ± error estándar, n=2). Las flechas indican la menor concentración de metal ensayada a la que se observa efecto significativo (LOEC; $p \leq 0,01$).

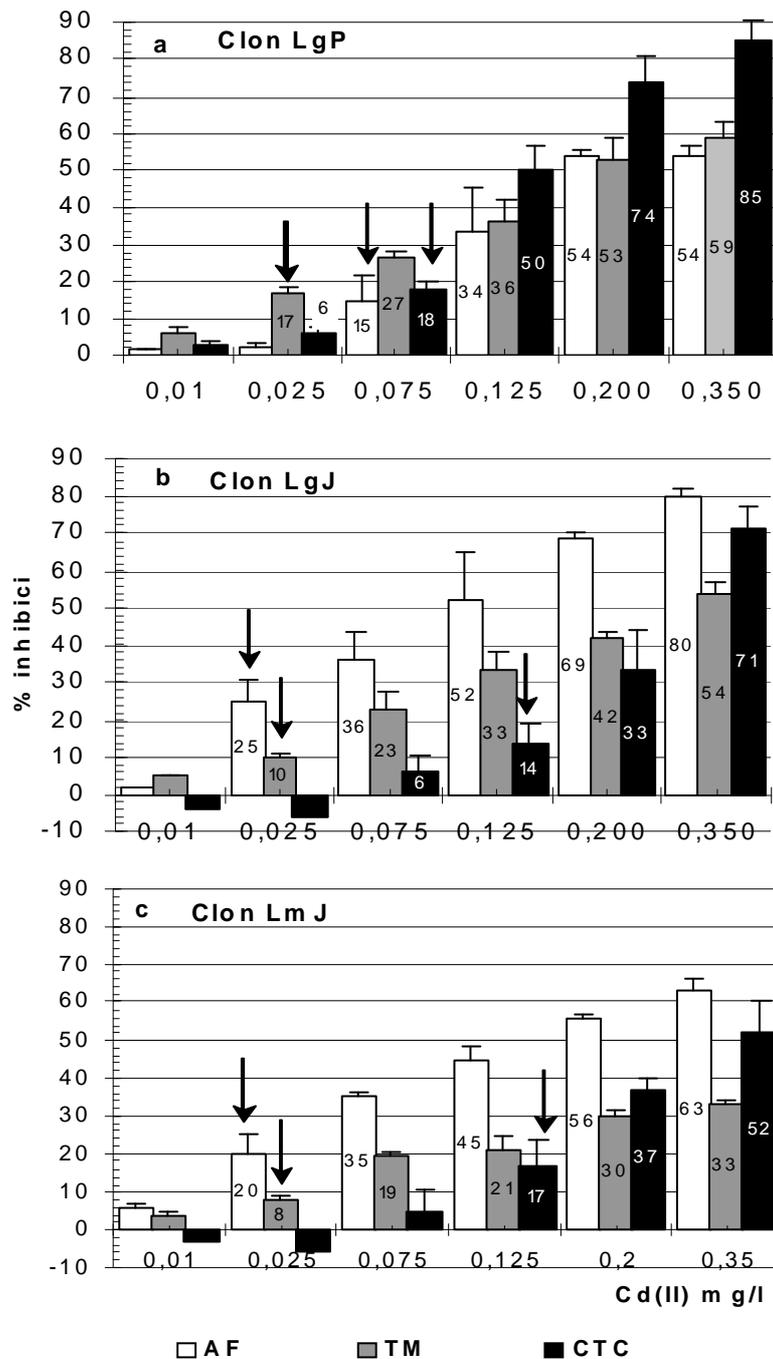


Figura IV.3.21: Toxicidad subcrónica del Cd(II) en Lemnáceas. Efecto comparativo en el área foliar (AF), en la tasa de multiplicación (TM) y en el contenido total de clorofila (CTC). **a, b y c.** Porcentaje de inhibición en el AF, en la TM y en el CTC en los clones de Lemnáceas LgP, LgJ y LmJ, respectivamente. Los valores corresponden al promedio de la inhibición en ambos ensayos \pm error estándar ($n=7$). Las flechas indican la menor concentración de metal a la que se observa efecto significativo ($p \leq 0,01$).

Al evaluar la sensibilidad considerando la CI_{50} en los tres puntos finales vemos que para el clon LgJ la respuesta en la TM, AF y CTC es similar. En los clones LgJ y LmJ es el AF el parámetro más afectado y la TM el de menor sensibilidad (Tabla IV.3.12; Figura IV.3.21).

Al comparar la respuesta de los tres clones expuestos al cadmio, el clon LgP es el más sensible al evaluar los efectos en la TM y CTC, no sólo al considerar la CI_{50} sino también en la respuesta observada en exposiciones a bajas concentraciones del metal. El AF es el parámetro más sensible en los clones LgJ y LmJ.

Si comparamos la sensibilidad de los clones estudiados con diferentes referencias bibliográficas de la respuesta de otras Lemnáceas a este metal, se observa una amplia variabilidad en la sensibilidad respecto a lo observado para *L. gibba* y *L. minor* en este trabajo. Landolt & Kandeler (1987) citan, para las especies *Lemna minor* y *Spirodela polyrrhiza*, inhibición del crecimiento a concentraciones superiores a 0,011 y 0,045 mgCd(II)/L, respectivamente. Para el caso de *L. gibba*, describen efecto en el crecimiento de la raíz y clorosis a partir de 0,112 mgCd(II)/L e inhibición del crecimiento a 1,12 mgCd(II)/L (Landolt & Kandeler, 1987). Huebert & Shay (1992 y 1993b) observan en la Lemnacea *L. trisulca*, expuesta a 0,034 y 0,071 mgCd(II)/L durante 14 días, una marcada inhibición en la tasa de multiplicación (35% y 68%, respectivamente) y en el peso seco (83% y 96%, respectivamente). Los resultados obtenidos por Singh et al., (1994) indican que la exposición de *L. minor* a 0,1 mgCd(II)/L durante 24 h no produce efectos significativos en el peso fresco, contenido de clorofila y proteínas totales, mientras que a las 48 h de exposición, los valores de inhibición registrados en estos parámetros corresponden al 25%, 14% y 33%, respectivamente. Sajwan & Ornes (1994) observan en la especie *S. polyrrhiza*, inhibición significativa en el número de frondes producidas luego de 4 semanas de exposición a 0,04 mgCd(II)/L, mientras que valores de 7,63 mgCd(II)/L inhiben completamente el crecimiento luego de 7 días de exposición. Mohan & Hosetti (1997) observan para *L. minor* reducción significativa en el CTC y proteínas totales por exposición a 0,056 mgCd(II)/L (8 días), alcanzando el 50% de inhibición en el CTC recién a 0,56 mgCd(II)/L. Mohan & Hosetti (1999) informan valores de CI_{50} en el número de frondes producidas entre 0,2 y 0,5 mgCd(II)/L para *L. minor*, entre 0,15 y 0,3 mgCu(II)/L para *L. valdiviana*, entre 0,6 y 0,9 mgCd(II)/L para *L. polyrrhiza* y 6 mgCd(II)/L para *L. paucicostata*. Li & Xiong (2004b) observan en ensayos con *L. paucicostata* que la exposición al Cd(II) genera en esta especie la disgregación de las colonias a partir de 0,09 mgCd(II)/L (24h), alcanzando valores de $CE_{50(24h)}$ para este parámetro final a 0,11 mgCd(II)/L.

La exposición de plántulas de *Juncus acutus* a 0,13 mgCd(II)/L, produce inhibición marcada en la elongación de la raíz (70%), siendo este efecto mayor que en la elongación del tallo (37%) (Stefani et al., 1991). No obstante la alta sensibilidad de Lemnáceas y otras especies acuáticas, Maine et al. (2001) observan en *Pistia stratiotes* una gran tolerancia al cadmio, entre valores de 1 a 6 mgCd(II)/L.

Para especies terrestres, varios antecedentes bibliográficos indican una alta resistencia a este metal. Los resultados obtenidos por Kummerová & Brandejsová (1994) en plántulas de *Zea mays* muestran una alta tolerancia de esta especie al cadmio, con relación a la sensibilidad observada para Lemnáceas. Estos autores observan reducción en la biomasa de hojas y tallos, en el área foliar y en el contenido de clorofila a los 6 días de exposición a 112,4 mgCd(II)/L, mientras que a valores de 1,12 y 11,24 mgCd(II)/L la inhibición en el contenido de clorofila se manifiesta a los 11 días, con reducción de la biomasa y el área foliar recién a los 17 días. Skórzyńska-Polit et al. (1995), evaluaron el efecto del cadmio en plántulas de *Phaseolus coccineus* expuestas a 2,8 mgCd(II)/L, observando, luego de 16 días de crecimiento, la supervivencia de las mismas, aunque evidenciando inhibición en el área foliar, en la concentración de clorofila y en la actividad del PSII, además de alteraciones en la arquitectura del mesófilo y la ultraestructura de los cloroplastos. Esta alta tolerancia al cadmio también la describen Kovačević et al. (1999) en plantas jóvenes de *Triticum aestivum* expuestas durante 5 días a 112,4 mgCd(II)/L, observando una marcada reducción en la biomasa foliar y radical, pero a valores de cadmio tres órdenes de magnitud superior a lo descrito para los clones de *Lemna* en este trabajo.

De igual manera a lo descrito para el cromo y el cobre, en comparación con la sensibilidad de otras plantas vasculares acuáticas o terrestres anteriormente mencionadas, los tres clones de Lemnáceas utilizados presentan buena sensibilidad al cadmio estando los valores de CI o LOEC en el orden de lo informado en la bibliografía para diferentes especies y puntos finales.

IV.3.3.4. CONSIDERACIONES RESPECTO DE LA EVALUACIÓN DE LA FITOTOXICIDAD DEL Cu(II), Cr(VI) Y Cd(II) A PARTIR DE LOS PUNTOS FINALES SELECCIONADOS: EL ÁREA FOLIAR (AF), LA TASA DE MULTIPLICACIÓN (TM), EL CONTENIDO TOTAL DE CLOROFILA (CTC) Y LA RELACIÓN Cla/CIb.

Con relación a la selección de los puntos finales considerados, TM, AF, CTC y Cla/CIb, en la evaluación de la fitotoxicidad de los tres metales, se analizan de manera general las ventajas y desventajas del uso de los mismos y su respuesta en los tres clones de Lemnáceas.

Con respecto a la respuesta de la TM, se observa que este parámetro es de alta sensibilidad. Pequeñas variaciones en la TM son fácilmente cuantificables independientemente del tamaño de la especie, siendo además un parámetro muy sensible a leves variaciones ambientales o cambios en la composición del medio nutritivo (Landolt & Kandeler, 1987; Environment Canada, 1999b). Por otra parte, la medición de la TM es de alta simplicidad, baja variabilidad y de muy bajos costos por no requerir el uso de instrumental o reactivos específicos.

A pesar que la inhibición en el AF es un parámetro de buena sensibilidad, incluso a bajas concentraciones de tóxico (Tablas IV.3.4, IV.3.8 y IV.3.12), se observan algunas dificultades metodológicas en su determinación. Al evaluar el efecto fitotóxico de un contaminante mediante la inhibición en el AF, es importante considerar la variación debida a las diferentes edades de las frondes producidas y el crecimiento de las mismas al final del período de ensayo, siendo necesario discriminar este factor del efecto del tóxico. Si bien, como se describió en el Capítulo IV.1.8.3, solamente se utilizan en la medición del AF aquellas frondes que hayan desarrollado frondes hijas o yemas, esta selección lleva implícita cierta subjetividad metodológica. Por otra parte, la medición de éste parámetro implica mayor dificultad y tiempo de ejecución, además de requerir el uso de instrumental específico. Para el caso particular del clon LgP, el AF promedio es bajo en relación a la de los clones LgJ y LmJ ($5,92 \pm 0,32$; $11,41 \pm 1,04$ y $13,8 \pm 1,78 \text{ mm}^2$, respectivamente), por lo que los efectos en este punto final generados por la exposición a bajas concentraciones de un compuesto tóxico podrían ser subestimados por las limitaciones metodológicas de la medición del mismo.

De los resultados obtenidos con los tres metales pesados, se observa de manera general que, en el clon LgP, la respuesta inhibitoria en el AF fue inferior a la manifestada por los clones LgJ y LmJ (Tablas IV.3.4, IV.3.8 y IV.3.12). En exposiciones del clon LgP al cobre, el AF se inhibe más que la TM pero los niveles de inhibición alcanzados en este punto final son menores en comparación con los de los otros dos clones (Tabla IV.3.4).

Para el caso de la respuesta de los puntos finales a bajos niveles de exposición a los metales, se observa de manera general que si bien la inhibición en el AF es de buena sensibilidad, en algunos casos los efectos en la TM son significativos a concentraciones menores. La respuesta del clon LgP a bajas concentraciones de exposición al cobre indica que la TM es un punto final de evaluación de fitotoxicidad de mayor sensibilidad que el AF. Para el cadmio, los mayores efectos se verifican en la TM observándose, al igual que con el cobre, que a bajas concentraciones los efectos son significativos en la TM pero no así en el AF. En la exposición del clon LgP al cromo a bajas concentraciones se detecta efecto en el AF y TM. En el clon LgJ la sensibilidad a bajas concentraciones fue mayor en la TM para el cobre mientras que con cadmio y cromo la respuesta es similar en la TM y AF. En el clon de *L. minor* se evidencia mayor sensibilidad de la TM a bajas exposiciones al cromo mientras que para cobre y cadmio la respuesta en la TM y AF es similar.

En los tres clones, la TM constituye un punto final de buena sensibilidad para la evaluación de la fitotoxicidad del cobre, cobre y cadmio a bajos niveles de exposición

De manera general, en los tres clones y para los tres metales evaluados, si bien se observa efecto inhibitorio muy marcado en el CTC, éste se manifiesta a altas concentraciones de exposición. Los valores de LOEC para el CTC fueron en todos los casos, para los tres metales y en los tres clones, mayores a los valores para la TM (Tablas IV.3.3, IV.3.7 y IV.3.11). Esto mismo se observa para el AF, con la excepción de la respuesta del clon LgP al cromo y

cadmio en donde los valores de LOEC son similares (Tablas IV.3.3, IV.3.7 y IV.3.11). El CTC no constituye un punto final relevante para detectar toxicidad en Lemnáceas por exposición a bajas concentraciones de cobre, cromo o cadmio. La mayor sensibilidad de la TM y AF podría deberse a un rápido efecto del tóxico en las células meristemáticas y en el crecimiento y diferenciación celular, en relación a las alteraciones en la biosíntesis o degradación de la clorofila. Sinha et al. (1994) también observaron una mayor sensibilidad en la TM, respecto de otros puntos finales. Estos autores estudiaron la toxicidad del Fe(III) y el Mn(II) en la Lemnacea *Spirodela polyrrhiza* observando que la TM se inhibe, detectando toxicidad, aún a bajas concentraciones de estos metales en donde el CTC y la producción de biomasa (peso seco) no se modifican. No obstante estos resultados, otros autores, considerando la exposición a otros contaminantes, observan respuestas diferentes en la sensibilidad de distintos puntos finales. Kwan & Smith (1988), evaluaron la fitotoxicidad en Lemnáceas por exposición al talio, comparando la respuesta en el área foliar, peso seco y tasa de multiplicación, observando mayor sensibilidad en el área foliar, siendo la CE_{50} y el umbral de toxicidad de menor sensibilidad que evaluar el efecto en la TM y en el peso fresco. Por otra parte, estos autores no observan diferencias significativas en la respuesta tóxica al comparar el peso seco y la tasa de multiplicación. Vesonder et al. (1992) evalúan la actividad fitotóxica de micotoxinas en *L. minor* en el contenido de clorofila y en la tasa de multiplicación, considerando ambos puntos finales como indicadores sensibles de fitotoxicidad y complementarios respecto de la respuesta fisiológica observada.

Así como se verificó con el cobre, y en menor medida con el cromo, es notable, particularmente en el clon LmJ (Figura IV.3.15: h, i), que si bien se observan frondes con una elevada clorosis, éstas son capaces de desarrollar yema hijas verdes. Esto indicaría que no existe un efecto en el desarrollo de los cloroplastos a partir de los protoplastidios de las células meristemáticas, ni tampoco inhibición en la síntesis de clorofila durante la morfogénesis de la yema. Si bien el Cd(II) y el Cu(II) son de gran movilidad dentro de la planta, existiría una distribución o translocación diferencial de estos metales (u otro nutriente) hacia las zonas meristemáticas, por lo que sería necesario un periodo de exposición directa al Cd(II), de la fronde en desarrollo, para evidenciar efectos en la clorofila.

Es importante considerar que para la cuantificación del contenido total de clorofila en Lemnáceas expuestas a los metales pesados o a otros contaminantes, se toma un grupo de frondes del total de las desarrolladas al finalizar el ensayo, luego de 14 días de crecimiento. Esto implica que la determinación de este punto final se realiza sobre una población heterogénea de plantas que poseen diferente edad y que han tenido distintos tiempos de exposición al contaminante. Consecuentemente, y como puede observarse en las Figuras IV.3.1, IV.3.8 y IV.3.15, el nivel de inhibición en el CTC no es el mismo en todas las frondes y los valores de efecto cuantificados e informados corresponden a la inhibición promedio de una población de plantas con 1 a 14 días de exposición. Por lo tanto, vale destacar que a nivel individual, los valores de daño en las frondes de mayor tiempo de exposición son superiores a

los informados. Esto puede ser claramente observado en las Figuras IV.3.1, IV.3.8 y IV.3.15 donde las frondes mayores están totalmente cloróticas, mientras que no ocurre lo mismo con las yemas hijas recientemente formadas.

Con relación a los valores de exaltación en el CTC observados a bajas concentraciones de exposición al cobre (a 0,25 y 0,50 mg Cu(II)/L) y cadmio (0,010 y 0,025 mgCd(II)/L), es importante destacar que no se pueden interpretar como una respuesta beneficiosa para la planta, sino que deben evaluarse de manera conjunta a lo observado en otros puntos finales. A estas concentraciones donde el CTC no sólo no se ve inhibido, sino que además hay un efecto de estimulación (hormesis), se observan efectos inhibitorios en el AF y TM en ambos metales. Esto remarca la importancia de considerar simultáneamente la respuesta en diferentes puntos finales para poder estimar con mayor confiabilidad la fitotoxicidad de un contaminante, en particular a bajos niveles de exposición.

Con respecto a la medición de la variación de la relación Cla/C1b, vemos que este punto final no aporta mayor sensibilidad al bioensayo de toxicidad con Lemnáceas, pero sí proporciona información necesaria para la comprensión de la respuesta fisiológica de estas plantas vasculares frente a la exposición a metales pesados. Otro aspecto a considerar, si comparamos la metodología de determinación del contenido de clorofila y relación Cla/C1b con la del área foliar y la tasa de multiplicación, es que estas últimas son medidas no destructivas, lo cual permite el seguimiento de los efectos tóxicos durante el período de ensayo.

Como se ha mencionado tanto para el cobre, cromo y cadmio (Figura IV.3.1, IV.3.8 y IV.3.15), estos metales pesados producen reducción en el número de frondes por colonia, observándose además que este efecto se manifiesta a bajos niveles de exposición en los tres metales. En el trabajo realizado por Rimoldi et al. (2004), también utilizando el clon LgP de *L. gibba*, se compara la sensibilidad en la respuesta de los puntos finales TM, CTC y AF con el efecto en el número de frondes por colonia (NFC), luego de 14 días de exposición al Cu(II), Cr(VI) y Cd(II). Estos autores muestran la buena sensibilidad del NFC como punto final de evaluación de efectos fitotóxicos de los metales y otros contaminantes. La respuesta en la desagregación de frondes en las colonias comienza a evidenciarse a concentraciones similares a lo observado en el presente estudio para el AF: a partir de 0,25 mg/L en los tratamientos con Cu y Cr y desde 0,075 mg/L en el tratamiento Cd, desarrollándose así colonias con menor número de frondes. Si se compara con los efectos en la TM, se observa que éstos ocurren a partir de 0,5 mg/L para el Cu; 0,25 para el Cr y 0,025 para el cadmio, siendo el NFC de mayor sensibilidad en el tratamiento con Cu, menor en el del Cd y similar en el del Cr. Con respecto al CTC, la sensibilidad en el NFC fue mayor para todos los metales. Li & Xiong (2004a y 2004b) también estudiaron los efectos en la desagregación de las colonias en *L. paucicostata* como un biomarcador de la fitotoxicidad de contaminantes, recomendándolo como punto final de rápida respuesta y muy buena sensibilidad. El número de frondes por colonia (NFC) constituye un punto final de muy buena sensibilidad para la evaluación de la fitotoxicidad de los metales Cu(II),

Cr(VI) y Cd(II), del orden de la TM y AF. Es además de fácil cuantificación y con la ventaja de ser una evaluación no destructiva, lo que permite realizar el seguimiento de la toxicidad en el tiempo y sin recurrir a un número mayor de replicados en el ensayo. La reducción en el número de frondes por colonia podría estar relacionado con el aumento de la producción de etileno y la consecuente estimulación de los mecanismos de abscisión (Taiz & Zeiguer, 2002; Li & Xiong 2004 a y b). Para el caso de *Spirodela punctata*, el crecimiento en solución nutritiva con 0.02mM de Cu(II) produce un aumento de entre 20 a 30 veces en la producción de etileno de las frondes (Landolt & Kandeler, 1987).

En numerosos trabajos y protocolos de toxicidad (Huebert & Shay, 1992; Environment Canada, 1999a; Environment Canada, 1999b; Mohan & Hosetti, 1999; Paradiso Giles, 2000; Castillo, 2004), se informa o compara la toxicidad de un contaminante mediante la CI_{50} . Se evidencia en este trabajo, al comparar la sensibilidad de los puntos finales o de los clones considerando la respuesta tóxica en todo el intervalo de la curva de toxicidad, y no solamente a partir de los valores de CI_{50} , ya que ésta no es similar en todo el intervalo de concentraciones ensayadas. No siempre la respuesta entre los clones y en los diferentes puntos finales es la misma, cuando se compara la exposición a concentraciones bajas y altas de un contaminante. Se observa que un punto final puede tener una alta sensibilidad (capacidad de evidenciar toxicidad) a muy bajas concentraciones de exposición, o no manifestar efecto hasta que la exposición no alcanza determinados umbrales de respuesta.

Si bien no se ha considerado como un punto final en la comparación de la respuesta de los clones de Lemnáceas a los tres metales, se observa que el crecimiento de las raíces se ve afectado significativamente en los tres clones a partir de 0,1, 0,25 y 0,025 mg/L de Cu(II), Cr(VI) y Cd(II), respectivamente (Figuras IV.3.1, IV.3.8 y IV.3.15), siendo la respuesta en este punto final de muy buena sensibilidad e importante de considerar en la evaluación de efectos fitotóxicos de contaminantes. Otros autores también señalan el daño de estos metales en los sistemas radicales de plantas vasculares (Wang, 1987; Hendry & Crawford, 1992; Samantary, 2002).

La exposición al cobre en concentraciones superiores a las esenciales, así como el cadmio y cromo, genera en las plantas estrés oxidativo, produciendo un incremento de especies reactivas de oxígeno en las células, causando saturación o destrucción de los sistemas antioxidantes y el consecuente daño en biomoléculas, en el aparato fotosintético, entre otros efectos celulares (Weckx & Clijsters, 1996; Briat & Leburn, 1999; Sanità di Toppi & Gabrielli, 1999; Samantary, 2002; Liu et al., 2004; Frankart et al., 2002; Sobrero & Ronco, 2009). Estos efectos a nivel molecular y celular, si no son contrarrestados por los mecanismos antioxidantes y de reparación celular, se manifiestan a niveles superiores de la organización y fisiología de las plantas con alteraciones en la funcionalidad vegetal (Briat & Leburn, 1999; Sanità di Toppi & Gabrielli, 1999). Si bien este trabajo no se ha centrado en la evaluación del estrés oxidativo generado por los metales pesados, y su correlación con los daños a nivel molecular y celular, en

trabajos previos se ha observado, para el caso del clon local de *L.gibba* (clon LgP), que la exposición a 0,25 mgCu(II)/L y 0,025 mgCd(II)/L, genera el aumento significativos en la producción de especies reactivas de oxígeno (Sobrero & Ronco, 2009). A estas concentraciones se observaron en este trabajo y para el mismo clon, efectos significativos del cobre en el área foliar (LOEC en el AF; Tabla IV.3.3) y del cadmio en la tasa de multiplicación (LOEC en la TM; Tabla IV.3.3).

Si bien los puntos finales utilizados en este trabajo de tesis aportan información relevante, varios autores han evaluado otros mecanismos de respuesta de los sistemas vegetales frente a condiciones de estrés ambiental, de modo tal que indiquen de manera precoz la toxicidad, tanto en el tiempo de respuesta como en el nivel de daño, previo a observar efectos en parámetros de crecimiento. En relación a esto, existen numerosos trabajos en los que se considera la respuesta abarcando efectos a nivel bioquímico y fisiológico tales como modificaciones en la actividad de enzimas reguladoras de estrés oxidativo (superóxido dismutasa, catalasa, glutatión reductasa, etc.), producción de radicales libres, peroxidación lipídica y alteraciones en la permeabilidad de membranas, entre otros (Hendry, 1994; Jayaprakash et al., 1994; Roy & Hänninen, 1994; Gille & Sigler, 1995; Weckx & Clijsters, 1996; Mohan & Hosetti, 1997; Lytle & Lytle, 2001; Liu et al., 2004). No obstante, los efectos en estos puntos finales son de difícil interpretación en la aplicación de este bioensayo de toxicidad como herramienta de regulación ambiental, dado el desconocimiento de la relevancia ecológica de este tipo de daño en relación con el efecto en el crecimiento de las poblaciones vegetales (Wang, 1990; Boutin et al., 1993; Lewis, 1995).

La tendencia general observada en los resultados de la toxicidad de los tres metales, se puede expresar mediante los valores promedio de las CI_{50} para los distintos puntos finales y para los tres clones de *Lemna*. Estos son, indicando entre paréntesis los valores máximos y mínimos, para el Cd(II): 0,24 (0,13-0,35), para el Cu(II): 1,03 (0,68-1,25) y para el Cr(VI): 3,12 (0,9-5) mg/L. Estos valores indican que el cadmio es un orden de magnitud más tóxico que el cromo mientras que el cobre es 5 veces menos tóxico que el cadmio y tres veces más que el cromo. Cuando comparamos estos valores medios con el intervalo de valores de toxicidad y sensibilidad informados en la bibliografía de diferentes especies de *Lemna* para estos metales (Cd(II): 0,07- 6,13; Cu(II): 0,12-1,3 y Cr(VI): 3,3 a >10 mg/L; Huebert & Shay, 1992; Mohan & Hosetti, 1997; Mohan & Hosetti, 1999; Li & Xiong, 2004b), se puede observar que la sensibilidad media de los clones estudiados se encuentra dentro de este intervalo. Por otra parte, la sensibilidad de algunos puntos finales evaluados (Tablas IV.3. 4, IV.3.8 y IV.3.12) es similar al de las especies más sensibles informadas en la bibliografía. En comparación con los resultados obtenidos con la especie *L. sativa* en exposiciones agudas, se observa que con los tres metales la sensibilidad de los tres clones de Lemnáceas es significativamente mayor ($CI_{50, 96h}$ para Cu: 1,99 mg/L, Cr: 5,01 mg/L, Cd: 3,7 mg/L). Respecto de lo observado con semillas en la respuesta la elongación de radícula, el ensayo con Lemnáceas es hasta 3 veces más sensible para el

cobre, 5,6 veces para el cromo y, para el cadmio, hasta 28 veces más sensible. No obstante la baja respuesta observada en el ensayo de 96 h con *L. sativa* a los metales pesados, se comprobó que la sensibilidad de esta especie se modifica significativamente al prolongar el tiempo de exposición de las plántulas hasta 25 días en condiciones de hidroponia. En ensayos subcrónicos, la sensibilidad de *L. sativa* al cromo es entre 2,4 y 28 veces mayor con relación al clon de *Lemna* (LgJ) más sensible a este metal, dependiendo del punto final considerado (Capítulo III.2.3.2).

Si comparamos la sensibilidad de los tres clones de Lemnáceas a estos tres metales con los valores de los niveles guía de protección de la vida acuática establecidos por la SRHN y otros organismos (Capítulo VI, Tabla VI.1), se observa que las concentraciones que no producen efecto (NOEC), en los tiempos de exposición y condiciones experimentales utilizadas en este estudio, están entre 2 a 3 órdenes de magnitud por encima de dichos niveles guía. Esto indica que, al menos para las Lemnáceas, existe un intervalo de seguridad amplio para la protección de estos organismos. No obstante esto, los valores de metales registrados en efluentes y sitios de vuelco de éstos en aguas superficiales, están muchas veces en el orden de la sensibilidad observada para los clones de *Lemna* estudiados. Por ejemplo, como ya se mencionó en el Capítulo III.2.3, de acuerdo a la legislación vigente para la provincia de Buenos Aires (Ley Provincial 5965, Decreto 2009/60 3970/90, Resolución 336/03), los límites admisibles en efluentes para el vertido en agua superficial o conducto pluvial son: ≤ 1 mg Cu(II)/L, $\leq 0,2$ mg Cr(VI)/L y $\leq 0,1$ mg Cd(II)/L. Si bien se espera que el efluente se diluya al incorporarse en el cuerpo de agua, los niveles admisibles para el cobre y cadmio se corresponden, o son aún mayores, con los valores de la Cl_{25} o Cl_{50} observados en los clones de Lemnáceas (Tablas IV.3.4, IV.3.8 y IV.3.12). Con relación a las concentraciones de estos metales en cuerpos de agua superficial, algunos antecedentes bibliográficos para Argentina indican que los valores registrados no serían fitotóxicos si lo comparamos con la sensibilidad observada en Lemnáceas (Colombo et al., 1996; AA-AGOSBA-ILPLA-SHN, 1997; Villar et al., 1998; Gagnetten et al., 2007; SADS-PNA-OPS-UNLP, 2007). No obstante estos antecedentes, los resultados para sitios de vuelcos industriales en aguas superficiales indican niveles de metales muy por encima de los valores de NOEC para las Lemnáceas estudiadas (Cattogio, 1991; Ronco et al., 1992; Cataldo et al., 2001).

La respuesta comparativa de los tres clones indican que la variabilidad entre los clones LgP y LgJ de *L. gibba* es baja para todos los metales y puntos finales, con la excepción del efecto del cromo en el contenido de clorofila y en el área foliar donde se observan diferencias de hasta tres veces en los valores de Cl, siendo el clon LgJ el más sensible. La respuesta del clon local fue también muy similar a la del clon de *L. minor* (clon LmJ) de Alemania, salvo también por la respuesta al cromo y cobre donde el clon LmJ fue levemente más sensible. Las máximas diferencias en sensibilidad observadas en los clones estudiados son con relación al CTC, donde

las relaciones entre la CI_{50} entre clones alcanzaron valores de 2,4 para LgP:LmJ con el cromo y 2,5 para LmJ:LgP con el cadmio.

La información bibliográfica respecto de la variación intraespecífica de la fitotoxicidad a la exposición a metales indica que ésta es muy amplia (Van Steveninck et al., 1992; Samantary, 2002; Wu & Zhang, 2002; Liu et al., 2004). Dentro de la misma especie, las concentraciones mínimas que generan toxicidad se hayan en un amplio intervalo, desde el mismo orden hasta un orden de magnitud de diferencia. Este patrón ha sido informado para algas (Kaplan et al., 1995), en las que se verifica que dos líneas celulares de *Chlorella* sp. difieren en un orden de magnitud en la sensibilidad al cadmio. En plantas vasculares, Hendry et al. (1992) encuentran diferencias significativas en la respuesta de clones de la gramínea *Holcus lanatus* al cadmio, siendo estas del mismo orden de magnitud. Wu & Zhang (2002) observan esta misma respuesta al cadmio en diferentes genotipos de cebada. Para las leguminosas, Samantary (2002) informa que la variación en la sensibilidad al cromo en dos cultivares de *Vigna radiata* es de un orden de magnitud. Esta diferencia en la sensibilidad también se registra para el cobre en poblaciones de *Rumex dentatus* provenientes de sitios contaminados y no contaminados con este metal, en donde las plantas provenientes de sitios con cobre presentan mayor resistencia al metal (Liu et al., 2004). En las Lemnáceas, se describen variaciones en la sensibilidad al Zn en tres clones de *L. minor* de hasta un orden de magnitud (Van Steveninck et al., 1992). Por otra parte, si bien los resultados de este trabajo indican diferencias significativas en la sensibilidad de los clones de Lemnáceas estudiados, dentro de los de la misma especie y entre especies diferentes, estas diferencias son menores a las observadas para algas y otras plantas vasculares. Esta baja variabilidad en la sensibilidad ha sido también observada entre 14 clones de *L. gibba* de diferente origen geográfico expuestos al herbicida simazina (Mazzeo et al., 1998).

IV.3.4 CONCLUSIONES

- En los tres clones de Lemnáceas y en los diferentes puntos finales considerados, se evidencia que el cadmio es el metal más tóxico, seguido del cobre, siendo el cromo el de menor toxicidad.
- Los diferentes puntos finales TM, AF, CTC y Cl_a/Cl_b, no presentan igual sensibilidad en la respuesta de Lemnáceas a la exposición a metales pesados. La sensibilidad de cada punto final varía de acuerdo al metal considerado y del nivel de concentración de la exposición al tóxico.
- La TM constituye un punto final de buena sensibilidad para la evaluación de la fitotoxicidad del cobre, cobre y cadmio, detectando toxicidad en los tres clones de Lemnáceas a bajos niveles de exposición. Este punto final es, además, de fácil determinación y de bajo costo de ejecución. No obstante la buena respuesta en la TM, la evaluación simultánea de otros

puntos finales permite obtener información complementaria, en particular a bajos niveles de exposición a un contaminante.

- El cobre, cromo y cadmio, a las concentraciones estudiadas, producen en los tres clones de Lemna, inhibición en el crecimiento radical y alteraciones en la arquitectura de la colonia y en la abscisión de las frondes hijas, además de los efectos fitotóxicos en el área foliar, en tasa de multiplicación y disminución en el contenido de clorofila.
- Si bien la sensibilidad de los tres clones de Lemnáceas, difiere significativamente en algunos puntos finales y metales estudiados, los valores de CI se encuentran dentro del mismo orden de magnitud.
- El clon local de *L. gibba* (clon LgP), presenta sensibilidad comparable al clon LgJ de la misma especie, siendo la respuesta en esta especie en general de mayor o equivalente sensibilidad a la de *L. minor*.
- En comparación con la sensibilidad de las Lemnáceas descrita por otros autores, la respuesta de los tres clones para el cobre, cromo y cadmio, indica que la sensibilidad de estos se encuentra en el mismo orden o, en muchos casos, es mayor a lo registrado en la bibliografía.
- En comparación con el bioensayo agudo con semillas de *L. sativa*, el ensayo con Lemnáceas es significativamente más sensible para estos contaminantes.
- Los niveles de sensibilidad observados en los tres clones de Lemnáceas al cobre, cromo y cadmio, hacen posible el uso de estas especies como herramienta de control de nivel de metales pesados en efluentes industriales. Si bien el clon local de *L. gibba* (Clon LgP) no es el más sensible de los tres estudiados, considerando los tres metales y los diferentes puntos finales analizados, igualmente presenta muy buena sensibilidad para detectar los niveles de metales posibles de encontrar en efluentes industriales o en sitios de vuelco de los mismos, siendo relevante y factible su uso como especie diagnóstico representativa en estudios ecotoxicológicos en la región.

IV.4 FITOTOXICIDAD DEL PRINCIPIO ACTIVO GLIFOSATO Y DEL FORMULADO COMERCIAL ROUNDUP®MAX EN LA ESPECIE NO BLANCO *Lemna gibba*.

IV.4 FITOTOXICIDAD DEL PRINCIPIO ACTIVO GLIFOSATO Y DEL FORMULADO COMERCIAL ROUNDUP® MAX EN LA ESPECIE NO BLANCO *Lemna gibba*.

IV.4.1 INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Como se ha mencionado en el Capítulo I.4, en Argentina se ha incrementado significativamente en la última década el área de cultivos transgénicos resistentes al glifosato (Cultivos RR). Dada la amplia difusión en el uso del glifosato, sumado a la rápida expansión de la frontera agrícola en nuestro país, es relevante evaluar el efecto de este herbicida en especies no blanco representativas de ambientes acuáticos característicos de nuestros agroecosistemas.

El estudio de la fitotoxicidad del glifosato en especies características de la flora acuática local ha sido poco documentado, siendo de gran relevancia a la hora de evaluar el impacto de estas prácticas agrícolas sobre ambientes acuáticos asociados a los agroecosistemas de nuestro país (Martin et al., 2003, Martin et al., 2005). Como ya se ha mencionado (Capítulo IV.1.1), *Lemna gibba* junto con otras especies de Lemnáceas, han sido recomendadas como organismos de referencia en protocolos estandarizados para la evaluación de la fitotoxicidad de plaguicidas y otros contaminantes (Boutin et al., 1993; USEPA, 1996; Environment Canada, 1999b; OECD, 2002; Environment Canada, 2007). En este trabajo se evaluará la sensibilidad del clon local de *L. gibba* (clon LgP) al glifosato como especie representativa de la flora regional de ambientes acuáticos asociados a áreas con cultivos transgénicos RR.

Por otra parte, si bien resulta importante evaluar la toxicidad del glifosato como principio activo, este herbicida se utiliza en combinaciones comerciales asociado a coadyuvantes que le confieren características toxicológicas diferentes. Esto hace relevante el estudio comparativo de la toxicidad del principio activo glifosato y de sus productos formulados. El Roundup® Max es un formulado comercial muy utilizado en Argentina por lo que a la hora de evaluar la sensibilidad de *L. gibba* al glifosato, se ha considerado comparativamente la toxicidad del principio activo puro con la de este producto formulado en particular.

Los objetivos planteados en este trabajo fueron los siguientes:

- *Evaluar la sensibilidad de la especie acuática no blanco L. gibba al glifosato en solución, abarcando en el intervalo de concentraciones ensayadas, a aquellas esperables en ambientes acuáticos naturales.*
- *Estimar la fitotoxicidad del glifosato en L. gibba comparando la respuesta en las curvas de crecimiento poblacional y la tasa de multiplicación, en el crecimiento foliar, número de frondes por colonia, arquitectura de la colonia y contenido de clorofila.*
- *Estudiar la sensibilidad de L. gibba comparando la toxicidad del principio activo puro y del producto formulado Roundup, durante 10 días de exposición.*

- *Analizar la variación de la toxicidad del principio activo glifosato y del formulado comercial, a lo largo del tiempo de exposición, en los diferentes puntos finales considerados.*

IV.4.2 METODOLOGÍA

La fitotoxicidad del herbicida glifosato y del formulado comercial Roundup[®]Max, se evaluó mediante el bioensayo de laboratorio utilizando como organismo diagnóstico el clon LgP de *L. gibba* (Clon local mantenido en cultivos estandarizados, de acuerdo a la metodología descrita en el Capítulo IV.1.4. Los ensayo de toxicidad con *L. gibba* se realizaron según el protocolo descrito en el Capítulo IV.1.7, en condiciones controladas de laboratorio a 24±2°C, pero con fotoperíodo (16 h de luz; 80 uM/m².seg). Pevio a la realización de los ensayos las plantas se aclimataron durante un mes en las condiciones de exposición, en laboratorio.

La exposición se realizó sin renovación de la solución o diluciones de los tóxicos, en recipientes de 500 ml conteniendo 300 ml de solución nutritiva pero con el doble de concentración de macro y micronutrientes (Capítulo IV.1.4). Para asegurar las condiciones de crecimiento exponencial durante los 10 días de exposición, se realizó el sobreagregado de nutrientes cada 3 o 4 días de ensayo (1 ml de solución 5X). El control de calidad del ensayo incluyó el mantenimiento del crecimiento exponencial en los controles negativos. La toxicidad del principio activo (p.a. como ácido) y del formulado comercial Roundup se evaluó mediante la aplicación en solución de 0,5; 1; 7,5; 15; 25; 60 y 80 mgp.a./L, realizándose al menos cuatro repeticiones para cada tratamiento y los controles negativos. El formulado comercial de glifosato utilizado en los ensayos de toxicidad corresponde al Roundup[®]Max (70,7% de p.a. como ácido). Las diluciones de los tóxicos se prepararon en la solución nutritiva, unificando, al inicio del ensayo, a 6,5 el valor de pH de los diferentes tratamientos. Se registra además, la variación de pH durante el tiempo de exposición según recomendaciones de Tsui & Chu (2003). Con el fin de estimar la reducción del principio activo a lo largo del período de ensayo, se verificó la concentración de glifosato en la solución nutritiva al inicio y durante los días de exposición. El pretratamiento de las muestras y la cuantificación del herbicida se realizó de acuerdo a Peruzzo et al. (2003). La concentración de glifosato se determinó por HPLC (Beckman, System Gold modelo 126, detector 166 UV, columna Supelco RP 18), previa derivatización con FMOC-Cl (cloruro de 9-fluoroenilmetil cloroformo) y buffer borato. Las condiciones de corrida cromatográfica fueron: buffer fosfato 0,05 M (pH = 5,5): acetonitrilo (65:35) como fase móvil, con flujo de 0,8 ml/min y detección a 206 nm. Las concentraciones de glifosato (mg p.a./L) indicados en las tablas y figuras de los resultados, corresponden a las concentraciones nominales al inicio del ensayo.

El efecto del herbicida en el crecimiento poblacional se evaluó midiendo la tasa de multiplicación (TM) a lo largo del tiempo de exposición. Por otra parte, se compararon las curvas de crecimiento poblacional teniendo en cuenta el número de frondes producidas durante el período de ensayo. Los puntos finales evaluados, a los 7 y 10 días de ensayo, fueron el

crecimiento foliar (CF) y el número de frondes por colonia (NFC). Además, se consideró la respuesta en el contenido total de clorofila (CTC), en la arquitectura de la colonia (AC) y en la elongación de la raíz.

La TM y el CTC se midieron según lo descrito en el Capítulo IV.1.8. El CF se cuantificó considerando las medidas del eje longitudinal mayor (EL) y del eje transversal mayor (ET), además de la relación EL/ET, de las frondes madres, frondes hijas y yemas. El análisis de estos resultados se realizó considerando separadamente la respuesta en las frondes madres respecto de las frondes hijas y yemas (Capítulo IV.1.8). En el recuento de frondes para la evaluación de las curvas de crecimiento, la TM y el NFC se incluyeron toda yema emergente visible. Para la descripción de los efectos en la AC se consideró la respuesta del CF y NFC, además de la elongación del estipe que conecta las frondes madres con las hijas mientras conforman una colonia.

La concentración de glifosato en solución esperada en el ambiente (CEA), debida a deriva o escurrimiento superficial, se calculó como la concentración resultante de aplicar, en un área de 1m² con 15 cm de profundidad, la dosis de producto recomendada (Boutin et al. 1993, Boutin et al. 1995). La CEA, para la máxima (3,2 kg/ha) y mínima (0,8 kg/ha) dosis de aplicación recomendada, es de 2,13 y 0,53 mg/L de Roundup[®]Max, respectivamente, y de 1,59 y 0,40 mg/L del principio activo glifosato.

IV.4.2.1 Análisis estadístico de los resultados

Los resultados de los ensayos de laboratorio se analizaron estadísticamente mediante análisis de regresión, ANOVA simple y ANOVA factorial. Previo al ANOVA se verificó la normalidad y homoscedasticidad de los datos, aplicándose alguna transformación a los mismos cuando alguna de estas dos condiciones no se verifica. En el análisis de los efectos en el número de frondes por colonia (NFC) se aplicó la transformación de la raíz cuadrada (datos discretos). Para linealizar las curvas de crecimiento y realizar la comparación de pendientes de las regresiones, se aplicó la transformación logarítmica a los datos de número de fronde. Esta comparación incluyó sólo aquellos tratamientos en los que el modelo de crecimiento se mantuvo exponencial durante el período de ensayo. La comparación de medias de los diferentes tratamientos y de las pendientes de las curvas de crecimiento se realizó aplicando el método de Tukey ($p \leq 0,05$) (Zar, 1996). La estimación de la CI se realizó según lo descrito en el Capítulo III.1.5.

IV.4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.4.3.1 Efecto del glifosato en el crecimiento poblacional

Las modificaciones en las curvas de crecimiento en *L. gibba* por exposición a diferentes concentraciones de glifosato (p.a. y Roundup), durante los 10 días de exposición, se pueden ver en la Figura IV.4.1. Se observa que el ajuste de regresión es exponencial sólo en las curvas de

crecimiento correspondientes al control negativo y hasta la concentración de 15 mg p.a./L de glifosato, observándose que a concentraciones mayores la respuesta es lineal. En la comparación de pendientes de las curvas de regresión, no se observaron diferencias significativas entre la del control negativo y la de las plantas expuestas a 0,50 y 1 mg p.a./L del glifosato y del Roundup, mientras que sí se las hay con las curvas de crecimiento de las plantas expuestas a 7,5 y 15 mg p.a./L, indicando un decaimiento marcado en la tasa de multiplicación (Tabla IV.4.1). A concentraciones por encima de 25 mg p.a./L de glifosato, el crecimiento poblacional se vio completamente inhibido.

Los resultados de los efectos del principio activo y del Roundup en la tasa de multiplicación (TM), evaluados a diferentes tiempos de exposición, se observan en las Tablas IV.4.2 a IV.4.4 y en la Figura IV.4.2. El ANOVA Factorial de estos datos (Tabla IV.4.2) indican efectos significativos en la variación de la TM ($p \leq 0,05$) asociados al tipo de producto, concentración de glifosato y el tiempo de exposición. Se observa interacción entre los factores tiempo de exposición y concentración de glifosato, y entre el tipo de producto con la concentración de glifosato, mientras que la interacción entre el tiempo de exposición y el tipo de producto no es significativa (Tabla IV.4.2). En la Figura IV.4.2 se puede observar que el porcentaje de inhibición en la TM, durante el tiempo de exposición, no posee el mismo patrón de variación con el incremento de la concentración de glifosato. A la concentración de 0,5 mg p.a./L de glifosato (como p.a. o Roundup) no se detectaron cambios en la TM durante el tiempo de exposición evaluado (Tabla IV.4.3). A concentraciones mayores, sí hay efecto significativo durante la exposición, aunque a 1 mg p.a./L de glifosato, para ambos productos, los efectos detectados en la TM son mayores durante los primeros días, observándose luego una inversión de la tendencia, con reducción progresiva de la inhibición y recuperación total de los efectos al quinto día de exposición, para el Roundup, y al día décimo para el principio activo sólo (Figura IV.4.2 y Tabla IV.4.3). A 7,5 y 15 mg p.a./L de Roundup, la inhibición se incrementa durante los primeros días de exposición, revertiéndose parcialmente los efectos entre el quinto y el séptimo día de exposición, para luego incrementarse nuevamente la toxicidad hacia el final del ensayo (Figura IV.4.2 b). Para el caso del principio activo, para esas concentraciones, la inhibición registrada en la TM, permanece constante a partir del quinto día de exposición. A 25 mg p.a./L y concentraciones mayores de glifosato, como Roundup o p.a., los efectos se incrementan con el tiempo de exposición, siendo la inhibición de la TM a 60 y 80 mg p.a./L muy alta, no observándose aumento significativo en el número de frondes producidas durante los 10 días de exposición (Figura IV.4.2).

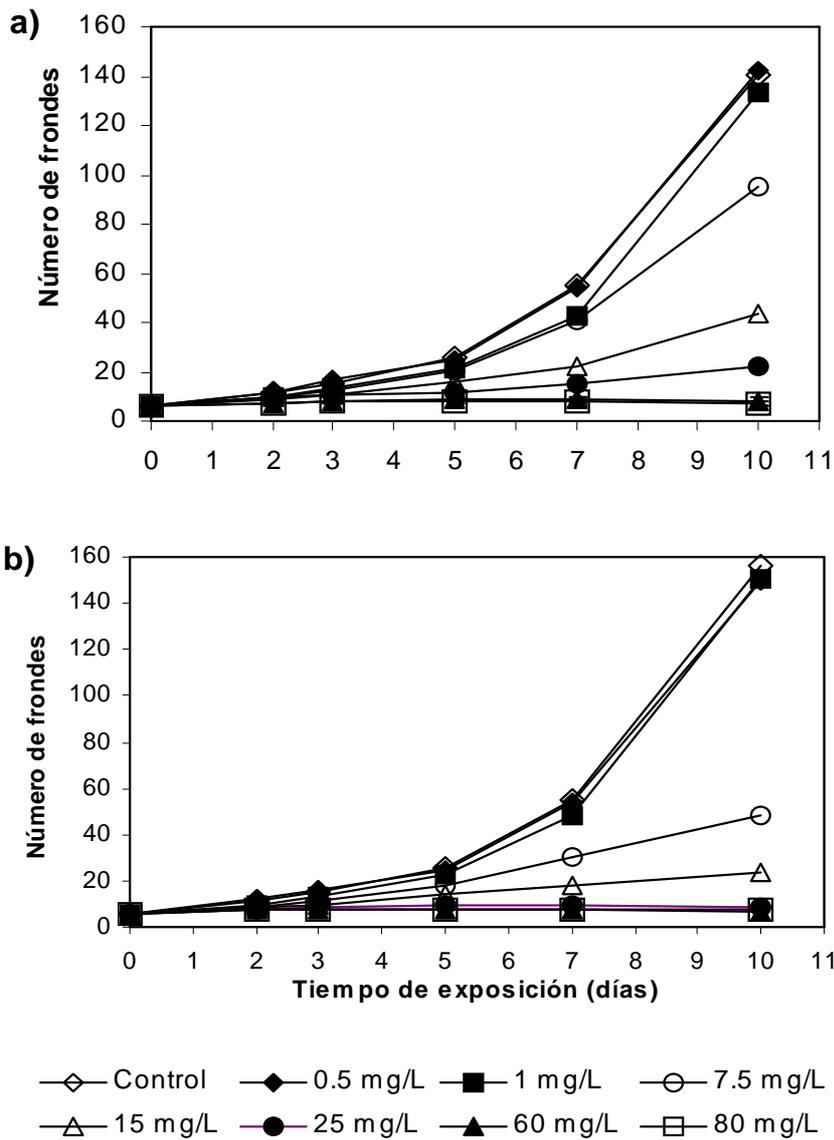


Figura IV.4.1: Efecto del glifosato en las curvas de crecimiento de *Lemna gibba*. Las concentraciones corresponden a mg/L del principio activo (valores nominales al inicio del ensayo). a -Plantas expuestas al glifosato como principio activo; b- Plantas expuestas al glifosato como Roundup®Max. Los valores corresponden al promedio del número de frondes.

Tabla IV.4.1. Curvas de crecimiento de *Lemna gibba* durante 10 días de exposición a diferentes concentraciones de glifosato.

Producto	Concentración de exposición (mg/L) [*]	Curva de regresión	R ²	Curva de regresión con transformación logarítmica [@]	R ²
Principio Activo	Control	$y = 5,96 e^{0,314x}$	0,998	$y = 0,32 x + 1,77^a$	0,984
	0,5	$y = 6,10 e^{0,311x}$	0,995	$y = 0,32 x + 1,81^a$	0,992
	1	$y = 5,36 e^{0,308x}$	0,990	$y = 0,30 x + 1,68^a$	0,971
	7,5	$y = 5,69 e^{0,278x}$	0,996	$y = 0,28 x + 1,73^b$	0,976
	15	$y = 6,16 e^{0,192x}$	0,994	$y = 0,19 x + 1,83^c$	0,957
	25	$y = 1,55 x + 5,39$	0,961	—	—
	60	$y = 0,21 x + 6,88$	0,571 [#]	—	—
	80	$y = 0,13 x + 6,85$	0,384 [#]	—	—
Roundup[®]	Control	$y = 5,96 e^{0,314x}$	0,998	$y = 0,32 x + 1,77^a$	0,984
	0,5	$y = 5,98 e^{0,3161x}$	0,995	$y = 0,32 x + 1,79^a$	0,995
	1	$y = 5,14 e^{0,3263x}$	0,991	$y = 0,32 x + 1,62^a$	0,976
	7,5	$y = 5,93 e^{0,2166x}$	0,992	$y = 0,22 x + 1,75^b$	0,951
	15	$y = 6,32 e^{0,1414x}$	0,987	$y = 0,14 x + 1,85^c$	0,858
	25	$y = 0,25 x + 7,10$	0,504 [#]	—	—
	60	$y = 0,03 x + 7,07$	0,016 [#]	—	—
	80	$y = 0,13 x + 6,71$	0,483 [#]	—	—

Concentración nominal de glifosato como principio activo o Roundup[®]. [@]Curvas de regresión con transformación logarítmica del número de frondes. Las pendientes de las ecuaciones seguidas por la misma letra, no son estadísticamente diferentes (Tukey, $p > 0,05$). [#] Al no haber crecimiento a estas concentraciones de exposición, no hay correlación significativa entre el número de frondes producidas y el tiempo transcurrido, por lo que los valores de R² no son relevantes.

Tabla IV.4.2: ANOVA factorial de las variables tasa de multiplicación, crecimiento foliar y número de frondes por colonia.

Tasa de Multiplicación [#]			
Fuente de variación	GL	F	p
Concentración de glifosato	7	394,4	0,000
Producto	1	37,2	0,000
Tiempo de exposición	3	8,6	0,000
Concentración *Producto	7	8,4	0,000
Concentración * Tiempo de exposición	21	7,3	0,000
Producto* Tiempo de exposición	7	2,5	0,058
Error	435	-	-

Tabla 2: continuación**Crecimiento Foliar: Eje Longitudinal #**

<i>Fuente de variación</i>	<i>GL</i>	<i>F</i>	<i>p</i>
Concentración de glifosato	4	56,6	0,000
Producto	1	8,0	0,005
Tiempo de exposición	1	17,6	0,000
Edad de la Fronde	1	3632,0	0,000
Concentración *Producto	4	26,6	0,000
Concentración * Tiempo de exposición	4	8,1	0,000
Concentration*Edad	4	3,8	0,004
Producto* Tiempo de exposición	1	5,0	0,026
Producto* Edad	1	4,3	0,038
Tiempo de exposición * Edad	1	1,4	0,232
Error	2261	-	-

Crecimiento Foliar: Eje Transversal #

<i>Fuente de variación</i>	<i>GL</i>	<i>F</i>	<i>p</i>
Concentración de glifosato	4	155,5	0,000
Producto	1	24,9	0,000
Tiempo de exposición	1	33,5	0,000
Edad de la Fronde	1	1133,7	0,000
Concentración *Producto	4	37,9	0,000
Concentración * Tiempo de exposición	4	6,8	0,000
Producto* Tiempo de exposición	1	0,3	0,579
Producto* Edad	1	15,4	0,000
Tiempo de exposición * Edad	1	45,8	0,000
Error	2257	-	-

Número de Frondes por Colonia #

<i>Fuente de variación</i>	<i>GL</i>	<i>F</i>	<i>p</i>
Concentración de glifosato	7	175,3	0,000
Producto	1	1,1	0,297
Tiempo de exposición	1	5,3	0,021
Concentración *Producto	7	3,2	0,004
Concentración* Tiempo de exposición	7	12,3	0,000
Producto* Tiempo de exposición	1	0,0	1,000
Error	714	-	-

Las interacciones a niveles superiores no son significativas. GL: grados de libertad; F: razón de los cuadrados medios; *p*: probabilidad.

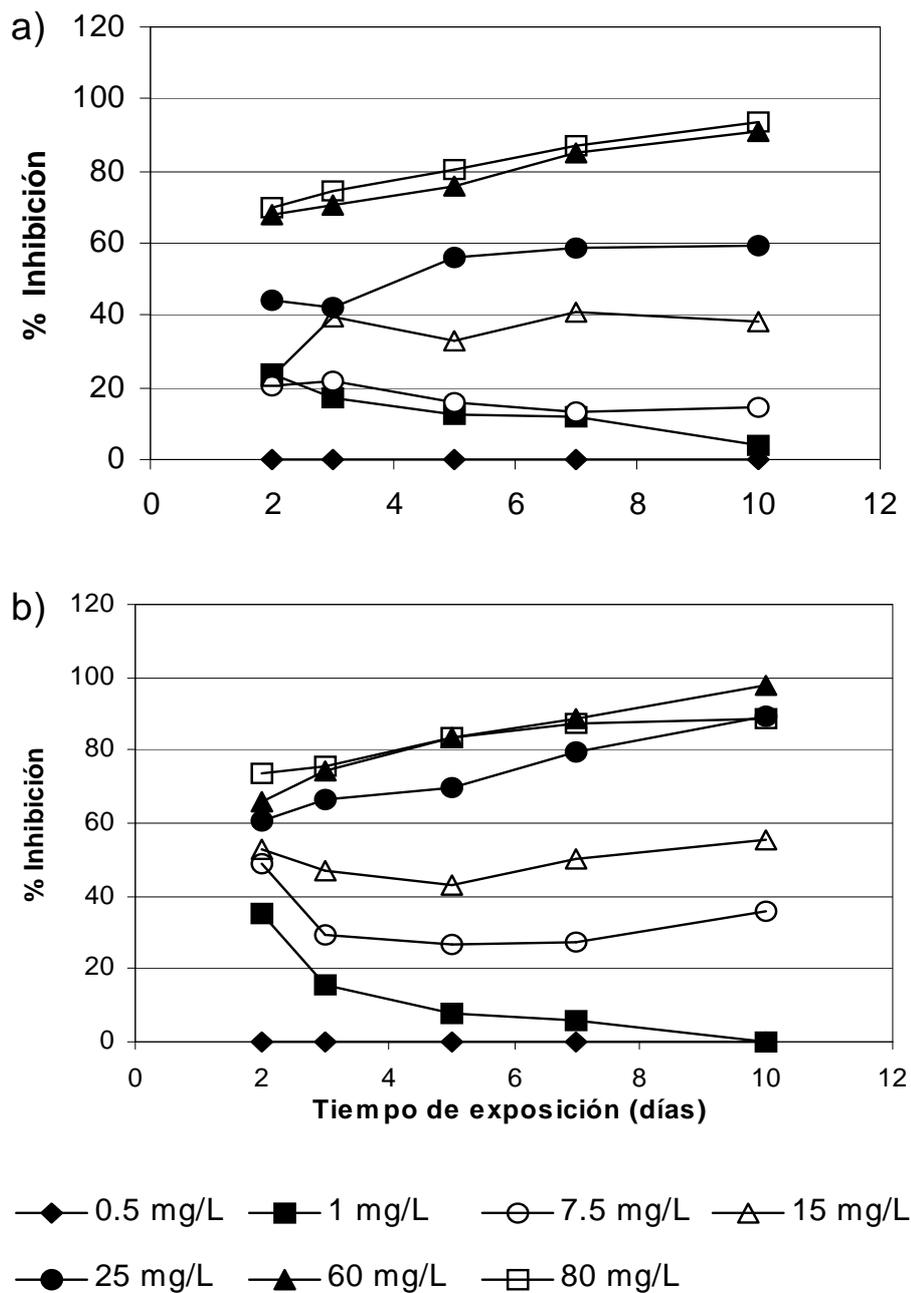


Figura IV.4.2: Efecto del tiempo de exposición al glifosato en la inhibición de la tasa de multiplicación en *Lemna gibba*. Las concentraciones corresponden a mg/L del principio activo (valores nominales al inicio del ensayo). a -Plantas expuestas al principio activo; b- Plantas expuestas a Roundup®Max. Valores promedio de los porcentajes de inhibición en la tasa de multiplicación.

Tabla IV.4.3: Efecto del glifosato, como principio activo y como formulado Roundup®Max, en la tasa de multiplicación de *Lemna gibba* durante 10 días de exposición.

Producto	Días	Tasa de Multiplicación (d ⁻¹) [#]								
		Concentración de Glifosato (mg p.a./L) ^{##}								
		0	0,5	1	7,5	15	25	60	80	
Principio activo	2	140 ^a	150 ^a	107 ^{A b}	112 ^{A b}	107 ^{A b}	78 ^{A c}	45 ^{A d}	42 ^{A d}	
		(22,2)	(18,1)	(30,1)	(19,5)	(28,2)	(15,2)	(12,9)	(13,2)	
	5	126 ^a	125 ^a	111 ^{A b}	106 ^{A b}	84 ^{AB c}	56 ^{A d}	31 ^{AB e}	25 ^{A e}	
		(10,4)	(2,9)	(9,6)	(7,3)	(4,3)	(12,2)	(11,8)	(11,1)	
	7	137 ^a	137 ^a	121 ^{A b}	119 ^{A b}	81 ^{B c}	57 ^{A d}	21 ^{B e}	18 ^{B e}	
		(8,6)	(7,8)	(8,4)	(6,3)	(5,1)	(8,3)	(9,3)	(5,6)	
	10	140 ^a	140 ^a	134 ^{B a}	120 ^{A b}	86 ^{AB c}	57 ^{A d}	13 ^{B e}	9 ^{B e}	
		(2,5)	(3,9)	(5,1)	(4,9)	(2,1)	(4,3)	(8,1)	(4,5)	
	Roundup®	2	140 ^a	150 ^a	91 ^{A b}	72 ^{A bc}	66 ^{A bc}	55 ^{A cd}	48 ^{A d}	37 ^{A d}
			(22,2)	(12,8)	(23,3)	(15,8)	(14,8)	(16,7)	(19,6)	(11,3)
5		126 ^a	124 ^a	116 ^{B a}	93 ^{B b}	72 ^{A c}	38 ^{AB d}	21 ^{B e}	21 ^{A e}	
		(10,4)	(2,5)	(11,9)	(8,8)	(8,1)	(11,2)	(6,5)	(5,7)	
7		137 ^a	137 ^a	129 ^{B b}	99 ^{B c}	68 ^{A d}	28 ^{BC e}	15 ^{B f}	17 ^{A f}	
		(8,6)	(10,1)	(7,9)	(8,7)	(4,2)	(8,9)	(5,9)	(4,6)	
10		140 ^a	141 ^a	143 ^{B a}	90 ^{B b}	63 ^{A c}	15 ^{C d}	5 ^{C d}	16 ^{A d}	
		(2,5)	(8,6)	(5,4)	(6,6)	(1,6)	(4,2)	(1,2)	(4,1)	

[#] Los valores corresponden a los promedios indicándose los desvíos estandar entre paréntesis. Las medias seguidas por la misma letra mayúscula, para cada columna, o por la misma letra minúscula, para cada fila, no difieren estadísticamente entre sí (Tukey p >0,05). ^{##} Concentración nominal de glifosato como principio activo o Roundup®Max

Al considerar la sensibilidad de la especie en relación a la CI₂₅ y CI₅₀ (Tabla IV.4.4), la comparación entre productos indica una mayor toxicidad del glifosato en el formulado comercial Roundup respecto del principio activo sólo. Sin embargo al evaluar la respuesta para bajos porcentajes de efecto, el principio activo mostró mayor toxicidad que el producto formulado, siendo el valor de la CI₁₀ inferior a 1 mg p.a./L luego de siete días de exposición, incrementándose ese valor hasta 4,6 mg p.a./L a los 10 días de ensayo. De manera contraria, la CI₁₀ del glifosato formulado, no muestra gran variación con el tiempo de exposición, produciendo el Roundup, durante los primeros días de ensayo, menor toxicidad en la tasa de multiplicación, respecto del principio activo solo. Para el caso de la CI₂₅ o CI₅₀, con el principio activo se produce un leve incremento de la toxicidad en los primeros días de exposición, manteniéndose luego constante la respuesta entre los siete y diez días de ensayo. La exposición al Roundup no generó el mismo comportamiento, siendo al inicio de la exposición muy tóxico, luego este efecto disminuye, pero se vuelve a incrementar posteriormente, a partir del quinto día de ensayo,

observándose una disminución en los valores de CI_{25} y CI_{50} (Tabla IV.4.4). La variación de estos parámetros a lo largo del tiempo coincide con las observaciones previamente realizadas, con relación a la Figura IV.4.2, en la inhibición en la tasa de multiplicación por exposición al Roundup. Mediante los cocientes entre las estimaciones de la $CI_{\text{principio activo}}$ y la CI_{Roundup} (Tabla IV.4.5) se puede comparar la diferencia en la sensibilidad de *L. gibba* al principio activo glifosato respecto del formulado Roundup. Se observa que en la mayoría de los casos el Roundup es aproximadamente el doble más tóxico, siendo luego de dos días de exposición mucho mayor esta diferencia (desde 3,6 hasta 30 veces más tóxico; Tabla IV.4.5).

Tabla IV.4.4: Sensibilidad del clon de *L. gibba* al glifosato como principio activo y el formulado Roundup[®]Max: efecto en la tasa de multiplicación durante el tiempo de exposición.

Tiempo de Exposición (días)	Tasa de Multiplicación: Concentración Inhibitoria (mg/L) ^a					
	Principio Activo			Roundup [®]		
	CI_{10}	CI_{25}	CI_{50}	CI_{10}	CI_{25}	CI_{50}
2	0,5<CI<1,0*	15,1 (3,8-21,8)	33,1 (21,6-47,9)	0,5<CI<0,9*	0,5<CI<0,9*	9,2 (4,4-17,3)
5	0,5<CI<1,0*	11,4 (8,9-13,5)	22,6 (20,3-25,7)	2,1 (0,96-3,7)	6,5 (4,5-8,4)	15,9 (14,3-17,5)
7	0,5<CI<1,0*	10,7 (9,6-11,7)	20,2 (18,4-22,2)	2,1 (0,99-3,3)	6,1 (4,7-7,7)	13,5 (12,7-14,5)
10	4,6 (2,4-6,7)	10,7 (9,9-11,4)	20,5 (19,6-21,7)	2,5 (2,3-2,7)	5,0 (4,5-5,5)	11,6 (10,9-12,1)

Los valores entre paréntesis corresponden al intervalo de confianza (95%),*La estimación de la CI_{10} o CI_{25} no fue posible para el intervalo de concentraciones ensayadas. ^a Concentración nominal de glifosato como principio activo o Roundup[®] Max

Tabla IV.4.5: Relación de toxicidad en la tasa de multiplicación de *L. gibba* entre el principio activo glifosato y el formulado Roundup[®]Max.

Tiempo de Exposición (días)	Concentración Inhibitoria _{Principio Activo} / Concentración Inhibitoria _{Roundup[®]}		
	$CI_{10 \text{ p.a.}}/CI_{10 \text{ R}}$	$CI_{25 \text{ p.a.}}/CI_{25 \text{ R}}$	$CI_{50 \text{ p.a.}}/CI_{50 \text{ R}}$
2	~ 1	17 > $CI_{\text{p.a.}}/CI_{\text{R}}$ < 30	3,6
5	0,24 > $CI_{\text{p.a.}}/CI_{\text{R}}$ < 0,48	1,8	1,4
7	0,24 > $CI_{\text{p.a.}}/CI_{\text{R}}$ < 0,48	1,8	1,5
10	1,8	2,1	1,8

Con relación al efecto del glifosato en el crecimiento poblacional se puede destacar:

- Los efectos del glifosato en las curvas de crecimiento poblacional se manifiestan a partir de la exposición a 7,5 mg p.a./L, durante los 10 días de exposición, tanto al principio activo como al producto formulado.
- La inhibición en la TM producida a los pocos días de la exposición a CEA de glifosato (1mg p.a./L como de p.a. o como formulado) se revierte luego de 5 (formulado) y 10 (p.a.) días de ensayo. Los efectos por exposiciones a concentraciones mayores se mantienen o incrementan con el aumento del tiempo de exposición.
- Los efectos en las curvas de crecimiento y en la TM por exposición al formulado Roundup fueron mayores a los observados por exposición a concentraciones equivalentes del p.a.

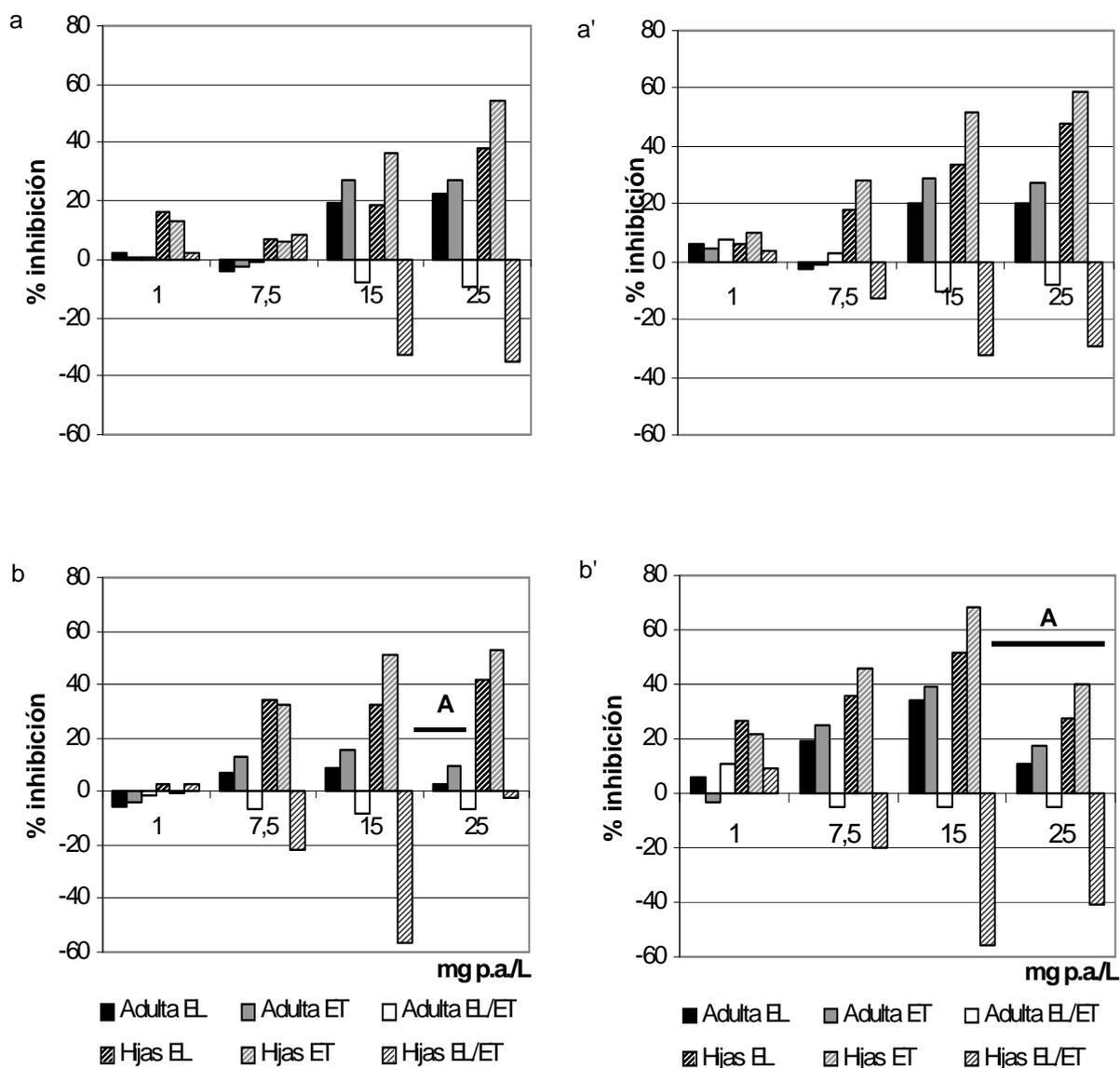
IV.4.3.2 Efecto del glifosato en el crecimiento foliar

La Tabla IV.4.2 muestra los resultados del ANOVA factorial de la evaluación de los efectos del herbicida en el crecimiento foliar, considerando de manera independiente las medidas del eje longitudinal (EL) y del eje transversal (ET) de las frondes. Se observan diferencias significativas en la longitud de ambos ejes asociada al tipo y concentración de producto, edad de las frondes y tiempo de exposición. Considerando las interacciones entre dos factores, todas fueron significativas, con excepción de la interacción entre los factores tiempo de exposición y edad de las frondes para el EL, y entre los factores tiempo de exposición y producto, para el ET.

La Figura IV.4.3 muestra los efectos en el crecimiento foliar expresados mediante la inhibición de la elongación de los ejes longitudinal (EL) y transversal (ET), discriminando la respuesta para las frondes madres respecto de las frondes hijas, luego de 7 y 10 días de exposición a diferentes concentraciones de glifosato como principio activo y como Roundup. Se debe aclarar que la evaluación de los efectos en el crecimiento foliar no se ha realizado para los mayores niveles de exposición, tanto al principio activo como al Roundup, dado que se registra una gran inhibición en la tasa de multiplicación, subestimándose la cuantificación de los efectos en el crecimiento foliar (Por ejemplo, a 25 mg p.a./L de Roundup -Figura IV.4.3, b y b'- y concentraciones mayores, no graficadas). En la Tabla IV.4.6 se indican los valores de las CI_{10} , CI_{25} y CI_{50} para la respuesta en los ejes longitudinal y transversal de las frondes madres e hijas, a 7 y 10 días de exposición.

La mayor inhibición en el crecimiento foliar se observó asociada al Roundup, aún por exposición (10 días) a 1 mg p.a./L del herbicida, (Figura IV.4.3), siendo siempre mayor el efecto en las frondes hijas. Por otra parte, la exposición al herbicida como p.a. produjo efectos significativos en el crecimiento foliar solamente a partir de concentraciones de 15 mg p.a./L.

Los efectos de ambas formas del herbicida en el área y crecimiento foliar se evidencian en la reducción tanto del eje longitudinal como del eje transversal de la fronde. No obstante se



observa una respuesta diferencial, siendo mayor la inhibición en el eje transversal que en el longitudinal, produciéndose frondes más angostas, además de más pequeñas (Figuras IV.4.3 y IV.4.4). Esta diferencia en la respuesta fue mayor en las frondes hijas, según lo indican los bajos valores de las relaciones EL/ET, para las frondes de menor edad. Asociado a la edad de las frondes, también se detecta sensibilidad diferencial al herbicida: las frondes madres fueron siempre menos inhibidas que las frondes hijas, tanto en el EL como en el ET, y para ambos productos, resultando mas conveniente la evaluación de este tipo de respuesta en las últimas (Figuras IV.4.3 y IV.4.4, Tabla IV.4.6).

Tabla IV.4.6: Sensibilidad del clon de *L. gibba* al glifosato como principio activo y el formulado Roundup® Max: efecto en el crecimiento foliar durante el tiempo de exposición.

<i>Concentración Inhibitoria (mg/L)^a: Crecimiento Foliar</i>							
<i>Principio Activo</i>							
Días	Eje [#]	Frondes madres			Frondes hijas y yemas		
		CI ₁₀	CI ₂₅	CI ₅₀	CI ₁₀	CI ₂₅	CI ₅₀
7	EL	14,1 (11,41-19,98)	> 25	> 25 *	0,5>CI ₁₀ <1 *	16,2 (5,65-23,72)	> 25 *
	ET	11,2 (10,14-12,43)	16,0 (13,17-23,32)	> 25 *	0,5>CI ₁₀ <1 *	7,3 (2,49-13,25)	> 25 *
10	EL	10,2 (8,13-11,93)	15,8 (12,78-23,23)	> 25 *	8,5 (3,98-10,19)	11,9 (9,17-14,50)	22,1 (17,01-24,81)
	ET	10,1 (8,99-10,86)	14,5 (13,19-17,89)	> 25 *	6,3 (1,22-9,30)	10,2 (7,90-12,27)	18,3 (14,23-22,94)
Roundup® Max							
Días	Eje [#]	Frondes madres			Frondes hijas y yemas		
		CI ₁₀	CI ₂₅	CI ₅₀	CI ₁₀	CI ₂₅	CI ₅₀
7	EL	9,7 (6,13-16,34)	> 25 *	> 25 *	2,7 (1,25-3,97)	6,2 (3,92-12,65)	> 25 *
	ET	5,3 (3,99-6,18)	> 25 *	> 25 *	2,8 (1,46-3,82)	6,0 (4,50-7,94)	13,6 (11,24-14,98)
10	EL	2,8 (1,39-4,25)	10,1 (7,81-12,23)	> 25 *	0,5<CI<1,0*	3,8 (1,09-9,05)	12,7 (6,76-14,88)
	ET	3,4 (3,07-3,78)	7,0 (6,25-8,11)	> 25 *	0,5<CI<1,0*	2,6 (1,13-4,54)	8,8 (6,47- 10,91)

Los valores entre paréntesis corresponden al intervalo de confianza (95%), *La estimación de la CI no fue posible para el intervalo de concentraciones ensayadas.

EL: eje longitudinal de la fronde; ET: eje transversal de la fronde.

^a Valores estimados considerando la concentración nominal de glifosato como principio activo o Roundup® Max.

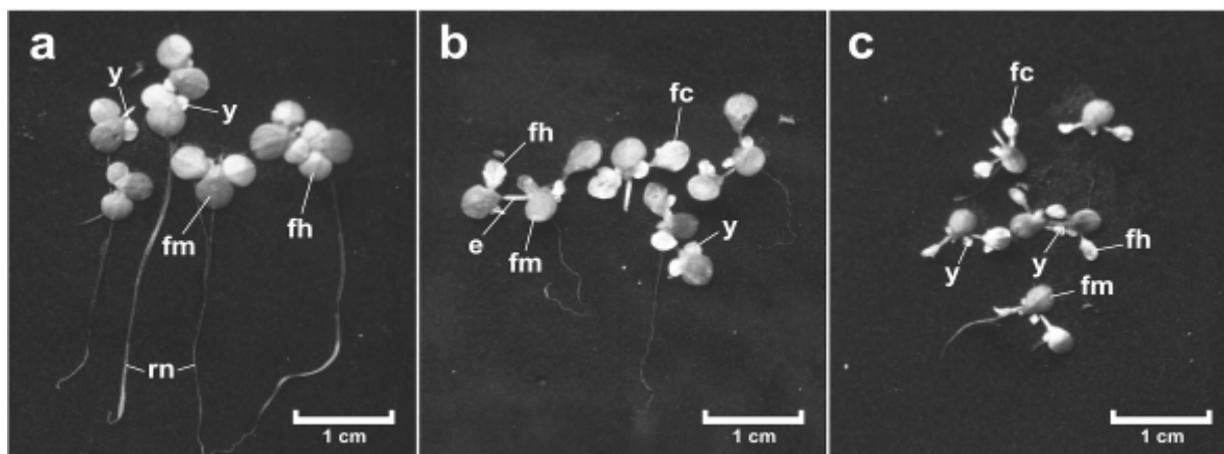


Figura IV.4.4: Efecto del Roundup[®]Max en el crecimiento foliar, contenido de clorofila y arquitectura de la colonia de *Lemna gibba* luego de 10 días de exposición. a- control negativo; b- plantas expuestas a 7,5 mg p.a./L de Roundup[®]Max; c- plantas expuestas a 15 mg p.a./L de Roundup[®]Max; fm: fronde madre; fh: fronde hija; y: yema; e: estipe; fc: fronde clorótica; r: raíz.

Al comparar la respuesta a 7 y 10 días de ensayo (Figura IV.4.3), se observa que los efectos son mayores al incrementarse el tiempo de exposición, con la excepción de la respuesta a bajas concentraciones de p.a. Para este caso particular, si bien se detecta una baja inhibición en las frondes hijas luego de 7 días de ensayo, los efectos son menores al aumentar la exposición (Figura IV.4.3 a y a'). A 7 días de exposición a 1 mg p.a./L de Roundup el crecimiento foliar no se redujo mientras que transcurridos 10 días, la inhibición en el EL y el ET, se hace significativa en las frondes hijas. Cabe recordar que a 1 mg p.a./L no se registraron efectos significativos en la TM a los 10 días de ensayo, mientras sí se sigue evidenciando inhibición al evaluar los efectos en el crecimiento foliar. A los 7 días de exposición a bajas concentraciones de herbicida (1 y 7,5 mg p.a./L de Roundup y p.a., respectivamente), se evidencia una leve, aunque significativa, exaltación del crecimiento de las frondes madres en comparación con las frondes de las poblaciones no expuestas. Al incrementarse el tiempo de exposición (10 días) esta exaltación no se manifiesta, para las concentraciones mencionadas.

La Tabla IV.4.7 muestra la relación de toxicidad del principio activo glifosato respecto al formulado Roundup, expresado mediante el cociente entre la estimación de la $CI_{\text{principio activo}}$ y la CI_{Roundup} para las medidas del EL y ET para las frondes hijas, por ser éstas las más susceptibles. Se observa que, con excepción de la CI_{10} a 7 días de exposición, el Roundup es más tóxico que el principio activo, aumentando esta diferencia marcadamente con el tiempo de exposición. La diferencia en la toxicidad entre ambas formas de glifosato registrada en el crecimiento foliar de las frondes hijas luego de 10 días de exposición, fue mayor aún a la descrita para los efectos en la tasa de multiplicación (Tabla IV.4.5).

Tabla IV.4.7: Relación de toxicidad en el crecimiento foliar de *Lemna gibba* (frondes hijas) entre el principio activo glifosato y el formulado Roundup®Max.

		Concentración Inhibitoria_{Principio Activo}/Concentración Inhibitoria_{Roundup®}		
<i>Tiempo de Eje</i>				
<i>Exposición</i>		CI_{10 p.a.}/CI_{10 R}	CI_{25 p.a.}/CI_{25 R}	CI_{50 p.a.}/CI_{50 R}
(días)				
7	EL	0,19 < CI _{p.a.} /CI _R < 0,37	2,6	~ 1
	ET	0,18 < CI _{p.a.} /CI _R < 0,36	1,2	> 1,8
10	EL	8,5 < CI _{p.a.} /CI _R < 17	3,1	1,7
	ET	6,3 < CI _{p.a.} /CI _R < 13	3,9	2,8

Con relación al efecto del glifosato en el crecimiento foliar se puede destacar:

- La exposición al herbicida glifosato produce mayor inhibición en el crecimiento foliar de *L.gibba* como formulado Roundup que como principio activo sólo, incrementándose la toxicidad con el tiempo de exposición.
- La sensibilidad al glifosato difiere con la edad de las frondes, siendo mayor el efecto en las frondes hijas respecto de las frondes madres.
- La inhibición en el crecimiento foliar se manifiesta con mayor intensidad en el eje transversal de la fronde, evidenciando los cambios en la morfología foliar, además de la reducción del tamaño.

IV.4.3.3 Efecto en el número de frondes por colonia (NFC) y modificaciones en la arquitectura de la colonia (AC).

En las Figuras IV.4.4 y IV.4.5 se indican los efectos en el número de frondes por colonia y en la arquitectura de la colonia luego de 7 y 10 días de exposición al herbicida. Los resultados del ANOVA factorial del NFC se muestran en la Tabla IV.4.2, observándose variación significativa asociada a la concentración del herbicida y al tiempo de exposición al mismo. Los efectos en el NFC se registran a partir de la exposición a 1 mg p.a./L y a concentraciones mayores, modificándose el patrón de respuesta según la concentración. En las exposiciones entre 1 y 15 mg p.a./L, durante 7 y 10 días, se registra un aumento significativo del NFC (reducción en la abscisión de las frondes), registrándose colonias de hasta 12 frondes. Las diferencias entre 7 y 10 días de exposición son leves en este intervalo de concentraciones, observándose mayor agregación a los 10 días (Figura IV.4.5). A concentraciones mayores de exposición al glifosato hay un cambio en el patrón de respuesta, reduciéndose el NFC debido a una mayor abscisión de las frondes hijas de las frondes madres, generando colonias más pequeñas. Si bien no se registran diferencias estadísticas asociadas al tipo de producto (Tabla IV.4.2), siendo la respuesta en el NFC similar por la exposición al p.a. o al producto formulado, existe algunas

variaciones en la exposición a altas concentraciones de Roundup (Figura IV.4.5). El Roundup produce, luego de siete días de exposición, el desagregado de las colonias a concentraciones mayores que el principio activo. No obstante, se evidencia un cambio pronunciado en el NFC entre los 7 (NFC elevado) y 10 (bajo NFC) días de exposición a 25 y 60 mg p.a./L como Roundup (Figura IV.4.5).

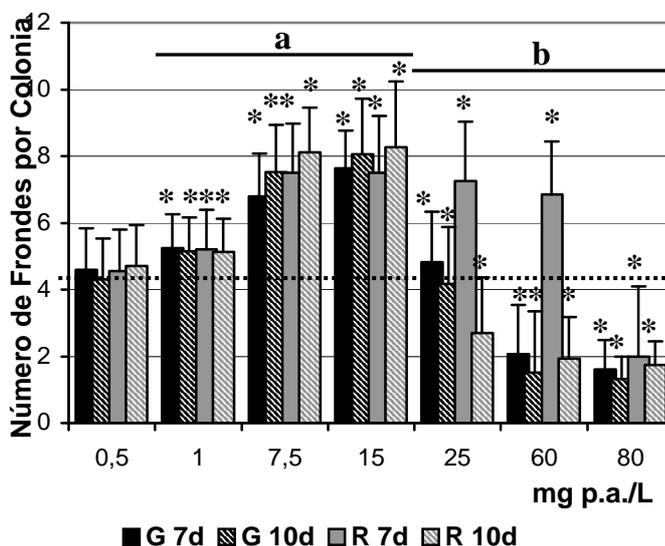


Figura IV.4.5: Efecto del glifosato en el número frondes por colonia a los 7 y 10 días de exposición al principio activo y al formulado Roundup®Max.

La línea punteada indica el valor promedio del número de frondes por colonia en el control negativo. a- intervalo de concentraciones del herbicida que inducen agregación; b intervalo de concentraciones del herbicida que inducen desagregación de la colonia. Las barras de error corresponden al desvío estándar de los valores medios (barras) del número de frondes por colonia.

*valores significativamente diferentes del control (Tukey, $p \leq 0,05$).

Otro efecto fitotóxico observado en las plantas expuestas al glifosato, tanto como principio activo o como producto formulado, es el sobrecrecimiento del pequeño tallo o “estipe” que conecta las yemas y frondes hijas con las frondes progenitoras. En la Figura IV.4.4 se muestran colonias de *L.gibba* expuestas durante 10 días a 7,5 y 15 mg p.a./L como Roundup, observándose el desarrollo de estipes más largos respecto de las plantas control, además de la alteración en el tamaño y forma de las frondes anteriormente mencionado. Este crecimiento diferencial del estipe, junto a las variaciones en el número de frondes por colonia, la reducción en el área foliar y las alteraciones en la morfología foliar, determinan modificaciones en la arquitectura normal de las colonias. Si bien se registra un mayor NFC, hay una estructura más abierta determinando una menor proporción de área cubierta productiva por colonia.

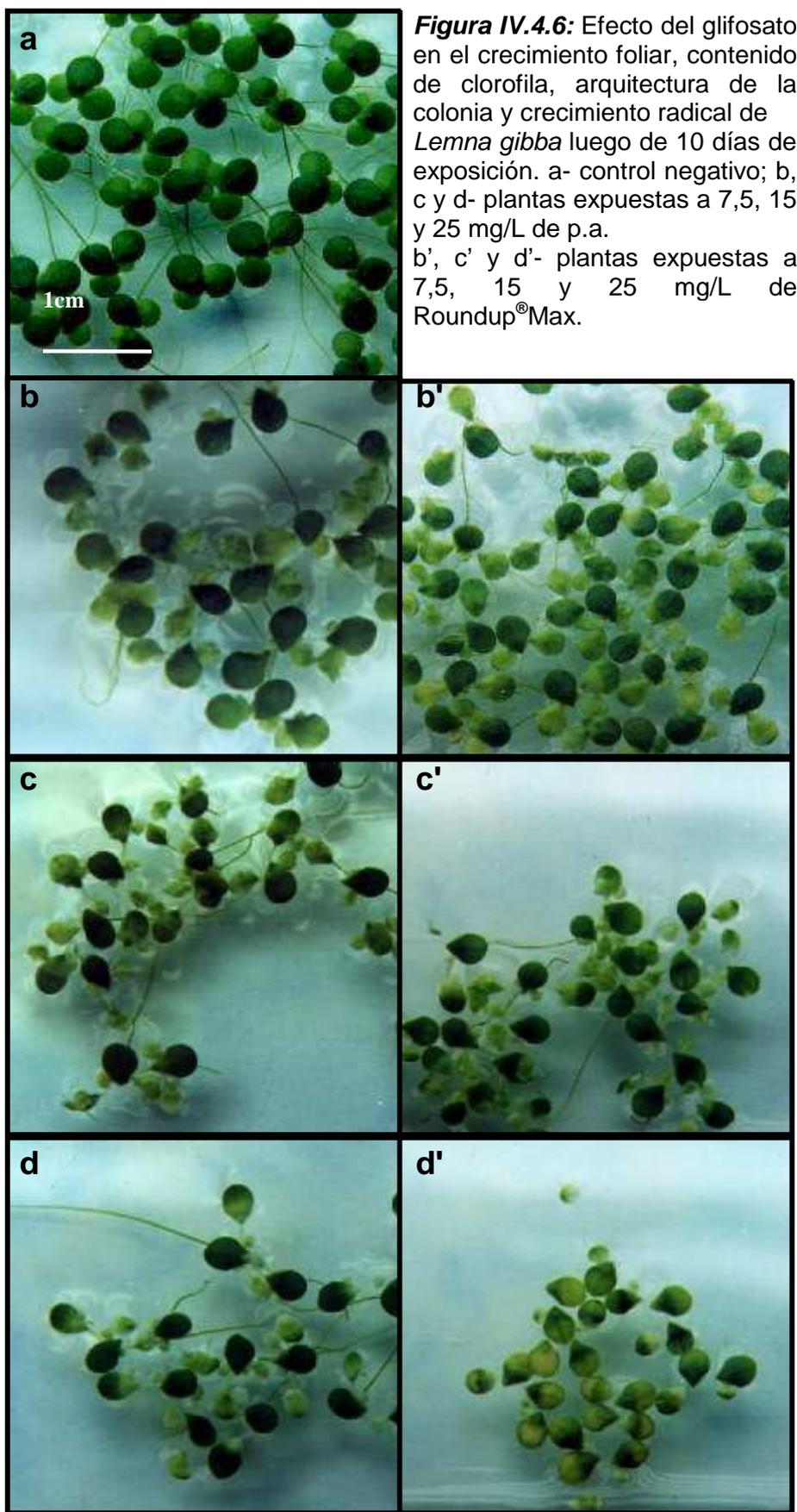
Con relación al efecto del glifosato en el número de frondes por colonia y en la arquitectura de la colonia se puede destacar:

- *La exposición al glifosato produce alteraciones en la abscisión de las yemas y frondes hijas de *L.gibba*, generando por un lado colonias más numerosas de lo normal a bajos niveles de exposición pero aumentando la abscisión y la desagregación de las colonias cuando la exposición es a concentraciones elevadas del herbicida.*
- *La exposición al glifosato determinan modificaciones en la arquitectura normal de las colonias.*

IV.4.3.4 Efectos en el contenido total de clorofila (CTC) y en la elongación de la raíz

La exposición al glifosato produjo clorosis en *Lemna gibba* a partir de los dos días de exposición a 7,5 mg p.a./L y concentraciones mayores, como principio activo y formulado comercial, respectivamente, incrementándose los efectos con el tiempo de exposición (Figuras IV.4.4 y IV.4.6). Cabe destacar que para la exposición a 1 y 7,5 mg p.a./L de Roundup (dos días), se registró exaltación en el CTC, revirtiéndose esta respuesta a mayor tiempo de ensayo. A los 7 días de exposición a 1 mg/L de glifosato como p.a. (CEA) la reducción del CTC de la población es significativa (23%), no siendo así para la misma concentración del formulado Roundup. Si bien a bajas concentraciones los efectos del p.a. fueron mayores que los del formulado, esta tendencia se invierte a concentraciones más altas, produciendo el producto formulado mayor inhibición que el p.a.. Al observar el patrón de clorosis en la colonia de frondes, se verifica que la inhibición es principalmente en las yemas y frondes jóvenes, no así en las frondes madres. Sólo por exposición a altas concentraciones de Roundup (superiores a 25 mg p.a./L) la reducción en el contenido de clorofila fue evidente también en las frondes madres (Figuras IV.4.4 y IV.4.6). Dado que los efectos en el CTC son marcadamente mayores en las frondes hijas y yemas respecto de las frondes adultas desarrolladas en los primeros días de exposición, y esto sumado a la reducción en número y tamaño de las frondes nuevas, la cuantificación de los efectos en el CTC se ve subestimada, principalmente a mayores niveles de inhibición en la TM y CF. Los máximos niveles de efecto no se ven reflejados, subestimando la cuantificación de los efectos en el CTC. Por ejemplo, la CI_{50} estimada a los 7 días de exposición al Roundup fue de 42 mg p.a./L, mientras que a 25 mg p.a./L se observan yemas y frondes hijas totalmente cloróticas (Figura IV.4.6).

Otro efecto que se puede observar en las Figuras IV.4.4 y IV.4.6 por exposición al glifosato, es la inhibición en la elongación de las raíces. Se verifica inhibición significativa a 7,5 mg/L como p.a. y formulado a partir del tercer día de exposición.



Con relación al *efecto del glifosato en el contenido de clorofila y en la elongación de la raíz* se puede destacar:

- *La exposición al herbicida glifosato produce inhibición en la elongación de las raíces y clorosis marcada, evidenciándose la reducción en el CTC primero y con mayor intensidad en las yemas y frondes hijas.*

IV.4.3.5 Control de calidad del ensayo

A lo largo del ensayo las condiciones de crecimiento en los controles negativos se mantuvieron exponenciales. El control del pH durante el ensayo indica un incremento en los valores de este parámetro a lo largo del tiempo de exposición. Los valores de pH variaron desde 6,5 al inicio del ensayo hasta un valor final máximo de 7,8 a los 10 días de exposición (media \pm DE: 7,59 \pm 0,118; n:14). La evaluación de la concentración de glifosato durante el tiempo de exposición indica un intervalo de decaimiento entre el 12% (para 1 mg p.a./L) y el 33% (para 15 mg p.a./L) luego de 4 días de exposición. Esta disminución en la concentración inicial del glifosato se mantuvo más o menos constante hasta finalizar el ensayo.

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que la exposición de *Lemna gibba* a partir de 1 mg p.a./L de glifosato produce efectos significativos en el crecimiento poblacional, en el crecimiento foliar y en el número de frondes por colonia además de cambios en la arquitectura de la colonia. Es de destacar que este nivel de exposición está en el orden de la concentración de glifosato esperada en el ambiente (CEA: 1,59 y 0,40 mg p.a./L de glifosato, para la máxima y mínima dosis de aplicación, respectivamente) de acuerdo a las dosis recomendadas para las diferentes prácticas del control de malezas.

Una característica común en la exposición al p.a. y al producto formulado, al considerar la respuesta en la tasa de multiplicación (TM) y en el contenido de clorofila (CTC), es que la fitotoxicidad se manifestó tempranamente (2 días de exposición), en relación a lo descrito para especies terrestres. En el control de malezas, luego de una aplicación del producto formulado, están previstos signos de clorosis luego de 4-7 días, en gramíneas muy susceptibles, y entre 10 y 20 días en las especies menos sensibles (WSSA, 1994). No obstante, si bien la TM es un buen punto final de evaluación de efectos, manifestando inhibición a bajas concentraciones y luego de un tiempo breve de exposición, se observó que, tanto en la exposición al p.a. como el formulado, estos efectos se revierten al extenderse el tiempo de exposición. Si bien la recuperación en la TM es evidente, los efectos en los demás puntos finales se mantienen o incrementan a lo largo del tiempo de exposición, a pesar que las nuevas frondes que se van desarrollando están expuestas a concentraciones menores del herbicida debido al decaimiento en el tiempo de los niveles de glifosato. Por lo tanto, la TM puede ser considerada como un buen punto final indicador de fitotoxicidad para tiempo breve de exposición pero no se puede interpretar la recuperación de este parámetro como una

condición de 'buena salud' de los individuos o la población. La inhibición en otros puntos finales (crecimiento foliar, número de frondes por colonia), aún cuando los efectos en la TM se han revertido, indica claramente que la exposición al herbicida continúa generando toxicidad y que el metabolismo vegetal está aún siendo afectado. La exposición de *L. gibba* a concentraciones altas de glifosato, entre 15 y 80 mg p.a./L, determina curvas de toxicidad típicas, incrementándose la toxicidad con el tiempo de exposición.

Otro aspecto a considerar al evaluar la exposición a bajas concentraciones del herbicida es la exaltación en la respuesta en algunos puntos finales, como se observó en el crecimiento foliar y en el contenido de clorofila. Este tipo de respuesta hormética también fue descrita por Lockhart et al. (1989) para el crecimiento poblacional de *L. minor* por exposición a un intervalo de concentraciones de glifosato entre 2,28 y 22,8 mg p.a./L. Además, Peterson et al. (1994) han registrado exaltación en el crecimiento de varias especies de algas expuestas a 2,84 mg/L de Roundup® (si se considera un 40% de contenido de p.a., sería equivalente a una exposición de glifosato de 1,14 mg p.a./L). En consecuencia, la aparente recuperación del crecimiento poblacional, simultáneamente con la inhibición en otros parámetros, además de la exaltación o respuesta de tipo hormética, debe ser considerada cuidadosamente al establecer niveles guía de exposición para la protección de la flora acuática y riparia. Esta amplia gama de respuestas observada en los diferentes puntos finales, muestra además la relevancia y complementariedad de evaluar la toxicidad considerando los efectos en diversos parámetros, abarcando de esta manera distintas respuestas fisiológicas del organismo.

La sensibilidad del clon de *Lemna gibba* en bioensayos de laboratorio permitió detectar efectos fitotóxicos a concentraciones muy bajas de exposición al Roundup®, del orden de la CEA. La comparación de los resultados obtenidos, con los registrados por otros autores para otras especies de Lemnáceas, indica una alta sensibilidad de este clon local al glifosato. Por ejemplo, en *L. minor* luego de 15 días de exposición a 22,8 mg p.a./L, no se observó inhibición en las curvas de crecimiento (Lockhart et al., 1989) ni en el número de frondes producidas por exposición a 1,5 mg p.a./L durante siete días (Peterson et al., 1994). Michel et al. (2004) informan, para *L. paucicostata*, la CE₅₀ de 66 mg p.a./L para la tasa de crecimiento (midiendo área foliar) luego de siete días de exposición. Para el caso de *L. gibba*, el estudio de la sensibilidad de 20 clones geográficamente diferentes, muestra que los valores de CE₅₀, evaluando el número de frondes a los 15 días de exposición, se hallan entre 16 y 58 mg p.a./L (Paradiso Giles, 2000). Considerando la respuesta en diferentes especies de algas expuestas a 2,85 mg p.a./L del formulado Roundup® (1,5 mg p.a./L, aproximadamente), se observa una amplia variabilidad en la sensibilidad al herbicida al cuantificar la incorporación de C¹⁴ como punto final de toxicidad (entre el 73–77% en las diatomeas *Cyclotella meneghiana* y *Nitzschia* sp. y entre el 3–18% en las clorofitas *Selenastrum capricornutum* y *Scenedesmus quadricauda*; Peterson et al., 1994). Tsui & Chu (2003) también informan una gran diferencia en la sensibilidad al glifosato en dos especies de algas, observando además que la toxicidad es

significativamente mayor para la exposición al formulado Roundup® respecto del p.a. sólo: para la diatomea *Skeletonema costatum* la CI_{50} fue de 2,27 y 1,85 mg p.a./L, para el p.a. y formulado, respectivamente, mientras que para la clorofita *Selenastrum capricornutum* fue 24,7 mg p.a./L, para el p.a., y 5,81 mg p.a./L, para el formulado. La Secretaría de Recursos Hídricos de la Nación (SRHN), para el establecimiento de *Niveles guía nacionales de calidad de agua ambiente correspondiente al glifosato*, cita efectos significativos en el crecimiento de las clorofitas *S. capricornutum* y *Chlorella sorokiniana* a valores de $CE_{50, 72 - 96 h}$ de 2,1 y 8 mg/L de Roundup®, respectivamente y 189 mg/L ($CE_{50 - 7 d}$) para *Chlorella pyrenoidosa*. Para el glifosato (sal IPA), la SRHN informa que valores entre 2 y 590 mg/L ($CE_{50, 4d}$) afectan el crecimiento de las algas *Anabaena variabilis* y *Chlorella pyrenoidosa* (SRHN, 2003a).

Martin & Ronco (2006) estudiaron el efecto del Roundup®Max en la germinación de semillas y crecimiento de plántulas de diferentes especies terrestres, observando una gran variabilidad en la sensibilidad de las mismas, con valores de CI_{50} (elongación de radícula, 96h) de 9,9, 15,3, 56,2, 131,8, 1164,3 mg p.a./L para *Lactuca sativa*, *Lolium perenne*, *Medicago sativa*, *Allium cepa* y *Brassica napus*, respectivamente. Estos autores no observaron inhibición en la germinación para estas especies para estos niveles de exposición. Al comparar la sensibilidad de *L.gibba* con los efectos registrados para estas especies terrestres (Martin & Ronco, 2006), se observa que la sensibilidad en el clon de Lemnácea es similar a la observada para la *L. sativa* pero significativamente mayor, con valores de CI_{50} de hasta dos órdenes de magnitud menor, que las demás especies consideradas. Por otra parte, estos autores evaluaron la variación de la toxicidad del glifosato en la elongación de la radícula de *L. sativa*, cuando la exposición al herbicida es en mezclas junto a otros productos fitosanitarios. Observaron que la toxicidad del glifosato se incrementa cuando la exposición es junto con el insecticida cipermetrina y en la mezcla del glifosato con los insecticidas clorpirifos y cipermetrina (Martin & Ronco, 2006).

Estudios realizados por Pline et al. (2002) en plántulas de *Gossypium hirsutum* indican alteraciones en la morfología y el crecimiento radical, así como el desarrollo de raíces laterales, obteniendo además valores de CI_{50} de 3,9, 11,7 y 4,5 mg p.a./L en el crecimiento de los cotiledones, hipocótilo y la elongación de la radícula, respectivamente. Ronco et al. (2008) evaluaron la toxicidad del glifosato en el suelo (a la dosis recomendada de aplicación en el cultivo: 4 L/ha con 36% de p.a.) sobre la germinación y el crecimiento de *Capsicum annum*. Estos autores observaron, luego de 48 d de crecimiento de las plantas, inhibición significativa en la producción de biomasa seca aérea y radical, en el número de hojas y en la actividad mitótica y elongación celular de los ápices radicales, observando no obstante, aumento en el CTC y proteínas totales de las hojas (Ronco et al., 2008).

Considerando el modo de acción del glifosato en vegetales, la reducción en crecimiento foliar, elongación de raíz e inhibición en la tasa de multiplicación podría ser el resultado de alteraciones a diferentes niveles del sistema. Por un lado, la inhibición de la síntesis de

aminoácidos aromáticos produciría un déficit en la disponibilidad de proteínas necesarias para el crecimiento y desarrollo foliar y radical normal. Estos efectos en la síntesis de proteínas podrían interferir en numerosas rutas metabólicas por ausencia o reducción de enzimas específicas, pudiendo ser ésta la causa de la disminución en la síntesis de clorofila. Por otra parte, la inhibición en la producción del triptofano estaría interfiriendo en la síntesis normal de auxinas y, consecuentemente, en la estimulación del crecimiento de las frondes, en la actividad meristemática (formación de yemas y raíces nuevas) y en la elongación de las raíces (Salisbury & Ross, 1994; WSSA, 1994; Blackburn & Boutin, 2003). La presencia de un alto número de frondes por colonia en las plantas expuestas a concentraciones de glifosato entre 1 a 15 mg p.a./L, así como la elongación diferencial de los estipes, podría asignarse a alteraciones en la producción normal de etileno regulado por auxinas, afectando los mecanismos de abscisión normal de las frondes y de elongación de estipes (Landolt, 1986; Li & Xiong, 2004a,b). Considerando de manera integrada los efectos observados tanto a nivel del CTC, CF y TM, la inhibición en estos parámetros se traduce en disminución en la productividad general del sistema. Es importante mencionar además, que la interferencia del glifosato en el metabolismo de numerosos y variados compuestos fenólicos simples y moléculas derivadas, con funciones diversas y en muchos casos desconocidas (Ej: alteraciones en la síntesis de lignina, suberina, fitoalexinas, flavonoides, etc.), tendría efectos con consecuencias difíciles de evaluar en aspectos relacionados al desarrollo de plantas saludables y resistencia a las enfermedades, interacción con herbívoros, competencia interespecífica, polinización, etc. (Salisbury & Ross, 1994; Crawley, 1997; Blackburn & Boutin, 2003).

Si bien la absorción del glifosato es a través de la cutícula cerosa de las hojas, (WSSA, 1994; Blackburn & Boutin, 2003), la matriz del polímero de cutina es la principal barrera para la transferencia de moléculas polares como el glifosato a través de la cutícula vegetal. Inclusive aún después de extraídas las ceras cuticulares, el pasaje del glifosato a través de las cutículas sólo se incrementa levemente (Santier & Chamel, 1998). La sal isopropilamínica del glifosato se absorbe más fácilmente que el ácido, mientras que el agregado de surfactantes y de sulfato de amonio (coadyuvante presente en muchos formulados de glifosato) favorece aún más la entrada del producto a través de la cutícula. El pasaje al interior de la célula a través de la membrana plasmática es muy lento debido posiblemente a las cargas negativas del glifosato a pH fisiológico, estando este transporte favorecido por un transportador fosfato (WSSA, 1994). Las Lemnáceas, como otras macrófitas flotantes, no poseen la cutícula muy desarrollada, estando además los órganos sumergidos muchas veces desprovistos de cutícula (Landolt, 1986), por lo que el ingreso del glifosato al tejido de la fronde sería más fácil. Por otro lado, las frondes de Lemnáceas poseen una relación área-volumen alta y, al estar flotando, se ubican paralelas a la superficie del agua, por lo que también es mayor la superficie de exposición al tóxico, ya sea en solución o por contacto superficial directo. Además, y esto en relación al riesgo de exposición por deriva en una aplicación, estos organismos no poseen anexos

epidérmicos como pelos o escamas superficiales o el desarrollo de cera epicuticular que les darían una mayor protección, siendo muy susceptibles a los tóxicos en general. Es importante considerar que las Lemnáceas, como todos los organismos del pleuston, son especialmente susceptibles a sustancias tensoactivas, compuestos hidrofóbicos o toda aquella sustancia localizada en la interfase aire-agua. Por otra parte, en ambientes naturales el riesgo para estos organismos es mayor ya que, la formación de películas superficiales de materia orgánica concentran no solo nutrientes sino que también contaminantes orgánicos y metales pesados, aportando mayor toxicidad a los organismos ubicados en esta interfase (Waite, 2001).

De la comparación de la toxicidad del p.a. con relación al formulado comercial, se observa de manera general que en todos los parámetros de toxicidad considerados, el herbicida glifosato presenta mayor fitotoxicidad para *Lemna gibba* cuando es utilizado en un formulado comercial, para concentraciones equivalentes de p.a.. Esta mayor toxicidad del formulado respecto del principio activo estaría dada por la presencia de coadyuvantes. Como se mencionó en el Capítulo I.4.1, el POEA (polioxietilen amina) es uno de los surfactantes presentes en el Roundup, constituyendo entre el 15 y 20% del producto formulado. Los estudios realizados por Tsui & Chu (2003) en algas, indican que los coadyuvantes aportan hasta el 86% de la toxicidad producida por el Roundup. Por un lado, la mayor toxicidad del formulado estaría asociada a la interacción de los componentes surfactantes con la cutícula y/o membrana celular, lo que incrementaría la disponibilidad del p.a. para la célula vegetal. Por otra parte, la propia acción de los surfactantes en la permeabilidad de las membranas biológicas estaría determinando alteraciones en la fisiología celular. Contrariamente a los resultados obtenidos en este trabajo y a los citados por Tsui y Chu (2003), Martin et al. (2008) comparan la toxicidad de los componentes principales del Roundup en ensayos de germinación con semillas de *Lactuca sativa* (96h), no observándose diferencias significativas entre la toxicidad generada por la exposición al Roundup y al principio activo. La SRHN (2003a) cita valores de Roundup® de 0,78 y 56 mg/L como no tóxicos para las especies *Myriophyllum sibiricum* y *Lemna gibba*, respectivamente (NOEC_{14 d}, inhibición del crecimiento) mientras que valores de glifosato (sal IPA) de 1,6 y 25,5 mg p.a./L (CE_{50, 14 d}) sí afectan significativamente el crecimiento de *M. sibiricum* y *L. gibba*, respectivamente.

Como se ha mencionado anteriormente en los resultados, la concentración de principio activo en solución se redujo parcialmente en los primeros días de ensayo, por lo que el aumento y persistencia de la toxicidad observada en la TM por exposición a 7,5 y 15 mg p.a./L (Figura IV.4.2), luego de una recuperación parcial, podría también deberse a la acción tóxica más persistente de los coadyuvantes del formulado comercial. Otro aspecto a considerar es que la toxicidad de POEA es mayor a pH alcalino (Blackburn & Boutin, 2003; Krogh et al 2003; Tsui & Chu, 2003). El POEA está como catión a pH ácido o neutro pero se convierte en no iónico a pH alcalino. De esta manera, la forma no iónica de este surfactante podría generar una mayor toxicidad a los organismos, principalmente por disrupción no específica a nivel de

membrana (Tsui & Chu, 2003). Dado el incremento del pH a lo largo del tiempo de exposición en las condiciones experimentales, el aumento en la toxicidad de los surfactantes podría contribuir a la variación en la respuesta tóxica observada al aumentar el tiempo de exposición a las concentraciones entre 7,5 y 15 mg p.a./L (Figura IV.4.2b). Es importante considerar la mayor toxicidad del POEA asociada a pH alcalinos en la evaluación del riesgo de las comunidades vegetales acuáticas por exposición al Roundup en ambientes naturales, así como los diferentes aspectos que afectan la biodisponibilidad de este herbicida (principio activo y sus coadyuvantes) en estos ambientes acuáticos. En presencia de arcillas y/o material orgánico soluble o particulado, la sal de isopropilamina de glifosato se adsorbe fácilmente a éstos, estando menos disponible para las plantas (no así para organismos animales filtradores!!). Esto mismo ocurre con el surfactante POEA que se adsorbe al material particulado orgánico y a arcillas siendo esto mayor cuando se encuentra en su forma química catiónica, a pH ácido o neutro, (Krogh et al., 2003; Tsui & Chu, 2003; Tsui & Chu, 2004). De esta forma, para la máxima CEA de glifosato, la fracción biodisponible para las plantas vasculares y las algas sería menor, dependiendo de las características fisicoquímicas del cuerpo de agua receptor. Por otra parte, en la evaluación del riesgo por exposición a la CEA del glifosato, es fundamental considerar el tipo de formulado utilizado, ya que una determinada CEA puede ser peligrosa para los organismos acuáticos si el formulado de glifosato es el Roundup (con aproximadamente 15% de POEA como surfactante), el formulado Roundup Bioactive (componentes surfactantes no declarados) o de menor peligrosidad si es el formulado Rodeo® (sin agregado de POEA) (Tsui & Chu, 2004). Dado que a partir del año 2000 dejó de tener vigencia la protección de patente del Roundup por la firma Monsanto Co., además del incremento en el desarrollo e implementación de cultivos genéticamente modificados resistentes al glifosato, el número de formulados diferentes de glifosato disponibles en el mercado está aumentando considerablemente. Por lo tanto, y siendo que es mayor la toxicidad del glifosato como producto formulado respecto del p.a sólo, es importante considerar los diferentes tipos y concentraciones de coadyuvantes utilizados en las formulaciones comerciales al evaluar el riesgo del uso de herbicidas sobre especies no blanco, tanto vegetales como animales.

Al comparar los resultados de los ensayos de laboratorio con los obtenidos por Martin et al. (2003) en experimentos a campo con la misma especie, se observa una buena correlación en la respuesta en ambos sistemas de exposición de Lemnáceas a bajas concentraciones de glifosato. Los ensayos a campo fueron realizados exponiendo a las plantas directamente a las aplicaciones del herbicida en sistemas de limnocorales en un arroyo que atraviesa cultivos de soja RR (Pergamino, Bs. As.). La dosis aplicada en el cultivo fue de 1,5 kg/ha de Roundup® Max y la máxima concentración de glifosato medida en el agua de este arroyo, asociada a los eventos de aplicación, fue de 1,6 mg p.a./L (Peruzzo et al., 2003). Los resultados indicaron fitotoxicidad por exposición al herbicida, observándose efecto significativo en el CTC (75,5%) y

en la producción de biomasa seca (35,5%) en *L. gibba* a los 5 días de la aplicación. De acuerdo a las dosis recomendada de uso del formulado Roundup®Max para el control de malezas (0,8 a 3,2 kg/ha), la concentración esperada en el ambiente acuático se encuentra entre 0,34 y 1,59 mg a.i./L. Por lo tanto, y de acuerdo a la sensibilidad observada para *Lemna gibba*, es de esperar efectos adversos en la flora riparia de cuerpos de agua de agroecosistemas, asociado al uso del Roundup para el control de malezas durante el manejo del cultivo.

IV.4.4 CONCLUSIONES

- Los efectos fitotóxicos del glifosato se observan en los diferentes puntos finales considerados, indicando que las alteraciones se manifiestan en diferentes aspectos de la fisiología de los organismos. La mayor sensibilidad por exposición al glifosato se registra en el crecimiento foliar de las yemas y frondes hijas.
- La exposición de *Lemna gibba* a partir de 1 mg p.a./L de glifosato, en el orden de la concentración esperada en el ambiente (CEA), produce inhibición significativa en el crecimiento foliar y en el número de frondes por colonia, además de cambios en la arquitectura de la colonia.
- La fitotoxicidad del glifosato se incrementa con el tiempo de exposición.
- La sensibilidad de *L. gibba* al glifosato difiere con la edad de las frondes, siendo mayor el efecto en las yemas y frondes hijas respecto de las frondes madres.
- En todos los parámetros de toxicidad considerados, el herbicida glifosato presenta mayor fitotoxicidad para *L. gibba* cuando es utilizado en el formulado comercial Roundup®Max, para concentraciones equivalentes de principio activo.
- La utilización de diferentes puntos finales para la evaluación de la fitotoxicidad del glifosato y el formulado Roundup®Max, aporta información complementaria permitiendo estimar el daño en diversos parámetros fisiológicos a diferentes niveles y tiempos de exposición.
- La sensibilidad del clon local de *L. gibba* (LgP) permite detectar toxicidad a niveles de glifosato factibles de encontrar en los cuerpos de agua asociados a agroecosistemas de la región pampeana.
- El clon LgP considerado en este trabajo, es un organismo de referencia de gran utilidad en la evaluación del impacto del uso del herbicida glifosato en las especies vegetales acuáticas no blanco.
- Para los niveles aplicación del glifosato asociados a cultivos RR, y dada la sensibilidad de especies acuáticas como *L. gibba*, existe el riesgo de impacto en flora riparia no blanco por exposición a este herbicida en estos agroecosistemas.

IV. 5 BIODISPONIBILIDAD DE CONTAMINANTES EN AGUAS SUPERFICIALES: EVALUACIÓN DE LA FITOTOXICIDAD DE METALES PESADOS Y DEL HERBICIDA GLIFOSATO EN *Lemna gibba*.

IV. 5 BIODISPONIBILIDAD DE CONTAMINANTES EN AGUAS SUPERFICIALES: EVALUACIÓN DE LA FITOTOXICIDAD DE METALES PESADOS Y DEL HERBICIDA GLIFOSATO EN *Lemna gibba*.

IV.5.1 INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Si bien en capítulos anteriores (Capítulos IV.3 y IV.4) se ha realizado una detallada caracterización de la toxicidad de los metales Cu(II), Cr(VI) y Cd(II) y del herbicida glifosato para la especie *L. gibba* en ensayos de laboratorio en solución nutritiva como medio de ensayo, estos resultados no siempre representan a los escenarios naturales de exposición de las plantas vasculares a estos contaminantes ambientales. Si bien abundan en la bibliografía ejemplos de estudios de laboratorio en los que se utilizan soluciones de crecimiento estandarizadas como medio de ensayo para la evaluación de los efectos fitotóxicos de metales pesados y otros contaminantes en especies acuáticas (Van Steveninck et al, 1992. Sajwan & Ornes, 1994; Boutin et al, 1995; Mohan & Hosetti, 1999; Li & Xiong, 2004b), ese no es el caso para estudios de laboratorio utilizando aguas de ambientes naturales como medio de exposición (Maine et al., 2004; Miretzky et al., 2004). Teniendo en cuenta estos antecedentes, se plantea la evaluación del efecto del medio en la modificación de la toxicidad de metales pesados y glifosato, mediante un estudio comparativo de exposición de *L. gibba* en solución nutritiva de crecimiento, con características fisicoquímicas estandarizadas, y en aguas de ambientes naturales con características fisicoquímicas propias del sitio.

La especiación de los metales en los cuerpos de agua superficiales está determinada por las características fisicoquímicas de los mismos, condicionando en la biota su biodisponibilidad, incorporación y, consecuentemente, su toxicidad. Está bien documentada la reducción de la toxicidad de los metales por complejación a la materia orgánica disuelta y particulada (Gerzabek & Ullah, 1990a,b; Christensen & Christensen, 2000; Van Veen et al., 2002), así como la variación de la biodisponibilidad asociada al pH, dureza, alcalinidad, relación Ca^{2+}/Mg^{2+} , etc. (Newman & Jagoe, 1996; Naddy et al., 2003; Manahan, 2007). Si bien existen en Argentina antecedentes de evaluación de variación de la toxicidad y acumulación de metales en ambientes naturales para especies animales (Porta & Ronco, 1993; Gómez et al., 1998; Cataldo et al., 2001; Villar et al, 2001; Carriquiriborde & Ronco, 2002; Carriquiriborde & Ronco, 2008), los estudios ecotoxicológicos con plantas vasculares son escasos para esta región. Investigaciones recientes se han centrado principalmente en estudios de bioacumulación, tendientes a evaluar la aplicación de plantas vasculares para la fitoextracción de metales en ambientes acuáticos naturales y su aplicación en sistemas de depuración de aguas contaminadas (Villar et al, 1998; Maine et al., 2004; Miretzky et al., 2004; Hadad et al., 2006; Maine et al., 2007).

Como se ha visto en capítulos anteriores (Capítulos III.2 y IV.3) las plantas vasculares presentan una gran variabilidad en la sensibilidad a la exposición a metales pesados, así como en la capacidad de bioacumularlos, sin que ello genere fitotoxicidad. Varios autores han evaluado la capacidad de muchas Lemnáceas de acumular metales pesados, siendo estos organismos ampliamente recomendados para su uso en procesos de fitoremediación (Landolt & Kandeler, 1987; Van Steveninck et al., 1992; Sajwan & Ornes, 1994; Wahaab et al., 1995; Boniardi et al., 1998; Prasad et al., 2001; Dirilgen & Dogan, 2002; Miretzky et al., 2004).

El conocimiento de la toxicidad de los metales sobre especies de la flora local, así como su capacidad de acumularlos o bioconcentrarlos, es de relevancia para su potencial aplicación en estudios de riesgo ecotoxicológico, aplicaciones en la fitoextracción y fitoremediación de efluentes y de ambientes acuáticos contaminados. Por otra parte, las Lemnáceas como organismos productores, constituyen la base de algunas tramas tróficas en ambientes naturales, por lo que se torna relevante conocer su rol en los procesos de biomagnificación a niveles tróficos superiores. Es por ello que en este trabajo, se evaluará además, la capacidad de bioacumulación del Cu(II), Cr(VI) y Cd(II) en *L. gibba*, en medios con diferentes características fisicoquímicas.

Para el caso del glifosato, también está documentada la variación de la eficiencia como herbicida, y por lo tanto su toxicidad para especies no blanco, con relación a las características fisicoquímicas del medio de exposición. Como se mencionó en el Capítulo I.4 si bien el glifosato es de alta solubilidad, en los cuerpos de agua superficiales se adsorbe fuertemente a la arcilla, limo y materia orgánica del sedimento y al material particulado en suspensión, disminuyendo de esta manera la biodisponibilidad (WSSA, 1994; Cox, 1998; Morillo et al., 2000; Information Ventures, Inc., 2002). Esto mismo se verifica también para los diferentes coadyuvantes que forman parte de los formulados comerciales (Tsui & Chu, 2003; Wang et al., 2005). Con relación a esto, para el caso de la región pampeana, los sistemas acuáticos superficiales varían en sus características fisicoquímicas, siendo el pH en muchos de ellos predominantemente neutro a alcalino y niveles altos de materia orgánica soluble y particulada (Conzonno & Fernández Cirelli, 1988; Conzonno & Claverie, 1990; Mercado, 2000; Gabellone et al., 2001; Gómez & Licursi, 2001; Mugni, 2009).

Este trabajo no se ha diseñado para el estudio detallado de los diferentes factores que determinan la biodisponibilidad de los contaminantes en ambientes acuáticos naturales, sino que tiene por fin evaluar la representatividad de los resultados de los bioensayos de toxicidad con *Lemna*, con metales pesados y el herbicida glifosato, en aguas artificiales (solución nutritiva de crecimiento), respecto de la toxicidad de los mismos por exposición en aguas naturales de mayor complejidad. Para ello se tendrá en consideración la metodología ya desarrollada de cálculo de la Relación Agua-Efecto (RAE), para establecer criterios de calidad de aguas para sitios específicos (Welsh et al., 2000). La Relación Agua-Efecto se define como la razón entre la toxicidad de un contaminante en el agua de un sitio dado y su toxicidad en solución nutritiva

estandarizada de laboratorio. Estos ensayos permiten obtener una aproximación sobre cuál sería la protección asociada a las condiciones naturales, tomando como ejemplo de ello, arroyos característicos de la región pampeana.

Se proponen como objetivos de este estudio:

- *Evaluar la influencia de las características fisicoquímicas de aguas superficiales en la variación de la toxicidad de los metales pesados Cu(II), Cd(II) y Cr(VI) y del herbicida glifosato, en la especie L. gibba, comparando la exposición en la solución nutritiva de crecimiento y en el agua de arroyos de la Provincia de Buenos Aires.*
- *Evaluar la bioacumulación, en L. gibba, de los metales Cu(II), Cd(II) y Cr(VI), luego de la exposición en la solución nutritiva de crecimiento y en el agua de arroyos de la Provincia de Buenos Aires.*

IV.5.2 METODOLOGÍA

Se utilizó el clon local de *L.gibba* (LgP) para estudiar de manera comparativa la variación de la fitotoxicidad de los metales Cobre (II), Cromo (VI) y Cadmio (II) y del herbicida glifosato (formulado Roundup®Max) en solución, en medios de ensayo con características fisicoquímicas diferentes. Se comparó la biodisponibilidad de estos contaminantes mediante ensayos de toxicidad en laboratorio utilizando como medio de exposición, la solución nutritiva de crecimiento de *Lemna* (Capítulo IV.1.4) y las aguas de arroyos de la pampa deprimida de la Provincia de Buenos Aires. La variación de la toxicidad de los metales se evaluó en aguas de los arroyos Juan Blanco y Vitel, mientras que la del herbicida glifosato en aguas del A° El Sauce.

IV.5.2.1 Muestras ambientales y determinación de parámetros fisicoquímicos

El A° El Sauce es afluente del A° El Pescado, siendo este último tributario del Río de la Plata. A lo largo de su recorrido atraviesa una región rural, desarrollándose en sus márgenes mayoritariamente actividad agrícola-ganadera. En las márgenes del A° Juan Blanco, tributario también del Río de la Plata, se verifican actividades agrícola ganaderas, atravesando, en su tramo inferior hasta la desembocadura, la reserva natural de la UNESCO, la estancia El Destino. El A°Vitel (sur) nace en la Laguna Vitel y vierte sus aguas en la Laguna Chascomús. Estos cuerpos de agua pertenecen a la cuenca del Río Salado (Buenos Aires) siendo la actividad de la región mayoritariamente ganadera. En la Figura IV.5.1 se muestran imágenes de los arroyos en el sitio donde fueron tomadas las muestras (A° Vitel 35°32'26"lat., 58°4'30" long.; A° Juan Blanco: 35°8'31"lat., 57°26'37"long.; A° El Sauce: 35°1'41"lat., 58°0'15" long.). Se observa el sector muestreado del A° El Sauce, en la intersección con la ruta provincial 36,

próximo a la localidad de Olmos, atravesando un cultivo de soja RR. El agua de los arroyos para realizar los ensayos se obtuvo luego de una semana después de la última lluvia registrada y, para el caso del A° El Sauce, transcurridos dos meses desde la última aplicación de herbicidas o plaguicidas en el cultivo. El muestreo de los arroyos Vitel y Juan Blanco se realizó en la primavera de 2002 y el A° El Sauce en otoño de 2006. La selección de los A° Juan Blanco y Vitel, para el estudio de biodisponibilidad y acumulación de metales, se realizó considerando sus diferencias fisicoquímicas de acuerdo a los trabajos de Conzonno & Fernández Cirelli (1988) y Mercado (2000), los que muestran antecedentes de mayor concentración de HCO_3^- , Cl^- , Na^+ , K^+ y relación $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ para el A° Vitel respecto del A° Juan Blanco.

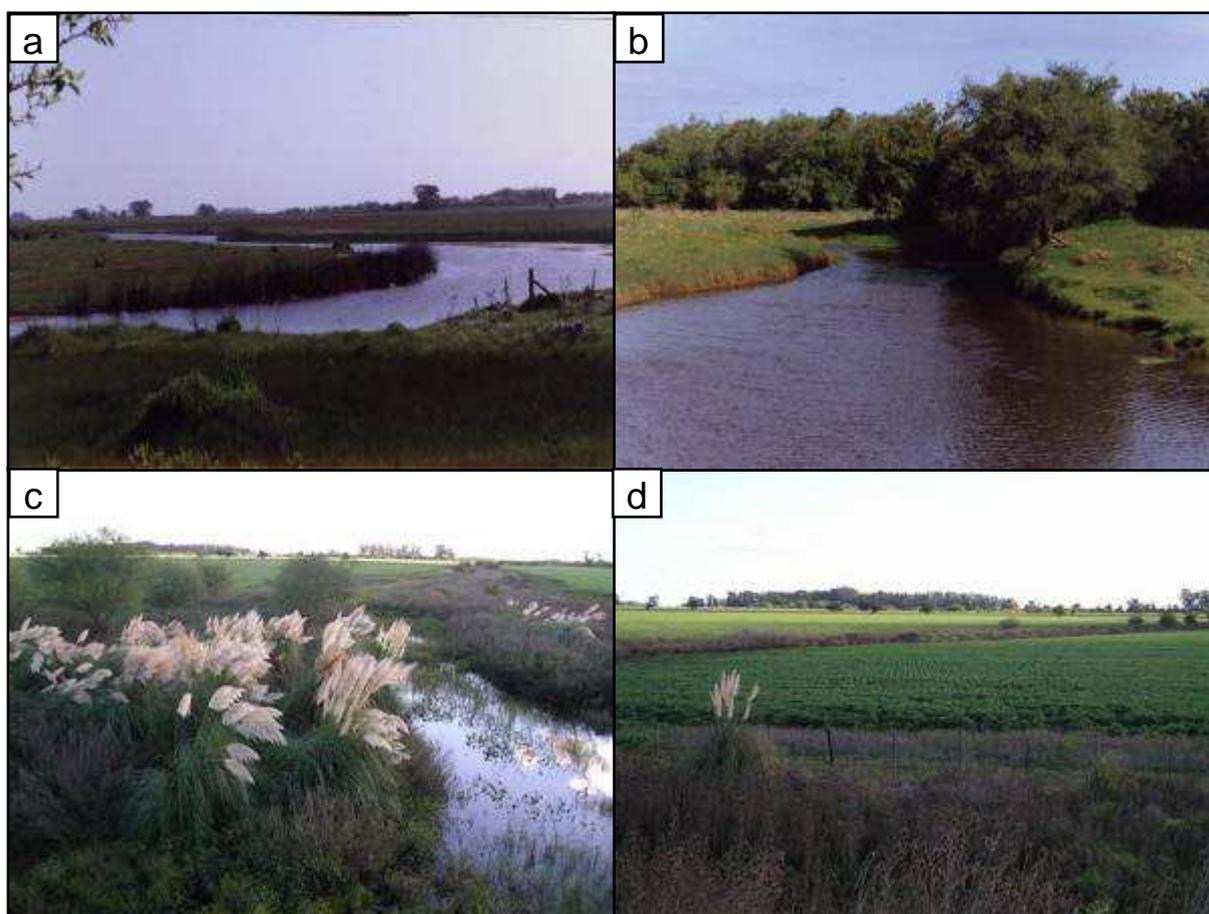


Figura IV.5.1. a- A° Vitel (Buenos Aires); b- A° Juan Blanco (Buenos Aires); c- A° El Sauce (afluente del A° El Pescado, Buenos Aires). d- Cultivo de soja transgénica (Resistente al glifosato) a ambas márgenes del A° El Sauce.

La determinación de los parámetros fisicoquímicos de las aguas de los arroyos se realizó de acuerdo a la siguiente metodología: el fósforo reactivo soluble (FRS) (molibdato-ascórbico) y los NO_3^- y NO_2^- (reducción de Cd seguida de diazotación) se determinaron siguiendo la técnica de Strickland & Parsons (1972). El NH_4^+ (azul indofenol) se midió de acuerdo con Mackereth et al.

(1978). La determinación de nutrientes se realizó a partir de muestras previamente filtradas con filtros Whatman GF/C. El Ca^{2+} y Mg^{2+} (titulación con EDTA), Na^+ y K^+ (fotometría de llama), HCO_3^- (Gran titration), SO_4^{2-} (turbidimetría) y Cl^- (titulación con AgNO_3) se determinaron según APHA (1998) a partir de las muestras sin filtrar. El material en suspensión se determinó por diferencia de pesada luego de filtrar la muestra por filtros Whatman GF/C. El carbono orgánico particulado se determinó de acuerdo con Golterman et al. (1978), mediante la digestión de los filtros usados para la cuantificación del material en suspensión. El carbono orgánico total se midió en las muestras de agua sin filtrar, previamente fijadas en el campo con H_2SO_4 (Golterman et al., 1978). La temperatura, conductividad, pH y turbidez se midieron directamente en el arroyo con un medidor multiparámetro portátil (Horiba U-10).

IV.5.2.2 Evaluación de la toxicidad y bioacumulación de los metales pesados Cu(II), Cr(VI) y Cd(II).

Las condiciones experimentales de los ensayos de toxicidad para los metales Cu(II), Cr(VI) y Cd(II), corresponden a las descritas en el Capítulo IV.1.7. El ensayo se inició colocando 8 frondes (33 mgPF/L) de *L. gibba*, exponiendo a los organismos en recipientes con 300 mL de las diluciones de cada metal en la solución nutritiva de crecimiento y en las aguas de los arroyos Juan Blanco y Vitel.

Para asegurar condiciones no limitantes de crecimiento, y para lograr las mismas concentraciones que en la solución nutritiva, a las plantas expuestas en las aguas naturales se le realizó el sobreagregado de macro y micronutrientes (Environment Canada, 1999b). Se realizó la renovación parcial, cada 2 o 3 días, de la solución de ensayo durante los 14 días de exposición, manteniendo una relación en el incremento de la renovación de 1:3 a 1:1 del volumen de solución, en función del aumento de la biomasa vegetal. En las diluciones con agua de los arroyos, no se realizó el ajuste del pH al inicio de la experiencia, registrándose las variaciones en este parámetro a lo largo de la exposición (Environment Canada, 1999b).

El diseño experimental para el ensayo incluye el estudio de la toxicidad del Cu(II), Cr(VI) y Cd(II) a diferentes concentraciones, en solución nutritiva y en agua de los dos arroyos, con al menos tres réplicas por tratamiento. Como puntos finales de evaluación de la toxicidad, se consideraron el efecto en la tasa de multiplicación (TM) y en el contenido total de clorofila (CTC), los cuales fueron medidos a los 14 días de exposición, según lo especificado en el Capítulo IV.1.8. El intervalo de concentraciones iniciales de exposición fue: Cu(II) 0,5 a 3 mg/L; Cr(VI) 0,75 a 8 mg/L y Cd(II) 0,05 a 1,5 mg/L. El intervalo de concentraciones se estableció a partir de resultados previos (Capítulo IV.3.3). Para cada arroyo evaluado, se ensayaron simultáneamente los tres metales. Las diluciones de los metales se prepararon a partir de soluciones de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Anedra), $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (Anedra) y CdSO_4 (Carlo Erba). La concentración de exposición de cada metal se verificó al inicio y durante la experiencia, así como en los controles negativos con solución nutritiva y con las aguas de los arroyos. Todas las

determinaciones de metales se realizaron mediante espectrofotometría de absorción atómica (EAA) por aspiración directa en llama aire-acetileno (Varian Spectra AA) (APHA, 1998), utilizando patrones analíticos de soluciones certificadas (Accu Trace TM). El límite de detección por EAA para los metales estudiados es de 0,01mg/L para el cobre, 0,03 mg/L para el cromo y 0,005 mg/L para el cadmio.

En las plantas expuestas durante 14 días a 0,5 y 0,75 mgCu(II)/L; 0,75 y 1,5 mgCr(VI)/L y a 0,05 y 0,15 mgCd(II)/L, se cuantificó la concentración de metal en los tejidos para evaluar la capacidad de bioacumulación de *L. gibba*. Las plantas fueron cuidadosamente enjuagadas con agua destilada desionizada y posteriormente secadas a 80°C, para estimar el peso seco. Las cenizas obtenidas a partir del material vegetal seco (12 hs en muffle a 475 °C) se digirieron con HNO₃ concentrado, seguido de HCl 6N (Mc Kenna et al., 1993). El contenido total de metales en el material digerido, se analizó mediante EAA. El factor de bioconcentración (FBC) se expresó como el cociente entre la concentración de metal en el tejido vegetal (mg/Kg peso seco) y la concentración inicial de metal en la solución de exposición (mg/L), según lo descrito por Boniardi et al. (1998).

IV.5.2.3 Evaluación de la toxicidad del herbicida glifosato (formulado comercial Roundup® Max).

Las condiciones experimentales de los ensayos de toxicidad para el glifosato, corresponden a las descritas en el Capítulo IV.4.2.

El ensayo se inició con 8 frondes (33 mgPF/L), exponiendo a los organismos en recipientes con 300 mL de las diluciones del herbicida realizadas en la solución nutritiva de crecimiento y en las aguas del A° El Sauce. La exposición al glifosato se realizó en ensayos estáticos (sin renovación de la solución) pero con el sobreagregado de nutrientes a lo largo de los 10 días de exposición. Para asegurar condiciones no limitantes de crecimiento, a las plantas expuestas en las aguas naturales se le realizó el sobreagregado de macro y micronutrientes para lograr las mismas concentraciones que en la solución nutritiva (Environment Canada, 1999b). En las diluciones del herbicida con agua del arroyo, no se realizó el ajuste del pH al inicio de la experiencia, registrándose las variaciones en este parámetro a lo largo del tiempo de exposición. En las diluciones del herbicida realizadas en solución nutritiva, el pH se ajustó al correspondiente al del agua del arroyo al iniciar la exposición. Con el fin de estimar la reducción del principio activo a lo largo del período de ensayo, se verificó la concentración de glifosato en la solución nutritiva al inicio y durante los días de exposición. La metodología de cuantificación del glifosato corresponde a la descrita en el Capítulo IV.4.2.

El diseño experimental para el ensayo con el herbicida incluye la evaluación de la toxicidad del herbicida Roundup® Max, a diferentes concentraciones (1 a 15 mg p.a./L), en solución nutritiva y en aguas del A° El Sauce, con al menos tres réplicas por tratamiento. Se utilizó el formulado Roundup® Max (70,7% de p.a. como ácido), expresando los resultados como

la concentración del principio activo glifosato (mg p.a./L). Como puntos finales de evaluación de la toxicidad, se consideraron el efecto en la tasa de multiplicación (TM) y en el crecimiento foliar (CF), medidos según lo especificado en los Capítulos IV.1.8 y IV.4.2.

IV.5.2.4 Análisis estadístico de los resultados y calculo de la Relación Agua-Efecto (RAE)

El análisis estadístico de los resultados de la toxicidad de los metales y del herbicida, en los diferentes medios de exposición, para los puntos finales considerados, se realizó por ANOVA factorial. Las diferencias en la bioacumulación de metales se evaluaron mediante ANOVA simple. Las diferencias significativas, en las comparaciones múltiples, se analizaron mediante el método de Tukey ($p \leq 0,05$). A partir de las curvas concentración-respuesta de cada punto final se calculó la CI_{10} , y la CI_{50} (Zar, 1996; Environment Canada, 1999a).

A partir de los resultados obtenidos luego de la exposición en los diferentes medios, se calculó la Relación Agua-Efecto (RAE). Se define a la RAE, para cada contaminante, como la relación entre la toxicidad que éste produce en aguas naturales respecto de la que produce este mismo contaminante cuando la exposición se realiza en solución nutritiva estandarizada (Welsh et al., 2000). Los valores de RAE, para los diferentes arroyos y tóxicos estudiados, se calcularon como: $CI_{Arroyo}/CI_{Solución\ nutritiva}$

IV.5.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.5.3.1 Biodisponibilidad del Cu(II), Cr(VI) y Cd(II) en aguas naturales

En la Tabla IV.5.1 se indican las principales características fisicoquímicas de los arroyos Juan Blanco y Vitel (Buenos Aires), así como de la solución nutritiva de crecimiento. La Tabla IV.5.2 muestra los resultados del ANOVA factorial para los efectos en la tasa de multiplicación y el contenido total de clorofila de *L.gibba* luego de los 14 días de exposición a los tres metales. Los valores de TM, a los 14 días de ensayo, a cada concentración de metal y en los diferentes medios de exposición, se muestran en la Tabla IV.5.3. La Tabla IV.5.4 indica los valores de CTC a los 14 días de exposición. Las curvas de inhibición, para los tres metales y en los tres medios estudiados, además de las estimaciones de la CI_{10} y CI_{50} para la TM y CTC, se indican en la Figura IV.5.2 y Tabla IV.5.5, respectivamente. La Tabla IV.5.6 muestra los cálculos de la RAE, respecto de cada arroyo, para cada metal y para cada punto final evaluado.

Tabla IV.5.1: Características fisicoquímicas de la solución nutritiva y de las aguas de los arroyos Juan Blanco y Vitel (Buenos Aires). Se comparan los valores obtenidos en este trabajo con datos bibliográficos para los mismos cuerpos de agua.

	Solución Nutritiva	Arroyo Vitel		Arroyo Juan Blanco	
		Muestra ensayada	Datos Bibliográficos (Conzonno & Fernández Cirelli, 1988; Miretzky et al., 2004)	Muestra ensayada	Datos Bibliográficos (Mercado, 2000)
Temperatura °C	22 (1,5)	21,6 (0,5)	nd	23 (2,8)	19 (4,6)
Conductividad (µS/cm)	nd	381 (1,4)	nd	340 (2,8)	485 (148)
pH	7 (0,09)	8,4 (0,04)	7,9	7,9 (0,07)	8,4 (0,1)
Turbidez	50	113 (11,3)	nd	102 (11)	25 (9) [#]
Salinidad	0,01	0,01	nd	0,01	nd
SS (mg/L)	< LD	93 (8,5)	nd	148 (9,5)	98 (57,2)
PRS (µg/L)	nd	59 (2,8)	nd	66 (4,2)	46 (9)
PO ₄ [≡] (µg/L)	1425 (199)	nd	nd	nd	-
N-NH ₄ ⁺ (µg/L)	1695 (209)	24 (3,5)	nd	132 (22,6)	136 (109)
N-NO ₃ ⁻ (µg/L)	1760 (179)	94 (14,9)	nd	528 (42,4)	116 (141)
N-NO ₂ ⁻ (µg/L)	< LD	18 (0,4)	nd	17 (1,8)	11 (5,0)
COT (mg/L)	< LD	23,5 (2,1)	nd	20,5 (2,1)	nd
COP (mg/L)	< LD	6,1 (0,8)	nd	3,3 (0,2)	nd
COP (%)	0	6,5	nd	2,2	nd
HCO ₃ ⁻ (mg/L)	3,8	233 (4)	278,2	170 (40)	58 (22)
CO ₃ ⁼ (mg/L)	15,3 (1,2)	6,6 (1,8)	1,5	15,8 (2,1)	2,2 (2,4)
SO ₄ ⁼ (mg/L)	20 (2,3)	43 (1,1)	43,5	6 (0,5)	nd
Cl ⁻ (mg/L)	7,8 (1,8)	41 (1,4)	87,1	30 (1,9)	44 (8,0)
Ca ²⁺ (mg/L)	4,4 (0,7)	11 (1,4)	17,9	10 (2,8)	17 (6,7)
Mg ²⁺ (mg/L)	4,9 (0,4)	5,5 (0,4)	12,4	3,8 (0,7)	4,5 (4,4)
Ca ²⁺ /Mg ²⁺	0,9	2	1,4	2,6	3,8
Na ⁺ (mg/L)	< LD	53 (2,1)	135,4	33 (2,8)	78 (27,7)
K ⁺ (mg/L)	1 (0,3)	5 (0,6)	12	3 (0,8)	6 (2,2)
Cu ²⁺ (mg/L)	0,003*	< LD	0,089	< LD	nd
Cr ⁶⁺ (mg/L)	< LD	< LD	0,014	< LD	nd
Cd ²⁺ (mg/L)	< LD	< LD	nd	< LD	nd

Los valores corresponden a la Media (Desvío Estándar)

Secchi (cm); * Valor estimado de acuerdo a la composición de micronutrientes del medio; LD: límite de detección de acuerdo a cada metodología analítica utilizada; SS: Sólidos en suspensión; COT: carbono orgánico total; COP: carbono orgánico particulado; PRS: fósforo reactivo soluble; nd: no determinado.

La caracterización fisicoquímica de las aguas de los arroyos Juan Blanco y Vitel (Buenos Aires) indica que éstas no difieren significativamente entre sí. El A^o Vitel presenta aguas más alcalinas, bicarbonatadas sódicas, con menor contenido de sólidos en suspensión, y una concentración significativamente inferior de nitrógeno amoniacal y de nitratos. Sin embargo el contenido de materia orgánica particulada y sulfatos es superior que en el A^o Juan Blanco. Al comparar las

características de ambos arroyos con datos bibliográficos de los mismos, se observan algunas diferencias. Los parámetros determinados por Mercado (2000) para el A° Juan Blanco muestran mayor valor de pH, conductividad, Cl^- , Na^+ , K^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} , mientras que los sólidos en suspensión, N-NO_3^- , PRS, $\text{CO}_3^{=}$, HCO_3^- fueron mayores en las muestras de agua utilizadas en este trabajo. Para el caso del A° Vitel, las diferencias se manifiestan principalmente en un menor pH y $\text{CO}_3^{=}$, pero valores mayores de los iones HCO_3^- , Cl^- , Na^+ , K^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} (Conzonno & Fernández Cirelli, 1988), en comparación con las muestras de este arroyo utilizadas en los ensayos de toxicidad. Si bien la selección de los A° Juan Blanco y Vitel se realizó considerando las diferencias en sus características fisicoquímicas (mayor concentración de HCO_3^- , Cl^- , Na^+ , K^+ , y relación $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ en aguas del A° Vitel) de acuerdo a los datos de Mercado (2000) y Conzonno & Fernández Cirelli (1988), éstos no se diferenciaron de la misma manera en los muestreos realizados en este estudio para ser utilizados en ensayos de toxicidad.

La principal diferencia entre el medio nutritivo y las aguas de los arroyos, sin considerar el sobreagregado de nutrientes, está en los niveles de concentración de la fuente de nitrógeno y fósforo. Por otra parte, se destaca una mayor relación $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ en las aguas naturales así como la presencia de iones Cl^- , Na^+ y de carbono orgánico en forma particulada y soluble.

La concentración de los metales Cu(II), Cr(VI) y Cd(II) medida en las aguas naturales se encuentra por debajo del límite de detección de acuerdo a la metodología utilizada (Cu: 0,01mg/L; Cr: 0,03; Cd: 0,005mg/L) (Tabla IV.5.1). La concentración de cada metal en la solución nutritiva y en la obtenida de ambos arroyos se mantuvo sin modificaciones significativas a lo largo de la exposición, verificándose durante la experiencia, que la máxima variación registrada respecto de las concentraciones iniciales fue de 15, 11 y 16% para el Cu(II), Cr(VI) y Cd(II), respectivamente. Esta pequeña variación en la concentración de metales era de esperar, dado que se realizó la renovación parcial del medio a lo largo del tiempo de exposición. Además, se inició el ensayo con una relación *biomasa vegetal fresca/volumen de exposición* (B/V) muy baja (33 mgPF/L), la cual alcanzó, luego de 14 días de crecimiento, valores máximos de 1,3 gPF/L, en las situaciones de mínima inhibición del crecimiento o en los controles negativos. En comparación con otros trabajos (Boniardi et al., 1998; Maine et al., 2004; Miretzky et al., 2004), estos son valores muy bajos de la relación B/V, por lo que no se verifica una reducción marcada de la concentración de los metales en la solución de exposición, aunque en las plantas se cuantificó bioacumulación significativa de los mismos (Tabla IV.5.5). La relación B/V inicial en las experiencias realizadas por Boniardi et al. (1998) es de 6,7 g/L, y de 14g/L en el trabajo de Maine et al. (2004), mientras que Miretzky et al. (2004) inician sus experiencias con 10 g/L de relación B/V, observándose en los tres casos una reducción significativa de los metales en la solución, al final de la exposición.

A lo largo del período de exposición se registró un aumento significativo del pH en los medios de exposición, tanto en la solución nutritiva como en las aguas de ambos arroyos. El pH alcanzó, al finalizar el periodo de exposición, los siguientes valores máximos: para el cobre, 8,1;

9,5 y 8,7; para el cromo: 7,9; 9,9 y 8,9 y para el cadmio: 8,2; 9,9 y 9,2, para la exposición en solución nutritiva, en aguas del A° Juan Blanco y d el A° Vitel, respectivamente. El incremento en el pH del medio, a lo largo del período de exposición, fué mayor en los tratamientos con agua de los arroyos debido al significativo crecimiento de algas en los mismos.

Los resultados del ANOVA factorial (Tabla IV.5.2) indican una variación significativa en la toxicidad de los tres metales asociada a los diferentes medios de exposición (solución nutritiva vs aguas naturales). La respuesta fue diferente, tanto en la TM como en el CTC, en los tres medios evaluados (Tukey $p \leq 0.05$). De manera general se observa que la fitotoxicidad de los metales Cu(II), Cr(VI) y Cd(II) es menor cuando la exposición se realiza en aguas naturales (Arroyos Juan Blanco y Vitel), respecto de la exposición en solución nutritiva de crecimiento. Como excepción a esta respuesta general, la exposición al Cu(II) en el A° Vitel produjo mayor toxicidad que la exposición en solución nutritiva (Figura IV.5.2 y Tabla IV.5.5).

Como se mencionó en el Capítulo IV.3., los efectos en la TM son mayores a las concentraciones más bajas de cada metal (ver los valores de CI_{10} en la Tabla IV.5.5). Por otro lado, el CTC es un punto final de mayor sensibilidad para la evaluación de la fitotoxicidad a altas concentraciones de metal (ver los valores de CI_{50} en la Tabla IV.5.5). Estas diferencias son más evidentes cuando la exposición se realiza en aguas de los arroyos.

Si bien en los tratamientos con agua de los arroyos se realiza el sobreagregado de nutrientes equivalente a las concentraciones de la solución nutritiva, se observa que los valores de TM y CTC de los controles en aguas del A° Vitel y Juan Blanco, son menores a los observados para las plantas crecidas en solución nutritiva (Tablas IV.5.3 y IV.5.4). Estas diferencias en la TM y CTC en los controles negativos, podrían relacionarse con la menor disponibilidad del Fe en las condiciones de exposición en el agua de los arroyos, debido a los valores elevados de pH, HCO_3^- , CO_3^{2-} y Ca^{2+} (Salisbury & Ross, 1994; Manahan, 2007). Es importante destacar que la exposición de *L. gibba* en medios naturales no se realiza de manera axénica, ya que las aguas de los arroyos no se esterilizaron ni filtraron para la ejecución del ensayo, para no alterar sus características fisicoquímicas y biológicas naturales. Esto promueve el desarrollo de algas y otros microorganismos que no solo interfieren en la disponibilidad de nutrientes para *L.gibba* sino que también modifican, directa o indirectamente, la biodisponibilidad de los metales en estudio (Ej. Absorción y/adsorción de metales, aporte de materia orgánica, modificación del pH, etc.).

Tabla IV.5.2: ANOVA factorial de las variables tasa de multiplicación y contenido total de clorofila. Exposición de *L. gibba* al Cu(II), Cr(VI) y Cd(II).

Tasa de Multiplicación #	Cobre	Cromo	Cadmio
-------------------------------------	--------------	--------------	---------------

<i>Fuente de variación</i>	<i>GL</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>GL</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>GL</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
Concentración metal	5	27,1	0,000	5	86,8	0,000	5	34,8	0,000
Matriz de exposición	2	50,2	0,000	2	26,9	0,000	2	28,3	0,000
Error	94	-	-	94	-	-	103	-	-

Contenido Total de Clorofila	Cobre			Cromo			Cadmio		
<i>Fuente de variación</i>	<i>GL</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>GL</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>GL</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
Concentración metal	5	41,3	0,000	5	55,2	0,000	5	21,9	0,000
Matriz de exposición	2	10,2	0,005	2	10,1	0,000	2	12,9	0,000
Error	58	-	-	58	-	-	55	-	-

Las interacciones no significativas no se indican ni se consideraron en el cálculo final. GL: grados de libertad; F: razón de los cuadrados medios; p: probabilidad.

Tabla IV.5.3: Efecto del Cu(II), Cr(VI) y Cd(II) en la tasa de multiplicación de *L. gibba* a los 14 días de exposición en medios con características fisicoquímicas diferentes.

Tasa de Multiplicación (1/d)^a				
	<i>mg/L^b</i>	Solución Nutritiva	A° Juan Blanco	A° Vitel
Cobre	0	111 (4,5) a	96 (3,6) a	80 (5,1) a
	0,5	107 (5,6) ab	86 (7,6) b	54 (5,6) b
	0,75	95 (5,8) b	79 (2,1) bc	31 (4,4) c
	1,2	65 (1,9) c	68 (4,4) c	26 (4,1) c
	1,7	36 (3,5) d	53 (3,9) d	28 (5,1) c
	3	-	52 (3,6) d	21 (2,9) c
ANOVA (Tukey $p \leq 0,05$)		SN \neq JB \neq V		
	<i>mg/L^b</i>	Solución Nutritiva	A° Juan Blanco	A° Vitel
Cromo	0	111 (4,5) a	96 (3,6) a	80 (5,1) a
	0,75	92 (4,6) b	95 (3,8) a	74 (4,3) a
	1,5	69 (2,8) c	79 (5,5) b	72 (8,1) a
	3,5	60 (2,2) d	71 (2,9) bc	55 (2,6) b
	5	46 (4,2) e	65 (2,6) c	52 (2,8) b
	8	-	62 (2,9) c	45 (2,2) b
ANOVA Tukey ($p \leq 0,05$)		SN \neq JB \neq V		

Tabla IV.5.3: continuación

	<i>mg/L^b</i>	Solución Nutritiva	A° Juan Blanco	A° Vitel
Cadmio	0	111 (4,46) a	96 (3,62) a	80 (5,10) a

0,05	104 (3,93) a	89 (5,17) a	79 (3,07) a
0,15	96 (5,71) b	90 (3,19) a	72 (2,90) b
0,3	65 (4,40) c	91 (1,08) a	62 (3,83) c
0,75	43 (4,16) d	90 (4,20) a	58 (1,52) c
1,5	-	74 (1,39) b	37 (5,98) d

ANOVA Tukey ($p \leq 0,05$) SN \neq JB \neq V

^a Los valores corresponden a los promedios, indicándose los desvíos estándar entre paréntesis. Las medias seguidas por la misma letra, para cada columna (comparación de diferentes concentraciones de metal en cada medio diferente), no difieren estadísticamente entre sí (Tukey $p > 0,05$). ^b

Concentración de los metales al inicio de la experiencia.

Tabla IV.5.4: Efecto del Cu(II), Cr(VI) y Cd(II) en el contenido total de clorofila de *L. gibba* a los 14 días de exposición en medios con características fisicoquímicas diferentes.

		Contenido Total de Clorofila (ug/mg PF) ^a		
	mg/L ^b	Solución Nutritiva	A ⁰ Juan Blanco	A ⁰ Vitel
Cobre	0	944 (37,7) a	693 (44,5) a	880 (43,5) a
	0,5	1012 (26,7) a	645 (35,8) a	653 (38,3) b
	0,75	950 (9,8) a	635 (10,5) a	378 (46,7) c
	1,2	404 (79,5) b	416 (35,4) b	265 (27,5) d
	1,7	47 (18,1) c	217 (18,9) c	45 (8,4) e
	3	-	68 (7,4) d	22 (3,9) e

ANOVA (Tukey $p \leq 0,05$) SN \neq JB \neq V

	mg/L ^b	Solución Nutritiva	A ⁰ Juan Blanco	A ⁰ Vitel
Cromo	0	938 (73,6) a	688 (15,2) a	880 (43,4) a
	0,75	833 (46,5) b	633 (9,4) a	802 (32,6) a
	1,5	574 (63,9) c	619 (73,3) ab	783 (8,2) a
	3,5	363 (59,6) d	499 (38,9) b	563 (41,5) b
	5	311 (21,2) d	419 (67,9) c	499 (78,9) b
	8	-	331 (23,3) c	432 (47,5) b

ANOVA Tukey ($p \leq 0,05$) SN \neq JB \neq V

Tabla IV.5.4: continuación

	mg/L ^b	Solución Nutritiva	A ⁰ Juan Blanco	A ⁰ Vitel
--	-------------------	--------------------	----------------------------	----------------------

Cadmio	0	938 (73,6) a	700 (45,1) a	880 (43,5) a
	0,05	683 (69,5) b	757 (45,1) a	-
	0,15	596 (88,7) b	762 (51,2) a	774 (10,7) b
	0,3	395 (92,5) c	759 (16,9) a	777 (41,5) b
	0,75	79 (11,1) d	639 (58,5) a	674 (32,1) c
	1,5	-	428 (94,8) b	87 (10,3) d
ANOVA (Tukey p ≤ 0,05)		SN ≠ JB		
		≠ V		
		JB = V		

^a Los valores corresponden a los promedios indicándose los desvíos estándar entre paréntesis. Las medias seguidas por la misma letra, para cada columna, no difieren estadísticamente entre sí (Tukey $p > 0,05$). ^b Concentración de los metales al inicio de la experiencia

Tabla IV.5.5: Valores de Concentración Inhibitoria de los metales cobre, cromo y cadmio para el clon de *L. gibba* expuesto en solución nutritiva y en agua del A^o Juan Blanco y del A^o Vitel. Efecto en la tasa de multiplicación y contenido total de clorofila luego de 14 días de exposición.

	Concentración Inhibitoria (mg/L)			
	Tasa de Multiplicación		Contenido Total de Clorofila	
	CI₁₀	CI₅₀	CI₁₀	CI₅₀
Cobre				
Solución nutritiva	0,65 (0,595-0,721)	1,51 (0,992-1,996)	0,75 (0,704-0,802)	1,18 (0,935-1,379)
A^o Juan Blanco	0,42 (0,285-0,493)	> 3*	0,77 (0,699-0,815)	1,38 (1,275-1,464)
A^o Vitel	<< 0,5*	0,69 (0,641-0,726)	<< 0,5*	0,73 (0,703-0,756)
Cromo				
Solución nutritiva	<< 0,5*	4,38 (3,25-4,95)	0,52 (0,459-0,893)	3,09 (2,952-3,591)
A^o Juan Blanco	1,23 (0,973-1,455)	10,78[#]	1,49 (1,055-2,105)	6,70 (4,742-7,199)
A^o Vitel	<<0,5*	8,24[#]	1,15 (1,074-1,852)	7,59 (5,482-7,825)

Tabla IV.5.5: continuación

Cadmio	CI₁₀	CI₅₀	CI₁₀	CI₅₀
Solución nutritiva	0,11 (0,069-0,1496)	0,35 (0,164-0,441)	<< 0,05*	0,22 (0,135-0,361)
A° Juan Blanco	0,86 (0,634-0,999)	2,96[#]	0,84 (0,692-0,923)	1,68[#]
A° Vitel	0,17 (0,112-0,219)	1,34 (1,185-1,483)	< 0,1*	0,97 (0,924-0,997)

Los valores entre paréntesis corresponden al intervalo de confianza (95%)

*La estimación de la CI₁₀ no fue posible para el intervalo de concentraciones ensayadas.

[#] Cálculo por interpolación gráfica

Tabla IV.5.6: Relación Agua-Efecto (RAE): Variación de la biodisponibilidad de los metales en las aguas de los arroyos con relación a la exposición en la solución nutritiva.

	Relación Agua-Efecto (CI_{Arroyo}/CI_{Solución Nutritiva})			
	Tasa de Multiplicación		Contenido Total de Clorofila	
	CI_{10A}/CI_{10SN}	CI_{50A}/CI_{50SN}	CI_{10A}/CI_{10SN}	CI_{50A}/CI_{50SN}
Cobre				
A° Juan Blanco	0,7	> 2	1	1,2
A° Vitel	< 0,8	0,5	< 0,7	0,6
Cromo				
A° Juan Blanco	> 2,5	2,5	2,9	2,2
A° Vitel	1	1,9	2,2	2,5
Cadmio				
A° Juan Blanco	7,8	8,5	> 16,8	7,6
A° Vitel	1,6	3,8	> 2	4,4

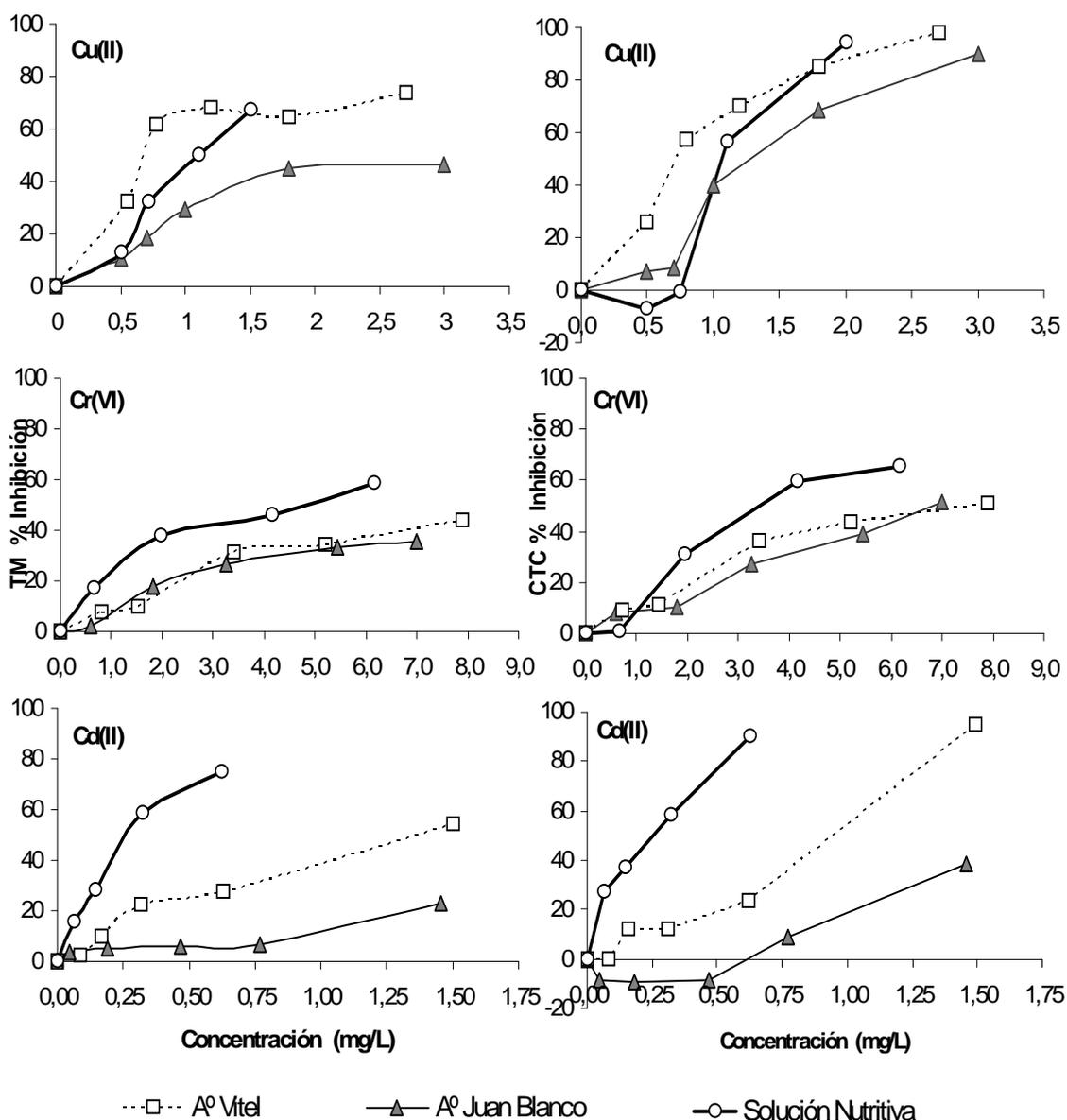


Figura IV.5.2. Curvas de toxicidad del Cu(II), Cr(VI) y Cd(II) en *L.gibba* luego de 14 días de exposición en aguas naturales y solución nutritiva de crecimiento. Efecto en la tasa de multiplicación (TM) y contenido total de clorofila (CTC).

Al evaluar la relación Agua-Efecto (RAE) (Tabla IV.5.6), se observó que la máxima protección asociada a los arroyos corresponde al Cd(II), seguida por el Cr(VI). La toxicidad de los metales para *L.gibba* en aguas naturales se redujo entre 1 y 2 veces para el Cu(II), entre 1 y 3 veces para el Cr(VI) y entre 2 y 17 veces para el Cd(II). Los mayores valores de RAE se observaron para el cadmio siendo el metal cuya biodisponibilidad es más variable de acuerdo a las

características fisicoquímicas del medio. Los resultados obtenidos con el Cu(II) indican que su biodisponibilidad fue la que menos se modificó con la exposición en diferentes medios.

La variación de la toxicidad asociada a las características fisicoquímicas del medio de exposición fue similar en ambos puntos finales, siendo levemente mayor (valores de RAE más altos) en la TM para el cromo y el cobre en el A° Juan Blanco mientras que para el CTC es mayor para el cadmio, en ambos arroyos (Tabla IV.5.6).

De los dos arroyos evaluados, se observó que las características fisicoquímicas del A° Juan Blanco (Tabla IV.5.1) son las que generan menor biodisponibilidad para los tres metales considerados, observándose para el mismo los valores más altos de la RAE. Comparando con los valores de RAE para el A° Vitel, en el A° Juan Blanco la toxicidad se redujo hasta 4, 2,5 y 8,4 veces más para el Cu(II), Cr(VI) y Cd(II), respectivamente.

En la Figura IV.5.3 se muestra la variación de la toxicidad (CI_{50} en la TM y el CTC) en función de los parámetros fisicoquímicos más relevantes, considerando las principales diferencias en la composición del agua de los arroyos Juan Blanco y Vitel en el momento del muestreo, respecto del medio de crecimiento. En las figuras se observa, que si bien existe variación en los contenidos de carbono orgánico total (COT), iones sulfato y bicarbonato y en la relación Ca^{2+}/Mg^{2+} en los diferentes medios de exposición, no existe una correlación definida entre el aumento en los valores de estos parámetros respecto de la disminución de la toxicidad del cobre, cromo y cadmio.

Si bien en los tres medios de exposición considerados existen diferencias en el contenido de sulfatos, el aumento en la concentración de este ión, no se relaciona directamente con la reducción en la toxicidad de los metales (Figura IV.5.4). Para el caso del cobre, se observa que ninguno de los parámetros considerados en la Figura IV.5.3 indica una relación clara con la reducción de la toxicidad. Al considerar la toxicidad del cromo, se evidencia que ésta se reduce con el aumento del COT, de la relación Ca^{2+}/Mg^{2+} y del contenido de iones bicarbonato. Para el caso del cadmio, la mejor correlación con la reducción de la toxicidad, se observa con el aumento de la relación Ca^{2+}/Mg^{2+} y, en menor medida, con el COT. Cabe destacar entre los factores determinantes de la variación de la biodisponibilidad de los metales, el marcado aumento del pH en los medios de exposición. Como se mencionó anteriormente, si bien también se verificó este incremento en los tratamientos en medio nutritivo de crecimiento, este aumento fue mayor cuando la exposición se realizó en el agua de los arroyos.

Si bien ambos arroyos no presentan marcadas diferencias en los parámetros fisicoquímicos determinados, dada la mayor alcalinidad, contenido de materia orgánica y sulfatos del A° Vitel, era de esperar una mayor protección en estas aguas respecto de las del A° Juan Blanco. No obstante esto, los valores más altos de la relación Ca^{2+}/Mg^{2+} y el mayor aumento del pH a lo largo del ensayo en las aguas del A° Juan Blanco, determinarían la menor biodisponibilidad de los tres metales en este arroyo con respecto al A° Vitel (Gupta et al., 1996; Christensen & Christensen, 2000).

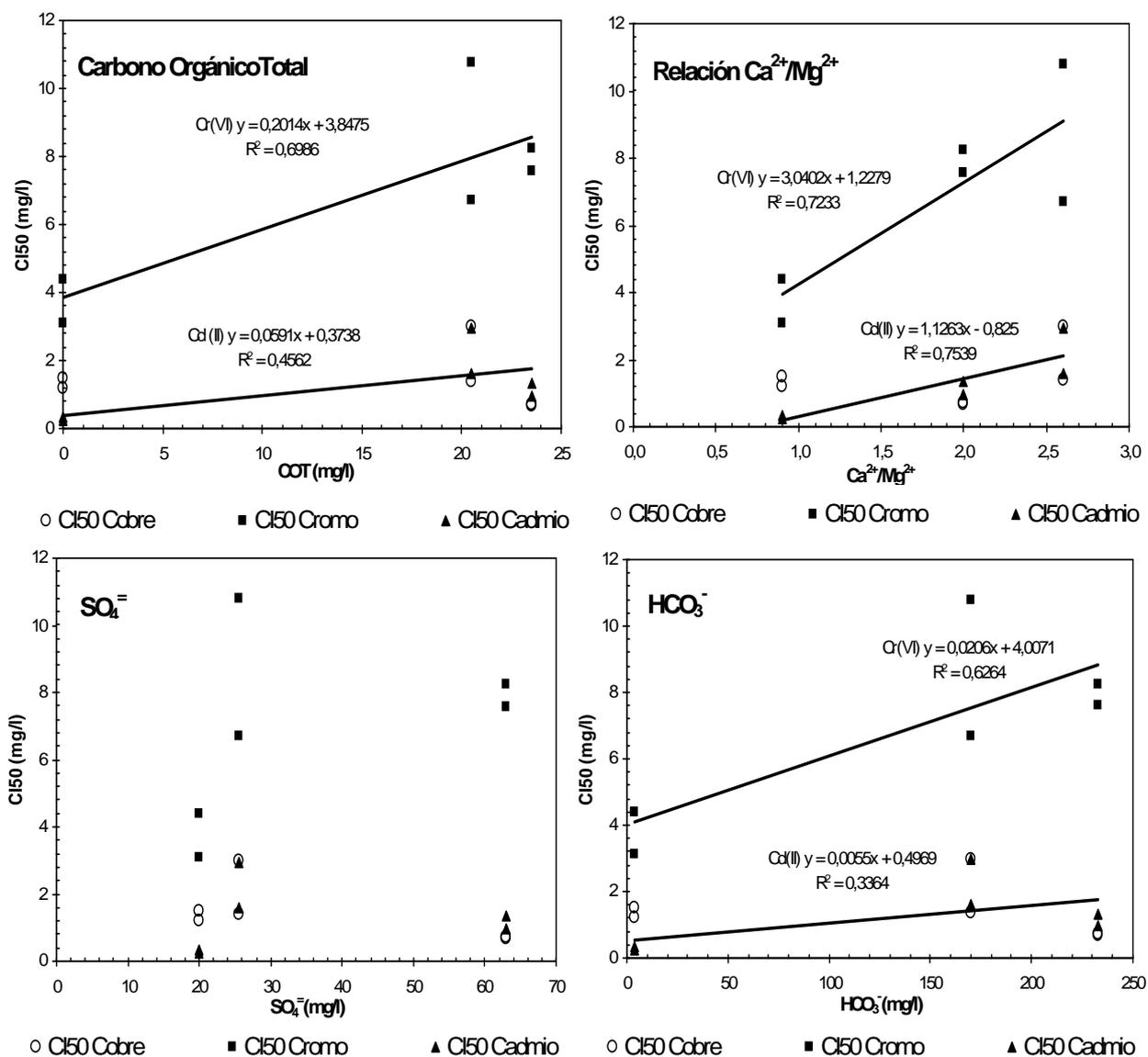


Figura IV.5.3: Variación de la toxicidad (CI₅₀) en función de la variación del contenido de carbono orgánico total (COT), de la relación de los iones Ca^{2+}/Mg^{2+} y del contenido de iones sulfato y bicarbonato en los diferentes medios de exposición.

IV.5.3.2 Bioacumulación del Cu(II), Cr(VI) y Cd(II) en aguas naturales

La Figura IV.5.4 muestra los valores de metales bioacumulados por *L. gibba* luego de 14 días de exposición en medios de diferentes características fisicoquímicas: solución nutritiva, el A° Juan Blanco y el A° Vitel. Se indica además el factor de bioconcentración (FBC).

Los resultados de las mediciones de metales en los tejidos vegetales, para las dos concentraciones de exposición de cada metal, indican que fueron bioacumulados, aún dentro del intervalo de toxicidad para *L. gibba* (Figura IV.5.4). Se observa además, que la acumulación de los metales se incrementa con el aumento de la concentración de exposición, aunque disminuye en función de la biodisponibilidad de los mismos, cuando la exposición se realiza en

aguas de los arroyos. La mayor bioacumulación y los valores más altos de FBC se verifican cuando la exposición fue en solución nutritiva. Si bien la acumulación aumenta con el incremento de la concentración externa, el factor de bioacumulación se mantiene constante o se reduce a mayor concentración de exposición. Como excepción a esto, en la exposición al cromo en solución nutritiva y en el A° Vitel, también se incrementa el FBC con el aumento de la concentración.

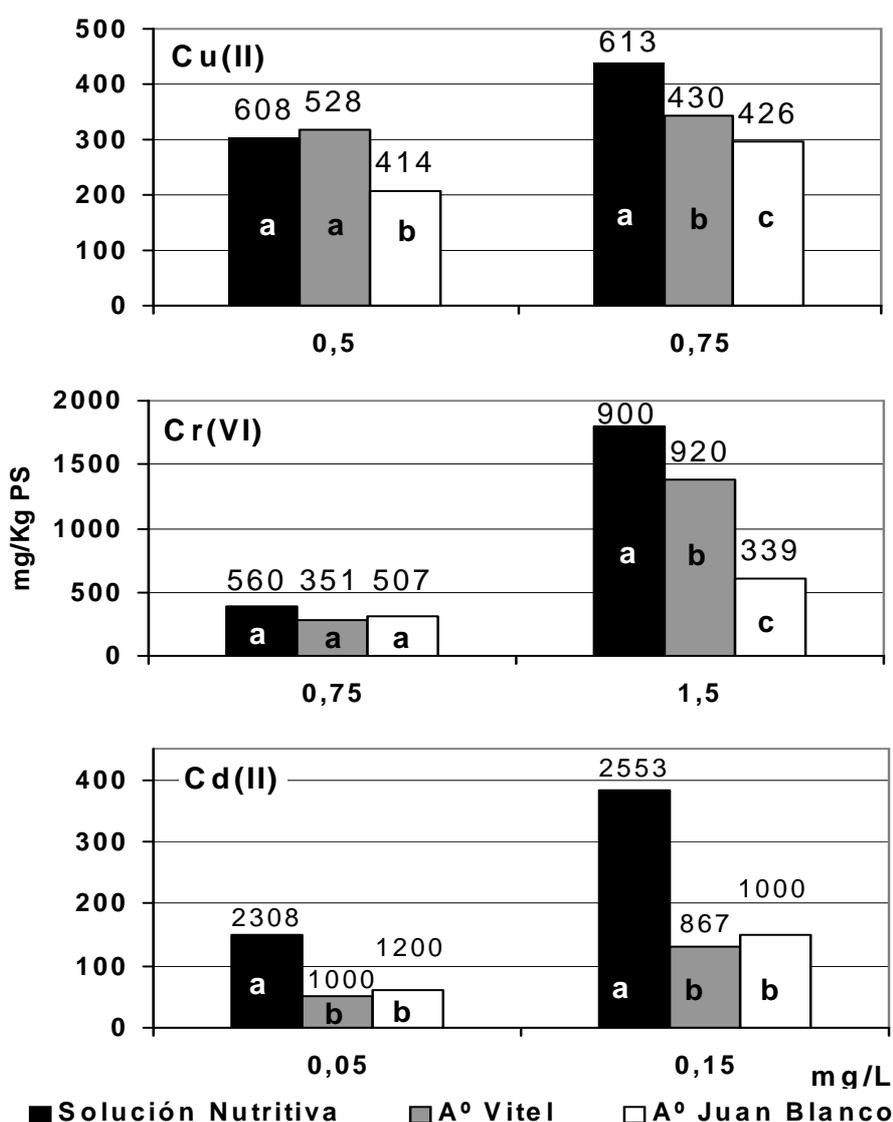


Figura IV.5.4: Bioacumulación y factor de bioconcentración (FBC) en *L.gibba* luego de 14 días de exposición al Cu(II), Cr(VI) y Cd(II) en solución nutritiva y en agua de los arroyos Vitel y Juan Blanco.

Las barras indican la concentración de cada metal en los tejidos vegetales respecto del control (Promedio de tres repeticiones). Las letras distintas dentro de cada barra indican diferencias significativas ($p \leq 0.5$) en la bioacumulación entre los distintos medios, para cada concentración de exposición. Los números indicados en cada barra corresponden al factor de bioconcentración.

Cuando comparamos los resultados en ambos arroyos, se observa que en las aguas del A° Juan Blanco la acumulación y el FBC fue menor para el Cu(II) y Cr(VI), respecto del A° Vitel. Para el Cd(II) se registra que no hay diferencias entre los dos arroyos en los valores de metal acumulado, siendo estos significativamente menores a lo registrado para las plantas expuestas en solución nutritiva. La capacidad de *L. gibba* de bioconcentrar Cd(II) se reduce a más del 50% cuando la biodisponibilidad disminuye en las aguas naturales.

De los tres metales estudiados, y para las condiciones experimentales en las que se realizó este trabajo, el Cd(II) fue el metal donde se verificaron los mayores valores de FBC, en los tres medios de exposición. A bajas concentraciones de exposición (0,05 mgCd(II)/L), aunque se registró toxicidad significativa (16 y 27 % en la TM y CTC, respectivamente), se lograron altos valores de FBC aunque las plantas no acumularon grandes concentraciones del metal (Figura IV.5.4).

La Figura IV.5.5 muestra la variación de la bioacumulación y del factor de bioconcentración (FBC) con relación a la toxicidad del Cu(II), Cr(VI) y Cd(II) en *L.gibba*. Los valores de toxicidad graficados, corresponden a la inhibición registrada en el CTC y la TM para la exposición a 0,5 y 0,75 mgCu(II)/L, a 0,75 y 1,5 mgCr(VI) y a 0,05 y 0,15 mgCd(II)/L, considerando la exposición en solución nutritiva y en los arroyos Vitel y Juan Blanco.

Para los tres metales se observa que, si bien se verificó toxicidad a las concentraciones evaluadas, se registra bioacumulación significativa de los mismos en los tejidos vegetales y esta acumulación no se reduce con el aumento de la toxicidad.

Con respecto a la exposición al cobre no se observa relación directa entre la toxicidad y el FBC por lo que, en el intervalo de exposición considerado, la toxicidad no estaría condicionando el FBC. Existe una leve tendencia al incremento de la bioacumulación con el aumento de la toxicidad dada por una mayor biodisponibilidad o por una mayor concentración de exposición al metal, al menos para el intervalo de concentraciones ensayadas.

Al igual que con el cobre, el FBC en la exposición al cromo, no parece tener una variación relacionada con la toxicidad. La bioacumulación del cromo se incrementa aún a valores de inhibición del 40%.

Para el caso del cadmio, y en el intervalo de concentraciones estudiadas, la bioacumulación y el FBC se incrementan con el aumento de la toxicidad. A mayor concentración externa y mayor biodisponibilidad se observa mayor incorporación del metal en los tejidos y, consecuentemente mayor toxicidad.

La incorporación del metal no se reduce por el aumento de la toxicidad, al menos para los porcentajes de inhibición observados, por lo que estos valores de metales disponibles son aceptables para la utilización de esta especie en procesos de fitorremediación. No obstante ésto, la biodisponibilidad de los metales estaría condicionando la eficiencia de esta especie en la remoción de metales en ambientes naturales.

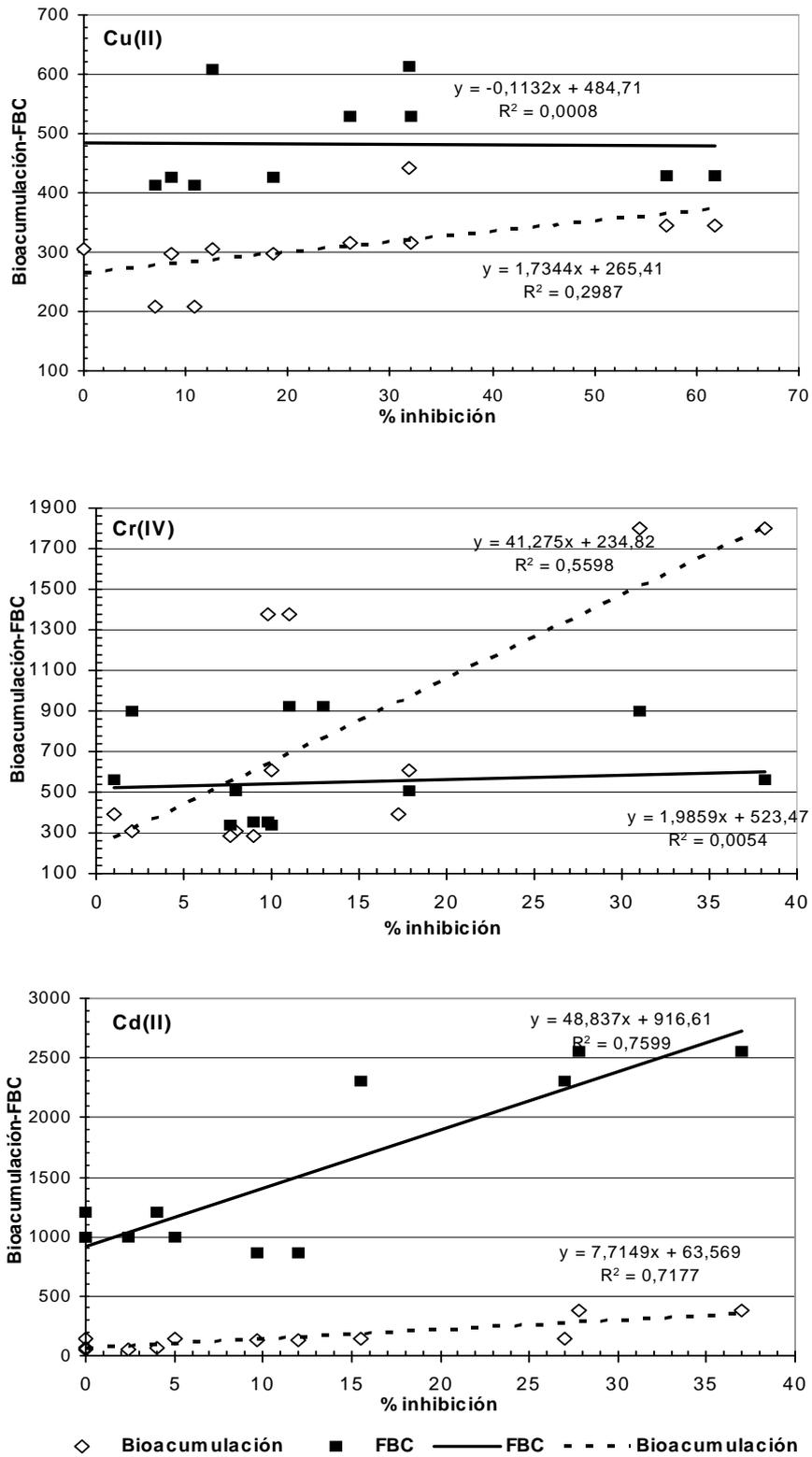


Figura IV.5.5: Toxicidad del Cu(II), Cr(VI) y Cd(II) en *L. gibba* y su relación con la variación de la bioacumulación y el factor de bioconcentración (FBC).

De la misma manera a lo indicado en el Capítulo I.2.1 con relación a la toxicidad de los metales Cu(II), Cr(VI) y Cd(II) en Lemnáceas y en otras plantas vasculares, los antecedentes indican que existe una amplia variación en la capacidad de bioacumular estos metales entre diferentes especies vegetales, y aún dentro de las Lemnáceas. Estas diferencias dependen de las concentraciones de exposición, del metal, de los factores fisicoquímicos y biológicos que condicionan la biodisponibilidad de los mismos, además de los mecanismos de detoxificación o tolerancia a los tóxicos, propios de cada especie (Van Steveninck et al., 1992; Sajwan & Ornes, 1994; Prasad et al., 2001; Moschione et al., 2002; Maine et al., 2004; Miretzky et al., 2004).

En los resultados obtenidos por Sajwan & Ornes (1994) con la Lemnácea *Spirodela polyrhiza*, evaluando la toxicidad y bioacumulación del Cd(II) en exposiciones en solución nutritiva, se observó que la capacidad de acumulación de esta especie fue significativamente menor a lo registrado para *L. gibba* en este trabajo. Wahaab et al. (1995) consideraron la potencial aplicación de *L. minor* en la remoción de Cr(III) y Cu(II) en el tratamiento de líquidos cloacales y domiciliarios así como de efluentes industriales, observando entre 2 a 3 veces mayor capacidad de absorción del Cr(III) que del Cu(II) en exposiciones a 0,25 y 1 mg/L de ambos metales. La absorción del Cr(III) fue 3 veces mayor a la máxima concentración ensayada, mientras que para el caso del Cu(II), 1 mg/L producen toxicidad marcada a partir de los 8 días de exposición. Prasad et al. (2001) observaron para *L. trisulca* una alta tolerancia a la acumulación de Cd(II) a concentraciones de exposición muy superiores (entre 11 y 56 mgCd(II)/L) a las estudiadas para *L. gibba*. Para el caso del cobre, si bien observaron una mayor toxicidad respecto del cadmio (1000 veces más tóxico), se registró bioacumulación a valores de exposición entre 0,13 y 3,2 mgCu(II)/L. En ambos metales la acumulación fue dependiente de la concentración externa, alcanzándose valores de bioacumulación de hasta 50 mgCd(II)/g y 5,5 mgCu(II)/L, luego de exposiciones a 56 mgCd(II)/L y 3,2 mgCu(II)/L, respectivamente (Prasad et al., 2001). En ensayos realizados por Moschione et al. (2002), comparando la acumulación de Cd(II) en solución nutritiva en *Pistia stratiotes*, en *L. minor* (clon Lgm) y en *L. gibba* (clones LgP y LgJ), se evidenciaron valores de metal acumulado y del FBA significativamente superiores en los tres clones de Lemnáceas respecto de *P. stratiotes*, luego de la exposición a 0,013 y 0,12 mgCd(II)/L. Estos autores también observaron que el FBC del cadmio disminuyó en ambas especies con el aumento de la concentración de exposición, al menos en el intervalo de concentraciones ensayadas (Moschione et al., 2002).

Los estudios realizados por Miretzky et al. (2004) con *Spirodela intermedia* y con *P. stratiotes*, expuestas a 1mg/L de Cu(II) y Cr(VI) en aguas del A° Vitel, mostraron valores de bioacumulación del cobre similares a los registrados para *L. gibba* en este trabajo. Sin embargo, los valores de cromo acumulados fueron significativamente inferiores a los observados para *L. gibba*. Maine et al. (2004) también observaron, para exposiciones al Cr(III) en aguas naturales (lagunas en planicies de inundación del río Paraná medio), que, aún a concentraciones tóxicas

de este metal, las especies *P. stratiotes* y *Salvinia herzogii* bioacumulan cromo en sus tejidos. Estos autores verificaron que, para el intervalo de exposición de 1 a 6 mgCr(III)/L, la acumulación del metal en los tejidos se incrementó con el aumento en la concentración en el medio de exposición. En comparación con los valores registrados para *L. gibba* en este trabajo, en aguas de ambientes naturales y para concentraciones equivalentes de Cr(VI), la capacidad de acumulación fue mayor en las especies *P. stratiotes* y *S. herzogii* (Maine et al., 2004). A diferencia de los resultados obtenidos en este trabajo con el clon local de *L. gibba* en solución nutritiva, Boniardi et al. (1998) informan para *L. gibba* que, el factor de bioconcentración del Cu(II) y Cr(VI) disminuye con el aumento de la concentración del metal, para los intervalos de exposición entre 0,9 y 6,7 mgCu(II)/L y entre 0,1 y 1 mgCr(VI)/L. Los resultados obtenidos por Dirilgen & Dogan (2002), indican una gran tolerancia de *L. minor* al Cr(VI). Luego de la exposición durante 7 días a valores entre 5 y 20 mgCr(VI)/L, la concentración interna del metal se incrementó con el aumento de la concentración externa, aunque se verificó alta toxicidad en las plantas expuestas a 20 mgCr(VI)/L.

La capacidad de *L. gibba* de bioacumular el Cu(II), Cr(VI) y Cd(II), así como las concentraciones tóxicas para esta especie, varían de acuerdo a la biodisponibilidad de estos metales, dependiendo ésta de las características fisicoquímicas del medio de exposición, factores importantes a tener en cuenta al considerar a esta especie en potenciales usos en procesos de fitorremediación. Si bien este clon de *L. gibba* no se encuentra entre aquellas especies con alta capacidad de acumulación, los resultados obtenidos indican una buena respuesta para la bioacumulación del Cu(II), Cr(VI) y Cd(II) a pesar de su elevada sensibilidad a estos metales. A las concentraciones de exposición al Cu(II), Cr(VI) y Cd(II) consideradas en este estudio (0,5 y 0,75 mgCu(II)/L, 0,75 y 1,5 mgCr(VI) y 0,05 y 0,15 mgCd(II)/L), *L. gibba* tolera y acumula eficientemente estos metales.

IV.5.3.3 Biodisponibilidad del herbicida glifosato (formulado comercial Roundup®Max en aguas naturales)

En la Tabla IV.5.7 se indican las características fisicoquímicas del A°El Sauce y de la solución nutritiva de crecimiento utilizados como medios de exposición para esta experiencia. La Tabla IV.5.8 muestra los resultados del ANOVA factorial para los efectos del glifosato en la tasa de multiplicación (TM) y el crecimiento foliar (CF) de *L. gibba* luego de 10 días de exposición en medios con diferentes características fisicoquímicas. En la Tabla IV.5.9 se indican los valores de TM y CF para cada concentración de glifosato y en los diferentes medios de exposición. Las curvas de inhibición para los diferentes puntos finales y comparando ambos medios estudiados, se indican en la Figura IV.5.6. Las estimaciones de la CI_{10} y CI_{50} para la TM y CF, así como los cálculos de sus respectivas RAE, se muestran en las Tabla IV.5.10 y Tabla IV.5.11, respectivamente.

Tabla IV.5.7: Características fisicoquímicas y de las aguas del arroyo El Sauce (Buenos Aires) y la solución nutritiva de crecimiento.

	Solución Nutritiva	A° El Sauce
Temperatura (°C)	24 (2)	24 (2)
Conductividad (µS/cm)	nd	381
pH	7,0 (0,1)	6,8 (0,4)
Turbidez	55	113
Salinidad	0,01	0,01
SS (mg/L)	< LD	188
PRS (µg/l)	nd	410 (160)
PO ₄ ⁼ (µg/l)	1410 (412)	nd
N-NH ₄ ⁺ (µg/l)	1735 (272)	75(36)
N-NO ₃ ⁻ (µg/l)	1778 (375)	792 (223)
N-NO ₂ ⁻ (µg/l)	nd	40 (21)
COT (mg/L)	< LD	13
COP (mg/L)	< LD	2,3
COP (%)	-	17,7
HCO ₃ ⁻ (mg/L)	3,8 (0,9)	102 (31)
CO ₃ ⁼ (mg/L)	15,3 (1,2)	8,0 (2,6)
SO ₄ ⁼ (mg/L)	20 (2,3)	25 (12)
Cl ⁻ (mg/L)	7,8 (1,8)	6,2 (1,9)
Ca ²⁺ (mg/L)	4,4 (0,7)	9,4 (2,6)
Mg ²⁺ (mg/L)	4,9 (0,4)	3,0 (1,6)
Ca ²⁺ /Mg ²⁺	0,9	3
Na ⁺ (mg/L)	< LD	14 (4,6)
K ⁺ (mg/L)	1 (0,3)	13 (3,9)

Los valores corresponden a la Media (Desvío Estándar). LD: límite de detección de acuerdo a cada metodología analítica utilizada; SS: Sólidos en suspensión; COT: carbono orgánico total; COP: carbono orgánico particulado; PRS: fósforo reactivo soluble; nd: no determinado.

Al comparar las características fisicoquímicas de los dos medios de exposición utilizados en el ensayo, se observa que las aguas del A° El Sauce son neutras, de baja dureza y alcalinidad, bajos sólidos en suspensión pero alta materia orgánica soluble y particulada. En comparación con los parámetros químicos del medio nutritivo, las aguas del A° El Sauce se diferencian por tener mayor concentración de HCO₃⁻, Na⁺, K⁺, Ca²⁺, relación Ca²⁺/Mg²⁺ y, fundamentalmente, por la presencia de sólidos en suspensión, carbono orgánico soluble y particulado (Tabla IV.5.7). Si bien no fueron determinados en este trabajo, los resultados obtenidos por Mugni (2009) en este mismo arroyo y similar periodo de muestreo, indican que de los sólidos en suspensión, solamente entre el 2 al 6 % corresponde a carbono orgánico particulado, representando el resto de los sólidos a compuestos inorgánicos.

Las concentraciones de glifosato cuantificadas al inicio del ensayo, se redujeron a lo largo de los 10 días de exposición. Esta reducción fue mayor en la exposición en solución nutritiva (entre

28 y 35%) respecto de las aguas del A° El Sauce (entre 12 y 20%). Durante el periodo de exposición se verificó un aumento significativo en el pH del medio de exposición, siendo mayor la variación en las aguas del A° El Sauce. Al inicio de la experiencia el valor de pH fue de 6,9 en ambos medios, alcanzando valores de hasta 7,8 (media \pm DS: 7,49 \pm 0,121; n:10) y 9,4 (media \pm DS: 9,19 \pm 0,118; n:10) en el medio nutritivo y en las aguas del arroyo, respectivamente. Igual a lo mencionado para la exposición a metales en aguas naturales, este incremento en los valores de pH, estaría asociado al crecimiento de algas verificado durante el ensayo.

Los resultados del ANOVA factorial de las variables tasa de multiplicación y crecimiento foliar indican que existen diferencias significativas ($p \leq 0,05$) en la toxicidad del glifosato cuando la exposición se realiza en medios con características fisicoquímicas diferentes (Tabla IV.5.8). El análisis de las interacciones (matriz*concentración de herbicida) muestra que estas son significativas, indicando que la variación en la toxicidad asociada a los diferentes medios de exposición, es dependiente de la concentración de exposición.

Tabla IV.5.8: ANOVA factorial de las variables tasa de multiplicación y crecimiento foliar. Exposición de *L. gibba* al glifosato en medios con diferentes características fisicoquímicas.

Tasa de Multiplicación #			
<i>Fuente de variación</i>	<i>GL</i>	<i>F</i>	<i>p</i>
Concentración de herbicida	5	148,3	0,000
Matriz de exposición	1	39,3	0,000
Matriz*Concentración	5	54,2	0,000
Error	36	-	-

Crecimiento Foliar (eje longitudinal) Frondes madres			
<i>Fuente de variación</i>	<i>GL</i>	<i>F</i>	<i>p</i>
Concentración de herbicida	4	90,68	0,000
Matriz de exposición	1	6,25	0,013
Matriz*Concentración	4	40,05	0,000
Error	609	-	-

Crecimiento Foliar (eje longitudinal) Frondes hijas			
<i>Fuente de variación</i>	<i>GL</i>	<i>F</i>	<i>p</i>
Concentración de herbicida	4	19,36	0,000
Matriz de exposición	1	84,25	0,000
Matriz*Concentración	4	3,71	0,005
Error	694	-	-

GL: grados de libertad; F: razón de los cuadrados medios; *p*: probabilidad.

En la exposición en aguas del A°El Sauce, al igual a lo observado para el crecimiento en aguas de los arroyos Juan Blanco y Vitel, se observa que, si bien se realiza el sobreagregado de nutrientes, la TM y CF de las frondes madres en los controles es menor al crecimiento que se verifica cuando la exposición es en solución nutritiva de ensayo (Tabla IV.5.9). No obstante esto, en los controles negativos en solución nutritiva y en agua del arroyo con nutrientes, la producción de biomasa siguió un modelo de crecimiento exponencial durante los días de exposición (Huebert & Shay, 1993a).

Tabla IV.5.9: Efecto del glifosato en tasa de multiplicación y crecimiento foliar de *L. gibba* a los 10 días de exposición en medios con características fisicoquímicas diferentes.

Tasa de Multiplicación (1/d)^a			
Glifosato	mg p.a./L^b	Solución Nutritiva	A° El Sauce
	0	146 (2,97) a	125 (1,56) a
	1	143 (5,39) a	121 (3,44) a
	2,5	138 (2,87) b	115 (4,54) b
	5	127 (5,95) c	109 (3,64) b
	15	47 (4,71) d	101 (4,94) c
ANOVA (Tukey p ≤ 0,05)	SN	≠	A°
Crecimiento Foliar: Eje Longitudinal (mm)			
<i>Fronde madre</i>			
Glifosato	mg p.a./L^b	Solución Nutritiva	A° El Sauce
	0	3,95 (0,679) a	3,61 (0,456) a
	1	3,85 (0,543) a	3,56 (0,673) a
	2,5	3,83 (0,569) a	3,59 (0,463) a
	5	3,32 (0,396) b	3,51 (0,549) b
	15	1,95 (0,652) c	3,19 (0,459) b
ANOVA (Tukey p ≤ 0,05)	SN	≠	A°
Crecimiento Foliar: Eje Longitudinal (mm)			
<i>Fronde hijas</i>			
Glifosato	mg p.a./L^b	Solución Nutritiva	A° El Sauce
	0	1,84 (0,353) a	2,09 (0,451) a
	1	1,85 (0,295) a	1,93 (0,352) a
	2,5	1,93 (0,378) a	2,02 (0,392) a
	5	1,23 (0,452) b	1,77 (0,399) b
	15	0,75 (0,315) c	1,51 (0,358) b
ANOVA (Tukey p ≤ 0,05)	SN	≠	A°

^a Los valores corresponden a los promedios indicándose los desvíos estándar entre paréntesis. Las medias seguidas por la misma letra, para cada columna, no difieren estadísticamente entre sí (Tukey $p > 0,05$). ^b Concentración del glifosato (p.a.) al inicio de la experiencia.

Las curvas dosis respuesta para el glifosato (Figura IV.5.6), así como los valores de Concentración Inhibitoria (Tabla IV.5.10), indican mayor inhibición en la tasa de multiplicación y el crecimiento foliar cuando la exposición se realiza en el medio de crecimiento estandarizado, observándose reducción significativa de la toxicidad cuando la exposición es en aguas del arroyo (Tabla IV.5.9). Si bien en estas condiciones la toxicidad del Roundup fue menor que en la exposición en solución nutritiva, aún a bajas concentraciones en el A° El Sauce se registró inhibición significativa. La exposición a 2,5 y 5 mg p.a./L produjo inhibición en la TM y CF, respectivamente (Figura IV.5.6; Tabla IV.5.9).

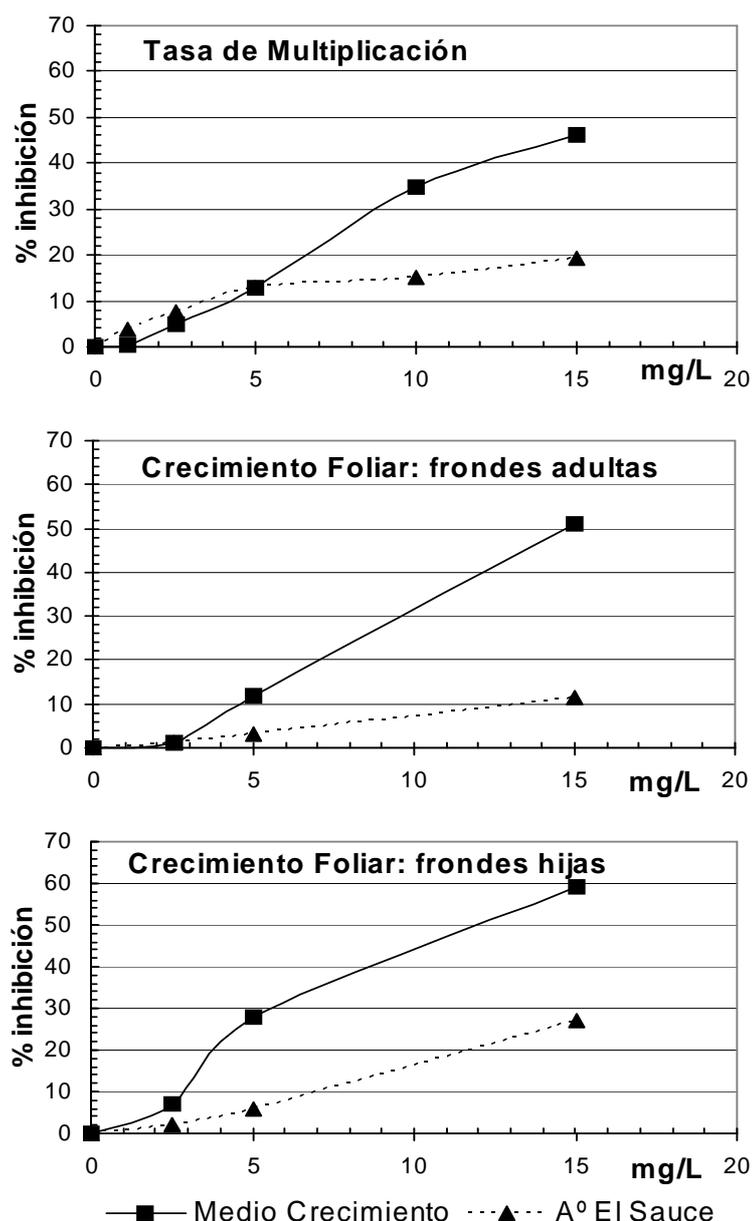


Figura IV.5.6: Toxicidad del Roundup en *L. gibba* expuesta en medio de crecimiento y en aguas del A° El Sauce. Respuesta en la tasa de multiplicación y en el crecimiento foliar. Las concentraciones corresponden a mg p.a./L al inicio del ensayo.

Si bien en esta experiencia no se cuantificó el contenido total de clorofila, se observó clorosis en las plantas expuestas a 2,5 mg p.a./L y concentraciones mayores, tanto en la exposición en solución nutritiva como en aguas del arroyo. De igual modo a lo mencionado en el Capítulo IV.4.3.4, la clorosis se observó en las yemas y frondes hijas mientras que las frondes adultas verificaron clorosis a concentraciones mayores. Otro efecto observado por exposición al Roundup en ambos medios de ensayo, fue la inhibición en la elongación de las raíces a partir de la exposición a 5 mg p.a./L.

Tabla IV.5.10: Valores de Concentración Inhibitoria (CI) del Roundup para la tasa de multiplicación (TM) y el crecimiento foliar (CF) por exposición en aguas del A° El Sauce y en solución nutritiva de crecimiento.

CI mg p.a./L	Medio de Crecimiento			A° El Sauce		
	TM	CF (Eje Long.)		TM	CF (Eje Long.)	
		Madres	Hijas		Madres	Hijas
CI ₁₀	3,5	4,8	3,1	6,8	13,3	6,9
CI ₅₀	13,3	14,7	12,4	45,6	59,3	26,1

Tabla IV.5.11: Relación Agua-Efecto (RAE): Variación de la biodisponibilidad del glifosato en las aguas del A° El Sauce con relación a la exposición en la solución nutritiva.

RAE CI _{Arroyo} /CI _{Medio}	TM	CF (Eje Long.)	
		Madres	Hijas
CI ₁₀ /CI ₁₀	1,9	2,8	2,3
CI ₅₀ /CI ₅₀	3,4	4,1	2,2

Los valores de relación agua-efecto (RAE) indicados en la Tabla IV.5.11 muestran que la toxicidad del glifosato para *L. gibba* (CF de las frondes madres) se redujo hasta 4 veces cuando la exposición de los individuos se realizó en aguas del A° El Sauce (El 50% de efecto en el CF se evidencia con 4 veces la concentración de glifosato, respecto de la exposición en solución nutritiva). Las menores diferencias se evidenciaron en la TM y en el CF de las frondes hijas, donde se observa que para alcanzar el 10% de inhibición, es necesario duplicar la concentración de exposición cuando ésta se realiza en aguas naturales. Al comparar la RAE correspondiente a la CI₁₀, se observa que a niveles bajos de inhibición los valores de RAE son

menores, tanto para TM como para el CF de las frondes madres. Cuando la exposición fue a concentraciones mayores del herbicida (CI_{50}), se registró una mayor diferencia entre la toxicidad por exposición en medio nutritivo y en el agua del arroyo (Tabla IV.5.11). Esto implica que si bien hay un efecto protector de la toxicidad, por reducción de la biodisponibilidad del herbicida cuando la exposición se realiza en aguas naturales, este efecto es menor a concentraciones bajas, más representativas de las exposiciones esperadas en ambientes acuáticos aledaños a campos con cultivos RR.

Si bien el glifosato es de alta solubilidad, en los cuerpos de agua superficiales se adsorbe fuertemente a la arcilla, limo y materia orgánica del sedimento y del material particulado en suspensión, disminuyendo de esta manera la biodisponibilidad para los vegetales (WSSA, 1994; Cox, 1998; Information Ventures, Inc., 2002; Morillo et al., 2000; Tsui & Chu, 2004). Además, como ya se ha discutido en el Capítulo IV.4.3, la alta toxicidad del formulado Roundup está asociada no sólo al principio activo glifosato sino también a sus coadyuvantes, entre los cuales el POEA es el componente mayoritario, constituyendo entre el 10 y 20% del formulado (Tsui & Chu, 2003; Tsui y Chu, 2004). Estudios realizados por Wang et al. (2005) para evaluar el efecto de los sedimentos en la biodisponibilidad del POEA, indican que la disminución de la toxicidad de estos surfactantes está directamente relacionada con la presencia de arcillas y carbono orgánico en el medio de exposición. Estos autores asocian además, la reducción de la toxicidad del POEA, a lo largo del tiempo de exposición, con la biodegradación de estos compuestos por la actividad microbiana del medio. Los resultados informados por Tsui & Chu (2004), también corroboran la reducción de la biodisponibilidad del glifosato y del POEA (formulado Roundup), asociada a la presencia de carbono orgánico particulado.

Considerando los datos bibliográficos del párrafo anterior y dadas las características fisicoquímicas de los medios de exposición utilizados en este trabajo, la disminución de la biodisponibilidad del herbicida (principio activo y coadyuvantes) en las aguas del A° El Sauce estaría asociada principalmente a la presencia de materia orgánica de este cuerpo de agua. Si bien no se ha cuantificado en este trabajo el contenido de arcillas en las aguas del A° El Sauce, éstas estarían también interviniendo en la reducción de la biodisponibilidad del Roundup cuando la exposición es en aguas naturales. Un estudio realizado por Camilion et al. (2006) en lotes con siembra directa en las márgenes del A° El Sauce, indican que hay un alto porcentaje de transporte de arcillas hacia el arroyo en el agua de escorrentía asociada a los eventos de lluvia.

De acuerdo a los resultados informados en el Capítulo IV.4.3, a la concentración de glifosato esperada en el ambiente (CEA), luego de una aplicación en el cultivo de 1,5 kg/ha (CEA:1,34 mg/L), se espera que ocurran efectos significativos en *L. gibba* en el crecimiento foliar (CF) y en el número de frondes por colonia (NFC). Pero si consideramos que cuando la exposición al glifosato es en aguas naturales es necesario duplicar la concentración para observar inhibición significativa (CI_{10} para TM y CF de frondes hijas, Tabla IV.5.11), la CEA no sería tóxica, al

menos para la especie no blanco *L. gibba*. No obstante, es importante destacar que en estas estimaciones de riesgo de exposición, sólo se está considerando el contacto de la planta con el herbicida en solución en el cuerpo de agua y no la posible exposición por contacto superficial directo asociado a la deriva durante la aplicación. Por otra parte hay que tener en cuenta que para el cálculo de la CEA (Boutin et al. 1993, Boutin et al. 1995) se utilizan las dosis de aplicación recomendadas sin considerar que en muchos casos el productor no respeta esas recomendaciones de aplicación (dosis y distancias de aplicación respecto de cuerpos de agua) o repite las aplicaciones (Ej. aplicación de herbicida seguida de precipitaciones), aumentando en estos casos la concentración de exposición y el impacto en el ambiente. Además, cuando el herbicida es utilizado para el control de malezas acuáticas, su incorporación al ambiente es aún mayor. Conocer la biodisponibilidad del herbicida glifosato en ambientes naturales aporta información importante para la evaluación del riesgo del uso de este herbicida en las especies no blanco de nuestros agroecosistemas.

Martin et al. (2003) evaluaron, en exposiciones a campo, el estado fisiológico de plantas acuáticas en un arroyo asociado a un campo con cultivo de soja RR (Pergamino, Pcia. Bs. As.), observando inhibición significativa en el CTC en las especies acuáticas *Sagittaria montevidensis*, *Hydrocotyle ranunculoides* y *Pontederia rotundifolia* (25; 71 y 12 %, respectivamente), a los cuatro días de la aplicación (1,5 kg/ha; CEA de 1,34 mg/L). Estos autores observaron además efecto significativo en el CTC (38%) y en la TM (45%) en la lemnácea *Spirodela intermedia* en sistemas de limnocorrales, luego de 7 días de la aplicación del Roundup en los cultivos de soja RR a ambos márgenes del arroyo El Sauce (Martin et al., 2005). Si bien en estos trabajos no se discrimina el aporte de la toxicidad del Roundup por contacto superficial o por solución, se evidencia claramente el impacto del herbicida en la flora acuática.

IV.5.4 CONCLUSIONES

- La fitotoxicidad del cobre, cromo y cadmio para *Lemna gibba* es menor en las aguas de los arroyos, indicando una menor biodisponibilidad de estos metales en los ambientes naturales.
- En las aguas del A° Juan Blanco la biodisponibilidad para el Cu(II), Cr(VI) y Cd(II) fue menor, observándose menor toxicidad en *L. gibba* respecto de la exposición en solución nutritiva y en aguas del A° Vitel.
- Los valores más altos de la Relación Agua Efecto (RAE) se observaron para el Cd(II), seguido del Cr(VI) y, en tercer lugar, el Cu(II), indicando que es con el cadmio donde más se modificó la biodisponibilidad, al realizar la exposición en cuerpos de agua naturales.

- Si bien no se evidencia una correlación definida entre cada uno de los parámetros fisicoquímicos y la variación en la biodisponibilidad de los metales en aguas de los arroyos, la complejidad de esta matriz de exposición reduce significativamente la toxicidad de estos contaminantes respecto de la exposición en solución nutritiva.
- Si bien el clon de *L. gibba* no se encuentra entre aquellas especies con alta capacidad de acumulación utilizables en procesos de fitoremediación, los resultados obtenidos indican una buena respuesta en la bioacumulación del Cu(II), Cr(VI) y Cd(II) a pesar de la elevada sensibilidad a estos metales.
- La fitotoxicidad del glifosato para *Lemna gibba* es menor cuando la exposición ocurre en las aguas del A° El Sauce, indicando una menor biodisponibilidad de este herbicida en ambientes naturales.
- La menor disponibilidad del Roundup (p.a. glifosato y coadyuvantes) en aguas naturales del A° El Sauce estaría asociada principalmente al contenido de carbono orgánico de las mismas.

V CONCLUSIONES GENERALES

V CONCLUSIONES GENERALES

El estudio comparativo de los efectos de tres metales pesados y del herbicida glifosato sobre plantas vasculares con el ensayo de toxicidad aguda con semillas de *Lactuca sativa* y el ensayo de toxicidad subcrónica con las macrófitas *Lemna gibba* y *L. minor*, permite concluir que ambas pruebas son herramientas de diagnóstico ecotoxicológico de buena sensibilidad para la evaluación de efectos fitotóxicos de contaminantes ambientales.

Estos bioensayos son complementarios y no reemplazables uno por otro en sus aplicaciones para el diagnóstico de efectos de contaminantes. Cada uno aporta información relevante y complementaria, referida a diferentes etapas ontogénicas y procesos fisiológicos de las plantas vasculares. En su implementación, poseen ventajas y desventajas concernientes a la metodología de aplicación, sensibilidad de respuesta, costos de ejecución, representatividad ecológica, etc.

A pesar de la menor sensibilidad del ensayo de toxicidad aguda con semillas, su rápida ejecución facilita su uso en estudios preliminares de muestras o compuestos de toxicidad desconocida. Diferentes aplicaciones permitieron detectar baja variabilidad en la medida de los puntos finales respecto de lo observado en las Lemnáceas.

La obtención y selección de semillas aptas para el ensayo es simple, manteniéndose el vigor y poder germinativo adecuado al menos durante dos años, en condiciones apropiadas de conservación. El desarrollo del ensayo y medida de los puntos finales es simple, no se requiere equipamiento especial y conlleva bajos costos de ejecución.

En el ensayo de toxicidad aguda con *L. sativa* en la exposición a metales pesados, la inhibición de la elongación de la radícula y del hipocótilo son puntos finales relevantes, siendo la elongación de la radícula el de mayor sensibilidad.

El ensayo subcrónico con Lemnáceas es muy sensible a la exposición a metales pesados y al herbicida glifosato, con potencial interés en diagnóstico ecotoxicológico en la región, dado que *L. gibba* es una especie representativa de los ambientes lénticos de casi todo el país.

El mantenimiento de condiciones estandarizadas y controladas en la producción de biomasa y ejecución del ensayo de toxicidad, así como la correcta aclimatación de los individuos, previo a la realización de un ensayo de toxicidad, reduce la variabilidad no asociada a los tóxicos. El

tamaño de las Lemnáceas en comparación a otras macrófitas, permite trabajar con un número amplio de réplicas en volúmenes reducidos.

La estandarización y unificación de protocolos de ensayo, tanto respecto a la obtención, producción y conservación de biomasa (semillas-cultivo de clones), al procedimiento de ensayo y medición de puntos finales, así como a los criterios de análisis e interpretación de los resultados, es fundamental para obtener información confiable para estimaciones de riesgo o peligrosidad de un contaminante o muestra ambiental.

En el bioensayo con Lemnáceas, no se observan patrones generales y definidos en la sensibilidad de respuesta de los distintos puntos finales. La sensibilidad de éstos es variable y dependiente del tóxico evaluado, de la concentración de exposición y del clon utilizado. Ningún parámetro es el más sensible a todos los tóxicos ensayados. La información que aporta cada uno es relevante y complementaria por lo que se sugiere abarcar varios puntos finales en el estudio de la fitotoxicidad.

La respuesta en la relación cl_a/cl_b es de baja sensibilidad para los tres metales, aunque aporta información acerca del modo de acción del tóxico en la inhibición del contenido total de clorofila. El contenido total de clorofila es un parámetro muy afectado en Lemnáceas, tanto por los metales como por el glifosato. Su cuantificación puede ser muy subestimada cuando los efectos son diferenciados en las frondes jóvenes respecto de las adultas, especialmente a bajos niveles de exposición o, como con el glifosato, cuando los efectos son mayores en las yemas y frondes jóvenes. El tamaño de las frondes, expresado como área foliar o como crecimiento foliar, aunque es una medida laboriosa, es de muy buena sensibilidad.

La tasa de multiplicación y el número de frondes por colonia presentan buena respuesta a bajas concentraciones de exposición, son de fácil de determinación y no destructivos.

Considerar diversos puntos finales en la aplicación de los bioensayos para evaluar la fitotoxicidad de los metales y el herbicida glifosato, permite abarcar un intervalo más amplio de respuestas, mejorando así la capacidad de detectar toxicidad al considerar un espectro mayor de posibles sitios de acción para los contaminantes. Los distintos puntos finales poseen umbrales de respuesta diferentes, manifestando distinta sensibilidad frente a los tóxicos.

Los resultados de la exposición aguda de *L. sativa* a metales pesados, evidencian que el cobre es el metal más tóxico, seguido del cadmio, siendo el cromo el de menor toxicidad; mientras que en las Lemnáceas es el cadmio el más tóxico, seguido del cobre y por último el cromo.

La sensibilidad de los clones de *L. gibba* y el de *L. minor* para el cobre, cromo y cadmio, se encuentra en el mismo orden o, en muchos casos muy superior, a lo registrado en la bibliografía para estas especies y otras plantas vasculares. La variabilidad intra e interespecífica observada es baja. La respuesta del clon local de *L. gibba* (clon LgP), es comparable a la del clon LgJ de la misma especie. La sensibilidad de *L. gibba* es en general mayor o equivalente a la de *L. minor*

La sensibilidad del ensayo subcrónico con Lemnáceas para la evaluación de la fitotoxicidad del Cu(II), Cr(VI) y Cd(II) es significativamente mayor respecto del ensayo agudo con *L. sativa*. El bioensayo de toxicidad subcrónico con *L. sativa*, aunque de mayor complejidad metodológica respecto del de exposición aguda, mejora significativamente la sensibilidad de esta especie al Cr(VI) y supera incluso a la sensibilidad de las Lemnáceas.

La respuesta aguda y subcrónica con *L. sativa* y subcrónica con Lemnáceas al cobre, cromo y cadmio, permite el uso de estas especies como herramienta de control del nivel de metales pesados en efluentes industriales, o en sitios de vuelco de aguas superficiales en áreas urbano industriales.

Los efectos fitotóxicos en *L. gibba* (clon LgP) por exposición al glifosato, como principio activo y como formulado Roundup®Max, se registran a partir de 1 mg p.a./L. Los efectos observados incluyen alteraciones en la tasa de multiplicación, en el crecimiento y morfología foliar, el número de frondes y la arquitectura de las colonias así como en el contenido de clorofila y el crecimiento de las raíces.

La inhibición de la abscisión, promoviendo colonias con número anormal de frondes, es una respuesta fitotóxica novedosa registrada a bajas concentraciones de glifosato. Resulta también inédito como efecto fitotóxico, aunque de compleja interpretación y cuantificación, la evaluación de la arquitectura de la colonia, integrando los efectos en el número de frondes, crecimiento y morfología foliar y elongación de los estipes.

Los niveles de daño registrados en *L. gibba* (clon LgP) en ensayos de laboratorio a 1 mg/L, concentración de glifosato esperada en el ambiente acuático para las aplicaciones en los cultivos de las dosis recomendadas, concuerdan con lo observado para esta especie en ensayos confinados a campo, en los que se detectaron niveles similares de glifosato en aguas, luego de la aplicación del herbicida en un cultivo de soja RR adyacente.

La toxicidad del herbicida glifosato, comparando concentraciones equivalentes como principio activo y como formulado comercial Roundup®Max, es significativamente mayor cuando la

exposición es al producto formulado. Estas diferencias están asociadas a la presencia de coadyuvantes en el formulado, los que aportan toxicidad, a la vez de favorecer la disponibilidad del principio activo, potenciando sus efectos.

El glifosato a concentraciones relevantes de exposición ambiental es fitotóxico para la flora no blanco. Si se considerara la exposición por contacto directo por deriva en las poblaciones naturales de los ambientes riparios, se esperaría un riesgo mayor, con niveles superiores de daño, lo cual confirman otros trabajos con ensayos confinados a escala de campo realizados en nuestros agroecosistemas.

El clon local de *L. gibba* utilizado en este trabajo, resulta ser un organismo de referencia útil para la evaluación del impacto del uso de este herbicida, ya que es muy sensible a niveles de glifosato factibles de encontrarse en ambientes acuáticos de agroecosistemas de la región pampásica.

Los valores de sensibilidad observados en los ensayos agudos y subcrónicos con *L. sativa* y con los tres clones de Lemnáceas, tanto para los metales pesados como para el herbicida glifosato, superan, en por lo menos un orden de magnitud, a las concentraciones establecidas para los niveles guía de protección de la vida acuática, indicando que, al menos para estas especies y en las condiciones y tiempos de exposición ensayadas, existe un intervalo amplio de protección.

La exaltación o estimulación en la respuesta observada a bajas concentraciones de exposición a metales y al herbicida glifosato para algunos puntos finales, no debe ser interpretada como un efecto beneficioso para los organismos. Se corresponde simultáneamente con efectos inhibitorios en otros parámetros a niveles de exposición equivalentes.

La toxicidad de los metales y del herbicida glifosato en *L. gibba* disminuye significativamente en aguas naturales respecto a la solución nutritiva, dependiendo su biodisponibilidad de las características fisicoquímicas de las mismas.

El clon local de *L. gibba* posee buena capacidad de bioacumulación del Cu(II), Cr(VI) y Cd(II), aún a niveles de exposición fitotóxicos para esta especie. En el intervalo estudiado, la acumulación se incrementa con el aumento de la concentración de exposición y disminuye con la biodisponibilidad de cada metal.

Luego de la exposición subletal a un contaminante los efectos observados no revierten completamente a la condición inicial, luego de un periodo de recuperación en ausencia de

tóxico. Los efectos fitotóxicos pueden a su vez incrementarse. La capacidad de recuperación *L. sativa* y Lemnáceas depende de la concentración de exposición al contaminante, así como del parámetro afectado y niveles de inhibición alcanzados en la exposición.

Los resultados obtenidos en este trabajo, correspondiente a los efectos fitotóxicos del Cu(II), Cr(VI) y Cd(II) y al herbicida glifosato, en semillas y plántulas de *L. sativa* y en clones de *L. gibba* y *L. minor*, considerando puntos finales de respuesta que abarcan un amplio espectro de procesos fisiológicos así como diferentes etapas ontogénicas, además de parámetros poblacionales, aporta información relevante y complementaria a la disponible en la bibliografía acerca de la fitotoxicidad de estos contaminantes. La información generada sobre la variación de la sensibilidad intra e interespecífica, los efectos del tiempo de exposición en la variación de la toxicidad y en el establecimiento de umbrales de respuesta, la biodisponibilidad de los contaminantes en ambientes naturales de la zona, así como la evaluación de la capacidad de recuperación de los daños, es indispensable para el establecimiento de niveles guía de protección ambiental, así como para la estimación del riesgo para las poblaciones naturales.

Si bien en Argentina se han realizado ejercicios de intercalibración del ensayo de toxicidad aguda con semillas, además de su inclusión entre los protocolos del IRAM para la evaluación de efectos fitotóxicos en plantas vasculares, el uso del ensayo subcrónico con Lemnáceas no está difundido ni considerado en nuestro país en evaluaciones ecotoxicológicas. La buena sensibilidad constatada para las Lemnáceas en este trabajo de tesis, inclusive en el clon local de *L. gibba* seleccionado, además de la estandarización de biomasa en laboratorio y del protocolo de ensayo toxicidad, aportan información que avala su uso en futuras aplicaciones ambientales.

VI ANEXOS

VI ANEXOS

VI .1 Niveles de metales pesados en los diferentes compartimentos de ambientes acuáticos en la cuenca del Río de La Plata.

Estudios realizados en cuerpos de agua en áreas urbano-industriales de la Capital Federal, Gran Buenos Aires y La Plata, así como en el Río de la Plata y su franja costera, revelan distintos niveles de contaminación por metales pesados.

Con relación a la cuenca del Río Santiago, tributario del Río de la Plata, se han realizado diferentes estudios tendientes a caracterizar el nivel de contaminación por metales de las aguas y sedimentos. Para las aguas del Río Santiago y la zona cercana del Río de la Plata, en monitoreos realizados entre 1985 y 1989, se citan concentraciones de cobre entre 0,02 y 0,12 mg/L, entre < 0,001 a 0,150 mg/L de zinc y de hasta 0,005 mg/L para el plomo y cromo, mientras que estos metales, en aguas del canal Oeste de acceso al Puerto La Plata, alcanzan valores de 8 mgZn/L, 3,8 mgCr/L, 3 mgCu/L, y 0,13 mgPb/L en sitios de vuelcos industriales (Cattogio, 1991; Ronco et al., 1992).

Colombo et al. (1996) describen la presencia de altas concentraciones de metales en sedimentos del Río Santiago, del canal de acceso al Puerto La Plata, del Río de la Plata (a la altura de la ciudad de La Plata) y de la franja costera, así como en el material particulado en suspensión en agua. Estos autores registran las máximas concentraciones en el sedimento del Río Santiago y en el material particulado en suspensión, predominando metales de claro origen antrópico como el plomo, zinc y cobre, además del manganeso, cuyo origen es principalmente natural.

En el informe correspondiente al año 1997, del monitoreo de la calidad de las aguas de la franja costera sur del Río de la Plata, desde la localidad de San Fernando hasta Magdalena (AA-AGOSBA-ILPLA-SHN, 1997), se menciona al cromo, seguido del plomo, como los metales más abundantes en agua, alcanzando en los puntos más críticos –costa de Avellaneda y Quilmes- valores de hasta 0,060 mgCr/L. Al igual que lo mencionado por Colombo et al. (1996), la mayor concentración en agua se la encuentra asociada al material particulado en suspensión. Otros metales pesados como el cadmio o el mercurio presentan niveles promedio muy bajos (0,0005 mgHg/L y 0,00005 mgCd/L). El análisis de los sedimentos revela valores promedio de cromo de 11 a 78 mg/kg, de 6 a 55 mg/kg de plomo, < 0,5 a 1,2 mg/kg de cadmio y < 0,04 a 0,8 mg/kg de mercurio (AA-AGOSBA-ILPLA-SHN, 1997).

En estudios realizados por Villar et al. (1998) se evaluó el contenido de metales en la columna de agua y en los sedimentos de la cuenca baja del Río Paraná (desde la ciudad de Santa Fe hasta la desembocadura) y en la franja costera sur del Río de la Plata (desde la localidad de San Isidro hasta Punta Blanca). Los valores máximos hallados, en la columna de agua del Río Paraná y Río de La Plata, fueron: < 0,001 y 0,002 mg/L de cadmio, 0,027 y 0,102 mg/L de cromo, 0,021 y 0,045 de plomo y 0,072 y 0,116 mg/L de zinc, respectivamente,

estando estos valores asociados con los sitios de máxima descarga de contaminantes en los cuerpos de agua. Para el material particulado en suspensión del Río Paraná y en los sedimentos del Río de La Plata, los niveles registrados fueron: < 1 y 1 mg/kg de cadmio, 96 y 192 mg/kg de cromo, 147 y 141 mg/kg de plomo y 111 y 332 mg/kg de zinc, respectivamente. Cataldo et al. (2001) informan para las aguas del Río Paraná inferior, valores de Zn, Cu y Cr entre 1,6 y 4,9 veces superior a los límites permitidos para la protección de la vida acuática. Estudios más recientes realizados por Villar et al. (2001) informan, para las aguas del Río de La Plata (altura de Punta Lara, a 50 km de la ciudad de Buenos Aires) valores de Cu, y Cr de 0,008 y 0,011 mg/L, respectivamente, y valores de Cd menores al límite de detección (0,0002 mg/L). Estos resultados indican una gran variación en la concentración de metales para las aguas del Río de La Plata, en comparación a lo informado en estudios anteriores (AA-AGOSBA-ILPLA-SHN, 1997; Villar et al., 1998).

Para el caso de los arroyos del Gato, Martín, Carnaval y del Pescado (Partido de La Plata y Ensenada, Buenos Aires) que desembocan en el estuario del Río de la Plata, Manassero et al. (1998) analizaron el contenido de metales pesados en los sedimentos en diferentes sectores desde la naciente hasta su desembocadura. Estos autores establecen como línea de base de la región al arroyo del Pescado, siendo los valores medios de las concentraciones de los metales estudiados en los sedimentos los siguientes: 16,8 mgCr/kg, 15,1 mgNi/kg, 23,1 mgCu/kg, 8,6 mgZn/kg, 0,32 mgCd/kg, 0,5 mgHg/kg y 12,5 mgPb/kg (peso seco). En los demás cuerpos de agua la concentración de metales es significativamente superiores y, de manera general, ésta se incrementan desde las nacientes hacia la región media (área de gran impacto antrópico), observándose hacia la desembocadura valores más bajos. Los valores máximos se registran en el arroyo del Gato.

Estudios realizados en el Río Salado inferior (Prov. Santa Fé) indican valores de Cu(II), Cr(VI) y Cd(II) de hasta 0,022, 0,005 y 0,002 mg/L, respectivamente (Gagneten et al., 2007). Para el caso de los ríos Paraná, Paraguay y sus afluentes, los máximos valores detectados son de hasta 0,022, 0,005 y 0,002 mg/L, para el Cu(II), Cr(VI) y Cd(II) respectivamente (SADS-PNA-OPS-UNLP, 2007).

Con respecto a los controles ejercidos sobre este tipo de contaminación en el compartimento acuático, en muchos países desarrollados existen normativas que establecen los niveles de metales admitidos según sea el uso que se le da al recurso. Las leyes existentes en Argentina se refieren principalmente al control de residuos peligrosos. La Ley Nacional N° 24.051/92 y su decreto Reglamentario 831/93 regulan la generación, manipulación, transporte, tratamiento y disposición final de estos residuos. Para el caso de los metales pesados esta ley establece, en su Anexo I, que todo residuo que contenga estos elementos es considerado peligroso cuando éstos se hallan por encima de un nivel capaz de producir daño, directa o indirectamente, a seres vivos o contaminar el suelo, agua, atmósfera o el ambiente en general. Con relación a esto, en el Anexo II del Decreto Reglamentario, se sugieren niveles guía de

concentración de metales admitidos para la calidad de las aguas según sus diferentes usos. En el informe correspondiente al año 1997, del monitoreo de la calidad de las aguas de la franja costera sur del Río de la Plata (AA-AGOSBA-ILPLA-SHN, 1997) también se recomiendan niveles guía para diferentes usos del agua. Por otra parte, el Código Alimentario Argentino (Res. MSyAS N°494/94), se establecen valores máximos permitidos para el agua de bebida.

En la Tabla VI.1 se indican los niveles guía para el cobre (II), cromo (VI) y cadmio (II), metales pesados que se considerarán en este estudio, para aguas con diferentes usos para la Argentina, según diferentes reglamentaciones, además de lo sugerido en otros países.

Tabla VI.1: Niveles guía de Cu(II), Cr(VI) y Cd(II) para la calidad del agua superficial según sus diferentes usos.

CALIDAD DEL AGUA SEGÚN DIFERENTES USOS	METALES PESADOS (mg/L)					
	COBRE (II)		CROMO (VI)		CADMIO (II)	
	Nivel guía	Ref. Bibl.	Nivel guía	Ref. Bibl.	Nivel guía	Ref. Bibl.
Fuentes de agua de bebida humana con tratamiento convencional (agua superficial)	1	A	0,05	A	0,005	A
	≤ 0,1	B	≤ 0,05*	B	≤ 0,005	B
	1	C	0,05*	C	0,005	C
	-	D	≤ 0,02	D	≤ 0,0075	D
	1,3 0,02	F H	- 0,05	- H	- 0,001	- H
Protección de la vida acuática en agua dulce superficial	0,002 a	A1	0,002	A2	0,0002 a	A1
	0,004		0,02	A3	0,002	
	≤ 0,002	B	≤ 0,002	B	≤ 0,0002	B
	$\# \leq e^{0,7625 * (\ln \text{dureza}) - 1,6}$	D1	≤ 0,0025	D1	$\# \leq e^{1,1208 * (\ln \text{dureza}) - 7,3}$	D1
	0,013	F1	0,016	F	0,004	F1
	0,002 a 0,004	G1	0,001	G	0,00002	G1
	0,02	H	0,05	H	0,001	H
Idem agua salobre superficial	≤ 0,00095	D2	-	-	≤ 0,005	D2
	0,005	F2	1,1	F2	0,042	F2
	-	-	0,0015	G2	0,00012	G2
	0,05	H	0,05	H	0,005	H
Fuentes de agua para irrigación	≤ 0,2	B	≤ 0,05	B	≤ 0,005	B
	≤ 0,065 a ≤ 0,223	D3	≤ 0,008	D	≤ 0,004 a ≤ 0,013	D3
	0,2	E	0,1*	E	0,01	E
	0,02	H	0,05	H	0,001	H

Tabla VI.1: continuación

	COBRE (II)		CROMO (VI)		CADMIO (II)	
	Nivel guía	Ref. Bibl.	Nivel guía	Ref. Bibl.	Nivel guía	Ref. Bibl.
Fuentes de agua para bebida del ganado	1	A	1*	A	0,02	A
	≤ 0,2	B	≤ 0,05	B	≤ 0,005	B
	≤ 0,03	D4	≤ 0,02	D4	≤ 0,08	D4
Fuentes de agua para recreación	-	-	≤ 0,05	B	≤ 0,005	B
	0,02	H	0,05	H	0,001	H

Referencia bibliográfica A: Niveles guía sugeridos en el Anexo II del Decreto Reglamentario 831/93, Ley Nacional N° 24.051/93 de residuos peligrosos A1: varía según dureza, A2: fito y zooplancton, A3: peces; B: AA-AGOSBA-ILPLA-SHN (1997); C: Código Alimentario Argentino (Res. MSyAS N°494/94); D: SRHN (2003b, 2004, 2005) D1: agua dulce filtrada, dureza expresada en mg/L CO₃Ca, D2: agua marina filtrada, D3: Tasa de Riego ≤ 12000 a ≤ 3500 m³/ha, D4: agua sin filtrar para aves y mamíferos E: FAO (1985), máximas concentraciones admitidas; F: Criterio de Máxima Concentración, USEPA (1998), Water Quality Criteria Documents, Federal Register 63(237), 68353-68364, F1: varía según dureza, F2: agua salada; G: Canadian Council of Ministers of the Environment (1999), Canadian Environmental Quality Guidelines, G1: varía según dureza, G2: ambiente marino; H: Legislación Federal de Brasil, Res. N°20 del Consejo Nacional del Medio Ambiente (1986). * Cromo total. # ug/L

VII BIBLIOGRAFIA CITADA

VII BIBLIOGRAFIA CITADA

- AA-AGOSBA-ILPLA-SHN, 1997. Calidad de las Aguas de la Franja Costera Sur del Río de la Plata (San Fernando-Magdalena). Consejo Permanente para el Monitoreo de la Calidad de las Aguas de la Franja Costera Sur del Río de la Plata (Edts.), Buenos Aires, 187 pp.
- Aksoy A, Hale WHG & Dixon JM, 1999. *Capsella bursa-pastoris* (L.) Medic. as biomonitor of heavy metals. *The Science of the Total Environment* 226, 177-186.
- American Society for Testing and Materials, 1991a. Standard practice for conducting early seedling growth tests. E1598-94. En: *Annual Book of ASTM Standards*, Vol. 11.04. Philadelphia, PA. 1785 pp.
- American Society for Testing and Materials, 1991b. Standard guide for conducting static toxicity tests with *Lemna gibba* G3. E1415-91. En: *Annual Book of ASTM Standards*, Vol. 11.04. Philadelphia, PA. 1785 pp.
- Amrhein N, Deus B, Gehrke P & Steinrücken HC, 1980. The site of inhibition of the shikimate pathway by glyphosate. II. Interference of glyphosate with chorismate formation *in vivo* and *in vitro*. *Plant Physiology* 66, 830-834.
- APHA-AEEA-WPCF, 1992. Métodos Normalizados para el Análisis de Aguas Potables y Residuales. American Public Health Association. Ed. Diaz de Santos SA, Madrid. 1576 pp
- APHA-AWWA-WEF, 1998. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 20th ed, American Public Health Association, Washington DC.
- Arambašić MB, Bjelić S & Subakov G, 1995. Acute toxicity of heavy metals (copper, lead, zinc), phenol and sodium on *Allium cepa* L., *Lepidium sativum* L. and *Daphnia magna* St.: comparative investigations and the practical applications. *Water Research* 29:2, 497-503.
- Araujo A, Monteiro R & Abarkeli R, 2003. Effect of glyphosate on the microbial activity of two Brazilian soils. *Chemosphere* 52, 799-804.
- Arduini I, Godbold DL & Onnis A, 1996. Cadmium and copper uptake and distribution in mediterranean tree seedling. *Physiologia Plantarum* 97, 111-117.
- Ashmore M, 1997. Plant and pollution. En *Plant Ecology*. Blackwell Science Ltd., Oxford. 717 pp.
- Association Française de Normalisation, 1996. Determination of the inhibitory effect on the growth of *Lemna minor*. AFNOR XP T 90-337. Paris La Défense Cedex, France.
- Baird C, 2001. Química Ambiental. Reverté, Barcelona. 622 pp.
- Barceló J & Poschenrieder C, 1989. Estrés vegetal inducido por metales pesados. *Investigación y Ciencia* 154, 54-63.
- Barceló J & Poschenrieder C, 1997. Chromium in plants. En *Chromium Environmental Issues*. Franco Angeli s.r.l., Milano. 295 pp.

- Barlett RJ, 1997. Chromium redox mechanisms in soils: should we worry about Cr(VI)? En Chromium Environmental Issues. Franco Angeli s.r.l., Milano. 295 pp.
- Barua B & Jana S, 1986. Effects of heavy metals on dark induced changes in Hill reaction activity, chlorophyll and protein contents, dry matter and tissue permeability in detached *Spinacia oleracea* L. leaves. *Photosynthetica* 20:1, 75-76.
- Blackburn L & Boutin C, 2003. Subtle effects of herbicide use in the context of genetically modified crops: A case study with glyphosate (Roundup R). *Ecotoxicology* 12, 271-28
- Blaise C, Sergy G, Wells P, Bermingham N & Van Coillie R, 1988. Biological testing - development, application and trends in canadian environmental protection laboratories. *Toxicity Assessment: An International Journal* 3, 385-406.
- Bollard EG, 1983. V.5 Involment of unusual elements in plants growth and nutrition, 695-729. En *Encyclopedia of Plant Physiology New Series Vol. 15 B Inorganic Plant Nutrition*, Läuchli A & Bieleski RL Eds. Springer-Verlag, Berling. 870 pp.
- Boniardi N, Rota R & Nano G, 1998. Effect of dissolved metals on the organic load removal efficiency of *Lemna gibba*. *Water Research* 33, 530-538.
- Bories G, 1997. Bioavailability of chromium: transfer in the food chain and toxicological issues. En Chromium Environmental Issues. Franco Angeli s.r.l., Milano. 295 pp.
- Bourdeau P, Somers E, Richardson G & Hickman J (eds), 1990. Short-term Toxicity Tests for Non-genotoxic Effects. SCOPE 41-SCOMSEC 4. J. Wiley and Sons, New York. 353 pp.
- Boutin C, Freemark KE & Keddy CJ, 1993. Proposed guidelines for registration of chemical pesticides: nontarget plant testing and evaluation. Technical Report Series N° 145. Canadian Wildlife Service (Headquarters), Environmental Canada, Ottawa.
- Boutin C, Freemark KE & Keddy CJ, 1995. Overview and rationale for developing regulatory guidelines for nontarget plant testing with chemical pesticides. *Environmental Toxicology and Chemistry* 14, 1465-1475.
- Boutin C, Jobin B & Bélanger L, 2003. Importance of riparian habitats to flora conservation in farming landscapes of southern Québec, Canada. *Agriculture Ecosystems & Environment* 94, 73-87.
- Boutin C & Rogers CA, 2000. Pattern of sensitivity of plant species to various herbicides. An analysis with two databases. *Ecotoxicology* 9, 255-271.
- Bowers N, Pratt JR, Beeson D & Lewis M, 1997. Comparative evaluation of soil toxicity using lettuce seeds and soil ciliates. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16:2, 207-213.
- Breckle & Kahle, 1992. Effects of toxic heavy metals (Cd, PI) on growth and mineral nutrition off beech (*Fagus sylvática* L.). *Vegetatio* 101, 43-53.
- Briat JF & Leburn M, 1999. Plant responses to metal toxicity. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie* 322(1), 43-54.

- Brooks KM, 1997. Literature Review and Assessment of the Environmental Risks Associated With the Use of CCA Treated Wood Products in Aquatic Environments. Western Wood Preservers Institute, Aquatic Environmental Sciences WA, 59pp
- Burton GA, 1990. Ecotoxicology. Environmental Science and Technology 24, 9.
- Burton MAS, 1986. Biological monitoring of environmental contaminants (Plants). Monitoring and Assessment Research Centre MARC, technical report number 32. University of London.
- Cabrera AL & Zardini EM, 1993. Manual de la Flora de los Alrededores de Buenos Aires. Acme, Buenos Aires. 755 pp.
- Cairns J & Mount DI, 1990. Aquatic toxicology. Environmental Science and Technology 24, 154-161.
- Camilión MC, Sayavedra I, Silva I & Ronco AE, 2006. Erosión hídrica en suelos bajo siembra directa. Anales del XXVI Congreso Argentino de Química 8-009, 4 pp.
- Carranza CA, 1998. A minimização do custo do produto agrícola em ensaios adubação mineral. Tesis de maestría Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, Universidade de São Paulo. 47 pp.
- Carriquiriborde P & Ronco AE, 2002. Sensitivity of the neotropical Teleost *Odonthestes bonariensis* (Pisces, Atherinidae) to Chromium (VI), Copper (II), and Cadmium (II). Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 69, 294-301.
- Carriquiriborde P & Ronco AE, 2008. Distinctive accumulation patterns of Cd(II), Cu(II), and Cr(VI) in tissue of the South American teleost, pejerrey (*Odontesthes bonariensis*). Aquatic Toxicology 86:2, 313-322.
- Cary EE, Allaway WH & Olson OE, 1977. Control of chromium concentrations in food plants. I. Absorption and translocation of chromium in plants. II. Chemistry of chromium in soils and its availability to plants. J. Agric. Food Chem. 25, 300-310.
- Castillo G (ed.), 2004. Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas. Estandarización, Intercalibración, Resultados y Aplicaciones. Edición conjunta IDRC, SEMARNAT, IMTA, México. 188 pp.
- Cataldo D, Colombo JC, Boltovskoy D, Bilos C & Landoni P, 2001. Environmental toxicity assessment in the Paraná river delta (Argentina): simultaneous evaluation of selected pollutants and mortality rates of *Corbicula fluminea* (Bivalvia) early juveniles. Environmental Pollution 112, 379-389.
- Catoggio JA, 1991. Contaminación del agua. Causas de la contaminación de aguas superficiales y subterráneas. Precipitaciones ácidas, eutroficación. Polución costera. En: Latinoamérica Medio Ambiente y Desarrollo. Fundación Roulet-Fundación Nauman, Buenos Aires, 137-155.
- Caux PY, Weinberger P & Carlisle DB, 1988. A physiological study of the effects of triton surfactants on *Lemna minor* L. Environmental Toxicology and Chemistry 7, 671-676.

- Chakravarty P & Chatarpaul L, 1990. Non target effect of herbicides: I. Effect of glyphosate and hexazinone on soil microbial activity. Microbial population and *in-vitro* growth of ectomycorrhizal fungi. *Pesticide Management Science* 28, 233-241.
- Chatterjee J & Chatterjee C, 2000. Phytotoxicity of cobalt, chromium and copper in cauliflower. *Environmental Pollution* 109:1, 69-74.
- Cheung, YH, Wong MH & Tam NFY, 1989. Root and shoot elongation as an assessment of heavy metal toxicity and 'Zn equivalent value' of edible crops. *Hydrobiologia* 188/189, 377-383.
- Christensen JB & Christensen TH, 2000. The effect of pH on the complexation of Cd, Ni and Zn by dissolved organic carbon from leachate-polluted groundwater. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21:2, 275-280.
- Colombo JC, Bilos C, Rodríguez Presa MJ & Schroeder F, 1996. Contaminación química en el Río de la Plata. *Gerencia Ambiental* 1, 420-425.
- Conzonno VH & Fernández Cirelli A, 1988. Soluble humic substances from Chascomús Pond (Argentina). Factors influencing distribution and dynamics. *Arch. Hydrobiol.* 111:3, 467-473.
- Conzonno VH & Claverie EF, 1990. Chemical characteristics of the water of Chascomús pond (Provincia de Buenos Aires, Argentina). *Limnological Implications. Rev. Brasil. Biol.* 50:1, 15-21.
- Correl DL, 2005. Principles of planning and establishment of buffer zones. *Ecological Engineering* 24, 433-439.
- Couble K & Wagner RS, 2005. Sublethal effects of glyphosate on amphibian metamorphosis and development. *Bulletin of Environmental Contamination & Toxicology* 75, 429-435.
- Cox C, 2003. Herbicide Factsheet Glyphosate (Roundup). *Journal of Pesticidal Reform* 18:3-17, 1998, updated 4/03.
- Crawley MJ, 1997. *Plant Ecology*. Blackwell Science Ltd., Oxford. 717 pp.
- Cunningham SD & Lee CR, 1995. Capítulo 9: Phytoremediation: plant-based remediation of contaminated soils and sediment. En *Bioremediation, Science and Applications*. Skipper HD & Turco RF (Eds). *Soil Science Special Publication Number 43*. Soil Science Society of America Inc., American Society of Agronomy, Inc. & Crop Science of America, Inc., Madison. 322 pp.
- Delgado M, Bigeriego M & Guardiola E, 1993. Uptake of Zn, Cr and Cd by hyacinths. *Water Research* 27, 269-272.
- Deng H, Ye ZH & Wong MH, 2004. Accumulation of lead, zinc, copper and cadmium by 12 wetland plant species thriving in metal-contaminated sites in China. *Environmental Pollution* 132, 29-40.
- Dirilgen N & Dogan F, 2002. Speciation of chromium in the presence of copper and zinc and their combined toxicity. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 53, 397-403.

- Djingova R, Kuleff I & Andreev N, 1993. Comparison of the ability of several vascular plant to reflect environmental pollution. *Chemosphere* 27:8, 1385-1396.
- Dushenkov V, Kumar N, Motto H & Raskin I, 1995. Rhizofiltration: the use of plants to remove heavy metals from aqueous streams. *Environmental Science & Technology* 29, 1239-1245.
- Dutka B, 1989. Short-term root elongation toxicity bioassay. *Methods for Toxicological Analysis of Waters, Wastewaters and Sediments*. National Water Research Institute (NWRI). Environment Canada.
- Ellis RH, Hong TD & Roberts EH, 1985. *Handbook of Seed Technology for Genebanks*. Vol.1 Principles and Methodology. International Board of Plant Genetic Resources, Rome, pp 210.
- Environment Canada, 1990. Guidance document on control of toxicity tests precision using reference toxicants. EPS1/RM/12, Environmental Protection Service, Environment Canada, Ottawa, Ontario.
- Environment Canada, 1999a. Guidance document on application and interpretation of single-species tests in environmental toxicology. EPS1/RM/34, Environmental Protection Service, Environment Canada, Ottawa, Ontario.
- Environment Canada, 1999b. Biological test method: test for measuring the inhibition of growth using the freshwater macrophyte, *Lemna minor* EPS1/RM/37, Environmental Protection Service, Environment Canada, Ottawa, Ontario.
- Environment Canada, 2005. Guidance document on statistical methods for environmental toxicity tests. EPS 1/RM/46 (with june amendments 2007). Method Development and Applications Section Environmental Technology Centre, Environment Canada, Ottawa, Ontario.
- Environment Canada, 2007 Biological test method: test for measuring the inhibition of growth using the freshwater macrophyte, *Lemna minor*. EPS 1/RM/37. Method Development and Applications Section Environmental Technology Centre, Environment Canada, Ottawa, Ontario.
- Fiskesjö G, 1988. The *Allium*-test an alternative in environmental studies: the relative toxicity of metal ions. *Mutation Research* 197, 243-260.
- Frankart C, Eullaffroy P & Vernet G, 2002. Photosynthetic responses of *Lemna minor* exposed to xenobiotics, copper and their combinations. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 53, 439-445.
- Franzaring J, Bierl R & Ruthsatz B, 1992. Active biological monitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons using kale (*Brassica oleracea*) as a monitor-species. *Chemosphere* 25,827-834.
- Gagneten AM, Gervasio S & Paggi JC, 2007. Heavy Metal Pollution and Eutrophication in the Lower Salado River Basin (Argentina). *Water Air Soil Pollution* 178, 335–349.

- Gabellone NA, Solari LC & Claps MC, 2001. Planktonic and physico-chemical dynamics of a markedly fluctuating backwater pond associated with a lowland river (Salado River, Buenos Aires, Argentina). *Lakes and Reservoirs: Research and Management* 6, 133-142.
- Gelosi L., 2009. Evaluación toxicológica para el registro de productos fitosanitarios en la República Argentina. XVI Congreso Argentino de Toxicología, Chubut.
- Gerloff GC & Gabelman WH, 1983. Genetic basis of inorganic plant nutrition. En *Encyclopedia of Plant Physiology New Series Vol. 15 B Inorganic Plant Nutrition*, Läuchli A & Bielecki RL Eds. Springer-Verlag, Berlin. 870 pp.
- Gerzabek MH & Ullah SM, 1990a. Influence of fulvic and humic acids on Cu and Ni toxicity to *Zea mays* L.. *Journal für Landwirtschaftliche Forschung* 41:2, 115-124.
- Gerzabek MH & Ullah SM, 1990b. Influence of fulvic and humic acids on Cd, Ni and Zn uptake by *Zea mays* L.. Seibersdorf, Österreichisches Forschungszentrum 4539, 1-18.
- Giesy JP, Dobson S & Solomon KR, 2000. Ecotoxicological risk assessment of Roundup herbicide. *Review of Environmental Contamination and Toxicology* 167, 35-120.
- Gil JM, Moral R, Gómez I, Navarro Pedreño J & Mataix J, 1995. Effect of cadmium on physiological and nutritional aspects of tomato plant. 1-Chlorophyll (a and b) and carotenoids. *Fresenius Environmental Bulletin* 4, 430-435.
- Gille G & Sigler K, 1995. Oxidative stress and living cells (Review). *Folia Microbiology* 40, 131-152.
- Golterman H, Clymo R & Ohnstad M, 1978. *Methods for Physical and Chemical Examination of Freshwaters*. Blackwell Sci. Publ., Oxford, 166 pp
- Gómez N & Licursi M, 2001. The Pampean Diatom Index (IDP) for assessment of rivers and streams in Argentina. *Aquatic Ecology* 35, 173-181.
- Gómez SE, Villar CA & Bonetto C, 1998. Zinc toxicity in the fish *Cnesterodon decemmaculatus* in the Paraná river and Río de la Plata estuary. *Environmental Pollution* 99:2, 159-165.
- Grassi V, Rives C, Sobrero C & Ronco A, 2000. Aplicación de bioensayos de toxicidad para la evaluación de riesgo de suelos contaminados por la actividad petrolera. XX Jornadas Interdisciplinarias de Toxicología ATA, Buenos Aires.
- Greger M & Johansson M, 1992. Cadmium effects on leaf transpiration of sugar beet (*Beta vulgaris*). *Physiologia Plantarum* 86, 465-473.
- Gupta M & Devi S, 1994. Chronic toxicity of cadmium in *Pteris vittata*, a roadside fern. *Ecotoxicology* 3, 235-247.
- Gupta M, Sinha S & Chandra P, 1994. Uptake and toxicity of metals in *Scirpus lacustris* L and *Bacopa monnieri* L. *Journal of Environmental Science and health Part A: Environmental Science and Engineering and Toxic and Hazardous Substance Control* A29(10), 2185-2202.
- Gupta M, Sinha S & Chandra P, 1996. Copper –induced toxicity in aquatic macrophyte, *Hydrilla verticillata*: effect of pH. *Ecotoxicology* 5, 23-33.

- Hadad HR, Maine MA & Bonetto CA, 2006. Macrophyte growth in a pilot-scale constructed wetland for industrial wastewater treatment. *Chemosphere* 63, 1744-1753.
- Harrison RM (ed), 1992. *Pollution: Causes, Effects & Control*. Royal Society of Chemistry, Cambridge. 393 pp.
- Hassett JJ, Miller JE & Koeppe DE, 1976. Interaction of lead and cadmium on maize root growth and uptake of lead and cadmium by roots. *Environmental pollution* 11, 297-302.
- Hendry GAF, Baker AJM & Ewart CF, 1992. Cadmium tolerance and toxicity, oxygen radical processes and molecular damage in cadmium-tolerant and cadmium-sensitive clones of *Holcus lanatus* L. *Acta Bot. Neerl.* 41, 271-281.
- Hendry GAF & Crawford RMM, 1994. Oxygen and environmental stress in plants - an overview. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh*, 1628, 10.
- Hillman WS & Culley DD, 1978. The use of duckweed. *American Science* 66, 442-451.
- Hoagland DR & Arnon DI (Revised by Arnon DI), 1950. The water-culture methods for growing plants without soil. Circular 347. California Agric. Exp. St, The College of Agric. Univ. of California, Berkeley.
- Holländer H & Amrhein N, 1980. The site of inhibition of the shikimate pathway by glyphosate. I. Inhibition by glyphosate of phenylpropanoid synthesis in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). *Plant Physiology* 66, 823-829.
- Hossner LR, Loeppert RH, Newton RJ & Szaniszlo PJ, 1998. Literature review: Phytoaccumulation of chromium, uranium and plutonium in plant systems. Amarillo National Resource Center for Plutonium, ANRCP 9803. <http://www.osti.gov/bridge/>.
- Howe CM, Berrill M, Pauli BD, Helbing CC, Weny K & Veldhoen N, 2004. Toxicity of glyphosate-based pesticide to four North American frog species. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23:8, 1928-1938.
- Huebert DB & Shay JM, 1992. The effect of EDTA on cadmium and zinc uptake and toxicity in *Lemna trisulca* L.. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 22, 313-318.
- Huebert DB & Shay JM, 1993a. Considerations in the assessment of toxicity using duckweeds. *Environmental Toxicology and Chemistry* 12, 481-483.
- Huebert DB & Shay JM, 1993b. The response of *Lemna trisulca* L. to cadmium. *Environmental Pollution* 80, 247-253.
- Huebert DB, Dyck BS & Shay JM, 1993. The effect of EDTA on the assessment of Cu toxicity in the submerged aquatic macrophyte, *Lemna trisulca* L.. *Aquatic Toxicology* 24, 183-194.
- Hulzebos EM, Adema DMM, Dirven-van Breemen EM, Henzen L, van Dis WA, Herbold HA, Hoekstra JA, Baerselman R & van Gestel CAM, 1993. Phytotoxicity studies with *Lactuca sativa* in soil and nutrient solution. *Environmental Toxicology and Chemistry* 12, 1079-1094.

- Information Ventures, Inc., 2002. Glyphosate, pesticide fact sheet. Preparado por Information Ventures, Inc. para U.S. Forest Service Contact. Noviembre 1995. Copyright © 1994-2002. <http://infoventures.com/e-hlth/>.
- IRAM, 2004. Calidad Ambiental, Calidad de Agua. Determinación de la inhibición de la movilidad de *Daphnia magna* Straus (Cladóceras, Crustácea). Ensayo de toxicidad aguda. IRAM 29130.
- IRAM, 2006a. Calidad Ambiental, Calidad de Agua, Metodo de ensayo de inhibición del crecimiento de algas verdes unicelulares de agua dulce. IRAM 29111.
- IRAM, 2006b. Calidad Ambiental, Calidad de Agua, Determinación de la toxicidad letal aguda de sustancias en peces de agua dulce. Método semiestático. IRAM 29112.
- IRAM, 2008. Calidad Ambiental, Metodos Biologicos, Metodo de ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L.). Metodo en papel. IRAM 29114.
- IRAM, 2009. Calidad Ambiental, Calidad de Suelos. Determinación de los efectos de los contaminantes sobre la flora del suelo. Ensayo de emergencia en plantulas de lechuga (*Lactuca sativa* L.), IRAM 29117.
- Jalil A, Selles F & Clarke JM, 1994a. Growth and cadmium accumulation in two durum wheat cultivars. Communications in Soil Science and Plant Analysis 25:15&16, 2597-2611.
- Jalil A, Selles F & Clarke JM, 1994b. Effect of cadmium on growth and the uptake of cadmium and other elements by durum wheat. Journal of Plant Nutrition 17, 1839-1858.
- Jana S, 1987. Accumulation of Hg and Cr by three aquatic species and subsequent changes in several physiological and biochemical plant parameters. Water Air and Soil Pollution 38, 105-109.
- Jayaprakash C, Srinivas N, Rao BV & Rao PVVP, 1994. Effect of chromium (VI) on the mitotic activity of *Allium cepa* root meristems. Journal of Environmental Biology 15, 255-261.
- Kabata-Pendias A & Pendias H, 1985. Trace Elements in Soil and Plants. CRC Press, Inc., Boca Raton, FL. 315 pp.
- Kahle H, 1993. Response of roots of trees to heavy metals. Environmental and Experimental Botany 33:1, 99-119.
- Kaplan D, Heimer YM, Abeliovich A & Goldsbrough PB, 1995. Cadmium toxicity and resistance in *Chlorella* sp. Plant Science 109, 129-137.
- Kleiman ID & Cogliatti DH, 1992. Efecto de dos especies de cromo (Cr III y Cr VI) sobre el crecimiento de plantas de trigo. Actas XIX Reunión Argentina de Fisiología Vegetal. Córdoba 1, 265-266.
- Kleiman ID, Cogliatti DH & Cardozo JA, 1992. Efecto de la deficiencia de sulfato sobre la absorción de cromo en plantas de trigo. Actas XIX Reunión Argentina de Fisiología Vegetal. Córdoba 1, 404-405.
- Kneer R & Zenk MH, 1992. Phytochelatins protect plant enzymes from heavy metals poisoning. Phytochemistry 34:8, 2663-2667.

- Kovačević G, Kastori R & Merkulov LJ, 1999. Dry matter and leaf structure in young wheat plants as affected by cadmium, lead and nickel. *Biologia Plantarum* 42:1, 119-123.
- Krogh KA, Halling-Sorensen B, Mogensen BB & Vejrup KV, 2003. Environmental properties and effect of non ionic surfactants adjuvants in pesticides: a review. *Chemosphere* 50, 871-901.
- Kubota J, Welch RM & Van Campen DR, 1992. Partitioning of cadmium, copper, lead and zinc amongst above-ground parts of seed and grain crops grown in selected locations in the USA. *Environmental Geochemistry and Health* 14:3, 91-100.
- Kumar N, Dushenkov V, Motto H & Raskin I, 1995. Phytoextracción: The Use of Plants to Remove Metals from Soil. *Environmental Science & Technology* 29, 1232-1238.
- Kummerová M & Brandejsová R, 1994. Project TOCOEN. The fate of selected pollutants in the environment. Part XIX. The phytotoxicity of organic and inorganic pollutants-cadmium. The effect of cadmium on the growth of germinating maize plants. *Toxicological and Environmental Chemistry* 42, 115-122.
- Landolt E, 1986. Biosystematic investigations in the family of duckweeds (Lemnaceae). (Vol. 2). The family of Lemnaceae -a monographic study, vol. 1. *Veröffentlichungen des Geobotanischen Institutes der ETH, Zürich*, 71 Heft, 563 pp.
- Landolt E, 1996. 24. Lemnaceae (p 8)., en Hunziker AT (dir.) *Flora Fanerogámica Argentina*, fascículo 21, 24 Pro Flora CONICET.
- Landolt E & Kandeler R, 1987. Biosystematic investigations in the family of duckweeds (Lemnaceae). (Vol. 4). The family of Lemnaceae -a monographic study, vol. 2. *Veröffentlichungen des Geobotanischen Institutes der ETH, Zürich*, 95 Heft, 638 pp.
- Laws EA, 1993. *Aquatic Pollution: an Introductory Text*. John Wiley & Sons, Inc., New York. 611pp.
- Lenka M, Panda KK & Panda BB, 1992. Monitoring and assessment of mercury pollution in the vicinity of a chloralkali plant. IV. Bioconcentration of mercury in *in situ* aquatic and terrestrial plants at Ganjam, India. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 22, 195-202.
- Levitt J, 1980. *Responses of Plants to Environmental Stresses*, vol. 11. Academic Press Inc., 607 pp.
- Lewis MA, 1995. Use of freshwater plants for phytotoxicity testing: a review. *Environmental Pollution* 87, 319-336.
- Li T & Xiong Z, 2004a. A novel response of wild-type duckweed (*Lemna paucicostata* Hegelm.) to heavy metals. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19, 95-102
- Li T & Xiong Z, 2004b. Cadmium-induced colony desintegration of duckweed (*Lemna paucicostata* Hegelm.) and as biomarker of phytotoxicity. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 59, 174-179.

- Lidon FC & Henriques FS, 1992. Copper toxicity in rice: diagnostic criteria and effect on tissue Mn and Fe. *Soil Science* 154:2, 130-135.
- Liebert HP, 1986. The influence of potassium and light on the mineral content of dark precultivated *Lemna gibba* L. *Wissenschaftliche Zeitschrift der Friedrich-Schiller-Universitaet Jena Naturwissenschaftliche Reihe* 35, 639-646.
- Liu D, Jiang W & Li M, 1992. Effects of trivalent and hexavalent chromium on root growth and cell division of *Allium cepa*. *Hereditas* 117, 23-29.
- Liu J, Xiong Z, Li T & Huang H, 2004. Bioaccumulation and ecophysiological responses to copper stress in two populations of *Rumex dentatus* L. from Cu contaminated and non-contaminated sites. *Environmental and Experimental Botany* 52, 43-51.
- Lockhart, WL, Billeck BN & Baron CL, 1989. Bioassays with a floating aquatic plant (*Lemna minor*) for effects of sprayed and dissolved glyphosate. *Hydrobiologia* 188/189, 353-359.
- Lydon J & Duke SO, 2006. Pesticide effects on secondary metabolism of higher plants. *Pesticide Science* 25:4, 361-373.
- Lytle JS & Lytle TF, 2001. Use of plants for toxicity assessment of estuarine ecosystems. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20, 68-83.
- Mackereth F, Heron J & Talling J, 1978. Water analysis: some revised methods for limnologists. fresh Water Biological Association. Scientific Publication N°36, Kendall, 117pp
- Maine MA, Duarte MV & Suñé NL, 2001. Cadmium uptake by floating macrophytes. *Water Research* 35:11, 2629-2634.
- Maine MA, Suñé NL & Lager SC, 2004. Chromium bioaccumulation: comparison of the capacity of two floating aquatic macrophytes. *Water Research*, 38:6, 1494-1501.
- Maine MA, Suñé NL, Hadad H, Sánchez G & Bonetto C, 2007. Removal efficiency of a constructed wetland for wastewater treatment according to vegetation dominance. *Chemosphere*, 68:6, 1105-1113.
- Maine MA, Suñe N, Hadad H, Sánchez G & Bonetto C, 2009. Influence of vegetation on the removal of heavy metals and nutrients in a constructed wetland. *Journal of Environmental Management* 90, 355-363.
- Maksymiec W, Russa R, Urbanik-Sypniewska T & Baszyński T, 1994. Effect of excess Cu on the photosynthetic apparatus of runner bean leaves treated at two different growth stages. *Physiologia Plantarum* 91, 715-721.
- Manahan S, 2007. *Introducción a la Química Ambiental*. Reverté, Barcelona, 725 pp.
- Manassero M, Camilión C & Ronco A, 1998. Sedimentología y geoquímica de metales pesados en sedimentos de fondo de arroyos de la vertiente del Río de La Plata, Provincia de Buenos Aires. *Actas de la VII Reunión Argentina de Sedimentología*, 69-77.
- Margalef R, 1983. *Limnología*. Omega, Barcelona, 1010 pp.

- Markert B, 1992. Presence and significance of naturally occurring chemical elements of the periodic system in the plant organism and consequences for future investigations on inorganic environmental chemistry in ecosystems. *Vegetatio* 103, 1-30.
- Marrs RH, Frost AJ, Plant RA & Lunnis P, 1993. Determination of buffer zones to protect seedlings of non-target plants from the effects of glyphosate spray drift. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 45, 283-293.
- Marschner H, 1983. General introduction to the mineral nutrition in plants (5-49). En *Encyclopedia of Plant Physiology New Series Vol. 15A, Inorganic Plant Nutrition*, Läuchli A & Bielecki RL Eds. Springer-Verlag, Berlin. 870 pp.
- Martin ML, Sobrero MC, Rivas C, Rimoldi F & Ronco AE, 2003. Impacto del uso de pesticidas asociado a la siembra directa sobre especies no-blanco. *Flora riparia y acuática. Memorias Conferencia Internacional Usos del Agua, Agua 2003, Cartagena de Indias, Colombia.* 27-31.
- Martin ML, Sobrero MC & Ronco A, 2005. Fitotoxicidad de herbicidas sobre especies acuáticas y flora riparia en un agroecosistema. *Resúmenes de III Congreso Argentino de Limnología, Chascomús.*
- Martin ML & Ronco A, 2006. Effect of mixtures of pesticides used in the direct seeding technique on nontarget plant seeds. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 77, 228–236.
- Martin ML, Demetrio PM, Natale GS, Paracampo A & Bulus Rossini GD, 2008. Evaluación de riesgo preliminar del formulado Roundup Max y sus componentes (glifosato y POEA). *Actas del VIII Congreso SETAC Latinoamérica. Mar del Plata, Argentina.*
- Massot N, Poschenrieder C & Barceló J, 1992. Differential response of three bean (*Phaseolus vulgaris*) cultivars to aluminium. *Acta Bot. Neerl.* 41:3, 293-298.
- Matt KJ & van Laerhoven CJ, 1976. Differential effects of cadmium on lettuce varieties. *Environmental Pollution* 10, 163-173.
- Mazzeo N, Dardano B & Marticorena A, 1998. Interclonal variation in response to simazine stress in *Lemna gibba* (Lemnaceae). *Ecotoxicology* 7, 151-160.
- McKenna IM, Chaney RL, Tao SH, Leach RM Jr & Williams FM, 1992. Interactions of plant zinc and plant species on the bioavailability of plant cadmium to Japanese quail fed lettuce and spinach. *Environmental Research* 57, 73-87.
- McKenna IM, Chaney RL & Williams FM, 1993. The effect of cadmium and zinc interactions on the accumulation and tissue distribution of zinc and cadmium in lettuce and spinach. *Environmental Pollution* 79, 113-120.
- Mentaberry A, 2001. La revolución genética y la agricultura. *Ciencia Hoy* 11:62, 22-34.
- Mercado LM, 2000. Evaluación de la calidad de las aguas de seis sistemas lóticos pampásicos mediante el estudio de variables físicas y químicas. *Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales.* 2:1, 27-35.

- Michel A., Johnson R, Duke S & Scheffler B, 2004. Dose-response relationships between herbicides with different modes of action and growth of *Lemna paucicostata*: an improved ecotoxicological method. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23:4, 1074-1079.
- Ministerio de Justicia, Dirección Nacional del Registro Oficial, 1992. Ley Nacional N° 24.051/92 Residuos Peligrosos. Boletín Oficial de la República Argentina N° 27.307, 1-4.
- Ministerio de Justicia, Dirección Nacional del Registro Oficial, 1993. Decreto 831/93 Reglamentario de la Ley Nacional N° 24.051/92 Residuos Peligrosos. Boletín Oficial de la República Argentina N° 27.630
- Ministerio de Justicia, Dirección Nacional del Registro Oficial, 1998. Resolución 619/98 de la Secretaría de Recursos Naturales y Desarrollo Sustentable. Boletín Oficial de la República Argentina N° 28.960
- Ministerio de Justicia, Dirección Nacional del Registro Oficial, 1998. Ordenanza Marítima 1, Prefectura Naval Argentina.
- Ministerio de Justicia, Dirección Nacional del Registro Oficial, 1998. Resolución 440/98 Sanidad Vegetal de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación. Boletín Oficial de la República Argentina N° 28.951
- Miretzky P, Saralegui A & Fernández Cirelli A, 2004. Aquatic macrophytes potencial for the simultaneous removal of heavy metals (Buenos Aires, Argentina). *Chemosphere* 57, 997-1005.
- Mohan BS & Hosetti BB, 1997. Potencial phytotoxicity of lead and cadmium to *Lemna minor* grown in sewage stabilization ponds. *Environmental Pollution* 98, 233-238.
- Mohan RS & Hosetti BB, 1999. Aquatic plants for toxicity assessment. Review. *Environmental Research. Section A.* 81, 259-274.
- Montgomery DC, 1991. Diseño y Análisis de Experimentos. Grupo Editorial Iberoamérica, México DF, 589 pp.
- Moral R, Palacios G, Gómez I, Navarro-Pedreño & Mataix J, 1994. Distribution and accumulation of heavy metals (Cd, Ni and Cr) in tomato plant. *Fresenius Environmental Bulletin* 3, 395-399.
- Moral R, Navarro-Pedreño, Gómez I & Mataix J, 1995. Effects of chromium on the nutrient element content and morphology of tomato. *Journal of Plant Nutrition* 18:4, 815-822.
- Morillo E, Undabeytia T Maqueda C & Ramos A, 2000. Glyphosate adsorption on soils of different characteristics. Influence of copper addition. *Chemosphere* 40, 103-107.
- Moschione E, Porta A & Sobrero MC, 2002. Estudio comparativo de fitoacumulación de cadmio y expresión de proteínas de estrés en plantas acuáticas de los géneros *Lemna* y *Pistia*. XXII Jornadas Interdisciplinarias de Toxicología ATA, Buenos Aires.
- Mugni HD, 2009. Concentración de nutrientes y toxicidad de pesticidas en aguas superficiales de cuencas rurales. Tesis presentada para optar por el título de Doctor en

Ciencias Naturales, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata. Director: Dr. CA Bonetto, co- director: Dra. A E Ronco.

- Naddy RB, Stern GR & Gensemer RW, 2003. The effect of calcium and magnesium ratios on the toxicity of copper to five aquatic species in freshwater. *Environ Toxicol Chem* 21:2, 347-352
- Nellessen JE & Fletcher JS, 1993. Assessment of published literature on the uptake, accumulation and translocation of heavy metals by vascular plants. *Chemosphere* 27:9, 1669-1680.
- Neumann G, Kohls S, Landsberg K, Stock-Oliveira Souza K, Yamada T & Römeheld V, 2006. Relevance of glyphosate transfer to non-target plants via the rhizosphere. *Journal of Plant Disease and Protection* 20, 963-970.
- Newman MC & Jagoe CH (Edts.), 1996. *Ecotoxicology: a Hierarchical Treatment*. Lewis Publishers, Boca Raton, 411 pp.
- Organization for Economic Cooperation and Development, 1984a. Algal growth inhibition test. Guideline for testing of chemicals N ° 201. OECD Publications Service, Paris.
- Organization for Economic Cooperation and Development, 1984b. Terrestrial plants: growth test. Guideline for testing of chemicals N ° 208. OECD Publications Service, Paris.
- Organization for Economic Cooperation and Development, 1987. *Guidelines for testing of Chemical*. OECD, Paris.
- Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), 2002. *Guidelines for the Testing of Chemicals. Guideline 221 Lemna sp. Growth Inhibition Test*. OECD Publication Service, Paris..
- Paradiso Giles M, 2000. Variabilidad interclonal en *Lemna gibba* L. frente a dos herbicidas con distinto modo de acción. Tesis de Maestría en Biología. Fac. de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo. 73 pp.
- Pengue WA, 2000. *Cultivos Transgénicos ¿Hacia dónde vamos?*. Lugar Editorial. Buenos Aires. 190 pp.
- Peruzzo P, Marino D, Da Silva M, Porta AA & Ronco AE, 2003. Impacto de pesticidas en aguas superficiales y sedimentos asociado a cultivos por siembra directa. *Memorias Conferencia Internacional Usos del Agua 2003, Cartagena de Indias, Colombia*, 35-42.
- Peterson HG, Boutin C, Martin PA, Freemark K, Ruecker NJ & Moody MJ, 1994. Aquatic phyto-toxicity of 23 pesticides applied at expected environmental concentrations. *Aquatic Toxicology* 28, 275-292.
- Pline WA, Wilcut JW, Edminsten KL & Wells R, 2002. Physiological and morphological response of glyphosate-resistant and non-glyphosate-resistant cotton seedlings to root absorbed glyphosate. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 73, 48-58.
- Porta AA & Ronco AE, 1993. Cu(II) acute toxicity to the rotifer *Brachionus calyciflorus* as affected by fulvic acids of freshwater origin. *Environmental Pollution* 82, 263-267.

- Poverene M & Cantamutto M, 2003. Impacto ambiental de los cultivos transgénicos. *Ciencia Hoy* 13:75, 26-33.
- Prasad MNV, Malec P, Waloszek A & Bojko M Strzalka K , 2001. Physiological responses of *Lemna trisulca* L. (duckweed) to cadmium and copper bioaccumulation. *Plant Science* 161, 881-889.
- Ralph PJ, 2000. Herbicide toxicity of *Halophylla ovalis* assessed by chlorophyll a fluorescence. *Aquatic Botany* 66:141-152.
- Ramírez S, Porta A & Caffini N, 1999a. Fitoquelatinas y péptidos relacionados. Estructura, rol metabólico y aplicaciones ambientales. *Acta Farmacéutica Bonaerense* 18:1, 53-63.
- Ramírez S, Bilén M, Porta A & Caffini N, 1999b. Incorporation of Cu(II) by *Schoenoplectus californicus* (C.A. Meyer) Soják (Cyperaceae). *Acta Horticulturae* 500, 105-110.
- Ramírez S, Porta A & Caffini N, 1999c. Aplicación de Fitoquelatinas y péptidos relacionados en programas de biomonitorio ambiental. *Acta Farmacéutica Bonaerense* 18, 53-63.
- Rauser WE, 1990. Phytochelatin. *Annual Reviews of Biochemistry* 59, 61-86.
- Rauser WE & Meuwly P, 1995. Retention of cadmium in roots of maize seedlings. Role of complexation of phytochelatin and related thiol peptides. *Plant Physiology* 109, 195-2002.
- Ronco AE, Porta A & Roca A, 1992. Las aguas del Río Santiago. Otro caso de contaminación urbano-industrial. *Ciencia Hoy* 4, 34-38.
- Ronco AE, Sobrero MC & Bulus Rossini GD, 1993. Pollution studies in the Río Santiago basin, tributary of the Río de la Plata estuary: preliminary risk assessment evaluation. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 51:5, 657-664.
- Ronco AE, Sobrero MC, Alzuet PR, Bulus Rossini GD & Dutka BJ, 1995. Screening for sediment toxicity in the Rio Santiago basin: a baseline study. *Environmental Toxicology and Water Quality: an International Journal* 10, 35-39.
- Ronco AE, Sobrero MC, Grassi VI, Kaminski LP, Massolo LA & Mina L, 2000. Watertox Bioassay Intercalibration Network: results from Argentina. *Environmental Toxicology* 15:4, 287-296.
- Ronco AE, Sobrero MC, Grassi VI, Mina L, Mugni H & Cremonte C, 2001. Application of the WaterTox battery of tests for the toxicity assessment of surface, ground and drinking waters from the great La Plata region. *Resúmenes del 10th International Symposium on Toxicity Assessment, Quebec, Canadá.*
- Ronco AE, Castillo G, Díaz-Báez MC, Bulus Rossini G, Sobrero C, Apartin C, Ahumada I, Espinosa Ramírez A & Mendoza J, 2005a. Chapter 7. The Application of hazard assessment schemes using the Watertox toxicity testing battery. En: *Small Scale Fresh Water Toxicity Investigations. Volume 2: Hazard Assessment Schemes.* C Blaise and JS Ferard, Eds, Springer, New York, 422 pp.

- Ronco AE, Bulus Rossini GD, Sobrero MC, Apartin CD & Martin ML, 2005b. Indices ecotoxicológicos para la evaluación de riesgo de ambientes acuáticos contaminados. Resúmenes del VII Congreso SETAC Latinoamérica, Santiago de Chile.
- Ronco MG, Ruscitti MF, Arango MC & Beltrano J, 2008. Glyphosate and micorrhization induce changes in plant growth and in root morphology and architecture in pepper plants (*Capsicum annum* L.). *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 83:4, 497-505.
- Roy S & Hänninen O, 1994. Pentachlorophenol: uptake/elimination kinetics and metabolism in an aquatic plant, *Eichhornia crassipes*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 13, 763-773.
- SAGPyA, 2009. <http://www.sagpya.mecon.gov.ar>
- Sajwan KS & Ornes WH, 1994. Phytoavailability and bioaccumulation of cadmium in duckweed plants (*Spirodela polyrhiza* L. Schleid). *Journal of Environmental Science and Health A29:5*, 1035-1044.
- Salisbury FB & Ross CW, 1994. *Fisiología Vegetal*. Grupo Editorial Iberoamérica, México. 759 pp.
- Salt DE, Prince RC, Pickering IJ & Raskin I, 1995. Mechanisms of cadmium mobility and accumulation in indian mustard. *Plant Physiology* 109, 1427-1433.
- Saltabaş Ö & Akçin G, 1994. Removal of chromium, copper and nickel by water hyacinth (*Eichhornia crassipes*). *Toxicological and Environmental Chemistry* 41, 131-134.
- Samantary S, 2002. Biochemical responses of Cr-tolerant and Cr-sensitive mung bean cultivars grown on varying levels of chromium. *Chemosphere* 47, 1065-1072.
- Samardakiewicz S & Woźny A, 2005. Cell division in *Lemna minor* roots treated with lead. *Aquatic Botany* 83, 289-295.
- Sandmann G & Böger P, 1983. The enzymological function of heavy metals and their role in electron transfer processes of plants (563-588). En *Encyclopedia of Plant Physiology New Series Vol. 15 B Inorganic Plant Nutrition*, Läuchli A & Bielecki RL Eds. Springer-Verlag, Berlin. 870 pp.
- Sanità di Toppi L & Gabbrielli R, 1999. Response to cadmium in higher plants. *Environmental and Experimental Botany* 41, 105-130.
- Santier S & Chamel A, 1998. Reassessment of the role of cuticular waxes in the transfer of organic molecules through plant cuticles. *Plant Physiology and Biochemistry* 36, 225-231.
- Santoprete G, 1997. Total chromium content in foodstuffs and evaluation of the average amount of chromium uptake. En *Chromium Environmental Issues*. Franco Angeli s.r.l., Milano. 295 pp.
- Satorre EH, 2005. Cambios tecnológicos en la agricultura argentina actual. *Ciencia Hoy* 15:87, 24-31.
- SADS-PNA-OPS-UNLP,. 2007 Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable, Prefectura Naval Argentina, Organización Panamericana de la Salud, Universidad Nacional de La

Plata. Caracterización sanitaria y ambiental de las aguas en tramos específicos de los ríos Paraná y Paraguay y sus afluentes. Informe Técnico.

- Shewry PR, & Peterson, PJ, 1974. The uptake and transport of chromium by barley seedlings (*Hordeum vulgare L.*). J. Exp. Botany 25, 785-797.
- Silva S, Baffi C & Beone GM, 1997. Agronomical trials with the use of chromium containing fertilizer. En Chromium Environmental Issues. Franco Angeli s.r.l., Milano. 295 pp.
- Singh N, Singh SN, Yungus M & Ahmad KJ, 1994a. Growth response and element accumulation in *Beta vulgaris L.* raised in fly-ash-amended soils. Ecotoxicology 3, 287-298.
- Singh J, Chaula G, Naqvi SHN & Viswanathan PN, 1994b. Convined effects of cadmium and linear alkyl benzene sulfonate on *Lemna minor L.*. Ecotoxicology 3, 59-67.
- Singh J, Viswanathan PN, Gupta P & Devi S, 1996. Changes in uptake of calcium caused by phytotoxicity of cadmium in *Salvinia molesta*. Ecotoxicology 5, 9-21.
- Singh S & Sinha S, 2005. Accumulation of metals and its effects in *Brassica juncea (L.) Czern.* (cv. Rohini) grown on various amendments of tannery waste. Ecotoxicology and Environmental Safety 62, 118-127.
- Sinha S, Rai UN & Chandra P, 1994. Accunulation and toxicity of iron and manganese in *Spirodela polyrrhiza (L.) Schleiden*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 53, 610-617.
- Skórzyńska-Polit E, Bednara J & Baszyński T, 1995. Some aspects of runner bean plant response to cadmium at diferent stages of the primary leaf growth. Acta Societatis Botanicorum Poloniae 64:2, 165-170.
- Sobrero MC, 1996. Aplicación de bioensayos a la evaluación ecotoxicologica de cuerpos de agua superficiales de la región costera sur del Area Metropolitana y Gran La Plata. Beca Perfeccionamiento CONICET. Informe final.
- Sobrero MC, 1997. El uso de plantas vasculares en la evaluacion ecotoxicologica de contaminantes ambientales. Beca postdoctoral CONICET. Informe de Avance.
- Sobrero MC, 2000. Informe Mayor Dedicación. Facultad de Ciencias Exactas, UNLP.
- Sobrero MC & Ronco AE, 2000. Efecto del tiempo de exposición en la toxicidad subcrónica del Cu(II), Cr(VI) y Cd(II) en clones de Lemna sp. XX Jornadas Interdisciplinarias de Toxicología ATA. Buenos Aires.
- Sobrero MC & Ronco AE, 1998. Bioensayos de toxicidad con plantas vasculares: una herramienta para el diagnóstico ambiental. Actas del XVII Congreso Nacional del Agua, Santa Fe, 5, 236-245.
- Sobrero MC & Moschione E, 2001. Evaluación ecotoxicológica de barros industriales: fitoacumulación y fitotoxicidad del cromo. Resumenes de la I Reunión Binacional de Ecología. XX Reunión Argentina de Ecología, Bariloche.

- Sobrero MC & Rimoldi F, 2002. Recuperación de Lemnáceas a la exposición subcrónica al cromo: efecto en la tasa de multiplicación, crecimiento foliar y contenido total de clorofila. Resúmenes de las XXII Jornadas Interdisciplinarias de Toxicología ATA, Buenos Aires.
- Sobrero MC & Ronco AE, 2004. Capítulo 4.4: Protocolos de Prueba. Bioensayo de Toxicidad Aguda con Semillas de Lechuga (*Lactuca sativa*). En: Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas. Estandarización, Intercalibración, Resultados y Aplicaciones. Gabriela Castillo editora. Edición conjunta IDRC, SEMARNAT, IMTA, México. 188 pp.
- Sobrero MC, Riat P & Rimoldi F, 2006. Recuperación de la especie no blanco *Lemna gibba* luego de la exposición subletal al herbicida glifosato. Resúmenes de la XXII Reunión Argentina de Ecología, Córdoba.
- Sobrero MC & Ronco AE, 2009. Producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) como bioindicador *in vivo* de la fitotoxicidad en *Lemna gibba*. Química y Toxicología Ambiental en América Latina. Ed J. Herkovits. SETAC LA, Buenos Aires, 182-184.
- Sokal RR & Rohlf FJ, 1979. Biometría. Principios y Métodos Estadísticos en la investigación Biológica. H. Blume Ediciones, Madrid. 832 pp.
- SRHN, 2003a. Subsecretaría de Recursos Hídricos de la Nación. Niveles Guía Nacionales de Calidad de Agua Ambiente Correspondiente al Glifosato.
<http://www.hidricosargentina.gov.ar/pdfs/glifosato.pdf>
- SRHN, 2003b. Subsecretaría de Recursos Hídricos de la Nación. Niveles Guía Nacionales de Calidad de Agua Ambiente Correspondiente al Cromo.
<http://www.hidricosargentina.gov.ar/pdfs/cromo.pdf>
- SRHN, 2004. Subsecretaría de Recursos Hídricos de la Nación. Niveles Guía Nacionales de Calidad de Agua Ambiente Correspondiente al Cadmio.
<http://www.hidricosargentina.gov.ar/pdfs/cadmio.pdf>
- SRHN, 2005. Subsecretaría de Recursos Hídricos de la Nación. Niveles Guía Nacionales de Calidad de Agua Ambiente Correspondiente al Cobre.
- StatSoft, Inc., 1996. STATISTICA for Windows [Computer program manual]. Tulsa, OK: StatSoft, Inc., 2300 East 14th Street, Tulsa, OK 74104, phone: (918) 749-1119, fax: (918) 749-2217, email: info@statsoftinc.com, <http://www.statsoftinc.com>
- Stefani A, Arduini Y & Onnis A, 1991. *Juncus acutus*: germination and initial growth in presence of heavy metals. Annals Botanical Fennici 28:37-43.
- Stouthart AJHX, Spanings FAT, Lock RAC & Bonga W, 1994. Effects of low water pH on lead toxicity to early life stages of the common carp (*Cyprinus carpio*). Aquatic Toxicology 30, 137-151.
- Strickland J & Parsons T, 1972. A practical handbook for sea water analysis. Journal of Fish Research 67, Bd Canada, Ottawa.

- Subhadra AV, Nanda AK, Behera PK & Panda BB, 1991. Acceleration of catalase and peroxidase activities in *Lemna minor* L. and *Allium cepa* L. in response to low levels of aquatic mercury. *Environmental Pollution* 69,169-179.
- <http://www.hidricosargentina.gov.ar/pdfs/cobre.pdf>
- Suter GW, 1993. *Ecological Risk Assessment*. Lewis Publishers, Boca Raton.
- Systat, Inc., 1993. *Systat 5,02 for Windows*. Copyright 1990-1993 by SYSTAT, Inc. SYSTAT, Inc. 1800 Sherman Ave., Evanston, IL Usa 60201.
- Syversen N & Bechmann M, 2004. Vegetative buffer zones as pesticide filters for simulated surface runoff. *Ecological Engineering* 22, 175-184.
- Taiz L & Zeiger E, 2002. *Plant Physiology*. Sinauer Associates, Sunderland, 690 pp
- Tan K, Keltjens WG & Findenegg GR, 1992. Calcium induced modification of aluminium toxicity in sorghum genotypes. *Journal of Plant Nutrition* 15:9, 1395-1405.
- Tardiff RG, 1988. *Methods to Assess Adverse Effects of Pesticides on Non-target Organisms*. SCOPE 46. John Wiley & Sons, New York.
- Tardiff, RG & Goldstein BD, 1988. *Methods for Assessing Exposure of Human and Non-human Biota*. SCOPE 46. John Wiley & Sons, New York. 417 pp.
- Taylor MC Reeder WS & Demayo A, 1979. *Guidelines for surface water quality*. Vol. 1, Inorganic Chemical Substances Chromium. Inland Water Directorate, Water Quality Branch, Ottawa, 9 pp.
- Thompson RS & Carmichael NG, 1989. 1,1,1, Tricloroethano: medium-term toxicity to carp, Daphnids and higher plants. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 17:2, 172-182.
- Tölgyessy J, 1993. *Chemistry and Biology of Water, Air and Soil*. Environmental Aspects. Elsevier, Amsterdam. 858 pp.
- Trigo E, 2005. Consecuencias económicas de la transformación agrícola. *Ciencia Hoy* 15:87, 46-51.
- Tsui MTK & LM Chu, 2003. Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. *Chemosphere* 52:7, 1189-1197.
- Tsui MTK & LM Chu, 2004. Comparative toxicity of glyphosate-based herbicides: aqueous and sediment porewater exposures. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 46, 316-323.
- Turner MA & Rust RH, 1971. Effect of chromium on growth and mineral nutrition of soybeans. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* 35, 755-760.
- Turner DR, 1992. The chemistry of metal pollutants in water. En *Pollution: Causes, Effects and Control*. Harrison RM ed., Royal Society of Chemistry, Cambridge. 393 pp.
- Ullah SM & Gerzabek MH, 1991. Influence of fulvic and humic acids on Cu and V toxicity to *Zea mays* (L.). *Journal für Landwirtschaftliche Forschung* 42:2, 123-134.
- USEPA, 1985. *Lemna* acute toxicity test. Fed. Reg. 50, 39331-39333.

- USEPA, 1989. Protocols for short term toxicity screening of hazardous waste sites. US Environmental Protection Agency, 600/3-88/029, Corvallis.
- USEPA, 1990. Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. US Environmental Protection Agency. 600/4-90/027F, Washington DC.
- USEPA, 1991a. Methods for aquatic toxicity identification evaluations. US Environmental Protection Agency. 600/5-94/ 03, Washington DC.
- USEPA, 1991b. Manual for the evaluation of laboratories performing aquatic toxicity tests. US Environmental Protection Agency, 600/4-90/031, Cincinnati.
- USEPA, 1993 Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. US Environmental Protection Agency, 600/4-90/027, Cincinnati.
- USEPA, 1994. Short-Term Methods For Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Water to Freshwater Organisms. US Environmental Protection Agency, 600/4-90/031, Cincinnati.
- USEPA, 1996. Ecological effects test. Guidelines OPPTS 850.4400. Aquatic plant toxicity test using *Lemna* spp, tiers I and II. Public Draft USEPA. EPA-712-C-96-156.
- USEPA, 1998. Toxicological review of hexavalent chromium (CAS N°18540-29-9). Integrated Risk Information System, US Environmental Protection Agency, Washington DC.
- Vajpayee P, Tripathi RD, Rai UN, Ali MB & Singh SN, 2000. Chromium (VI) accumulation reduces chlorophyll biosynthesis, nitrate reductase activity and protein content in *Nymphaea alba* L. Chemosphere 41:7, 1075-1082.
- Van Assche F, Cardinaels C & Clijsters H, 1988. Induction of enzyme capacity in plants as a result of heavy metals toxicity: dose-response relations in *Phaseolus vulgaris* L., treated with zinc and cadmium. Environmental Pollution 52, 103-115.
- Van Leeuwen K, 1990. PROFILE Ecotoxicological effects assessment. Environmental Management 14, 779-792.
- Van Steveninck RFM, Van Steveninck ME & Fernando DR, 1992. Heavy-metal (Zn, Cd) tolerance in selected clones of duck weed (*Lemna minor*). Plant and Soil 146, 271-280.
- Van Veen H, Burton N, Comber S, Gardner M. 2002. Speciation of copper in sewage effluents and its toxicity to *Daphnia magna*. Environ Toxicol Chem 21:2, 275-280.
- Vermaat JE & Hanif MK, 1998. Performance of common duckweed species (Lemnaceae) and the waterfern *Azolla filiculoides* on different types of waste water. Water Research 32:9, 2569-2576.
- Vesonder RF, Peterson RE, Labeda D & Abbas HK, 1992. Comparative phytotoxicity of the fumonisins, AAL-toxin and yeast sphingolipids in *Lemna minor* L. (duckweed). Archives of Environmental Contamination and Toxicology 23, 464-467.

- Villar C, Tudino M, Bonetto C, de Cabo L, Stripeikis J, d'Huicque L & Troccoli O, 1998. Heavy metal concentrations in the Lower Parana River and right margin of the Río de La Plata Estuary. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 26 , 963-966.
- Villar C, Stripeikis J, Colautti D, d'Huicque L, Tudino M, & Bonetto C, 2001. Metal contents in two fishes of different feeding behaviour in the Lower Parana River and Río de La Plata Estuary. *Hydrobiologia* 457, 225-233.
- Wahaab RA, Lubberding HJ & Alaerts GJ, 1995. Copper and chromium (III) uptake by duckweed. *Water Science and Technology* 32:11, 105-110.
- Waite D, 2001. Exposure to low dose, high-potency herbicides. En: *Impacts of Low-dose High-potency Herbicides on Non Target and Unintended Plant Species*. Ferenc S. Ed, SETAC Press, Pensacola, Florida. 198 pp.
- Wang W, 1987. Root elongation method for toxicity testing of organic and inorganic pollutants. *Environmental Toxicology & Chemistry* 6, 409-414.
- Wang W, 1990. Literature review on duckweed toxicity testing. *Environmental Research* 52, 7-22.
- Wang W, 1992. Use of plants for the assessment of environmental contaminants. *Review of Environmental Contamination & Toxicology* 126, 87-127.
- Wang W & Freemark K, 1995. The use of plants for environmental monitoring and assessment. *Ecotoxicology & Environmental Safety* 30, 289-301.
- Wang N, Besser JM, Buckler DR, Honegger JL, Ingersoll CG, Johnson BT, Kurtzweil ML, MacGregor J, McKee MJ, 2005. Influence of sediment on the fate and toxicity of a polyethoxylated tallowamine surfactant system (MON 0818) in aquatic microcosms. *Chemosphere* 59, 545–551.
- Watson L & Dallwitz MJ, 1992 (actualizado). The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification and information retrieval. Version: 22 de abril 1999. <http://biodiversity.uno.edu/delta/>.
- Weckx JEJ & Clijsters HMM, 1996. Oxidative damage and defense mechanisms in primary leaves of *Phaseolus vulgaris* as a result of root assimilation of toxic amounts of copper. *Physiologia Plantarum* 96, 506-512.
- Welsh P, Lipton J, Chapman GA, 2000. Evaluation of water-effect ratio methodology for establishing site-specific water quality criteria. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19, 1616-1623.
- West Inc., 1996. Toxstat version 3,5
- Wetzel RG, 1981. *Limnología*. Omega, Barcelona, 679 pp.
- Wheeler DM & Power IL, 1995. Comparison of plant uptake and plant toxicity of various ions in wheat. *Plant and Soil* 172, 167-173.
- WSSA, 1994. Glyphosate. In: *Herbicide Handbook*, 7th ed. Lawrence: The Weed Science Society of America. 149-152.

- Wu FB & Zhang G, 2002. Genotypic differences in effect of Cd on growth and mineral concentration in barley seedlings. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 69, 219-227.
- Zakrzewski SF, 1991. *Principles of Environmental Toxicology*. American Chemical Society, Washington DC. 270 pp.
- Zar JH, 1996. *Bioestatistical Analisis*. Prentice hall, New Jersey. 718 pp.
- Zscheile FP & Comar CL, 1941. Influence of preparative procedure on the purity of chlorophyll components as shown by absorption spectra. *Botanical Gazette* 102, 463-481.