

# INVESTIGACIONES

## DETERMINACIÓN EXPERIMENTAL DEL LÍMITE ABSOLUTO DE TOLERANCIA (LAT) PARA CUATRO METALES PESADOS (Cd, Pb, Mo y Cu) EN RAÍCES ADVENTICIAS DE BULBOS DE CEBOLLA, *Allium cepa* L.<sup>1</sup>

Experimental determination of the upper critical levels for Cd, Pb, Mo and Cu in adventitious roots of onion bulbs, *Allium cepa* L.

Patricio Álvarez V.<sup>2</sup>, Jorge Cortés M.<sup>2</sup>, Donatila Ferrada T.<sup>2</sup>,  
Cecilia Leyton M.<sup>2</sup> y Jorge Sans P.<sup>2</sup>

### SUMMARY

The maximum concentration of heavy metal allowed in irrigator water established by the Chilean official norm NCh 1333. Of 1978, (INN 1987) are not based in studies performed in Chile, country with a great mine industries. Thus, the rules of other countries may be too restrictive for certain metals and permissive for others. For this reason, it is important to develop biological models in order to precisely define the concentration of heavy metals in water to be tolerated by living systems.

The purpose of this work was to determine the absolute upper critical level for two non essential heavy metals, Cd and Pb, and two essential metals, Mo and Cu, in adventitious roots of onion bulbs cultured directly in tap water. For this purpose, we studied separately the effect of different concentration of each one of the four metals on root growth, oxidative metabolism and the accumulation of them in several parts of the plants. The results show that upper critical level (metal concentration present in water capable to inhibit 20% of root growth) obtained after 96 hr of treatment, for Cd, Pb, Mo and Cu are 1.08, 2.40, 75.70 and 0.09 mg/L, respectively. The obtained upper critical level for Cd and Mo are 108 and 7,570 time fold higher to the Chilean norm, respectively. In contrast, for Pb and Cu the upper critical level obtained correspond approximately to the half of the Chilean official norm. These results show that the Chilean norm for Cd and Mo in irrigator water is too restrictive. On the contrary, for Cu and Pb is surpass.

The significance and projection of these results by using this bioassay is discussed.

**Key words:** upper critical level, biological toxicity, root growth, cadmium, molybdenum, lead, copper.

### INTRODUCCIÓN

Numerosas publicaciones en los últimos años han dejado en evidencia un grave problema de contaminación con metales pesados de aire, aguas y suelos de la zona central de nuestro país (Chiang *et al.*, 1985; González, 1986, 1990, 1992, 1994; González e Ite, 1992; CONAMA, 1991; Romo-Króger

y Llona, 1993; Sandoval, Préndez y Ulriksen, 1993). En general, se habla de contaminación cuando la concentración de un metal pesado sobrepasa la norma establecida como límite máximo permisible para dicho metal en un medio particular.

La determinación de la concentración máxima tolerable de un metal pesado por uno o varios sistemas vivos, es de vital importancia en el establecimiento de normas que regulen el nivel máximo permisible de dicho metal.

En Chile, las normas establecidas por el Instituto Nacional de Normalización, INN (NCh 1333. Of 1978,) (INN, 1987), como máximo permisible para metales pesados en aguas de riego, han sido copiadas de las normas de otros países y no se

<sup>1</sup>Recepción de originales: 21 de septiembre de 1994.

Trabajo financiado por el Proyecto FONDECYT 92/ 982 y por el Convenio entre la Universidad de Chile y el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), España. Parte del trabajo fue presentado en la IX Reunión Nacional de la Sociedad de Botánica de Chile, Valdivia, Chile, 1994.

<sup>2</sup>Laboratorio de Fitobiología Celular y Molecular, Departamento de Biología Celular y Genética, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Casilla 70061, Correo 7. Santiago, Chile.

sustentan en investigaciones efectuadas localmente, en que se hayan evaluado los posibles efectos biológicos que ellos pueden tener en los organismos vivos. Teniendo en cuenta que nuestro país posee una gran riqueza minera, cuya explotación ha sido históricamente una de las principales fuentes de divisas de la nación, la incorporación de normas de otros países puede resultar muy restrictiva para algunos metales y muy tolerante para otros.

Desde hace tres años los autores de esta investigación, a través de un proyecto FONDECYT, han estado preocupados de la evaluación de los efectos biológicos de cuatro metales pesados, dos no esenciales (Cd y Pb) y dos esenciales (Mo y Cu) (Kieffer, 1991) que se han encontrado como contaminantes en cursos naturales de aguas de la zona central de nuestro país, y que se usan, en parte, con fines de riego (González, 1986, 1990, 1992, 1994). Con este fin, el presente trabajo utiliza como modelo biológico las raíces adventicias de bulbos de cebolla *Allium cepa* L. (Ochoa, *et al.*, 1992; Ferrada, Cisterna y Sans, 1993). Estas raíces surgen de la base del bulbo cuando ella se sumerge en agua potable mantenida en condiciones controladas de temperatura y oxigenación.

La elección de este modelo para evaluar el efecto biológico de metales pesados se basa en los siguientes antecedentes: a) La contaminación de aguas de riego por metales pesados se traduce, en último término, en una acumulación de ellos en el suelo, en consecuencia, el primer blanco de estos metales pesados son las raíces, el órgano de absorción de las plantas. De esta manera, cualquier alteración que se produzca en ellas, repercutirá invariablemente en la integridad de toda la planta y, por ende, en el rendimiento del cultivo. b) El crecimiento de las raíces en agua permite estudiar los posibles efectos biológicos, agregando directamente en ella la concentración del metal pesado que se quiera evaluar, evitándose de esta manera, todos aquellos factores del suelo que pueden interferir directa o indirectamente con la biodisponibilidad de los metales para la planta. c) El rápido crecimiento de las raíces que, en determinadas condiciones de cultivo, pueden crecer con una cinética de un cm por día, permite evaluar los efectos biológicos en un período de tiempo relativamente corto (4 días), obviando de esta manera, el lento crecimiento de las plantas cuando se evalúa el efecto estimando el rendimiento de la planta entera (González, 1993).

El objetivo del presente trabajo fue determinar el límite absoluto de tolerancia (LAT) para Cd, Pb, Mo y Cu utilizando como prueba biológica las

raíces adventicias de bulbos de cebolla cultivadas directamente en agua potable. Con este fin, se estudió individualmente el efecto de distintas concentraciones de cada uno de estos cuatro metales sobre el crecimiento radical, metabolismo oxidativo y capacidad de acumulación de ellos en distintos segmentos de la planta.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron raíces adventicias de bulbos de cebolla *Allium cepa* L., variedad Perla. Las raíces se obtuvieron sumergiendo sólo la base de cada bulbo en agua potable filtrada, proveniente de la red de distribución de la Comuna de Santiago (EMOS Las Vizcachas), contenida en recipientes de vidrio de 80 ml de capacidad, la que se mantuvo oxigenada por un burbujeo continuo de aire, mediante una bomba de acuario, a razón de 10-20 ml de aire por minuto. Los cultivos se efectuaron en un incubador termoregulado a  $15 \pm 0,5$  °C, en ausencia de luz. En estas condiciones surgieron de cada bulbo alrededor de 30-40 raíces, las que crecieron a razón de 1 cm diario, a partir de las 48 hr de iniciado el cultivo (Sans, Giménez-Martín y De La Torre, 1980).

### Tratamientos

Después de 48 hr de iniciados los cultivos, las raíces unidas a los bulbos se incubaron con soluciones de: cloruro de Cd ( $\text{CdCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ), nitrato de Pb ( $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ), molibdato de amonio ( $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) o sulfato de Cu ( $\text{CuSO}_4$ ), preparadas separadamente en agua potable filtrada, en un rango de concentraciones del metal como elemento, sobre y bajo la norma NCh 1333. Of 1978 (INN, 1987), para estos metales en agua de riego. Durante las incubaciones se mantuvieron las condiciones de cultivo descritas. Bulbos controles se incubaron en agua potable filtrada por un tiempo y condiciones equivalentes a los tratados con los metales.

### Crecimiento radical

Previo a iniciar los diferentes tratamientos con los metales pesados, se dejaron unidas a cada bulbo entre 10 y 15 raíces de igual tamaño y distribuidas espacialmente de manera que pudiesen ser fácilmente individualizadas en las sucesivas mediciones. El crecimiento radical se determinó midiendo la longitud de las raíces cada 24 hr, durante 4 días consecutivos. El crecimiento radical se expresó como el incremento en longitud de las raíces a partir del inicio de cada tratamiento, considerando como cero el tamaño al inicio del tratamiento (15-20 mm de longitud).

### Determinación del límite absoluto de tolerancia (LAT)

Se definió como LAT, aquella concentración del metal pesado capaz de inhibir el crecimiento radical en un 20%. Se eligió este valor dado que la dispersión en el crecimiento radical fluctúa entre un 10 a un 15%. El LAT, para cada metal pesado en estudio, se determinó mediante un ajuste lineal entre el crecimiento radical y el incremento de la concentración del metal, después de 48 y 96 hr de iniciados los respectivos tratamientos. Para el caso de Cd y Mo, en que el incremento de la concentración utilizada fue exponencial, la mejor recta se obtuvo con una regresión logarítmica como se muestra en los insertos de las figuras 1 y 3. En cambio, para los otros dos metales (Pb y Cu), en que los incrementos de las concentraciones fueron lineales, las mejores rectas se obtuvieron con una regresión lineal, como se muestra en los insertos de las figuras 2 y 4.

### Consumo de oxígeno

Este se determinó en grupos de cinco segmentos de raíces de 1 cm de longitud correspondientes al ápice radical, obtenidas después de 96 hr de cultivo en presencia de cada metal pesado, en un polarógrafo con un electrodo de oxígeno tipo Clarck (Ochoa *et al.*, 1992). Los valores obtenidos se expresaron en nmoles de oxígeno/min/g de peso fresco y representan al promedio de cinco determinaciones por tratamiento.

### Contenido de metales pesados

La concentración de cada metal pesado se determinó en raíces, corona y bulbo a las 48 y 96 hr de iniciados los tratamientos. Las muestras se lavaron con detergentes no iónicos, luego se enjuagaron varias veces con agua bidestilada y posteriormente se secaron a 65 °C en una estufa con aire forzado. Luego, 50 mg de cada muestra se disolvió en un digestor tipo Parr con 3 ml de ácido nítrico al 65% p.a. colocado en un horno microondas, durante 30 seg. En el producto de digestión se midió directamente el contenido de metales pesados con un espectrofotómetro de absorción atómica Perkin-Elmer 360, usando lámparas monoelemento en una atmósfera de acetileno/aire 30/50 v/v, con llama normal o llama reductora acetileno/aire 40/45 v/v, según el caso. Los valores se expresaron en µg/g peso seco de tejido.

## RESULTADOS

Con el fin de facilitar el análisis de los resultados se tratará en forma separada las observaciones para cada metal pesado en estudio.

### Cadmio

Concentraciones de Cd iguales o menores a 0,22 mg/L estimulan el crecimiento radical (Figura 1). Este hecho es claramente evidente, ya a las 48 hr de tratamiento. Por el contrario, concentraciones iguales o mayores a 2,20 mg/L inhiben el crecimiento radical en forma proporcional a la concentración de metal usada. Este crecimiento se bloquea totalmente a partir de una concentración de Cd de 100 mg/L. Esta inhibición se correlaciona con una caída en el consumo de oxígeno radical, medido después de 96 hr de tratamiento (Cuadro 1). Respecto al LAT obtenido después de 96 hr de tratamiento este es 49% menor al calculado con un tratamiento efectuado durante 48 hr (1,08 y 2,11 mg/L, respectivamente) (Cuadro 2). Se detectó la presencia de Cd en distintos segmentos de las plantas controles, después de 48 y 96 hr de cultivo en agua potable, en cantidades de 13 µg/g de peso seco (Cuadro 3). Cuando las raíces se trataron con una concentración de Cd de 0,011mg/L la cantidad de Cd acumulada sólo aumentó en las raíces, aproximadamente 5 veces, después de 96 hr de tratamiento. Sin embargo,

**CUADRO 1. Consumo de oxígeno radical después de 96 hr de tratamiento con dos concentraciones diferentes de cada metal pesado expresado como porcentaje del control**

**TABLE 1. Oxygen consumption in the root after 96 hr of treatment with two different heavy metals concentrations in percent of the control**

Metal	Consumo de oxígeno, % del control <sup>1</sup>	
	Concentración, mg/L	96 hr
Cadmio	0,011	103,0
	110,00	78,2
Plomo	5,00	76,6
	10,00	66,0
Molibdeno	67,00	102,0
	670,00	99,5
Cobre	0,20	105,0
	0,40	100,0

<sup>1</sup>El consumo de oxígeno en los controles fue, en promedio, 1.100 nmoles oxígeno/min/g de peso fresco.

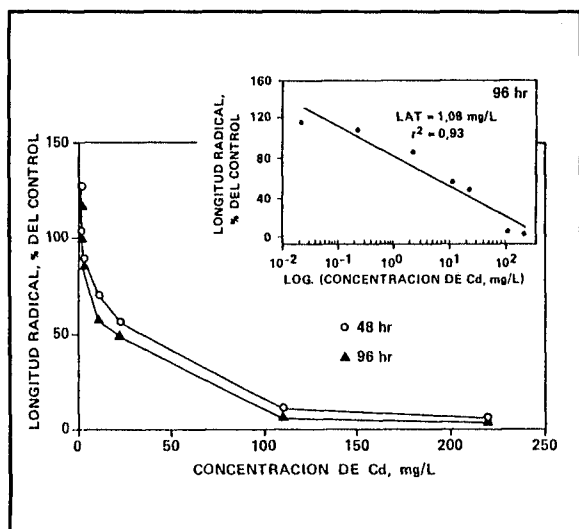


FIGURA 1. Efecto de diferentes concentraciones de Cd sobre el crecimiento de raíces adventicias de bulbos de cebolla. Cada punto corresponde al promedio obtenido de un total de 80 raíces de cuatro bulbos diferentes. La desviación estándar fue menor al 10% del promedio. En el inserto se muestra la recta de regresión lineal para 96 hr de tratamiento considerando un incremento exponencial (logarítmico = Log) de la concentración de Cd;  $r^2$  = coeficiente de correlación lineal; LAT = límite absoluto de tolerancia para ese tratamiento.

FIGURE 1. Effect of Cd concentration on adventitious root growth from onion bulb. Each point corresponds to mean values of 80 roots from four different bulbs. Standard deviations are less than 10% of the mean values. The insert shows lineal regression in relation to an exponential increment of Cd concentration (Log) after a 96 hr treatment;  $r^2$  = lineal correlation coefficient; LAT = upper critical level.

cuando se trataron con una concentración de 11,0 mg/L, la cantidad de Cd aumentó en forma importante, en raíces y en coronas (alrededor de 180 y 89 veces, respectivamente), no observándose un cambio significativo en bulbos, aún después de 96 horas de tratamiento.

**Plomo**

Todas las concentraciones de Pb empleadas en la evaluación inhiben el crecimiento radical en forma proporcional a la concentración utilizada, produciéndose una inhibición máxima de aproximadamente 60%, con una concentración de Pb de 12,5 mg/L (Figura 2). Esta inhibición se correlaciona con una caída de alrededor de 20% en el consumo de oxígeno radical, medido después de 96 hr de tratamiento (Cuadro 1). El LAT obtenido para este metal después de 96 hr de tratamiento es 40% menor al calculado con un tratamiento efectuado durante 48 hr (2,40 y 3,99 mg/L, respectivamente) (Cuadro 2). Se encontró Pb en todos los segmentos estudiados de las plantas controles, después de 48 y 96 hr de cultivo en agua

potable filtrada, en una cantidad de aproximadamente 35  $\mu\text{g/g}$  en raíces y de 16  $\mu\text{g/g}$  en los otros dos segmentos analizados (Cuadro 3). Cuando los bulbos se trataron durante 96 hr, con concentraciones de Pb de 5,0 y 10,0 mg/L se aumentó en forma importante la cantidad de Pb en todos los segmentos estudiados. Así, en raíces se incrementó en alrededor de 92 y 133 veces, respectivamente. En cambio, en corona y bulbo el aumento fue un poco menor (alrededor de 33 y 57 veces en corona y de 29 y 63 veces en bulbo).

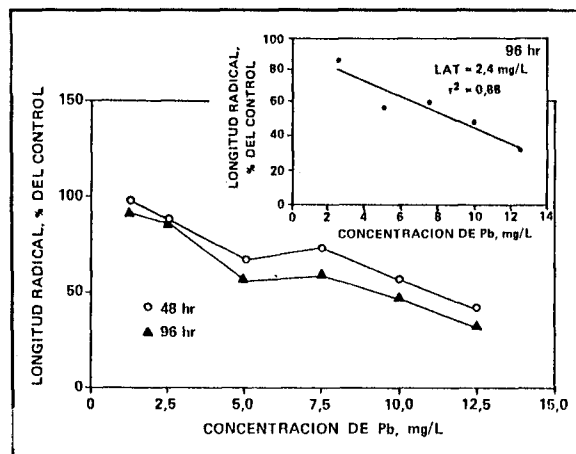


FIGURA 2. Efecto de diferentes concentraciones de Pb sobre el crecimiento de raíces adventicias de bulbos de cebolla. Cada punto corresponde al promedio obtenido de un total de 70 raíces de cuatro bulbos diferentes. La desviación estándar fue menor al 10% del promedio. En el inserto se muestra la recta de regresión lineal para 96 hr de tratamiento considerando un incremento lineal de la concentración de Pb;  $r^2$  = coeficiente de correlación lineal; LAT = límite absoluto de tolerancia para ese tratamiento.

FIGURE 2. Effect of Pb concentration on adventitious root growth from onion bulb. Each point corresponds to mean values from 70 roots from four different bulbs. Standard deviation are less than 10% of the mean values. The insert shows lineal regression in relation to a lineal increment of Pb concentration after a 96 hr treatment;  $r^2$  = lineal correlation coefficient; LAT = upper critical level.

**Molibdeno**

Concentraciones iguales o menores a 50 mg/L de Mo estimulan el crecimiento radical, en cambio, concentraciones iguales o mayores a 100 mg/L, lo inhiben (Figura 3). Este hecho se observa a partir de las 48 hr de iniciados los tratamientos con las distintas concentraciones del metal, y en forma muy evidente, después de 96 hr de tratamiento. Ninguna de las concentraciones de Mo utilizadas en este estudio alteraron el consumo de oxígeno (Cuadro 1). El LAT obtenido para este metal, después de 96 hr de tratamiento, es 37% menor al obtenido con un tratamiento efectuado

**CUADRO 2. Límite absoluto de tolerancia (LAT)<sup>1</sup> para Cd, Pb, Mo y Cu calculado después de 48 y 96 hr de tratamiento**

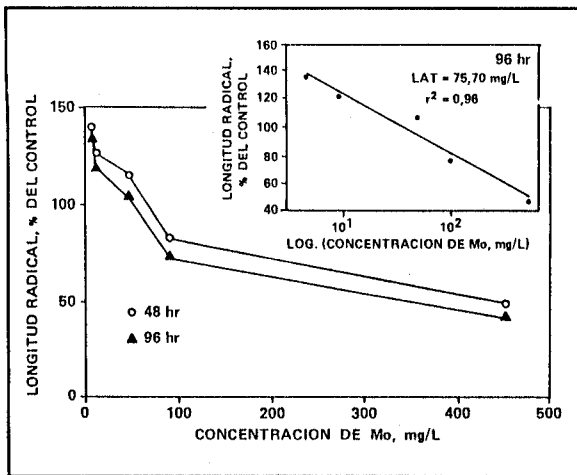
**TABLE 2. Absolute upper critical level for Cd, Pb, Mo and Cu obtained after 48 and 96 hr of treatment**

Metal	Norma <sup>2</sup>	Límite absoluto de tolerancia, mg/L			
		48 hr		96 hr	
		mg/L	r <sup>2</sup>	mg/L	r <sup>2</sup>
Cadmio	0,010	2,11	0,90	1,08	0,93
Plomo	5,0	3,99	0,88	2,40	0,88
Molibdeno	0,010	119,90	0,94	75,70	0,96
Cobre	0,20	0,13	0,96	0,09	0,98

<sup>1</sup>El LAT se determinó a partir de la aproximación a la mejor recta de regresión lineal de la correlación entre el crecimiento radical y el incremento de la concentración del metal administrada. Para el caso de Cd y Mo, en que la concentración utilizada fue exponencial, la mejor recta se obtuvo con una regresión logarítmica.

<sup>2</sup>Concentración máxima permitida en agua de riego por la norma chilena 1333. Of 1978 (INN, 1987).

r<sup>2</sup>Coefficiente de correlación lineal.



**FIGURA 3. Efecto de diferentes concentraciones de Mo sobre el crecimiento de raíces adventicias de bulbos de cebolla. Cada punto corresponde al promedio obtenido de un total de 95 raíces de seis bulbos diferentes. La desviación estándar fue menor al 10% del promedio. En el inserto se muestra la recta de regresión lineal para 96 hr de tratamiento considerando un incremento exponencial (logarítmico = Log) de la concentración de Mo; r<sup>2</sup> = coeficiente de correlación lineal; LAT = límite absoluto de tolerancia.**

**FIGURE 3. Effect of Mo concentration on adventitious root growth from onion bulb. Each point corresponds to mean values of 95 roots of six different bulbs. Standard deviations are less than 10% of the mean values. The insert shows lineal regression in relation to an exponential increment of Mo concentration after a 96 hr treatment; r<sup>2</sup> = lineal correlation coefficient; LAT = upper critical level.**

durante 48 hr (75,7 y 119,9 mg/L, respectivamente) (Cuadro 2). No se detectó la presencia de Mo en las plantas controles, y solo en raíces, después de 48 hr de tratamiento con una concentración de Mo de 67,0 mg/L (Cuadro 3). En cambio, con una concentración 10 veces mayor, administrada durante 96 hr, aumenta en 2,8 veces la cantidad detectada en raíces, empieza a detectarse en corona y, muy discretamente en bulbo.

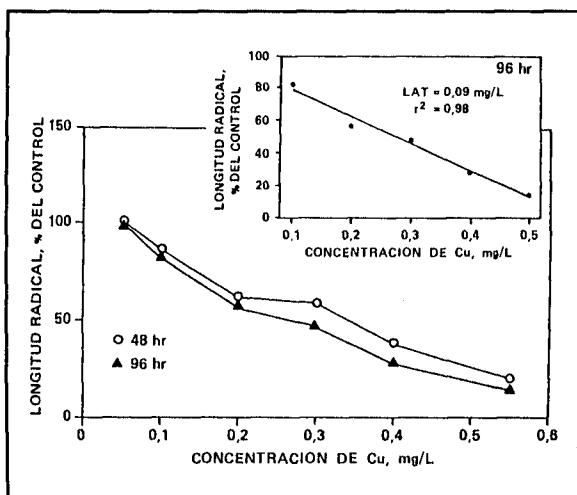
### Cobre

Todas las concentraciones de Cu empleadas inhiben el crecimiento radical, siendo levemente más evidente, después de 96 hr de tratamiento (Figura 4). Al igual que en el caso del Mo ninguna de las concentraciones de Cu utilizadas en el estudio, alteraron el consumo de oxígeno después de 96 hr de tratamiento (Cuadro 1). El LAT obtenido para este metal, después de 96 hr de tratamiento, fue 28% menor al calculado después de 48 hr de tratamiento (0,091 y 0,126 mg/L, respectivamente) (Cuadro 2). A diferencia de los otros metales estudiados, el Cu se acumuló sólo en las raíces, después de 48 y 96 hr de tratamiento, con concentraciones de Cu de 0,2 y 0,4 mg/L, respectivamente (Cuadro 3).

**CUADRO 3. Contenido de Cd, Pb, Mo y Cu en distintos segmentos de la planta después de 48 y 96 hr de tratamiento con dos concentraciones diferentes de cada metal**

**TABLE 3. Cd, Pb, Mo and Mo concentration in different plant segments after 48 and 96 hr of treatment with two different heavy metals concentrations**

Tratamientos	Concentración de metal, µg/g peso seco					
	Raíz		Corona		Bulbo	
	48 hr	96 hr	48 hr	86 hr	48 hr	96 hr
<b>Cadmio</b>						
Control	15,6	12,0	13,2	12,0	12,6	10,2
0,011 mg/L	30,6	60,6	12,6	14,4	13,2	11,4
11,000 mg/L	1.435,8	2.232,0	680,0	1.068,0	13,2	18,0
<b>Plomo</b>						
Control	31,2	42,0	15,3	16,2	16,8	16,2
5,0 mg/L	2.298,0	3.852,0	344,0	438,0	366,0	468,0
10,0 mg/L	2.708,0	5.604,0	826,0	918,0	354,0	590,0
<b>Molibdeno</b>						
Control	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
67,0 mg/L	198,0	410,0	0,0	0,0	0,0	0,0
670,0 mg/L	1.055,8	1.146,3	378,4	656,2	0,0	32,0
<b>Cobre</b>						
Control	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
0,2 mg/L	25,8	86,7	0,0	0,0	0,0	0,0
0,4 mg/L	163,2	268,7	0,0	0,0	0,0	0,0



**FIGURA 4. Efecto de diferentes concentraciones de Cu sobre el crecimiento de raíces adventicias de bulbos de cebolla. Cada punto corresponde al promedio obtenido de un total de 80 raíces de ocho bulbos diferentes. La desviación estándar fue menor al 10% del promedio. En el inserto se muestra la recta de regresión lineal para 96 hr de tratamiento considerando un incremento lineal de la concentración de Cu;  $r^2$  = coeficiente de correlación lineal; LAT = límite absoluto de tolerancia.**

**FIGURE 4. Effect of Cu concentration on adventitious root growth from onion bulb. Each point correspond to the mean values of 80 roots from eight different bulbs. Standard deviations are less than 10% of the mean values. The insert shows lineal regression in relation to a lineal increment of Cu concentration after a 96 hr treatment;  $r^2$  = lineal correlation coefficient; LAT = upper critical level.**

**DISCUSIÓN**

**Límite absoluto de tolerancia a metales pesados**

El objetivo de este trabajo fue determinar el límite absoluto de tolerancia (LAT) (González, 1993), para cuatro metales pesados, dos considerados como esenciales, ya que presentan propiedades de micronutrientes, como son Mo y Cu, y dos metales no esenciales, es decir, que no se les ha encontrado un rol biológico en los organismos vivos, como es el caso de Cd y Pb. Para ello se evaluó, individualmente, el efecto de distintas concentraciones de cada uno de estos metales sobre: el crecimiento de raíces adventicias de bulbos de cebolla cultivados directamente en agua, la relación con cambios metabólicos valorados a través de la medición del consumo de oxígeno radical y, el potencial bioacumulador para cada metal, en distintos segmentos de la planta. Si se tiene en cuenta que en el modelo biológico utilizado en esta investigación, las raíces crecen inmersas en un medio líquido en el que se halla disuelto el metal (todo el metal disuelto en el medio estará disponible para las raíces), entonces es posible determinar con bastante precisión, la concentración máxima absoluta de un metal que puede ser tolerada por el sistema, es decir, permite conocer el límite absoluto de tolerancia (LAT), propuesto por

González (1993). Se comprueba, que concentraciones bajas de Mo y Cd estimulan el crecimiento radical. Este resultado sería esperable para el caso de Mo, el cual es un micronutriente, pero no así para el caso del Cd que no se considera esencial, sin embargo, por los resultados obtenidos, podría pensarse que Cd tendría en esta planta un cierto carácter de micronutriente. Se ha comprobado, además, que todos los metales pesados estudiados inhiben el crecimiento radical cuando están presentes en el medio de cultivo a partir de ciertas concentraciones. Esta inhibición se hace evidente después de 48 hr de tratamiento. Sin embargo, se puede determinar un LAT más preciso o restrictivo cuando el tratamiento se prolonga durante 96 hr, tiempo correspondiente a la duración de tres ciclos proliferativos de las células meristemáticas en las condiciones de cultivo empleadas (González-Fernández, Giménez-Martín y De La Torre, 1971). Esto no significa que se requiera un mayor tiempo de exposición al metal para que se produzca el efecto biológico, sino que se requiere que transcurra un tiempo más prolongado para que se haga evidente una inhibición del crecimiento radical en relación al control, cuando una determinada concentración de metal empieza a tener un efecto biológico.

#### **Inhibición del crecimiento radical y consumo de oxígeno**

Un hecho interesante observado es que la inhibición del crecimiento radical, producida a partir de una determinada concentración, no siempre se correlaciona con una caída en el consumo de oxígeno, por parte de la raíz. El oxígeno es la molécula que produce el tiraje del metabolismo oxidativo, al actuar como el aceptor final de los electrones de la cadena transportadora de los mismos a nivel de las crestas mitocondriales. A esta cadena se halla acoplada la producción de ATP (Hinkle y McCarty, 1978). De esta manera, una caída en el consumo de oxígeno se corresponde con una caída en la producción de ATP. Esto conlleva a la inhibición de todos aquellos eventos celulares que requieren de esta importante molécula. Los resultados obtenidos con algunas concentraciones de Cd y Pb, muestran que existe una asociación entre inhibición del crecimiento radical con una disminución del consumo de oxígeno; lo que sugiere, que esta inhibición corresponde a una alteración, en algún nivel del metabolismo oxidativo celular, es decir es el reflejo de un efecto fitotóxico generalizado. En cambio, no se observó este mismo efecto con Mo y Cu, los que a partir de determinadas concentraciones, inhiben el crecimiento radical, sin alterar el consumo de oxígeno. En

estos casos la inhibición del crecimiento de las raíces podría ser consecuencia de un alteración de algún evento específico involucrado directamente con cualquiera de los dos parámetros responsables del crecimiento radical, como es la proliferación celular a nivel meristemático y/o la elongación celular, en la zona de maduración de la raíz (López-Sáez *et al.*, 1975; Torrey y Felman, 1977), hecho que se ha comprobado para estos metales (Sans *et al.*, 1993).

#### **Acumulación de metales en distintos segmentos de la planta**

Se ha observado que todos los metales se acumulan en la planta en forma proporcional a la concentración presente en el medio de cultivo. Sin embargo, el Cu y Mo se acumulan preferentemente en raíces y no en otros segmentos de la planta; en cambio, el Cd y Pb se acumulan en las raíces, corona y bulbo, con un gradiente de concentración que va disminuyendo desde la raíz al bulbo. El conocer en qué segmento de la planta se acumulan de preferencia los metales pesados, puede ser de utilidad, puesto que, si un cultivo se efectúa en un suelo contaminado o es regado con aguas contaminadas por metales pesados y estos se acumulan de preferencia en raíces, y no en los segmentos comestibles de ella como son el bulbo y los brotes, entonces la planta puede tener una mejor perspectiva para su utilización por animales y el hombre, con las implicancias que ello pueda conllevar en beneficio de la salud.

De los resultados de la investigación se desprende que las concentraciones absolutas de tolerancia determinadas para Cu y Pb son inferiores a los límites máximos de tolerancia establecidos por la norma chilena para agua de riego. Razón por la que se estima que la norma chilena estaría excedida para estos metales, y los resultados que se presentan serían una pauta más a tener en consideración como referencia en el momento que se deba decidir una nueva norma. En cambio, las concentraciones absolutas de tolerancia determinadas para Cd y Mo, son considerablemente superiores a las máximas establecidas por la norma chilena. Sin embargo, hay que tener en cuenta que el sistema biológico empleado pudiera presentar una alta tolerancia para Cd y Mo, como lo han descrito algunos autores para otras plantas con estos mismos metales pesados (Shultz y Hutchinson, 1991), por lo que la información obtenida sólo debiera considerarse como referencia en el momento de decidir la concentración máxima permitida de un metal en un determinado medio.

## RESUMEN

Las concentraciones máximas permitidas de metales pesados en aguas de riego fijadas por la norma chilena (NCH 1333. Of 1978) (INN 1987) no se sustentan en estudios realizados en Chile, sino que se basan en normas internacionales, las que pueden ser muy restrictivas para algunos metales y muy tolerantes para otros. Por esta razón se requiere contar con estudios realizados en el país en que se utilicen diversos sistemas biológicos que permitan definir con precisión la concentración de un determinado metal pesado en agua de riego, capaz de ser tolerada por un sistema vivo.

El objetivo del presente trabajo fue determinar el límite absoluto de tolerancia (LAT) para dos metales pesados no esenciales como Cd y Pb y dos esenciales como Mo y Cu, en raíces adventicias de bulbos de cebolla cultivadas directamente en agua potable. Con este fin, se estudió individualmente el efecto de distintas concentraciones de cada uno de estos cuatro metales sobre el creci-

miento radical, metabolismo oxidativo y capacidad de acumulación de ellos en distintos segmentos de la planta. Los resultados muestran que el LAT (concentración de metal biodisponible capaz de inhibir el crecimiento radical en un 20%) para Cd, Pb, Mo y Cu fue de 1,08, 2,40, 75,70 y 0,09 mg/L respectivamente, después de 96 hr de tratamiento. Es decir, que para Cd y Mo los LAT determinados son 108 y 7.570 veces superiores a la norma, en cambio, para Pb y Cu los LAT obtenidos corresponden aproximadamente a la mitad de la norma. Estos resultados muestran que la norma chilena para Cd y Mo en agua de riego, sería muy restrictiva. Por el contrario, para Cu y Pb estaría excedida. Se discute el significado y la proyección que pudiesen tener los resultados obtenidos mediante este bioensayo.

**Palabras claves:** límite absoluto de tolerancia, toxicidad biológica, crecimiento radical, cadmio, molibdeno, plomo, cobre.

## LITERATURA CITADA

- CHIANG, J., CORNEJO, P., LÓPEZ, J., ROMANO, S., PASCUAL, J. and CEA, M. 1985. Determination of Cd, Cu, Mn, Pb, Fe, Zn and As in atmospheric fall out, in Quintero, fifth Region of Chile. *Boletín de la Sociedad Chilena de Química*. 30: 139-158.
- CONAMA-COMISIÓN NACIONAL DEL MEDIO AMBIENTE. 1991. Los problemas ambientales por Regiones, Santiago, Chile. 42 p.
- FERRADA, D., CISTERNA, F. y SANS, J. 1993. ¿Cómo preservar el recurso agua? Proyecto de asignatura electiva en educación ambiental para la enseñanza media. *Revista de Educación* 205: 40-43.
- GONZÁLEZ M., S. (ed.). 1994. Impacto ambiental de metales pesados en Chile. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Regional de Investigación La Platina. Santiago, Chile. 19 y 20 de abril. 260 p.
- GONZÁLEZ, S. 1993. Reducción de la toxicidad del cobre y cadmio en alfalfa, mediante el uso de abono orgánico. *Agricultura Técnica (Chile)* 53: 245-250.
- GONZÁLEZ, S. 1992. Prospección de elementos traza en recursos agrícolas de Chile. III Aguas superficiales de los Valles Maipo y Mapocho, Región Metropolitana. *Agricultura Técnica (Chile)* 52: 320-329.
- GONZÁLEZ, S. 1990. Detección de elementos traza en recursos agrícolas de Chile. Aguas y suelos de los Valles Elqui y Limarí, IV Región. *Agricultura Técnica (Chile)* 50: 60-70.
- GONZÁLEZ, S. 1986. Calidad de las aguas de riego en Chile. *Agricultura Técnica (Chile)* 46: 467-474.
- GONZÁLEZ, S. e ITE, R. 1992. Acumulación metálica en suelos del área bajo influencia de las chimeneas industriales de Ventana (Provincia de Valparaíso, V Región). *Agricultura Técnica (Chile)* 50: 214-219.
- GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, A., GIMÉNEZ-MARTÍN, G. and DE LA TORRE, C. 1971. The duration of interphase period at different temperature on root tips cell. *Citobiologie* 3: 367-371.
- HINKLE, P. and McCARTY, R. 1978. How cells make ATP? *Scientific American* 238: 104-123.
- INN-INSTITUTO NACIONAL DE NORMALIZACIÓN DE CHILE. 1987. Requisitos de calidad del agua para diferentes usos. Norma Chilena Oficial N.Ch.1333. Of 1978 modificada en 1987. INN. Santiago, Chile. p.: 4.
- KIEFFER, F. 1991. Metals as essential trace elements for plants, animals, and humans. In: E. Merian (ed.). *Metals and their compounds in the environmental*. VCH Publisher Inc. N.Y. p.: 481-489.
- LÓPEZ-SÁEZ, J.F., GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, A., DE LA TORRE, C., DIEZ, J.L., FERNÁNDEZ-GÓMEZ, E., NAVARRETE, M.H., GARCÍA-HERDUGO, G. and GIMÉNEZ-MARTÍN, G. 1975. A model for cell cycle and growth kinetics in roots. *Journal Theoretical Biology* 53: 463-473.



- OCHOA, L., LEYTON, C., SANS, J. y PEPPER, I. 1992. Efecto de plomo sobre el crecimiento radicular de cebolla (*Allium cepa* L.). *Agricultura Técnica* (Chile) 52: 313-319.
- ROMO-KRÖGER, C. and LLONA, F. 1993. A case of atmospheric contamination at the slopes of the Los Andes mountain range. *Atmospheric Environment* 27 A: 401-404.
- SANDOVAL, H., PRÉNDEZ, M. y ULRIKSEN, P. 1993. Contaminación atmosférica de Santiago. Estado actual y soluciones. Editorial Universitaria, Santiago, Chile. 429 p.
- SANS, J., GIMÉNEZ-MARTÍN, G. and DE LA TORRE, C. 1980. Onset of cell proliferation in dormant roots of *Allium cepa* L. bulbs. Kinetic analysis. *Biologie Cellulaire* 38: 95-104.
- SANS, J., LEYTON, C., FERRADA, D., CORTÉS, J. and DORTA, P. 1993. Experimental evaluation of the biological effect of heavy metals (Cu, Pb, Cd and Mo), using onion roots. CITY 93 EPH93 Conference Antwerp, Bélgica 25 al 30 de Octubre.
- SCHULTZ, C. and HUTCHINSON, T. 1991. Metal tolerance in higher plants. In: E. Merian (ed.). *Metals and their compounds in the environmental*. VCH Publisher Inc. N. Y. p.: 413-418.
- TORREY, J.C. and FELMAN, L.J. 1977. The organization and function of the root apex. *American Scientist* 65: 334-344.