

EFFECTO ECOTOXICOLÓGICO DE TRES METALES PESADOS SOBRE EL CRECIMIENTO RADICULAR DE CUATRO PLANTAS VASCULARES

Ecotoxicological effects of three heavy metals on the root growth of four vascular plants

José Iannacone O.¹ * y Lorena Alvarino F.¹

ABSTRACT

Environmental risk assessment (ERA) of terrestrial environments polluted by heavy metals in Peru requires standardized biological organisms, the use of which is simple, practical, sensitive and repeatable, such as seeds of higher plants used in ecotoxicological bioassays. The aim of this research was to evaluate the phytotoxic effects of Cr⁶⁺, Hg²⁺ and Pb²⁺ as potassium dichromate (K₂Cr₂O₇), mercury chloride (Cl₂Hg) and lead acetate ((CH₃COO)₂Pb), respectively, on growing roots of four species of higher terrestrial plants: onions (*Allium cepa* L., Liliaceae), red beets (*Beta vulgaris* L., Chenopodiaceae), rice (*Oriza sativa* L., Poaceae) and radishes (*Raphanus sativus* L., Brassicaceae) at 192 h (8 days) exposure. Bioassays of static sub-lethal toxicity for each metal and for each species of plant were performed, using a randomized complete block design: six concentrations and eight replicates with 240 seeds for each bioassay. The sequence in ascending order for mean inhibition concentration (IC₅₀ in mg L⁻¹) on root growth at 192 h exposure in the majority of cases was: Hg²⁺ > Cr⁶⁺ > Pb²⁺. The perspectives of use for evaluation of soils contaminated by heavy metals in Peru are analyzed.

Key words: heavy metals, Peru, seeds, vascular plants, seeds, mining waste, chromium, mercury, lead.

RESUMEN

La evaluación del riesgo ambiental (ERA) de los ambientes terrestres contaminados por metales pesados en el Perú requiere del empleo de organismos biológicos estandarizados, que sean sencillos, prácticos, sensibles y repetibles, como las semillas de plantas superiores empleadas en bioensayos ecotoxicológicos. Por ello, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto fitotóxico del Cr⁶⁺, Hg²⁺ y Pb²⁺ en forma de dicromato de potasio (K₂Cr₂O₇), cloruro de mercurio (Cl₂Hg) y acetato de plomo ((CH₃COO)₂Pb), respectivamente, sobre el crecimiento radicular de cuatro especies de plantas superiores terrestres: cebolla (*Allium cepa* L., Liliaceae), betarraga (*Beta vulgaris* L., Chenopodiaceae), arroz (*Oriza sativa* L., Poaceae) y rabanito (*Raphanus sativus* L., Brassicaceae) a 192 h (8 días) de exposición. Se realizaron bioensayos de toxicidad subagudos estáticos para cada metal y para cada especie de planta, usando un diseño experimental en bloques completos al azar: seis concentraciones, ocho repeticiones, con un total de 240 semillas por bioensayo. La secuencia en orden ascendente para la concentración de inhibición media (CI₅₀ en mg L⁻¹) del crecimiento radicular de las semillas a 192 h fue en la mayoría de los casos: Hg²⁺ > Cr⁶⁺ > Pb²⁺. Se analizan las perspectivas de uso para la evaluación de suelos contaminados por metales pesados en el Perú.

Palabras clave: metales pesados, Perú, plantas vasculares, semillas, relave minero, cromo, mercurio, plomo.

¹ Universidad Nacional Federico Villareal, Facultad de Ciencias Naturales y Matemática, Calle San Marcos 383, Pueblo Libre, Perú.
E-mail: joselorena@terra.com *Autor para correspondencia.

Recibido: 12 de diciembre de 2003. Aceptado: 4 de mayo de 2004.

INTRODUCCIÓN

Es importante determinar el nivel de riesgo ambiental de los metales pesados sobre diversos representantes del ecosistema terrestre utilizando bioensayos ecotoxicológicos (Iannacone y Gutiérrez, 1999; Arkhipchuk *et al.*, 2000); entre ellos, las plantas terrestres presentan especies representativas de los agroecosistemas hortícolas (Wang, 1991; Arambasic *et al.*, 1995; Iannacone *et al.*, 2000). Los ensayos de fitotoxicidad con semillas germinadas son simples, versátiles y útiles para evaluar la toxicidad de aguas, sedimentos y muestras de suelo (Walsh *et al.*, 1991; Lewis, 1995; Rosa *et al.*, 1999). Algunas especies de plantas tienen ventajas sobre otros organismos biológicos, como por ejemplo: 1) poder almacenarse en forma de semilla por un año o más; 2) costo de mantenimiento mínimo; 3) las muestras no requieren aireación; 4) muestras con altas turbiedades no requieren filtración adicional; y 5) las pruebas se pueden llevar a cabo sin ajuste de pH.

Calow (1993) señala la potencialidad de uso de cebolla (*Allium cepa* L., Liliaceae), betarraga (*Beta vulgaris* L., Chenopodiaceae), arroz (*Oriza sativa* L., Poaceae) y rabanito (*Raphanus sativus* L., Brassicaceae) para evaluar la toxicidad y el riesgo de sustancias químicas peligrosas en el ambiente. Sin embargo, el efecto de metales pesados sobre plantas vasculares no se conoce bien en el Perú (Lerda, 1992; Barone *et al.*, 1997; Rosa *et al.*, 1999; De Jong y De Haes, 2001).

La determinación de algunos aspectos de la ecotoxicidad de metales pesados empleando bioensayos sencillos y prácticos para catalogar toxicológicamente muestras ambientales contaminadas por Pb, Hg y Cr contribuirá, en el Perú, a tomar medidas para evaluar la perturbación de los ecosistemas y promover alternativas de biorremediación (Shanker *et al.*, 1996; Iannacone y Alvarino, 1999).

Las pruebas de fitotoxicidad que emplean plantas terrestres, no son usadas frecuentemente en ecotoxicología (Wang, 1991; Calow, 1993; APHA, 1995). Las tres características más im-

portantes de los ensayos con plantas terrestres, es que se les puede usar con muestras coloreadas o turbias, en ensayos estáticos, semiestáticos y de flujo continuo, y con un mínimo costo de mantenimiento en el laboratorio (Wang, 1991). El empleo de las semillas de plantas terrestres como herramientas ecotoxicológicas es ventajoso, por requerir poco volumen de muestra (1 mL envase⁻¹), comparado con otros organismos que requieren de 50 a 200 mL envase⁻¹ (Arambasic *et al.*, 1995).

Las plantas vasculares han sido recomendadas por la Agencia de Protección Ambiental (EPA) y por la Administración de Drogas y Alimentos (FDA), ambas de EE.UU., debido a su buena sensibilidad, en comparación con semillas de otras especies de plantas terrestres (Wang, 1991). El ensayo ecotoxicológico con semillas de plantas vasculares presenta algunas ventajas sobre otras especies terrestres, lo que permite usar cuantitativamente el crecimiento de la raíz. Wang (1991) indicó que el crecimiento de raíz como punto final de lectura, es más sensible a la toxicidad que la germinación de semillas, la cual presenta un alto coeficiente de variación (Rosa *et al.*, 1999). Calow (1993) presentó un resumen de los protocolos de bioensayos de germinación de semilla y de elongación de raíz con diferentes especies de plantas, siendo comparables al protocolo usado en este estudio.

La sensibilidad de las especies a los metales pesados varía considerablemente a través de reinos y phyla, siendo las plantas vasculares ligeramente más tolerantes (Rosa *et al.*, 1999). Las diferentes respuestas de las plantas vasculares a metales pesados pueden ser atribuidas a factores genéticos y fisiológicos (Calow, 1993).

Lerda (1992) encontró que el Pb reduce el crecimiento radicular y la frecuencia de células mitóticas, y el incremento de la frecuencia de células aberrantes en *A. cepa*. La intensidad del efecto está en función de la concentración del Pb. Pal y Nandi (1990) y Liu *et al.* (1995) evaluaron el efecto citológico del Hg en las raíces de bulbos de *A. cepa*.

Los objetivos específicos planteados en la presente investigación fueron determinar la ecotoxicidad del cromo (Cr^{6+}), mercurio (Hg^{2+}) y plomo (Pb^{2+}) sobre la inhibición del crecimiento radicular de cuatro plantas vasculares: cebolla, betarraga, arroz y rabanito, a 192 h de exposición.

MATERIALES Y MÉTODOS

Semillas y bioensayo

Las semillas de *A. cepa*, *B. vulgaris*, *O. sativa* y *R. sativus* se obtuvieron en sobres de 240 semillas distribuidos por la empresa Actividades y Servicios Comerciales (ACSERCO) S.A., Lima, Perú, en mayo de 2000. Las semillas de *A. cepa* pertenecían a la cebolla roja variedad Credle.

Antes de su empleo en ensayos ecotoxicológicos, todas las semillas se mantuvieron en condiciones de oscuridad y a temperaturas de 6°C para inhibir su germinación y mantener su fertilidad, según el criterio propuesto por Wang (1991). Se descartaron las semillas dañadas y se utilizaron las de un mismo tamaño. Para la desinfección de las semillas se realizó un pretratamiento con una solución de hipoclorito de sodio al 5,25% (Clorox® tradicional, Callao, Perú) diluída al 3,33 g $\text{OCl}^{-}\text{L}^{-1}$ (2,5%), durante 7 a 20 min (APHA, 1995) y cuatro enjuagues en agua destilada. Los frascos empleados en los bioensayos de 2,8 cm de alto x 3,5 cm de ancho x 3,5 cm de fondo, y de 28,4 g de capacidad, se desinfectaron con la misma solución de hipoclorito de sodio por 30 min, luego se enjuagaron con agua destilada y se secaron en estufa a 30°C por 20 min. De igual forma, el papel absorbente (Tissue®) previamente cortado en trozos de $3,5\text{ cm}^2$ se esterilizó por 15 min en una estufa a 60°C .

Las semillas de las cuatro especies de plantas terrestres se evaluaron en bioensayos sin renovación de la solución tóxica utilizando un total de cinco semillas por envase, con ocho repeticiones. En cada envase se colocaron dos trozos de papel absorbente, y se añadió 1 mL de la solución hidropónica con cada concentración de metal pesado (Cr^{6+} , Hg^{2+} ó Pb^{2+}) por envase. Luego se colocaron cinco semillas en forma equidistante (cuatro en cada ángulo y otra en el centro) en

cada envase y se cubrió con dos trozos más de papel absorbente. El agua utilizada para los ensayos biológicos consistió en una solución hidropónica con las características descritas por Iannacone *et al.* (2000). La prueba se realizó bajo condiciones de oscuridad. La duración de la prueba fue de 192 h (8 días). Los indicadores para el bioensayo fueron el crecimiento de la radícula (mm) en comparación con el control. Los bioensayos se realizaron a una temperatura de $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$.

Metales pesados

Para la preparación de las soluciones madres de los tres metales pesados se utilizó: dicromato de potasio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) y cloruro de mercurio (HgCl_2) a 100 mg del metal L^{-1} y acetato de plomo ($\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$) a 200 mg de $\text{Pb}^{+2}\text{L}^{-1}$. En el caso del Cr^{+6} y del Hg^{2+} se emplearon las siguientes concentraciones 0,625; 1,25; 2,5; 5 y 10 mg L^{-1} , y para el Pb^{2+} : 12,5; 25, 50, 100 y 200 mg L^{-1} . Para todos los casos se empleó un factor de dilución de 0,5. Las concentraciones finales indicadas para cada metal se seleccionaron a partir de Lerda (1992), Arambasic *et al.* (1995) y Liu *et al.* (1995).

Diseño experimental y tratamiento estadístico

Las pruebas de toxicidad subaguda para las cuatro especies de plantas terrestres se evaluaron en cinco concentraciones nominales más el control, en un diseño factorial en bloque completo al azar: seis concentraciones, ocho repeticiones y cinco semillas por envase (longitud de radícula en mm), con un total de 240 semillas por bioensayo (Zar, 1996). La eficacia de los tratamientos se evaluó a través de un análisis de varianza (ANDEVA) de una vía, previa transformación de los datos a $\log x+1$. En el caso que el ANDEVA detectara diferencias significativas entre las concentraciones se realizó una prueba de Tukey a nivel de significancia de 0,05 (Norman y Streiner, 1996). Las concentraciones inhibitorias medias ($\text{CI}_{50\text{S}}$) para los ensayos fitotóxicos con semillas se calcularon usando un programa computarizado de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA), empleando el método de interpolación lineal para toxicidad subletal y calculando la concentración de inhibición media (CI_{50}) (EPA, 1993).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El Cuadro 1 muestra los valores comparativos de inhibición de crecimiento radicular (punto final de lectura) en términos de CI_{50} en los ensayos ecotoxicológicos con las cuatro plantas vasculares. Ninguna especie fue en todos los casos la más sensible a los tres metales pesados ensayados. Para el Cr^{6+} se observó el siguiente orden decreciente de ecotoxicidad: *O. sativa* > *B. vulgaris* > *A. cepa* > *R. sativus*. Para el Hg^{2+} se encontró la siguiente secuencia: *B. vulgaris* > *R. sativus* ~ *O. sativa* > *A. cepa*. Para el Pb^{2+} se encontró la siguiente secuencia: *B. vulgaris* > *A. cepa* > *R. sativus* > *O. sativa*. La secuencia de sensibilidad promedio en orden decreciente fue: Hg^{2+} > Cr^{6+} > Pb^{2+} .

Los Cuadros 2 al 4 señalan los porcentajes de inhibición del crecimiento radicular de las cuatro plantas vasculares a las cinco concentraciones de cada uno de los tres metales, indicando las diferencias significativas en los porcenta-

jes de inhibición entre las concentraciones evaluadas. En todos los casos, el porcentaje de inhibición se incrementó con la concentración del tóxico.

La comparación de resultados entre reportes es complicada para diferentes especies de plantas vasculares por las diferencias en la sensibilidad de las especies, por las diferencias en los tiempos de exposición, puntos finales de lectura y de evaluación (Rosa *et al.*, 1999; Arkhipchuk y Garanko, 2002). Inclusive la edad de las semillas debe ser tomada en consideración, pues pudiera producir resultados diferentes (Arkhipchuk *et al.*, 2000). Este criterio no fue evaluado en la presente investigación.

Las semillas de *B. vulgaris* fueron relativamente más sensibles a la acción de los tres metales en comparación a las otras tres especies vegetales, por lo que podría usarse para el monitoreo ecotoxicológico de suelos contaminados por

Cuadro 1. Valores comparativos de inhibición de crecimiento de radícula en términos de concentración de inhibición media, CI_{50} ($mg L^{-1}$) para cuatro ensayos ecotoxicológicos con semillas de plantas terrestres para la evaluación de tres metales pesados.

Table 1. Comparative values of inhibition of root growth in terms of mean inhibition concentration, IC_{50} ($mg L^{-1}$), for four ecotoxicological assays with seeds of terrestrial plants to evaluate three heavy metals.

Especie de planta	CI_{50} ($mg L^{-1}$) a 192 h		
	Cr^{+6}	Hg^{+2}	Pb^{+2}
<i>Allium cepa</i> L.	10,30	11,66	263
<i>Beta vulgaris</i> L.	6,28	0,51	28,44
<i>Oriza sativa</i> L.	4,58	5,47	438
<i>Raphanus sativus</i> L.	22,05	5,27	367

Cuadro 2. Porcentajes de inhibición del crecimiento radicular de cuatro plantas terrestres expuestas al cromo (Cr^{+6}) a 192 h de exposición.

Table 2. Percentage of root growth inhibition of four terrestrial plants exposed 192 h to chromium (Cr^{+6}).

Concentraciones ($mg L^{-1}$)	<i>Allium cepa</i>	<i>Beta vulgaris</i>	<i>Oriza sativa</i>	<i>Raphanus sativus</i>
0,625	12 a	30 a	0 a	2 a
1,25	07 a	60 b	41 b	2 a
2,5	27 b	59 b	50 b	3 a
5	32 b	64 b	68 c	13 b
10	49 c	75 b	73 c	32 c

Promedios en una misma columna, seguidos por la misma letra, no difieren significativamente según prueba de Tukey ($P = 0,05$).

Cuadro 3. Porcentajes de inhibición del crecimiento radicular de cuatro plantas terrestres expuestas al mercurio (Hg²⁺) a 192 h de exposición.

Table 3. Percentage of root growth inhibition of four terrestrial plants exposed 192 h to mercury (H²⁺).

Concentraciones (mg L ⁻¹)	<i>Allium cepa</i>	<i>Beta vulgaris</i>	<i>Oriza sativa</i>	<i>Raphanus sativus</i>
0,625	11 a	55 a	0 a	9 a
1,25	7 a	55 a	3 a	22 b
2,5	27 b	65 a	18 b	32 c
5	32 b	72 ab	46 c	33 c
10	29 b	78 b	100 d	76 d

Promedios en una misma columna, seguidos por la misma letra, no difieren significativamente según prueba de Tukey (P = 0,05).

Cuadro 4. Porcentajes de inhibición del crecimiento radicular de cuatro plantas terrestres expuestas al plomo (Pb²⁺) a 192 h de exposición.

Table 4. Percentage of root growth inhibition of four terrestrial plants exposed 192 h to lead (Pb²⁺).

Concentraciones (mg L ⁻¹)	<i>Allium cepa</i>	<i>Beta vulgaris</i>	<i>Oriza sativa</i>	<i>Raphanus sativus</i>
12,5	6 a	30 a	0 a	8 a
25	8 a	60 b	16 b	22 b
50	15 a	58 b	18 b	33 c
100	32 b	64 bc	32 c	33 c
200	37 b	75 c	34 c	38 c

Promedios en una misma columna, seguidos por la misma letra, no difieren significativamente según prueba de Tukey (P = 0,05).

relaves mineros (Cuadro 1). En contraste, las especies de plantas más tolerantes a los tres metales pesados, como *R. sativus* y *A. cepa*, permiten su uso en donde las condiciones agroecológicas permitan el cultivo de estas especies de importancia económica para la revegetación durante el abandono de depósitos de relaves y desmontes en la mediana y gran minería (Calzado, 1997).

CONCLUSIONES

De acuerdo a lo obtenido en la presente investigación, ninguna de las cuatro especies vegetales: cebolla, betarraga, arroz y rabanito, fue en todos los casos la más sensible a los tres metales pesados ensayados. Para el Cr⁶⁺ se observó el siguiente orden decreciente de ecotoxicidad: *O. sativa* > *B. vulgaris* > *A. cepa* > *R. sativus*. Para el Hg²⁺ se encontró la siguiente secuencia: *B. vulgaris* > *R. sativus* ~ *O. sativa* > *A. cepa*. Para el Pb²⁺ se encontró la siguiente secuencia: *B. vulgaris* > *A. cepa* > *R. sativus* > *O. sativa*. La

secuencia de sensibilidad promedio en orden decreciente fue: Hg²⁺ > Cr⁶⁺ > Pb²⁺.

Las semillas de *B. vulgaris* debido a su mayor sensibilidad a la acción de los tres metales, podría usarse para el monitoreo ecotoxicológico de suelos contaminados por relaves mineros. En contraste, las especies de plantas más tolerantes a los tres metales pesados, como *R. sativus* y *A. cepa*, permiten su uso para la revegetación en suelos afectados por la minería

RECONOCIMIENTOS

Se agradece a los estudiantes de Biología de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas que cursaron Ecología General durante el 2000 por el apoyo en el manejo de las semillas en el Laboratorio de Ecofisiología Animal. Este trabajo fue presentado en una exposición oral en el Tercer Congreso Internacional de Medio Ambiente en Minería, Lima, Perú, 16 al 18 de julio del 2003.

LITERATURA CITADA

- APHA. 1995. Standard methods for examination of water and wastewater. APHA (American Public Health Association), AWWA (American Water Works Association), WPCF (Water Pollution Control Federation), Washington D.C., USA.
- Arambasic, M.B., S. Bjelic, and G. Subakov. 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 Res.* 29:497-503.
- Arkipchuk, V.V., and N.N. Garanko. 2002. A novel nucleolar biomarker in plant and animal cells for assessment of substance cytotoxicity. *Environ. Toxicol.* 17:187-194.
- Arkipchuk, V.V., M.V. Malinovskaya, and N.N. Garanko. 2000. Cytogenetic study of organic and inorganic toxic substances on *Allium cepa*, *Lactuca sativa*, and *Hydra attenuata* cells. *Environ. Toxicol.* 15:338-344.
- Barone, L.M., C. Shih, and B.P. Wasserman. 1997. Mercury-induced conformational changes and identification of conserved surface loops in plasma membrane aquaporins from higher plants. Topology of PMIP31 from *Beta vulgaris* L. *J. Biol. Chem.* 272:30672-30677.
- Calow, P. 1993. Handbook of ecotoxicology. Vol. I. 478 p. Blackwell Science Ltd., London, England.
- Calzado, L. 1997. Caracterización y categorización de los problemas ambientales de la minería en el Perú. p. 13-14. Primer Simposio Nacional de Medio Ambiente y Seguridad Minera, Lima. 9- 12 de junio de 1997. Exposiciones de Medio Ambiente y Minería. Tomo II. Colegio de Ingenieros del Perú, Lima, Perú.
- De Jong, F.M.W., and H.A.U. De Haes. 2001. Development of a field bioassay for the side-effects of herbicides on vascular plants using *Brassica napus* and *Poa annua*. *Environ. Toxicol.* 16:397-407.
- EPA. 1993. Probit analysis program. Version 2. U.S. Environmental Protection Agency (EPA), Washington D.C., USA.
- Iannacone, J., y L. Alvarino. 1999. Ecotoxicidad de metales pesados sobre juveniles del caracol de agua dulce *Physa venustula* Gouldi (Mollusca). *Gayana* 63:101-110.
- Iannacone, J., L. Alvarino, C. Caballero, y J. Sánchez. 2000. Cuatro ensayos ecotoxicológicos para evaluar lindano y clorpirifos. *Gayana* 64:139-146.
- Iannacone, J., y A. Gutiérrez. 1999. Ecotoxicidad de los agroquímicos lindano y clorpirifos sobre el nemátodo *Panagrellus*, la microalga *Chlorella* y el ensayo con *Allium*. *Agric. Téc. (Chile)* 59:85-95.
- Lerda, D. 1992. The effect of lead on *Allium cepa* L. *Mutat. Res.* 281:89-92.
- Lewis, M.A. 1995. Use of freshwater plants for phytotoxicity testing: a review. *Environ. Pollut.* 87:319-336.
- Liu, D., L. Zhai, W. Jiang, and W. Wang. 1995. Effects of Mg^{2+} , Co^{2+} , and Hg^{2+} on the nucleus and nucleolus in the root tip cells of *Allium cepa*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 55:779-787.
- Norman, G.R., y D.L. Streiner. 1996. Bioestadística. 260 p. Ed. Mosby/Doyma Libros, México.
- Pal, R., and S. Nandi. 1990. Cytological abnormalities induced by mercury water pollutants on *Allium cepa*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 45:767-774.
- Rosa, C.E.V., M. Sierra, and C.M. Radetski. 1999. Use of plant tests in the evaluation of textile effluent toxicity. *Ecotoxicol. Environ. Res.* 2:56-61.
- Shanker, K., S. Mishra, S. Srivastava, R. Srivastava, S. Dass, S. Prakash, and M.M. Srivastava. 1996. Study of mercury-selenium (Hg-Se) interactions and their impact on Hg uptake by the radish (*Raphanus sativus*) plant. *Food Chem. Toxicol.* 34:883-886.
- Walsh, G.E., D.E. Weber, T.L. Simon, and L.K. Brashers. 1991. Toxicity test of effluents with marsh plants in water and sediments. *Environ. Toxicol. Chem.* 10:517.
- Wang, W. 1991. Literature review on higher plants for toxicity testing. *Water Air Soil Pollut.* 59:381-400.
- Zar, J.H. 1996. Biostatistical analysis. 662 p. 3rd ed. Prentice-Hall, New Jersey, USA.