



## PROGRAMA DE INVESTIGACION EN ECOTOXICOLOGIA



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BASICAS

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LUJAN

# Evaluación de la ecotoxicidad de una muestra líquida (lixiviado) protocolo Q360936 sobre “cebolla” *Allium cepa*

Profesionales Participantes:

Dra. María Elena SAENZ  
Dr. Walter DI MARZIO

Empresa Consultante: INDUSER Grupo Induser SRL

**Diciembre 2022**

## **INDICE**

	Página
Introducción	4
Ensayos de ecotoxicidad utilizando <i>Allium cepa</i> (“cebolla”)	5
Conclusiones	12
Bibliografía	13

## INTRODUCCION

Según el Plan de Trabajo acordado entre el Organismo Consultante, INDUSER Grupo Induser SRL y el PROGRAMA DE INVESTIGACION EN ECOTOXICOLOGIA (en adelante PRIET), Departamento de Ciencias Básicas, Universidad Nacional de Luján en el presente *Informe* se reportan los resultados alcanzados en la evaluación de la ecotoxicidad de una muestra líquida (lixiviado) suministrada por Induser SRL. La misma arribó al PRIET en adecuadas condiciones de preservación y embalaje.

La muestra recibida estaba rotulada como se indica:

### **Protocolo N° Q360936**

Se realizaron ensayos con *Allium cepa* (cebolla), siguiendo los procedimientos descriptos por la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos, US EPA.

De esta manera, los ensayos de ecotoxicidad utilizando como organismo de prueba *Allium cepa* se realizaron de acuerdo con los procedimientos descriptos en los procedimientos armonizados de US EPA (1996).

El ensayo de ecotoxicidad implica la exposición de un número representativo de ejemplares de la especie de prueba seleccionada a la muestra a evaluar en condiciones controladas de laboratorio. La duración de la exposición es una variable que depende de la condición aguda o crónica del ensayo y del ciclo de vida del organismo expuesto. Los ensayos de ecotoxicidad permiten evaluar los efectos de una exposición puntual a la muestra problema, durante un corto período de tiempo con relación al ciclo de la vida de la población de prueba (entre 24 hs y pocos días). En el caso de *Allium cepa* este período es de 3 a 5 días.

## **ENSAYOS DE ECOTOXICIDAD AGUDA UTILIZANDO *Allium cepa* (CEBOLLA) COMO ORGANISMO DE PRUEBA**

Se llevaron a cabo pruebas de ecotoxicidad utilizando un organismo terrestre considerado como un estándar internacional de ecotoxicidad, *Allium cepa* (cebolla) sobre la muestra recibida rotulada como:

### **Protocolo N° Q360936**

*Allium cepa* es una Angiosperma (plantas con flores, eucotiledónea), perteneciente al Orden *Asparagales*, Familia *Amaryllidaceae*. Posee  $2n = 16$  cromosomas de gran tamaño, con una morfología muy definida de sus cromátidas y posición de su centrómero. Es una especie herbácea bienal, que resiste al frío, aunque necesita temperaturas altas y fotoperíodos largos para formar sus bulbos. Es medianamente tolerable a la salinidad y poco tolerante a la acidez. Presenta un sistema radical profuso, superficial (90% en los primeros 20 cm de suelo), casi en su totalidad adventicio (no se originan de la radícula del embrión sino en cualquier otro lugar de la planta) de raíces finas (0,5 a 2mm de espesor) y con pocas ramificaciones secundarias, desprovistas de pelos radicales. Estas raíces surgen a partir de un tallo abreviado o disco (disco caulinar) que presenta nudos y entrenudos muy juntos. Desde allí también salen las hojas que forman gran parte del bulbo, por engrosamiento de la base de las mismas, que se ubican en forma superpuesta, determinando el tipo de bulbo tunicado. El bulbo presenta cinco partes fundamentales: *Disco basal*: es la parte inferior del bulbo desde donde crecen las raíces; *catáfils*: son el órgano de almacenamiento principal, ya que es sus parénquimas se acumulan nutrientes; *túnica*: capa que rodea a las hojas y las protege de la desecación, membranosa que puede ser de color blanco, amarillo violáceo; *vástago*: consiste en una yema floral; *yemas laterales*: las que darán origen a nuevos bulbos.

La parte terminal de las hojas es la parte verde de la planta que forman la parte aérea y activa de la planta. Presentan los márgenes foliares soldados dando apariencia de hoja hueca. Las hojas se disponen de forma alterna.

El ciclo vegetativo de esta especie consta de cuatro fases:

-Fase de crecimiento herbáceo: en esta fase se desarrolla ampliamente el sistema radicular y la parte aérea.

-Fase de formación de bulbos: es la fase en la que cesa el crecimiento de la parte aérea y comienza la movilización de reservas que se van a acumular en el bulbo. Este proceso se denomina bulbificación y sucede con un aumento del fotoperíodo, acompañado por un ascenso de la temperatura.

-Fase de reposo vegetativo: la planta entra en un período de latencia y no se desarrolla.

-Fase de reproducción sexual: las reservas del bulbo son movilizadas y se desarrolla el escapo floral que alcanza alrededor de 1 metro de altura, hueco en su interior y abombado en su parte basal. Este escapo culmina en un capuchón formado por tres brácteas que, en el momento de la floración, se abren dejando al descubierto la inflorescencia, que es tipo umbeliforme y redondeada. Las flores son homoclamídeas blanco-verdoso, formadas por dos ciclos de tépalos, seis estambres y un gineceo tricarpelar. La apertura floral es irregular y puede prolongarse por más de dos semanas. La floración de una umbela puede durar desde tres a cinco semanas. En una misma umbela pueden encontrarse flores con distinto grado de desarrollo. La polinización es entomófila. Entre la aparición de la inflorescencia y la maduración de las semillas pasan alrededor de diez semanas. La infrutescencia tiene forma trilocular. El fruto es de tipo cápsula, conteniendo semillas pequeñas de color negro que presentan una cara plana y la otra convexa. Las semillas pierden por completo la capacidad germinativa durante el segundo año.

Diferentes asociaciones internacionales para la protección del ambiente han desarrollado protocolos utilizando una batería de organismos de importancia ecológica y económica con el fin de evaluar la ecotoxicidad asociada a diferentes tipos de residuos. *Allium cepa* es una de las especies recomendada por U.S. Environmental Protection Agency (U.S.EPA).

Los ensayos de ecotoxicidad fueron realizados siguiendo el protocolo armonizado recomendado por la OPPTS (Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substance), Ecological Effects Test Guidelines U.S. EPA (1996).

## **Objetivo de los ensayos**

El objetivo de los ensayos ecotoxicológicos con *Allium cepa* consiste en determinar los efectos de la muestra analizada, sobre la germinación (definida como la reanudación de activo crecimiento de las raíces, de manera que alcancen una longitud mínima de 5 mm para ser considerada como germinada) y la elongación de las raíces de bulbos de esta especie, incubados en condiciones controladas de laboratorio por un período de 3 a 5 días (US EPA 1996). Para este fin, los bulbos son rehidratados para estimular el crecimiento de las células meristemáticas, lo cual permitirá la elongación de las raíces de la planta. Cuando esta hidratación se lleva a cabo en presencia de medios líquidos que contienen sustancias tóxicas, la división celular de los meristemas radiculares puede resultar inhibida, el proceso de mitosis ser retardado o las células meristemáticas pueden ser destruídas. Este tipo de alteraciones impide el crecimiento normal de las raíces de los bulbos y se traduce en falta de germinación o afecta la normal elongación de las raíces.

De esta manera el efecto de una muestra líquida puede determinarse mediante la comparación de la germinación y la elongación de las raíces de bulbos de *Allium cepa* expuestas a la misma, con bulbos no expuestos, luego de un período de 72 horas de exposición. La cuantificación del efecto se realiza estableciendo el porcentaje de inhibición de germinación y de crecimiento de las raíces respecto a la germinación y longitud promedio de las raíces del control.

## **Preparación del ensayo**

Se utilizaron recipientes de vidrio de tamaño adecuados para colocar los bulbos de *Allium cepa* de manera que queden suspendidos con el disco caulinar sumergido en la solución líquida y de una profundidad tal que, al término de la prueba, la elongación máxima de las raíces no alcance el fondo del recipiente.

Se utilizaron materiales como bisturí y regla para limpieza y mediciones de las raíces. Para la realización de los ensayos se seleccionaron bulbos de *Allium cepa* de 4 cm de diámetro aproximadamente, sanos, secos y sin formación de hojas o raíces. Estos bulbos se obtuvieron de fuentes comerciales en el mercado local.

En la preparación del ensayo se realizó el acondicionamiento de los bulbos realizando una cuidadosa limpieza con la ayuda de un bisturí, de manera de eliminar los restos de epidermis

seca, restos de tejido y raíces del área radicular. Se tuvo especial cuidado en no dañar los meristemas ubicados en el disco caulinar. Durante este proceso los bulbos se colocaron en agua para proteger los meristemas de la desecación. Con el fin de eliminar todos los restos de tejidos derivados de esta limpieza se lavaron los bulbos con agua Milli-Q y se dejaron secar por dos horas, apoyados sobre una hoja de papel. Se mantuvieron aquí hasta su colocación en los recipientes de vidrio.

### **Condiciones de incubación**

Los recipientes así preparados se colocaron en una cámara de cultivo bajo condiciones controladas, realizando la incubación a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  de temperatura sin iluminación directa durante 72 horas de exposición. Diariamente se controló el volumen de los recipientes tratados y controles para observar pérdida de volumen por evaporación o absorción. Se realizó la reposición del mismo, ya sea con la muestra o con el agua utilizada en los controles, con la ayuda de una pipeta de Pasteur (US EPA 1996)

### **Finalización del ensayo**

Una vez finalizado el tiempo de exposición del ensayo, se cuantificaron los bulbos germinados en los recipientes conteniendo la muestra a evaluar y controles y la elongación de las raíces. Se consideró como bulbo germinado, aquel que reanudó el activo crecimiento de las raíces, de manera que alcancen una longitud mínima de 5 mm. Se realizó la medición de la longitud promedio de las raíces con la ayuda de una regla. Se realizó la estimación en cada recipiente con la muestra y los controles y se calculó el promedio de las 10 réplicas.

A partir de la determinación del número de bulbos germinados y la elongación de las raíces de los mismos, en la muestra a evaluar y los controles, se determinó el porcentaje de efecto para el 100% de la muestra.

Para estimar el porcentaje de Inhibición de la germinación (% Inh G) se realizó el siguiente cálculo:

**% Inh G** = (Número de bulbos germinados en los controles – número de bulbos germinados en la muestra) x 100/ Número de bulbos germinados en los controles



Para estimar el porcentaje de efecto inhibitorio sobre la elongación de raíz (% Inh ER) se realizó el siguiente cálculo:

**% Inh ER** = (longitud promedio de la raíz del control – longitud promedio de la raíz de la muestra) x 100/ longitud promedio de la raíz del control

A continuación, se detalla el procedimiento estandarizado para los ensayos de ecotoxicidad con la muestra evaluada sobre la especie indicada.

RESUMEN DE LAS CONDICIONES DE ENSAYO Y LOS CRITERIOS DE  
ACEPTABILIDAD PARA LOS ENSAYOS DE GERMINACIÓN Y ELONGACIÓN DE  
RAÍZ CON *Allium cepa*

1. Tipo de ensayo: Estático
2. Duración del ensayo: 72 horas
3. Temperatura:  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .
4. Iluminación: indirecta
5. Tipo de luz: blanco frío
6. Recipientes de prueba: tamaño adecuado en cuanto a profundidad y diámetro
7. Material biológico: bulbos de cebolla de 4 cm de diámetro
8. Condición de los bulbos: limpiar y pelar los bulbos. Evita daño en el disco caulinar
9. Número de réplicas: 10
10. Efecto medido: inhibición de la germinación. Inhibición de la elongación de raíz.
11. Criterio de aceptación del ensayo: 65% de germinación y desarrollo de raíces de por lo menos 2 cm de longitud, en grupos control, requisitos que se cumplieron a las 72 horas de iniciado la exposición.

## RESULTADOS

### Protocolo N° Q360936

En la **Tabla 1** se presentan los resultados obtenidos de los ensayos de germinación y elongación de raíces de bulbos de *Allium cepa* realizados con la muestra denominada **Protocolo N° Q360936**.

**Tabla 1.** Efecto sobre la germinación y crecimiento de raíces (elongación) observados sobre bulbos de *Allium cepa* (cebolla) al cabo de 72 horas de exposición a la muestra **Protocolo N° Q360936**. \*media y desvío estándar.

Dilución %	Bulbos germinados	Inhibición germinación (%)	Elongación de raíces (cm)*	Inhibición elongación de raíces (%)
0 (Control)	10	-	2,17 (0,89)	-
100	10	0	2,14** (0,80)	-

\*\*Diferencia no significativa a  $p = 0.782$  t-Test

## **Conclusiones**

La muestra líquida (lixiviado) protocolo Q360936, al 100%, resultó **NO Ecotóxica** sobre la germinación y elongación de las raíces de *Allium cepa* en términos de la Resolución (OPDS) 4173/16 AIII.

## BIBLIOGRAFÍA

APHA-AWWA-WPCF. 1998. Franson. M. (Ed.). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 18th ed. American Public Association. American Water Works Association. Water Environment Federation. Washington. DC.

U.S. Environmental Protection Agency (EPA). 1996. Ecological Effects Test Guidelines, OPPTS 850.4200, Seed Germination / Root Elongation Toxicity Test, EPA 712-C-96-154.



Prof. Dr. WD Di Marzio  
Inv. Ind. CONICET - Director PRIET  
DCB UNLU

[ecotoxicologia@aae.org.ar](mailto:ecotoxicologia@aae.org.ar) [wdimarzio@conicet.gov.ar](mailto:wdimarzio@conicet.gov.ar)  
[www.priet.unlu.edu.ar](http://www.priet.unlu.edu.ar) [www.aae.org.ar](http://www.aae.org.ar)