

**Trabajo presentado en:** XII JORNADAS DE JÓVENES INVESTIGADORES DE LA AUGM. Universidade Federal do Paraná. Brasil. 1 y 2 de septiembre de 2004. Resúmenes p. 56

**UNIVERSIDAD:** Universidad Nacional de Entre Ríos.

**NÚCLEO DISCIPLINAR/COMITÉ ACADEMICO:** Ingeniería Agrícola

**TITULO DEL TRABAJO:** Ensayo exploratorio de la prueba de crecimiento de las raíces de cebolla para detectar salinidad y herbicidas en agua

**AUTORA:** Alicia Florencia Urteaga Omar

**E-MAIL DE LA AUTORA:** [afuomar@arnet.com.ar](mailto:afuomar@arnet.com.ar)

**PALABRAS CLAVES:** Allium test, prueba de ecotoxicidad

**Profesor Consejero:** Ing. Agr. Víctor H. Lallana

## RESUMEN:

Objetivo: Disponer de pruebas rápidas y sencillas para determinar los potenciales contaminantes del agua constituye una ventaja estratégica. Se efectuaron dos ensayos con la técnica del Allium test con el propósito de verificar sus bondades para monitoreos mediambientales. Método: Bulbos de Allium cepa fueron sometidos a crecimiento durante 72 horas en soluciones salinas de ClK (primer ensayo) y diluciones de un herbicida comercial (segundo ensayo). Resultados: Pruebas de diferencia de medias indicaron que concentraciones salinas bajas (entre 1,0 y 2,5 dS/m) no resultan potencialmente contaminantes, mientras que altas concentraciones (entre 4,5 y 6,67 dS/m) inhiben el crecimiento radicular, siendo el EC50 de 0.865 g i.a. En el caso del ensayo con herbicidas, se observaron significativas inhibiciones del crecimiento radicular a medida que aumentó la cantidad de ingrediente activo en el medio de crecimiento. Conclusión: El bioensayo demuestra su aptitud para la detección de sustancias potencialmente contaminantes disueltas en agua.

**Palabras clave:** Allium test, prueba de ecotoxicidad.

## INTRODUCCIÓN

El aumento sustantivo del uso de agroquímicos, en consonancia con la creciente actividad agrícola que se viene registrando en extensas zonas de la Argentina, está demandando estudios sistemáticos para detectar potenciales contaminantes en el agua, suelo y aire. Disponer de información rápida y confiable acerca de la calidad del agua tanto para riego como para consumo animal y humano, constituye una ventaja estratégica para la implementación de medidas preventivas y/o correctivas. Por lo general, las técnicas tradicionales de monitoreos medioambientales requieren equipamiento, tiempo y dinero, que no siempre están disponibles. De allí que la tendencia actual, especialmente en los países menos desarrollados, se orienta al empleo de bioensayos sencillos para cubrir estas necesidades.

En este sentido, el Allium test (Fiskesjö, 1988, 1993), por la mayor sensibilidad a la presencia de contaminantes demostrada por las plantas vasculares, es uno de los bioensayos que está recibiendo atención preferencial por parte de los especialistas. El Allium test es un bioensayo que permite determinar el grado de toxicidad de diferentes contaminantes, a partir de la observación del crecimiento del ápice radical de la cebolla (*Allium cepa*).

El objetivo del presente estudio es la puesta a punto de la técnica del Allium test mediante dos ensayos, uno con salinidad y otro con solución de herbicida. El presente estudio está enmarcado en una investigación orientada a la determinación de la toxicidad de efluentes agroindustriales de la zona de Paraná (Entre Ríos, Argentina).

## MATERIALES Y METODO

### Ensayo 1: Salinidad

Se seleccionaron 15 bulbos de Allium cepa (de 1,5 cm de diámetro aproximado), a los cuales se les extrajo las catáfilas externas, cuidando de no dañar el ápice radicular. Se prepararon 5 medios de crecimiento: 1 testigo con agua destilada y 4 concentraciones salinas de ClK de 1,0; 2,0; 4,5 y 6,67 dS/m, respectivamente. Se asignaron 3 bulbos a cada tratamiento, acondicionados individualmente en frascos de vidrio con una capacidad de 370 cc y un diámetro de 6,5 cm. Las cebollas peladas fueron colocadas sobre un triangulo de madera balsa colocado sobre la superficie del frasco de vidrio. Este dispositivo regulable puede ajustarse de acuerdo al tamaño de las cebollas. Cada 24 horas y durante tres días consecutivos, se procedió a reponer los faltantes por evaporación en cada frasco, sin someter a las cebollas en crecimiento a ninguna manipulación accesorias. Al cabo de las primeras 72 horas, se retiró una cebolla de cada uno de los tratamientos (incluyendo el testigo) y se procedió a contar el número de raicillas emergidas y a medirlas con una regla común. Para efectuar la medición de la longitud radical, se cortó cada raicilla con la ayuda de un bisturí y se la ubicó sobre una superficie limpia y plana.

Al cabo de 96 horas (4° día), se procedió a reemplazar en una cebolla (de las dos restantes en cada tratamiento) las concentraciones de prueba, por agua destilada con el propósito de determinar la reversibilidad sobre el crecimiento radical de las cebollas sometidas a los diferentes tratamientos. La cebolla restante continuó su crecimiento en la concentración salina correspondiente. Las dos cebollas del grupo testigo no fueron objeto de ninguna alteración en el tratamiento (se siguió con agua destilada). Al cabo de 120 horas (5° día), se procedió a medir la longitud radicular de la totalidad de las cebollas.

### Ensayo 2: Herbicida

Se repitió el bionsejo en idénticas condiciones a las descritas en el primer ensayo, sólo que en lugar de usar concentraciones salinas se emplearon 4 diluciones de un herbicida comercial

(Tordón D30) como medio de crecimiento, con 3 repeticiones. Se prepararon diluciones de 0,001; 0,0025; 0,005 y 0,05 l/ha, a partir de una dilución inicial de 3 l/ha. En esta oportunidad no se determinó la reversibilidad, por lo que al cabo de las primeras 72 horas se efectuó el conteo del número de raíces emergidas y la medición del crecimiento radicular correspondiente.

## RESULTADOS

En primer lugar, se calcularon índices descriptivos (medias y desviaciones estándar) de la longitud radical de las raíces emergidas por cada tratamiento y, posteriormente, se calcularon las correspondientes pruebas de diferencia de medias (“t” de Student), a efectos de determinar si las diferencias numéricas observadas, eran estadísticamente significativas.

### Ensayo 1: Salinidad

Tabla 1: Número, longitud media y desvío estándar de raíces de cebolla a las 72 horas, sometidas a diferentes concentraciones salinas.

	Tratamientos				
	Agua destilada	Concentraciones salinas (dS/m)			
	Testigo	1,0	2,5	4,5	6,67
Nº de raíces	56	43	56	51	40
Media	1,7375	1,03023256	0,88214286	0,64117647	0,525
Desviación estándar	(0,5703)	(0,4131)	(0,2232)	(0,1525)	(0,1391)

Tabla 2: Pruebas de diferencia de medias (“t” de Student) de la longitud radicular, en función del medio de crecimiento

	Medio de crecimiento (dS/m)				
	0	1,0	2,5	4,5	6,67
0	----	6.862** (97)	10.451** (110)	13.296** (105)	13.150** (94)
1,0		----	2.285* (97)	6.244** (92)	7.353** (81)
2,5			----	6.455** (105)	8.944** (94)
4,5				----	3.746** (89)
6,67					----

\*\* p < 0.01; \* p < 0.05

Entre paréntesis grados de libertad (N<sub>1</sub> + N<sub>2</sub> - 2)

Los resultados de este primer ensayo indican que: a) el mayor crecimiento radical se registró en los bulbos asignados al tratamiento testigo (agua destilada); b) a medida que aumentó la

concentración salina del medio de crecimiento, aumentaron las diferencias de crecimiento con respecto al grupo testigo; c) en las concentraciones intermedias (2,5 y 4,5 dS/m), se registró un número de raíces similar al grupo testigo, pero la longitud radicular fue estadísticamente menor (Tabla 2); d) la mayor heterogeneidad en el crecimiento radicular se observó en el tratamiento testigo; la dispersión fue disminuyendo en función del aumento de las concentraciones salinas (Tabla 1); siendo las mayores concentraciones las que presentaron la mayor homogeneidad (escaso crecimiento en la casi totalidad de las raíces).

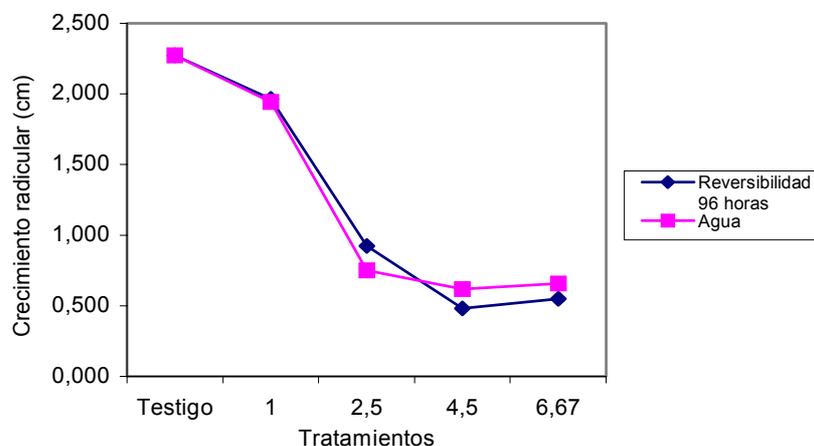
### Verificación de la reversibilidad

La Tabla 3 presenta las pruebas de diferencias de medias del crecimiento radical observado a las 96 horas, entre la cebolla que siguió su crecimiento en las concentraciones de los tratamientos y la otra cebolla que pasó a crecer en agua destilada.

Tabla 3: Pruebas de diferencia de medias del crecimiento radicular observado al quinto día, correspondientes a las cebollas que continuaron con el tratamiento inicial y a las cebollas a las que se les reemplazó el líquido de los tratamientos originales por agua destilada.

Tratamiento	N raíces	Media	Desv. Típica	"t"	g.l.	P
1,0 (continuación)	57	1,967	0,571	0,075	119	n.s.
1,0 (cambio por agua)	64	1,959	0,647			
2,5 (continuación)	26	0,923	0,196	2,063	59	0,044
2,5 (cambio por agua)	35	0,751	0,388			
4,5 (continuación)	17	0,482	0,159	-2,530	43	0,015
4,5 (cambio por agua)	28	0,618	0,183			
6,67 (continuación)	41	0,578	0,240	-1,860	79	0,067
6,67 (cambio por agua)	40	0,658	0,128			

Figura 1: Valores promedios del crecimiento radicular de cebollas a las 96 horas, en función del medio de crecimiento, luego del tratamiento de reversibilidad comparada con el testigo.



Los datos de la Tabla 3 y la Figura 1 indican que: a) no se produjeron diferencias significativas en la longitud radical de la cebolla que siguió creciendo en una concentración salina de 1,0 dS/m y su compañera que pasó a desarrollarse en agua destilada, igual situación ocurrió con la concentración de 6,67 dS/m; b) se constató diferencias estadísticamente significativas en la solución salina de 2,5 y 4,5 dS/m.

### Ensayo 2: Herbicidas

En la Tabla 4 se presentan los resultados correspondientes al segundo ensayo, con distintas dosis de herbicida.

Tabla 4: Número, longitud media y desvío estandar de raíces de cebolla a las 72 horas, sometidas a diferentes dosis de herbicidas

Tipo de tratamiento	Ingr. Activo	Crecimiento radicular de los bulbos		
		Nº de raíces	Media	Desvío estándar
Testigo	0	80	3,021	1,055
Herbicida 0,001	0.3041	72	0,190	0,074
Herbicida 0,0025	0.76025	50	0,126	0,052
Herbicida 0,005	1.5205	42	0,071	0,025
Herbicida 0,05	15.205	35	0,026	0,019

Tabla 5: Prueba de diferencia de medias (“t” de Student) de la longitud radical, en función del medio de crecimiento

	Medio de crecimiento				
	Testigo	0,001	0,0025	0,005	0,05
Testigo	----	22.706** (150)	19.357** (128)	18.077** (120)	16.749** (113)
0,001		----	5.282** (120)	10.069** (112)	12.890** (105)
0,0025			----	6.147** (90)	10.686** (83)
0,005				----	8.687** (75)
0,05					----

\*\*  $p < 0.0001$

Entre paréntesis grados de libertad ( $N_1 + N_2 - 2$ )

Los resultados de este segundo ensayo (tabla 4 y 5) permiten comprobar que: a) a medida que aumenta la dosis del principio activo en la dilución, disminuye el número de raíces y la longitud radical (Tabla 4); b) el crecimiento radical del grupo testigo fue más heterogéneo (la longitud de las

raíces varió entre 0,40 y 5,10 cm) que el de los tratamientos (la longitud de raíces varió entre 0,01 y 0,30 cm); c) las diferencias en longitud radical entre el grupo testigo y los restantes grupos experimentales (Tabla 5) fueron todas altamente significativas ( $p < 0.001$ ).

## DISCUSIÓN

Las diferencias vegetativas observadas en el primer ensayo, demuestran la sensibilidad de los bulbos de *Allium cepa* frente a diferentes concentraciones salinas. La concentración efectiva donde el crecimiento radicular alcanzó el 50% del testigo (CE50) fue de 0.865 g ia. De acuerdo a los resultados obtenidos, pareciera que concentraciones salinas bajas (entre 1,0 y 2,5 dS/m) no resultan potencialmente contaminantes, mientras que altas concentraciones salinas (entre 4,5 y 6,67 dS/m) generarían cierto stress salino que se traduciría en una mayor inhibición del crecimiento radicular. Observaciones que quedan corroboradas a partir de los resultados obtenidos mediante la verificación de la reversibilidad de potenciales efectos contaminantes. En este sentido, resulta particularmente ilustrativa la recuperación del crecimiento radicular de los bulbos cuando se reemplaza un medio de crecimiento altamente salino por agua destilada.

Así mismo, los bulbos de *Allium cepa* demuestran su especial sensibilidad para reaccionar ante sustancias químicas potencialmente tóxicas, como es el caso de las diluciones de herbicida empleadas en el segundo ensayo. En este caso, y a medida que el medio de crecimiento contenía mayor cantidad de ingrediente activo, se observó tanto una disminución del número de raíces emergidas, como una marcada inhibición del crecimiento radical. Además, y como dato ilustrativo, se señala que las diluciones potencialmente más contaminantes (0.005 y 0.05) causaron efectos casi letales sobre los bulbos de cebolla.

En resumen, se puede concluir que el *Allium test* es un bioensayo idóneo para pruebas de ecotoxicidad y que además resulta un método rápido, sencillo y económico. En el caso de la prueba con herbicidas, la sensibilidad es muy alta y deberían ensayarse otras dosis a fin de poder establecer los CE50.

## 6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Fiskesjö, G. (1988). 2,4-Dichlorophenol and MCPA in a V79 test. *Alternatives to Laboratory Animals* 15, 245-250.
- Fiskesjö, G. (1993). Allium Test I: A 2-3 day plant test for toxicity assessment by Measuring the Mean Root Growth of Onions (*Allium cepa* L.). *Environmental Toxicology and Water Quality: An International Journal*, 8: 461-470.
- Fiskesjö, G.; Dutka, B. et al. (1996). Toxicological monitoring of drinking waters in developing countries. In *Proceedings of WaterTox Workshop*, Ottawa.