



***Programa de Investigación en Ecotoxicología***

***Departamento de Ciencias Básicas***

***Universidad Nacional de Luján***

# Evaluación de la ecotoxicidad de una muestra de lixiviado sobre la lechuga común *Lactuca sativa*

## INFORME DE RESULTADOS

### ***Profesionales Participantes:***

Dra. María Elena SAENZ

Dr. Walter D. DI MARZIO

***Organismo Consultante:*** INDUSER Grupo Induser SRL

05 / 04 / 2022

## INDICE

	Página
Introducción	4
Ensayos de ecotoxicidad aguda utilizando <i>Lactuca sativa</i> como organismo de prueba	5
Conclusiones	10
Referencias y Bibliografía	11

## INTRODUCCIÓN

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 de 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 Q 343252 Barro de planta de lavado, muestra líquida lixiviado

Se realizaron ensayos con *Lactuca sativa* (lechuga común), siguiendo los procedimientos descritos por la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos, US EPA: "Lectuce Seed Germination/Root elongation Toxicity Test" (OPPTS 850.42001996, Res. Anexo 4173/16/III).

El ensayo de ecotoxicidad implica la exposición de un número representativo de ejemplares de la especie de prueba seleccionada, a una serie de concentraciones/diluciones crecientes de la muestra a ser evaluada, en condiciones controladas del medio de cultivo, fotoperíodo y temperatura. 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 al tóxico o muestra problema, durante un corto período de tiempo en relación al ciclo de la vida de la población de prueba (entre 24 hs y pocos días). En el caso de *Lactuca sativa* este período es de 5 días, o 120 horas.

## **ENSAYOS DE ECOTOXICIDAD AGUDA UTILIZANDO *Lactuca sativa* (LECHUGA) COMO ORGANISMO DE PRUEBA**

Se llevaron a cabo ensayos de ecotoxicidad utilizando un organismo terrestre considerado como un estándar internacional de ecotoxicidad, *Lactuca sativa* (lechuga) sobre la muestra recibida rotulada como: Protocolo Q 343252 Barro de planta de lavado, muestra líquida lixiviado.

*Lactuca sativa* es una Angiosperma (plantas con flores, eucotiledónea), perteneciente al Orden *Asterales*, Familia *Asteraceae* / *Compositae* y a la Tribu *Lactuceae*. Posee  $2n = 18$  cromosomas y es una hortaliza anual. Su sistema radicular presenta una raíz primaria pivotante, y raíces secundarias extendidas lateralmente, lo que resulta en un sistema más bien superficial.

El sistema caulinar se desarrolla en dos fases: una vegetativa y otra reproductiva. En la fase inicial o vegetativa, la planta presenta un tallo comprimido en el cual se ubican las hojas muy próximas entre sí, generando el hábito de roseta típico de la familia. La disposición de las hojas es variable; en algunas formas las hojas se mantienen desplegadas y abiertas, y en otras, en cierto momento del desarrollo, las hojas forman una cabeza o cogollo más o menos consistente y apretado. Las hojas son grandes, simples, sésiles, brillantes, de forma redondeada, oblonga u ovalada, de superficie lisa a ondulada, de color verde, pasando por el amarillo hasta el rojo. Las hojas poseen un margen irregularmente sinuoso, recortado, crespo o denticulado.

La fase reproductiva no requiere vernalización y se acelera con la existencia de temperaturas altas y días largos, a pesar de que la mayoría de los cultivares modernos son de fotoperíodo neutro. Esta fase se manifiesta inicialmente con la elongación del tallo, concurrente con el desarme de la cabeza de hojas en las variedades que la forman, y su posterior ramificación, floración y fructificación.

El tallo floral permite diferenciar hojas abrazadoras, sagitadas, auriculadas y progresivamente más pequeñas hacia su extremo distal, en el que produce un capítulo terminal y una serie de ramas con muchos capítulos pequeños agrupados en panículas o corimbos. Cada capítulo se compone de un involucre de brácteas herbáceas, erectas y sobrelapadas, rodeando un número de 10 a 20 flores perfectas, liguladas, de corola color amarillo o blanco amarillento. Después de la autofecundación, se forman frutos secos, indehiscentes y uniseminados llamados aquenios. Estos presentan una forma comprimida, aguda, de 2 a 3 mm de largo; pueden ser blancos o negros, y son conocidos en términos prácticos como la "semilla" de la especie.

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. *Lactuca sativa* es una de las especies recomendada por U.S. Environmental Protection Agency (U.S.EPA) y por otras

organizaciones tales como International Standards Organization (ISO) y Organization for Economic Cooperation and Development (OECD).

Los ensayos de ecotoxicidad fueron realizados siguiendo el protocolo recomendado por U.S. EPA (1996) y U.S. EPA (1989). El protocolo ha sido armonizado con los correspondientes a ISO (1986) y OECD (1984).

### **Objetivo de los ensayos**

El objetivo de los ensayos ecotoxicológicos con *Lactuca sativa* consiste en determinar los efectos de la muestra analizada, sobre la germinación y la elongación de la raíz de semillas de esta especie, en ensayos estáticos de 120 horas de duración (US EPA 1989; US EPA 1996). Para este fin, las semillas son incubadas sobre un sustrato inerte utilizando la muestra líquida para hidratar el mismo, en condiciones controladas de laboratorio por un período de 120 horas. Al cabo de este tiempo de exposición se analiza el porcentaje de germinación exitosa de las semillas y se determina la longitud de las raíces.

### **Preparación y comienzo del ensayo**

El soporte inerte de los controles y los tratamientos consistió en arena comercial, secada a 105 °C en estufa durante 24 h, y tamizada a 2 mm antes de su utilización. Se colocaron las semillas de lechuga en placas Petri de vidrio de 10 cm de diámetro conteniendo el sustrato inerte. La distribución de las semillas sobre el sustrato se realizó de manera de dejar 1 cm de separación entre las semillas y los bordes de la cápsula. La hidratación de las semillas se realizó con las diferentes diluciones de la muestra, como recomendado por los protocolos mencionados. Los controles consistieron en la misma cantidad de semillas colocadas en las placas sobre el sustrato inerte pero hidratadas con agua deionizada. Tanto las diluciones de la muestra evaluada como los controles se prepararon por triplicado. Las placas con el sustrato y las semillas fueron colocadas individualmente en bolsas de poliuretano y cerradas para generar una cámara húmeda que mantenga las condiciones de humedad durante el período de exposición. Las placas fueron colocadas en una cámara de cultivo bajo condiciones controladas, realizando la incubación durante las primeras 48 horas en oscuridad y luego con un fotoperíodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad con una intensidad lumínica de  $4300 \pm 430$  lux hasta culminar las 72 horas de exposición. La temperatura se mantuvo constante a  $24 \pm 2^\circ\text{C}$  durante las 120 h de exposición.

### **Finalización del ensayo**

Una vez finalizado el tiempo de exposición del ensayo, se cuantificaron las semillas germinadas en las placas tratadas y controles. Se consideró como criterio de germinación la aparición visible

de la radícula por fuera de la cubierta seminal. Para cada dilución, se calculó el porcentaje de las semillas germinadas en relación al total de semillas colocadas al inicio del ensayo. El porcentaje de germinación para cada dilución se utiliza para la estimación del índice de toxicidad CE50-120 horas, definido como la concentración que inhibe la germinación de un 50% de las semillas expuestas. La determinación de la elongación de raíces fue realizada en las semillas germinadas. A partir de la determinación de la elongación de las raíces de las semillas controles y tratadas germinadas se estimó el porcentaje de efecto para cada dilución. Los valores de los porcentajes de inhibición obtenidos se utiliza para la estimación de la CE50-120 h, definida como la concentración que inhibe en un 50% la elongación de las raíces en las semillas expuestas.

### **Análisis estadístico**

En el caso que los resultados lo permitan, la estimación de la CE50 120 horas y sus intervalos de confianza considerando el efecto sobre la germinación y la elongación de las raíces de *L. sativa*, se calculan de acuerdo a los métodos recomendados en US EPA (1996).

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 *L. sativa*

1. Tipo de ensayo: Estático sin renovación.
2. Duración del ensayo: 120 horas
3. Temperatura:  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .
4. Fotoperíodo : 48 hs oscuridad seguidas de 72 hs con 16 hs luz / 8 hs oscuridad
5. Tipo de luz: blanco frío
6. Intensidad de luz:  $4300 \pm 430$  lux
7. Tamaño de la cámara para ensayo: Placas de Petri (100 mm de diámetro).
8. Cantidad de sustrato por cámara: 50 g.
9. Sustrato artificial: arena lavada con granulometría mayor a  $20 \mu\text{m}$ .
10. Renovación del sustrato de ensayo: Sin renovación.
11. Edad de las semillas para ensayo: semillas con menos de 15 días de cosecha, de tamaño y peso similar.
12. Número de semillas por cámara de ensayo: 20
13. Número de réplicas por concentración: 3
14. Número de semillas por concentración/dilución: 60
15. Régimen de alimentación: sin alimentación.
16. Limpieza de cámara de ensayo: No es necesaria.
17. Solvente utilizado para dilución: ninguno
18. Factor de dilución: 0,5%
19. Criterio de aceptación del ensayo: 65% de germinación y desarrollo de raíces de por lo menos 2 cm de longitud, en grupos controles, requisitos que se cumplieron a las 120 horas de iniciada la exposición.



## RESULTADOS

En la **Tabla 1** se presentan los resultados obtenidos de los ensayos germinación y elongación de raíces de semillas de *Lactuca sativa* realizados con la muestra denominada **Protocolo N° Q343252**. Cada resultado representa la media de tres réplicas.

**Tabla 1.** Efecto sobre la germinación y crecimiento de raíces (elongación) observados sobre semillas de *Lactuca sativa* (lechuga) al cabo de 120 horas de exposición a la muestra **Protocolo N° Q343252**.

Dilución %	Semillas germinadas	Inhibición germinación (%)	Elongación de raíces (cm)	Inhibición elongación de raíces (%)
0 (Control)	15	0	2,1	-
3,1	14,6	2,66	2,0	4,76
6,2	13	13,33	1,93	8,09
12,5	14	6,66	1,86	11,43
25	13,3	11,33	1,87	10,95
50	12,6	16,00	1,89	10
100	12,3	<b>18,00</b>	1,84	<b>12,38</b>

Del análisis de la varianza de un factor (ANOVA) se comprueba que las medias de todas las diluciones, tanto para la germinación como la elongación de raíces no son estadísticamente significativas a  $p > 0.05$ .

## **Conclusiones**

La ecotoxicidad del lixiviado estudiado sobre *Lactuca sativa* no resultó ecotóxico sobre la germinación de semillas ni la elongación de las raíces para la muestra al 100% y ninguna de las diluciones ensayadas.

## REFERENCIAS Y 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). 1989, Lettuce Seed Germination/Root Elongation Toxicity Test Methods, Protocols for short-term Toxicity Screening of Hazardous Waste Sites, EPA/600/3-88/029.

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. CONICET - Director PRIET DCB UNLU  
[www.priet.unlu.edu.ar](http://www.priet.unlu.edu.ar) [www.aae.org.ar](http://www.aae.org.ar)