

BIOENSAYOS DE GERMINACION CON SEMILLAS DE RUCULA Y LECHUGA PARA MONITOREO DE CALIDAD DE AGUA*

Natalia M. FOTI, Cristina BILLARD, Víctor H. LALLANA¹

¹PID-UNER 2076. Cátedra Fisiología Vegetal. Facultad de Ciencias Agropecuarias. UNER. C.C. 24 (3100) Paraná, Entre Ríos. Argentina.

RESUMEN

Los objetivos fueron: 1) evaluar la respuesta de la germinación de semillas de rúcula a distintas concentraciones salinas y tipos de sales y 2) comparar la respuesta de semillas de rúcula y lechuga en bioensayos con aguas de distintos orígenes. Se emplearon soluciones de ClNa, ClK, SO₄Na₂ y SO₄K₂ de distinta concentración expresada por su valor de CE (6,67; 4,5; 2,5 y 1,0 dS/m). En un ensayo con agua de pileta de tratamiento de un municipio (M) y de un frigorífico (F) se utilizaron semillas de rúcula y los tratamientos fueron agua al 100 % y diluida al 50 %. En otro ensayo con agua de (F) al 100 %, 66 % y 33 % de dilución se utilizaron semillas de rúcula y lechuga. Todos los ensayos tuvieron un testigo con agua destilada. Se registró el número de semillas germinadas y la longitud radical a las 48 h (rúcula) y 72 h (lechuga). Se calculó un índice de germinación (IG) y se lo expresó como porcentaje respecto al testigo. Se observó una marcada diferencia en los valores de IG en los ensayos con cloruros y sulfatos lo cual indica que la forma en que se suministraron dichos iones influyó en el desarrollo radical. En los tratamientos de los ensayos con agua de (F) sin diluir, el IG se afectó en más del 50 % respecto del testigo. El tratamiento con lechuga no mostró diferencias significativas entre las tres diluciones, mientras que con rúcula se observó una respuesta sensible a las distintas diluciones. Las concentraciones salinas ensayadas con cloruros y sulfatos indicaron que la rúcula es tolerante a condiciones de alta salinidad en las primeras etapas de la germinación y que fue más sensible que la lechuga para monitorear aguas de distintos orígenes.

Palabras clave: *Eruca sativa* Mill.- *Lactuca sativa* L. - prueba biológica - calidad de agua

SUMMARY

Germination bioassay with rocket salad and lettuce seeds to monitor water quality

The objectives of this work were: 1) evaluate the answer of germination of seed of rocket salad using bioassays with different salads concentrations of chloride and sulphate 2) compare answers of seed of rocket salad and lettuce using bioassays with saline solutions and water from different sources. Sodium

*Original recibido (29/04/05)
Original aceptado (27/06/05)

chloride, ClK, SO_4Na_2 and SO_4K_2 solutions in varied concentrations were used expressed by their CE value (6,67; 4,5; 2,5 y 1,0 dS/m). In an assay with water from a township treatment pool and from a meat packing plant rocket salad seeds were used and treatments were water at 100 % and diluted at 50 %. In other assay with meat packing plant water diluted at 100 %; 66 % y 33 %, rocket salad and lettuce seeds were used. All assays had the corresponding distilled water control assay. After 48 hours in the case of rocket salad and 72 hours in lettuce, the number of germinated seeds and root length were recorded. The germination index (GI) was calculated and expressed as a percentage value compared with control treatment. A marked difference was noted in GI values in chloride and sulphate assays indicating that the way ions were administered had an influence on root development. In treatments of meat packing plant undiluted water assays, GI was 50 % more affected as compared with control treatment. Lettuce treatment did not show significant differences considering the three dilutions while rocket salad treatment showed a sensitive answer to the different dilutions. Saline concentrations in chloride and sulphate assays showed that rocket salad is tolerant to high salinity conditions in the first stage of germination and that has higher sensitivity than lettuce to monitor water from different sources.

Key words: *Eruca sativa* Mill.- *Lactuca sativa* L.- biological test - water quality

Introducción

Los bioensayos o pruebas biológicas son herramientas útiles para detectar la toxicidad de diversos compuestos (González *et al.*, 2003). Consisten en métodos rápidos, de escasos requerimientos instrumentales que cuantifican respuestas biológicas en las etapas iniciales del desarrollo vegetal (Ortega *et al.*, 2000). Las pruebas de ecotoxicidad utilizan organismos vivos y procesos biológicos con el objeto de mensurar los efectos a corto y largo plazo de la exposición a sustancias químicas (Ríos y Nudelman, 2000).

La reducción del porcentaje de germinación y/o inhibición del desarrollo radical de semillas recién germinadas, son las respuestas biológicas consideradas en bioensayos de germinación (González *et al.*, 2003; Torres Rodríguez, 2003). En las pruebas de fitotoxicidad se cuantifica la variación en presencia de distintas concentraciones del contaminante de algún objetivo de valoración previamente

determinado en una especie vegetal. Sin embargo la incidencia de los efectos tóxicos sobre la etapa de germinación no han sido tan estudiados. Las pruebas de fitotoxicidad en la etapa de germinación tienen ventajas respecto a otros métodos ya que resultan mas rápidos y económicos (Lewis, 1995).

La justificación para realizar este bioensayo radica en la importancia de eventos de desarrollo temprano basados en la velocidad de germinación que presenta la rúcula (Torres Rodríguez, 2003), si bien pueden utilizarse otras especies en diversas pruebas biológicas como rabanito (Lallana *et al.*, 2000) y berro (Abad *et al.*, 1993), entre otras.

Los objetivos fueron: 1) evaluar la respuesta de la germinación de semillas de rúcula a distintas concentraciones salinas y tipos de sales y 2) comparar la respuesta de semillas de rúcula y lechuga en bioensayos con aguas de distintos orígenes.

Materiales y métodos

Se realizaron ensayos de germinación con rúcula (*Eruca sativa* Mill) y con lechuga (*Lactuca sativa* L.). Para ambas especies se procedió de la misma manera con excepción del tiempo de incubación en cámara de crecimiento que fue de 48 h y 72 h para rúcula y lechuga, respectivamente.

Se utilizaron cajas plásticas transparentes con tapa de 8 cm de diámetro y 3 cm de altura. En el fondo de cada recipiente se colocó papel absorbente embebido con 2 ml de la solución correspondiente a cada tratamiento, luego se tapó y se llevó a cámara de crecimiento a 25 ± 1 °C. Cada tratamiento constó de 4, 5 o 6 repeticiones de 10 semillas cada una según los ensayos. A las 48 h o 72 h según la especie, se evaluó el número de semillas germinadas y la longitud de la raíz primaria utilizando un calibre digital bajo lupa de mesa. Se calculó el promedio de la longitud radical y el porcentaje de germinación de cada repetición. Estos valores se utilizaron para obtener un índice de germinación (IG) multiplicando el número de semillas germinadas por la longitud media de la raíz primaria, expresando ambas variables como porcentaje respecto al Testigo. Los datos de longitud radical e IG se analizaron estadísticamente empleando la prueba de Dunnet (Montgomery, 1999), con un nivel de confianza del 95 %, comparando cada uno de los tratamientos con el Testigo. También se utilizó la prueba “t” para muestras apareadas con la que se comparó la longitud radical entre los ensayos de salinidad con cloruros de sodio y de potasio.

Ensayo 1: Se utilizaron semillas de rúcula con un poder germinativo del 95 %. Se realizaron dos ensayos, uno (Ensayo 1.1.) con 4 concentraciones salinas de ClK y un testigo (agua destilada) y otro (Ensayo 1.2.) con 4 concentraciones salinas de ClNa y un testigo (agua destilada).

Ensayo 2: Se realizaron dos ensayos (2.1. y 2.2.) con semilla de rúcula. Uno con 4 concentraciones salinas de SO_4Na_2 y un testigo (agua destilada) y otro con 4 concentraciones salinas de SO_4K_2 y un testigo (agua destilada), con los siguientes tratamientos (Trat.):

Ensayos	1.1.	1.2.	2.1.	2.2.
Salinidad	ClK	ClNa	SO_4K_2	SO_4Na_2
Trat.	CE (dS/m)	Molaridad	Molaridad	
1-Testigo	0	0	0	0
2	6,67	0,050	0,066	0,033
3	4,50	0,034	0,045	0,022
4	2,50	0,019	0,025	0,012
5	1,00	0,007	0,01	0,004

Ensayo 3: Toxicidad de efluentes de distinto origen

Pileta de tratamiento de aguas servidas de un municipio (Ensayo 3.1.). Se utilizaron semillas de rúcula empleando 6 repeticiones. Los tratamientos fueron Testigo (agua destilada), agua de pileta de tratamiento al 100 % y diluida al 50 %.

Pileta de tratamiento de un establecimiento frigorífico (Ensayo 3.2.). En un ensayo se emplearon semillas de rúcula utilizándose 4 repeticiones por tratamiento. Los tratamientos fueron: Testigo (agua destilada), agua extraída de pileta de tratamiento secundario al 100 % y diluida al 50 %. En otro ensayo se utilizaron las especies rúcula y lechuga empleando 5 repeticiones. Los tratamientos fueron: Testigo (T1) con agua destilada, agua extraída de piletas de tratamiento secundario pura (T2), diluida al 66 % (T3) y 33 % (T4) con una CE de 2,27, 1,6 y 0,91 dS/m, respectivamente.

Resultados y discusión

Ensayo 1: Cloruros de potasio y sodio.

El porcentaje de germinación promedio en el ensayo de salinidad con ClK fue del 95 %, idéntico al poder germinativo inicial de las semillas, lo cual indica que la germinación no se vio afectada por las concentraciones salinas ensayadas. Las diferencias se observaron en la longitud radical lo cual influyó directamente sobre los resultados del índice de germinación.

El IG de todos los tratamientos superó al del testigo (Fig.1), lo cual indicaría un efecto estimulante del crecimiento radical ante la presencia tanto de ClK como de ClNa.

Los niveles de salinidad considerados apropiados para la germinación de semillas y crecimiento de plántulas se encuentran entre 0,75 y 1,99 dS/m (Abad y Noguera Murria, 1997), por lo que se podría afirmar que la rúcula es una especie tolerante a la salinidad.

No se observaron diferencias significativas al comparar la longitud radical (mm) e IG de cada uno de los tratamientos con el testigo (Cuadro 1) para ClK. Sin embargo, hubo diferencias altamente significativas para ClNa en todos los

tratamientos excepto en la comparación del tratamiento 5 con el testigo para IG.

Todos los tratamientos con ClK presentaron una longitud radical mayor que el testigo y la mayor variabilidad se observó en el tratamiento 3 y en el Testigo, la menor en los tratamientos 4 y 5 (Fig. 2).

El porcentaje de germinación promedio en el ensayo de salinidad con ClNa fue del 90 %. El IG fue mayor en todos los tratamientos con respecto al testigo (Fig.1). Los resultados indicarían que la rúcula también es tolerante a la salinidad por ClNa.

Cuadro1. Comparación de valores medios de la longitud radical (mm) e IG (%) con semillas de rúcula mediante la prueba de Dunnet, para los ensayos de salinidad con ClK y ClNa

	ClK		ClNa	
MSD Longitud radical	2,1971		1,0477	
MSD IG (Alfa = 0.05)	38,141		35,594	
Comparación Tratamiento – Testigo	Δ medias longitud	Δ medias IG	Δ medias longitud	Δ medias IG
2 – 1	1,830 ns	25,50 ns	1,550 ***	44,13 ***
3 – 1	1,617 ns	23,00 ns	1,377 ***	44,97 ***
4 – 1	0,425 ns	0,50 ns	1,300 ***	36,32 ***
5 – 1	1,757 ns	24,50 ns	1,280 ***	30,09 ns

MSD, mínima diferencia significativa; ns diferencia no significativa; ***diferencia altamente significativa

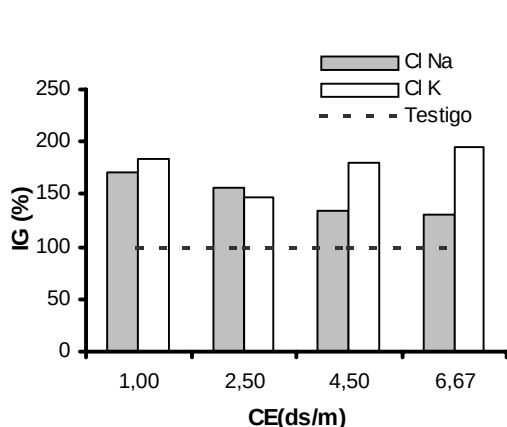


Figura 1. Índice de germinación (IG) en semillas de rúcula para los tratamientos de salinidad con ClK y ClNa, expresados en valores de conductividad eléctrica (CE) comparados con el Testigo

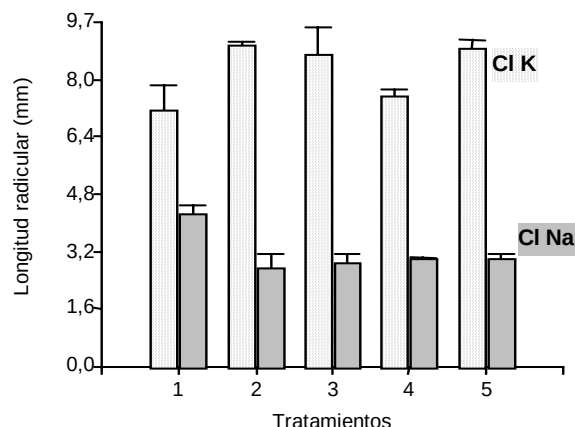


Figura 2. Longitud radical (mm) en semillas de rúcula comparando los tratamientos de salinidad mediante Prueba "t" para muestras apareadas

Todos los tratamientos con ClNa presentaron diferencias altamente significativas, en cuanto a longitud radical, al compararlos con el testigo (Cuadro 1).

Todos los tratamientos con ClNa presentaron una longitud radical menor que el testigo, la cual disminuyó a medida que aumentó la concentración salina, no obstante las diferencias entre tratamientos (excluido el testigo) no fueron significativas, existiendo mayor variabilidad en el tratamiento 2 (Fig. 2).

El sodio (Na^+), para la mayoría de los vegetales tiene un efecto tóxico sobre el crecimiento vegetal y se absorbe selectivamente en menor cantidad que el K^+ (Salisbury y Ross, 1994), lo cual explicaría la menor longitud radical registrada en el ensayo con dicho ión. El potasio, en cambio, es un elemento esencial para los vegetales y normalmente tiende a acumularse en tejidos en mayores concentraciones que las del medio de donde se nutre. Se ha descrito para el K^+ una razón de acumulación

aproximada de 250 a 1 mM para las plantas en general (Salisbury y Ross, 1994).

Ensayo 2: Sulfatos de sodio y potasio.

Todos los tratamientos con SO_4K_2 y SO_4Na_2 presentaron una longitud radical marcadamente mayor que el testigo, lo cual indicaría un efecto estimulante de dichas sales sobre el crecimiento de la raíz primaria lo cual también se reflejó en altos IG (Fig. 3).

Si comparamos estos resultados con los datos obtenidos con cloruros de sodio y potasio (Fig.1), se observa una marcada diferencia en cuanto a los valores obtenidos de IG entre cloruros y sulfatos de sodio y potasio (Fig.3), lo cual lleva a pensar que la forma salina en que se suministran dichos iones tiene notable influencia en el desarrollo radical.

Todos los tratamientos con SO_4K_2 y SO_4Na_2 presentaron diferencias altamente significativas en cuanto a longitud radical e IG al compararlos con el testigo (Cuadro 2).

Cuadro 2. Comparación de valores medios de la longitud radical (mm) e IG (%) con semillas de rúcula mediante la prueba de Dunnet, para los ensayos de salinidad con SO_4K_2 y SO_4Na_2

	SO_4K_2		SO_4Na_2	
MSD Longitud radical	3,2815		2,391	
MSD IG (Alfa = 0.05)	122,96		109,99	
Comparación Tratamiento – Testigo	Δ medias longitud	Δ medias IG	Δ medias longitud	Δ medias IG
2 – 1	5,593 ***	194,50 ***	3,600 ***	121,25 ***
3 – 1	6,478 ***	184,00 ***	4,862 ***	143,00 ***
4 – 1	6,110 ***	188,00 ***	7,367 ***	254,75 ***
5 – 1	5,510 ***	153,00 ***	6,990 ***	226,25 ***

MSD, mínima diferencia significativa; ***diferencia altamente significativa

Ensayo 3: Toxicidad de efluentes de distinto origen.

Ensayo 3.1

No hubo diferencias en cuanto al IG entre los tratamientos con aguas servidas de un municipio al 50 y 100 % (Fig. 4a), pero si existieron diferencias significativas en cuanto a IG y longitud radical al comparar

cada uno de dichos tratamientos con el testigo (Cuadro 3).

Ensayo 3.2

En el tratamiento con agua de frigorífico pura, el IG no llegó al 50 % del testigo, lo cual puede suponer un importante nivel de toxicidad (Fig. 4b), sin embargo, estadísticamente no se encontraron diferencias significativas al comparar cada

uno de los tratamientos con el testigo en cuanto a longitud radical e IG (Cuadro 3). Esto debido a que existió gran variabilidad en los datos, por lo que la mínima diferencia significativa del IG (MSD IG) fue alta.

El IG se afectó en más del 50 % respecto al testigo en los ensayos con agua

de frigorífico sin diluir (CE 2,27 dS/m) para las especies rúcula y lechuga (Fig. 5). Dicho tratamiento con rúcula (Cuadro 4) presentó diferencias significativas, en cuanto a longitud radical e IG, al compararlo con el testigo. Las diluciones al 66 % y 33 % no mostraron diferencias con el testigo.

Cuadro 3. Comparación de valores medios de la longitud radical (mm) e IG (%) con semillas de rúcula mediante la prueba de Dunnett, para los ensayos con agua de piletas de tratamiento secundario de un municipio y de un frigorífico

	Municipio		Frigorífico	
MSD Longitud radical	1,7551		5,006	
MSD IG (Alfa = 0.05)	23,715		61,308	
Comparación Tratamiento – Testigo	Δ medias longitud	Δ medias IG	Δ medias longitud	Δ medias IG
2 – 1	3,4500 ***	33,628 ***	4,095 ns	48,00 ns
3 – 1	2,8567 ***	27,648 ***	1,080 ns	10,50 ns

MSD, mínima diferencia significativa; ns: diferencia no significativa; ***diferencia altamente significativa

Cuadro 4. Comparación de valores medios de la longitud radical (mm) e IG (%) con semillas de rúcula y lechuga mediante la prueba de Dunnett, para los ensayos con agua de piletas de tratamiento secundario de un frigorífico

	Rúcula		Lechuga	
MSD Longitud radical	3,604		7,164	
MSD IG (Alfa = 0.05)	42,676		58,861	
Comparación Tratamiento – Testigo	Δ medias longitud	Δ medias IG	Δ medias longitud	Δ medias IG
2 – 1	6,724 ***	75,60 ***	6,542 ns	36,00 ns
3 – 1	1,542 ns	18,40 ns	7,452 ***	48,20 ns
4 – 1	0,196 ns	1,20 ns	6,146 ns	49,00 ns

MSD, mínima diferencia significativa; ns: diferencia no significativa ***diferencia altamente significativa

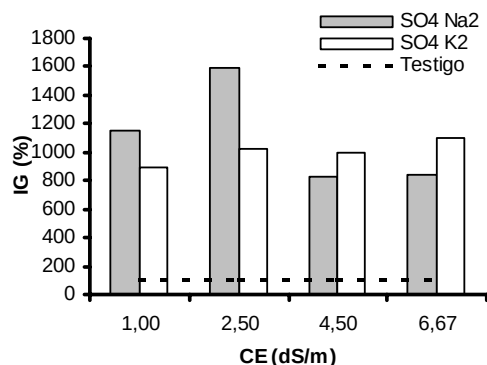


Figura 3. Índice de germinación (IG) en semillas de rúcula para los tratamientos de salinidad con SO_4K_2 y SO_4Na_2 , expresados en valores de conductividad eléctrica (CE) comparados con el Testigo

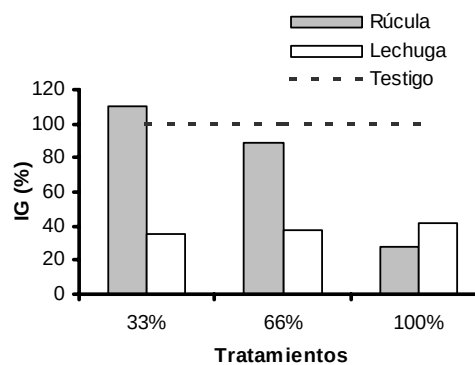


Figura 5. Índice de germinación (IG) en semillas de rúcula y lechuga en los tratamientos con agua de un frigorífico pura, diluida al 66 % y 33 % comparados con el Testigo

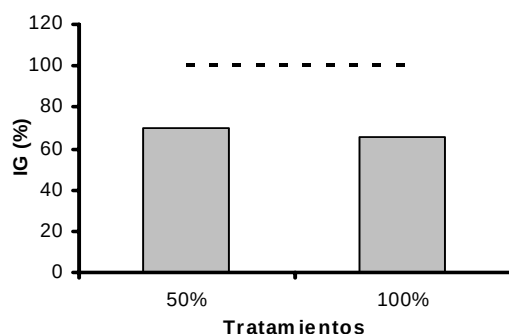


Figura 4. a) Índice de germinación (IG) en semillas de rúcula en los tratamientos con agua de un municipio (Testigo 100%, línea de puntos)

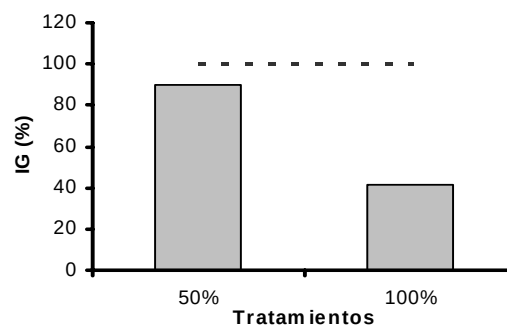


Figura 4. b) IG en semillas de rúcula con agua de un frigorífico pura y diluida al 50% comparados con el Testigo

Con lechuga (Cuadro 4), no se observaron diferencias significativas al comparar cada tratamiento con el testigo, excepto en el tratamiento con agua diluida al 66% que presentó diferencias con el testigo en cuanto a longitud radical. La rúcula resultó sensible en las concentraciones de agua ensayadas (Fig. 5) mientras que la lechuga fue insensible y mostró muy bajos valores de IG.

Conclusiones

Las concentraciones salinas ensayadas con cloruros y sulfatos indican que la rúcula es tolerante a condiciones de alta salinidad en las primeras etapas de la germinación.

La rúcula es más sensible que la lechuga para monitorear aguas de distintos orígenes.

Referencias bibliográficas

- ABAD, M.; MARTÍNEZ, M. D.; MARTÍNEZ, P. F.; MARTÍNEZ, J. (1993). Evaluación agronómica de los sustratos de cultivo. *Actas de Horticultura*, 11: 141-154.
- ABAD, M.; NOGUERA MURRIA, P. (1997). Los sustratos en los cultivos sin suelo (p. 101-116). En: "Manual de cultivo sin suelo". Coord. M. Urrestarazu Gavilán. *Manuales Univ. Almería*. 323 p.
- GONZÁLEZ, A. M.; PRESA, M. F.; LURÁ, M. C. (2003). Ensayo de Toxicidad a *Artemia*

- salina*: puesta a punto y aplicación a micotoxinas. *Revista FABICIB*, 7: 117-122.
- LALLANA, V. H.; CARDONA, O.; VALENZUELA O. R.. (2000). Bioensayo de germinación como test rápido para la valoración de lombricompostos. II Encontro Nacional de Sustratos para Plantas (II ENSUB). Florianópolis, SC-Brasil, 17-20 de Septiembre de 2000. Resúmenes pag. 74 – 76.
- LEWIS, M. (1995). Use of Freshwater Plants for Phytotoxicity Testing: A Review. *Environmental Pollution*, 87: 319-336.
- MONTGOMERY, D. (1999). Diseño y Análisis de Experimentos. Col. Cuajimalpa, México. Grupo Editorial Iberoamericana. 589 p.
- ORTEGA, M. C.; AGUADO, M. T.; ORDOVÁS, J.; MORENO, M. T.; CARMONA, E. (2000). Propuesta de Bioensayos para detectar factores fitotóxicos en sustratos y enmiendas. *Actas de Horticultura*, 32: 363-376.
- RÍOS, S. M.; NUDELMAN, N. (2000). Contaminación de suelos por la explotación petrolera. Fitotoxicidad en la etapa de germinación. *Ingeniería Sanitaria y Ambiental*, 49: 53-58.
- SALISBURY, F. B.; ROSS, C. W. (1994). "Fisiología Vegetal". Grupo Editorial Iberoamericana, (Col. San Rafael, México). Capítulo 7:149-175.
- TORRES RODRÍGUEZ, M. T. (2003). Empleo de los ensayos con plantas en el control de contaminantes tóxicos ambientales. http://bvs.sld.cu/revistas/hie/vol41_2-3_03/hie092-3203.htm