

ÍNDICES DE GERMINACIÓN Y ELONGACIÓN RADICAL DE *Lactuca sativa* EN EL BIOMONITOREO DE LA CALIDAD DEL AGUA DEL RIO CHALMA

Alexis Joseph RODRÍGUEZ ROMERO¹, Christopher Alberto ROBLES SALAZAR¹,
Ricardo Arturo RUÍZ PICOS¹, Eugenia LÓPEZ LÓPEZ¹, Jacinto Elias SEDEÑO DÍAZ³ y
Angélica RODRÍGUEZ DORANTES^{2*}

¹ Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Laboratorio de Bioconservación y Manejo, Instituto Politécnico Nacional, Prol. de Carpio y Plan de Ayala s/n, Col. Sto. Tomás, Mexico, D.F., 11340 Mexico

² Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Departamento de Botánica, Instituto Politécnico Nacional, Prol. de Carpio y Plan de Ayala s/n, Col. Sto. Tomás, Mexico, D.F., 11340 Mexico

³ Coordinación Politécnica para la Sustentabilidad, Instituto Politécnico Nacional, Av. IPN esq. Wilfrido Massieu, Edif. De la Biblioteca Nacional, 2º. Piso, Col. Zacatenco, 07738, D.F., México

*Autor de correspondencia; rodorantes@yahoo.com.mx

(Recibido julio 2013; aceptado mayo 2014)

Palabras clave: bioensayo, bioevaluación, fitotoxicidad, respuesta biológica integral

RESUMEN

Entre los métodos utilizados en el monitoreo de la calidad de agua en los ecosistemas dulceacuícolas encontramos el de evaluación de fitotoxicidad, el de germinación de semillas y la prueba de la elongación radical, que son de los más simples y recomendados para el biomonitoreo ambiental. Los objetivos de este trabajo consistieron en evaluar la toxicidad de las aguas del Río Chalma a través de un bioensayo con *Lactuca sativa* y establecer un índice biológico que permita conocer y evaluar las condiciones de contaminación del agua de este río. Se eligieron seis sitios de monitoreo representativos a lo largo del cauce, cuatro de ellos ubicados en el Estado de México y dos en el estado de Morelos. Los resultados se analizaron con métodos multivariados: un análisis de componentes principales y uno de similitud. Se diferenciaron tres zonas de acuerdo con los índices de toxicidad obtenidos: 1) los tres primeros sitios de estudio presentaron valores positivos y bajos en toxicidad, con altas concentraciones de nutrientes, que podrían estar promoviendo la elongación radical, 2) la parte media representada por el cuarto sitio, obtuvo el índice de elongación radical más bajo, lo que clasificó a este sitio en la categoría de toxicidad moderada y 3) la parte baja del río, cuyos índices clasificaron a esta zona con toxicidad de moderada a baja. Esta parte del río estuvo además asociada con la acumulación de compuestos lixiviados durante la época de lluvias. Finalmente, los índices obtenidos mostraron que la sensibilidad del bioensayo de germinación de las semillas de *Lactuca sativa* generó respuestas biológicas integradoras. Esta información puede ser utilizada para la evaluación de riesgos ecotoxicológicos.

Key words: bioassay, bioassessment, phytotoxicity, integral biological response

ABSTRACT

Among the methods used for water quality monitoring in freshwater ecosystems we can find the phytotoxicity assessment and the seed germination and root elongation tests, which are the simplest methods recommended for environmental biomonitoring. The aims of this study were to assess the water toxicity of the Chalma river by the use of a bioassay with *Lactuca sativa* and to elaborate a biological index to diminish the water pollution condition of this river. Six study sites along the river were chosen, four of them located in the state of Mexico and two in the state of Morelos. The results were analyzed with multivariate methods: a principal component analysis and a similarity analysis. Three zones were differentiated according to the toxicity indices obtained: 1) the first three study sites showed positive values and low toxicity with high concentrations of nutrients, which could be promoting radical elongation, 2) the middle portion, represented only by the fourth study site, exhibited the lowest value of the root length index, with a classification of moderate toxicity and 3) the lower portion of the river, whose indices classified this zone as moderate to low toxicity. The last portion of the river was also associated with the accumulation of leachate compounds during the rainy season. Finally, the indices obtained showed that the sensitivity of the *Lactuca sativa* seeds bioassay generated an integral biological response. This information can be used for ecotoxicological risk assessment.

INTRODUCCIÓN

El monitoreo de la calidad de agua en los ecosistemas acuáticos es de suma importancia desde el punto de vista ecotoxicológico, ya que si el líquido se emplea particularmente para la irrigación de cultivos puede afectar la salud animal y humana (Tal 2006, Kanae 2009).

Se han recomendado diversas técnicas ecotoxicológicas que emplean organismos de prueba (o blanco) de diferentes niveles tróficos para complementar los análisis ambientales (Plaza *et al.* 2005). La germinación de semillas y la prueba de la elongación radical son de los indicadores más simples del biomonitoreo ambiental (Wang *et al.* 2001, Mahmood *et al.* 2005, Di Salvatore *et al.* 2008, Ling *et al.* 2010). Estos indicadores en combinación con la longitud del brote son parámetros que pueden mostrar cambios en la calidad ambiental, ya que los resultados de estas pruebas se basan en la sensibilidad de las plantas centinela cuando se exponen a muestras de agua, suelo o sedimento.

Existen muchas ventajas al emplear especies de importancia agrícola en ensayos fitotóxicos sobre aquellas que emplean animales y algas. Algunas ventajas de las semillas de las plantas son: 1) están latentes (secas o deshidratadas) y pueden mantenerse en condiciones adversas sin perder su viabilidad y 2) cuando se presentan las condiciones favorables sufren cambios rápidos (en ocasiones inmediatos) en su metabolismo, transporte de nutrientes y división celular (Mayer y Polsakoff-Mayer 1982). Cuando las semillas se exponen a aguas contaminadas, estas

respuestas inmediatas pueden ser medidas, por lo que la sensibilidad al estrés ambiental las hace idóneas como organismos centinela (Wang 1991).

Los ensayos de toxicidad basados en la germinación de semillas y la elongación radical pueden realizarse con diversas especies que incluyen plantas de importancia económica, que son de fácil acceso y que además, germinan y crecen rápidamente (Fletcher *et al.* 1985). La aplicación de la prueba se suele realizar como ensayo único de toxicidad o a través de una batería de pruebas con otros bioindicadores. Estos ensayos se aplican en la evaluación de la toxicidad de compuestos puros solubles, de aguas superficiales (lagos, ríos), aguas subterráneas, agua para consumo humano y aguas residuales domésticas e industriales. Además de lixiviados de suelos, sedimentos, lodos u otras matrices sólidas (Cheung *et al.* 1989, Dutka 1989, Bowers *et al.* 1997). La ventaja de aplicar las pruebas de germinación y elongación radical con diferentes especies permite la generación de bases de datos sobre fitotoxicidad (Wang *et al.* 2001, Pallet *et al.* 2007, White *et al.* 2008) en los que se obtienen los valores de referencia.

El bioensayo de toxicidad con semillas de lechuga (*Lactuca sativa*) es una prueba estática de toxicidad aguda (120 h de exposición), para evaluar los efectos fitotóxicos de compuestos puros o de mezclas complejas de éstos, en el proceso de germinación de semillas y en el desarrollo de plántulas durante los primeros días de crecimiento (Bagur-González *et al.* 2011).

Es importante destacar que, durante el período de germinación y los primeros días de desarrollo de la

plántula, ocurren numerosos procesos fisiológicos en los que la presencia de una sustancia tóxica puede interferir en la supervivencia y el desarrollo normal de la planta. Por esta razón, la germinación es una etapa de gran sensibilidad frente a factores externos adversos (Sobrero y Ronco 2008). Así, la inhibición en la elongación de la radícula y el epicotilo constituyen indicadores subletales muy sensibles para la evaluación de efectos biológicos en la germinación de semillas de *L. sativa*.

Los objetivos de este trabajo incluyen la evaluación de la toxicidad de las aguas del Río Chalma a través de un bioensayo con *Lactuca sativa* en el que se valorará la respuesta de esta planta en la germinación de sus semillas y en la elongación de la radícula como indicadores de la calidad del agua, así como, la propuesta de un índice biológico recomendable que permita conocer y evaluar las condiciones de contaminación en dicho cuerpo de agua.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

El Río Chalma pertenece a la cuenca del Balsas y nace en el municipio de Ocuilán en el Estado de México, a 3500 m.s.n.m. Tiene una longitud aproximada de 50.72 km, atraviesa los estados de México (4.1 km)

y de Morelos (46.31 km). Su desembocadura se encuentra en la localidad de Puente de Ixtla en el estado de Morelos a una altura de 898 m.s.n.m. (CONAGUA 2010). Se seleccionaron seis sitios de estudio a lo largo del río (**Fig. 1a**): sitio E1 “Malinalco” (18° 56' 12.1" N; 99° 29' 31" W), el cual se localiza a 50 m del manantial que le da origen, su uso de suelo es predominantemente de riego suspendido y con vegetación abundante; sitio E2 “La Loma” (18° 53' 48.1" N; 99° 27' 58.3" W), su uso de suelo corresponde a pastizal cultivado, estos sitios (E1 y E2), se encuentran ubicados en el Estado de México; sitio E3 “El Platanar” (18° 49' 39.7" N; 99° 27' 17" W), con uso de riego eventual; sitio E4 “La Casa de la Escuela” (18° 48' 54.87" N; 99° 27' 14.67" W), con uso de riego suspendido e influencia de pastizal cultivado; sitio E5 “Tetecala” (18° 43' 55" N; 99° 24' 53.7" W) con uso de pastizal inducido y sitio E6 “Cuautlita” (18° 42' 3.9" N; 99° 22' 38.6" W), con uso de riego eventual, que se encuentran ubicados en el estado de Morelos (**Fig. 1b**).

Recolecta de muestras de agua

En septiembre de 2012 se visitaron los seis sitios de estudio y en cada uno se determinaron *in situ* los siguientes factores ambientales: temperatura (T °C), oxígeno disuelto (OD mg/L), turbiedad (Turb NTU), salinidad (mg/L) y conductividad (mS/cm) con una sonda multiparamétrica Quanta®. Adicionalmente,

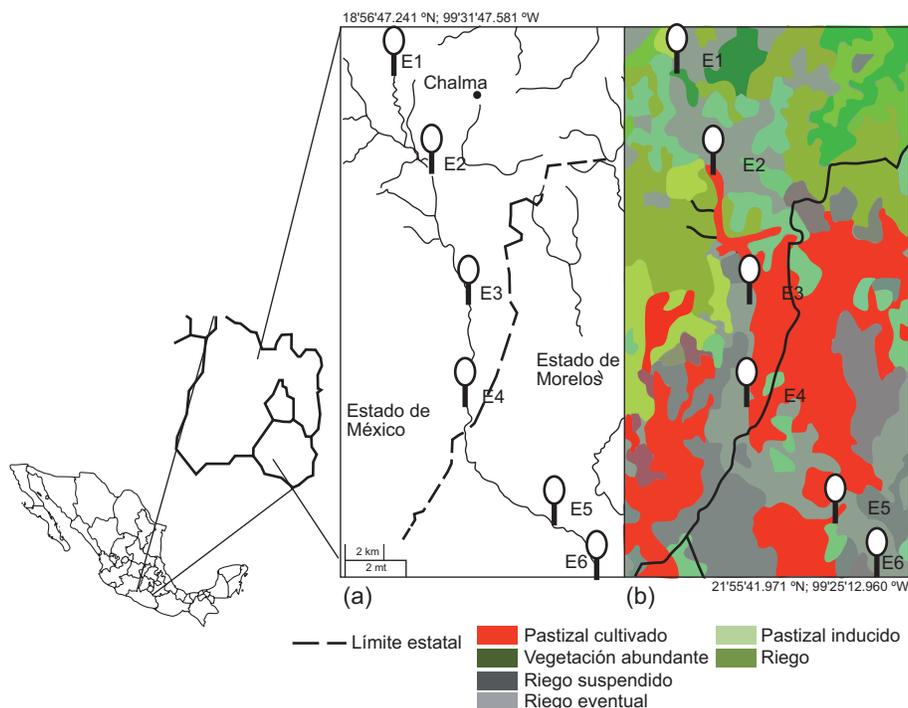


Fig. 1. Mapa del Río Chalma: a) ubicación geográfica, b) uso del suelo (INEGI 2013)

para cada sitio de estudio, se tomaron muestras de agua superficial por duplicado en recipientes plásticos de 500 mL para la determinación de parámetros fisicoquímicos en el laboratorio. Las muestras de agua se transportaron en obscuridad y refrigeración de acuerdo con el método estándar (APHA 2005).

En el laboratorio, las muestras de agua fueron analizadas con las técnicas HACH® en un espectrofotómetro DR2500 para determinar: nitrógeno total (NT mg/L), nitritos (N-NO₂ mg/L), nitratos (N-NO₃ mg/L) nitrógeno amoniacal (N-NH₃ mg/L), sulfatos (SO₄ mg/L), ortofosfatos (P-PO₄ mg/L), fósforo total (PT mg/L) y color (unidades de Pt-Co). La alcalinidad (mg/L), dureza (CaCO₃ mg/L) y contenido de cloruros (Cl mg/L) se determinaron por los métodos estándar de APHA (2005).

Desarrollo de los bioensayos con *Lactuca sativa*

Se tomaron muestras de agua de 50 mL de cada sitio de estudio para el desarrollo de los bioensayos con *Lactuca sativa* en el laboratorio, las cuales también se transportaron en obscuridad y refrigeración (APHA 2005).

Los bioensayos realizados para evaluar el efecto tóxico del agua del Río Chalma en la germinación de semillas de *Lactuca sativa* se establecieron siguiendo el método propuesto por Sobrero y Ronco (2008) y Bagur-González *et al.* (2011). Para lo cual se colocaron 20 semillas de *Lactuca sativa* de la variedad "Buttercrunch", en cajas Petri de 100 mm de diámetro sobre papel filtro de 90 mm de diámetro con nivel de poro equivalente al papel Whatman® No. 3. En cada caja de Petri se aplicaron 2 mL de agua de las muestras de cada sitio de estudio. Todos los bioensayos se realizaron por triplicado. Las cajas fueron selladas con papel Parafilm® para evitar la desecación y se mantuvieron en oscuridad durante 120 h a 22 ± 2 °C de acuerdo con Sobrero y Ronco (2008). Las semillas germinadas en cajas de Petri con 2 mL de agua dura se consideraron como testigo. Transcurrido el tiempo de exposición se contabilizó el número de semillas germinadas, considerando aquellas con una longitud radical mayor a 1 mm (Di Salvatore *et al.* 2008). Para evaluar el crecimiento de las plántulas de *L. sativa* en cada uno de los tratamientos al final de la exposición se realizó la medición de la longitud del epicotilo y de la radícula de las plántulas. Finalmente, para realizar las comparaciones adecuadas, los resultados obtenidos se expresaron como el porcentaje de la germinación relativa de semillas (GRS), el crecimiento relativo de la radícula (CRR) y el índice de germinación (IG) de acuerdo con Hoekstra

et al. (2002) y Walter *et al.* (2006), mediante las siguientes expresiones:

$$\text{GRS (\%)} = \frac{\text{Número de semillas germinadas con la muestra de agua problema}}{\text{Número de semillas germinadas en agua dura (testigo)}} \times 100$$

$$\text{CRR (\%)} = \frac{\text{Longitud promedio de la radícula con la muestra de agua problema}}{\text{Longitud promedio de la radícula en agua dura (testigo)}} \times 100$$

$$\text{IG (\%)} = \frac{\text{GRS} \times \text{CRR}}{100}$$

Adicionalmente, se calcularon los índices del porcentaje de germinación residual normalizado (IGN) y de elongación radical residual normalizado (IER), de acuerdo con Bagur-González *et al.* (2011):

$$\text{IGN} = \frac{\text{Germ}_x - \text{Germ}_{\text{Testigo}}}{\text{Germ}_{\text{Testigo}}}$$

Donde Germ_x es el porcentaje promedio de semillas germinadas en el agua de cada sitio de estudio y $\text{Germ}_{\text{Testigo}}$ es el porcentaje de semillas germinadas en el testigo.

$$\text{IER} = \frac{\text{Elong}_x - \text{Elong}_{\text{Testigo}}}{\text{Elong}_{\text{Testigo}}}$$

Donde Elong_x es la longitud promedio de la radícula de las semillas germinadas en cada sitio de estudio y cada dilución, y $\text{Elong}_{\text{Testigo}}$ es la longitud promedio de la radícula de las semillas germinadas en el testigo.

Ambos índices IGN e IER establecen valores de toxicidad desde -1 a > 0 bajo las siguientes categorías: índice de 0 a -0.25 baja toxicidad, de -0.25 a -0.5 toxicidad moderada, de -0.5 a -0.75 muy tóxico y de -0.75 a -1.0, toxicidad muy alta; valores del índice > 0 indican crecimiento de la radícula u hormesis (Bagur-González *et al.* 2011).

Tratamiento de los datos

En el análisis de las características fisicoquímicas del agua de los sitios de estudio se emplearon técnicas multivariadas debido a que las pruebas

univariadas no permiten analizar simultáneamente las similitudes o diferencias entre sitios debido al numeroso conjunto de atributos evaluados (por características fisicoquímicas). Los métodos estadísticos multivariados se han aplicado extensamente para la reducción de los datos ambientales (fisicoquímicos y biológicos). En este sentido, el análisis de componentes principales (ACP) es un método estadístico multivariado muy potente que se aplica para reducir la dimensionalidad de un conjunto de datos. Este análisis puede incorporar un gran número de variables, mientras que conserva en lo posible la variabilidad presente en el conjunto de datos. Además, permite evaluar la asociación entre las mismas variables (fisicoquímicas y biológicas), ya que muestra la participación de cada una de éstas. Adicionalmente, el ACP examina las diferencias y similitudes entre muestras a partir de las “cargas” de cada una de las variables incorporadas (Kebede y Kebedee 2012).

El ACP se realizó con una matriz de datos que incluye los sitios de estudio (E1 a E6) y los atributos de calidad de agua, así como los relativos al crecimiento vegetal. El análisis se llevó a cabo mediante la correlación de Pearson, con el paquete estadístico XL-Stat 2013.

Para identificar diferencias entre tratamientos (sitios de estudio y testigo), se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de Student Newman Keuls de comparaciones múltiples (con un nivel de significancia $p < 0.05$), con el paquete estadístico StatistiXL versión 1.8.

Por último, se realizó un análisis de similitud por distancia euclidiana entre los sitios de estudio y todas las respuestas biológicas (% GRS, % CRR, IG, longitud del epicotilo, longitud de la radícula e IER).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Factores ambientales

Los factores ambientales fueron analizados mediante un ACP. Se aplicó el criterio del eigenvalor uno (Kowalkowski *et al.* 2006), por lo que sólo los primeros cuatro componentes se tomaron en cuenta para el análisis. La varianza explicada acumulada en estos cuatro componentes es de 97.29 % del total de la varianza del conjunto de datos originales. De acuerdo con los criterios de Kowalkowski *et al.* (2006), sólo los factores ambientales que presentan cargas vectoriales superiores a 0.6 pueden ser considerados para la interpretación del ACP y dado que los componentes 3 y 4 no alcanzaron valores superiores a 0.6, no fueron

empleados para el análisis. En el primer componente los factores ambientales significativos fueron los nutrientes, tanto en sus formas nitrogenadas (nitrógeno total, nitratos, nitritos, nitrógeno amoniacal) como fosforadas (fósforo total y ortofosfatos) con una relación positiva. Por su parte, la dureza, los cloruros y la relación N/P, resultaron significativos con una relación negativa. En el segundo componente, la conductividad resultó significativa con una relación positiva, mientras que los sulfatos fueron significativos con una relación negativa.

El diagrama del ACP de todos los factores ambientales, sitios de estudio y respuestas biológicas medidas del bioensayo con *Lactuca sativa* se muestra en la **figura 2**. Los sitios E1, E2 y E3 (parte alta y media del Río Chalma), se asociaron de forma positiva con los nutrientes (aguas más eutrofizadas) y aguas blandas, poco alcalinas. Por otro lado, los sitios E4, E5 y E6 se caracterizaron por presentar la menor concentración de nutrientes, aguas duras y altas concentraciones de cloruros. Sin embargo, la mayor conductividad (concentración de sales disueltas), se asoció a los sitios E2, E3 y E1. De acuerdo con los criterios de Kowalkowski *et al.* (2006), los sulfatos son significativos en el segundo componente y guardan una relación negativa con el mismo, de tal forma que están asociados a los sitios E1 y E6. Los resultados indican que la parte alta del Río Chalma se encuentra más eutrofizada que la parte baja, como reflejo de su cercanía con las poblaciones de Chalma, Malinalco y el Platanar. Particularmente, los sitios E1 y E3 se localizan en zonas que se utilizan para la recreación, mientras que el Sitio E2 se localiza en una zona de cultivo tanto de temporal como de riego.

Índice de germinación

El IG representa el producto de la germinación relativa de las semillas por el crecimiento relativo de la radícula. Constituye un indicador de la interacción de los factores que promueven o inhiben la germinación, así como de los respectivos factores que favorecen o impiden el crecimiento de la radícula. Este índice expresa tanto el porcentaje de semillas germinadas como el porcentaje de crecimiento que alcanza la radícula durante el bioensayo. Los resultados obtenidos muestran que el sitio E4 presentó el IG más bajo (47.95), mientras que los demás sitios obtuvieron valores superiores a 70. Al considerar el promedio de los valores del IG de los sitios E1, E2, E3, E5 y E6 (78.45), el IG del sitio E4 representa aproximadamente el 50 % de dicho promedio (**Cuadro I, Fig. 3**).

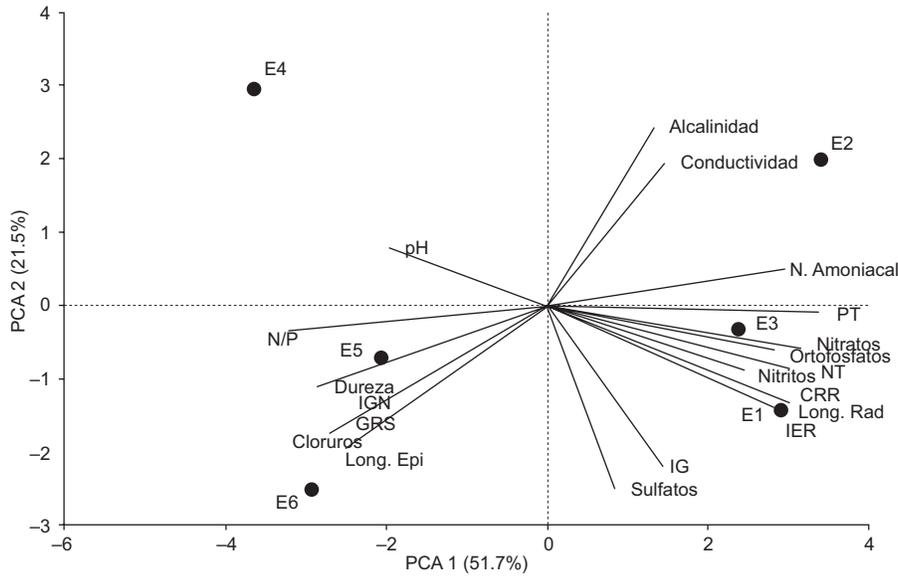


Fig. 2. Diagrama del análisis de componentes principales (ACP) que muestra la relación de los parámetros medidos de la calidad del agua del Río Chalma en los diferentes sitios de muestreo con los parámetros del bioensayo de *Lactuca sativa*

Porcentaje de germinación relativa de semillas (GRS)

El GRS representa el porcentaje de semillas germinadas en el agua de los diferentes sitios de estudio con respecto a aquellas germinadas en el testigo. Los tratamientos de los sitios E1 y E2 (que corresponden a la parte alta del Río Chalma) presentaron los valores promedio de GRS más bajos (63.3 y 58.3, respectivamente), mientras que los tratamientos con aguas de los sitios E5 y E6 (parte baja del Río Chalma) presentaron los valores promedio más altos del GRS (78.3 y 76.6, respectivamente; **Cuadro I, Fig. 3**). Mediante el análisis de varianza se detectaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el tratamiento del sitio E1 con los tratamientos de los

sitios E3, E5 y E6, y entre el tratamiento del sitio E2, con los tratamientos de los sitios E3, E4, E5 y E6. Lo anterior implica que los valores más bajos de GRS (tratamientos de los sitios E1 y E2) resultan significativamente menores que aquellos valores de GRS de los sitios E3, E4, E5 y E6. Las características de la calidad del agua indican que estos dos sitios (E1 y E2), presentaron las concentraciones más altas de sulfatos, así como, de nitrógeno total. En particular, el sitio E1 obtuvo valores altos de cloruros y el sitio E2 de nitrógeno amoniacal.

Se ha registrado que valores altos de salinidad provocan estrés en la germinación de *Capsicum annum* (Demir y Mavi 2008), así como en el crecimiento de *L. sativa* (Al-Maskri *et al.* 2010). A pesar de que los

CUADRO I. RESPUESTAS BIOLÓGICAS DETERMINADAS EN PLÁNTULAS DE *Lactuca sativa* EXPUESTAS A LAS AGUAS DE LOS DIFERENTES SITIOS DE ESTUDIO DEL RÍO CHALMA*

| Respuesta | Sitio de estudio | | | | | |
|--------------------|------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|---------------|
| | E1 | E2 | E3 | E4 | E5 | E6 |
| GRS | 63.3 ± 2.8 | 58.3 ± 5.7 | 76.6 ± 2.8 | 70 ± 5 | 78.3 ± 7.6 | 76.6 ± 2.8 |
| CRR | 114.5 ± 8 | 122.8 ± 51 | 121.7 ± 54 | 68.5 ± 16.7 | 91.6 ± 15.4 | 108.7 ± 37.94 |
| IG | 72.44 ± 4.2 | 70.21 ± 25 | 92.49 ± 39 | 48.44 ± 14 | 71.01 ± 5.8 | 83.99 ± 32 |
| Longitud epicotilo | 15.07 ± 0.97 | 9.43 ± 0.64 | 9.25 ± 0.35 | 14.44 ± 0.19 | 22.39 ± 0.68 | 27.15 ± 0.65 |
| Longitud radícula | 27.21 ± 1.60 | 28.26 ± 2.77 | 27.99 ± 3.12 | 15.85 ± 0.56 | 21.41 ± 0.54 | 24.64 ± 1.07 |
| IGN | -0.50 | -0.42 | -0.23 | -0.30 | -0.22 | -0.23 |
| IER | 0.19 | 0.39 | 0.35 | -0.32 | -0.28 | -0.048 |

*Donde: Valores promedio ± DS de GRS (porcentaje de germinación relativa), CRR (crecimiento relativo de la radícula), IG (índice de germinación) y las UA del IGN (índice de germinación residual normalizado) e IER (índice de elongación residual normalizado)

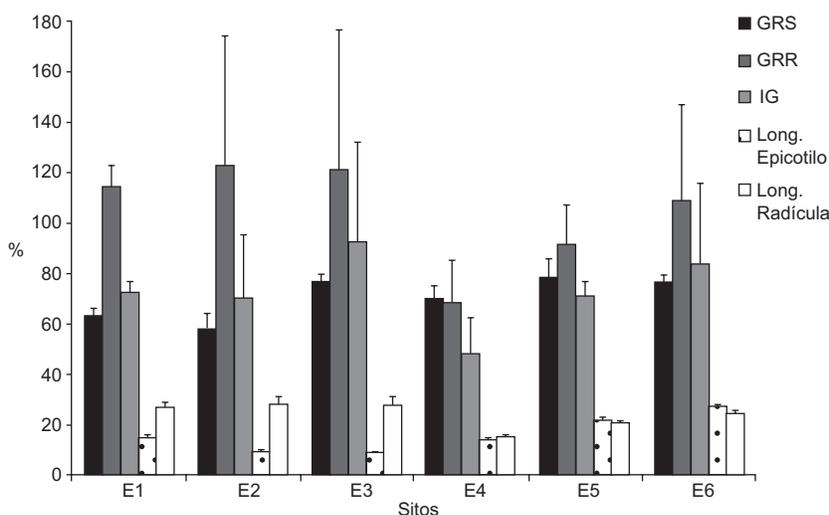


Fig. 3. Evaluación de las respuestas biológicas de las plántulas de *Lactuca sativa*

compuestos nitrogenados estimulan la germinación (Li *et al.* 2005), autores como Wong *et al.* (1983) y Fuentes *et al.* (2004) mencionan que altas concentraciones de nitrógeno amoniacal presentan efectos fitotóxicos sobre la germinación de las semillas de diversas plantas. En nuestro estudio se detectó la presencia potencial de compuestos fitotóxicos en la parte alta del Río Chalma (sitios E1 y E2). Dichos sitios de estudio mostraron una inhibición de más del 40 % en la germinación de las semillas de *L. sativa* con valores de GRS de 63.3 y 58.3, respectivamente. En el ACP (Fig. 2), el GRS se asoció de forma positiva a los sitios E5 y E6, los cuales presentaron los valores más altos de este índice, así como aguas alcalinas y duras.

Crecimiento relativo de la radícula (CRR)

El CRR representa el porcentaje de crecimiento de la radícula de las semillas expuestas a las aguas de los diferentes sitios de estudio con respecto a aquellas del lote testigo. A pesar de que no se detectaron diferencias significativas ($p > 0.05$), los valores de CRR de los sitios E1, E2, E3 y E6 mostraron crecimiento superior al testigo, mientras que las plántulas expuestas a las aguas de los sitios E4 y E5 presentaron un crecimiento de la radícula inferior al testigo. Las aguas de los sitios E1, E2, E3 y E6 se caracterizaron por altas concentraciones de nutrientes, lo que podría promover el crecimiento de la radícula.

Índice de germinación normalizado (IGN)

Los valores del IGN indican la presencia de un gradiente de toxicidad moderada en la parte alta (-0.5 en el sitio E1) a baja toxicidad en la parte baja (-0.21 en el sitio E5) del Río Chalma. En específico,

el sitio E3 mostró toxicidad baja y ésta se incrementa a moderada hacia el sitio E4. Posteriormente vuelve a disminuir en los sitios E5 y E6 (Fig. 4). En la parte alta de este río se localizan poblaciones como Malinalco y Chalma que a pesar de no tener zonas industriales, tienen importancia turística. La población flotante en estas zonas ejerce presión sobre diversos manantiales que dan origen al Río Chalma, al ser utilizados como centros recreativos, como sucede con el manantial del sitio E1. Adicionalmente, se localizan otras poblaciones como Acatzingo, Puente Caporal, San Pedro Chichicasco y El Platanar, que pueden contribuir con descargas de aguas residuales difusas y/o puntuales hacia el cauce del río.

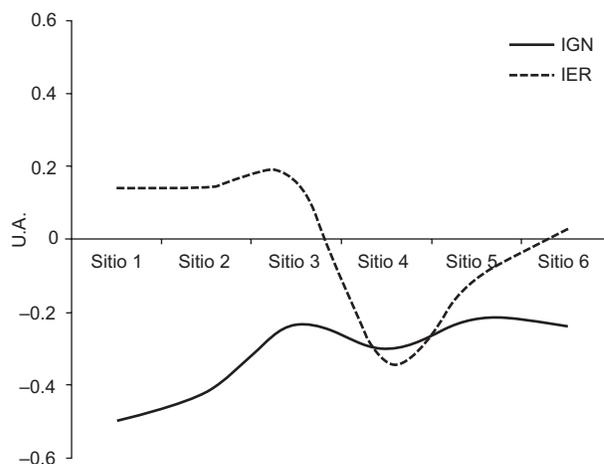


Fig. 4. Índices de germinación normalizada (IGN) y Elongación de la radícula (IER) de *Lactuca sativa* (-1 a +1) de los bioensayos con las diferentes muestras de agua de los seis sitios de estudio (“U.A.”= Unidades arbitrarias)

Índice de elongación radical (IER)

Los valores obtenidos del IER (**Fig. 4**), mostraron que los sitios E1, E2 y E3, compartieron valores positivos en el siguiente orden: E2 (0.39) > E3 (0.35) > E1 (0.19), lo que indica una respuesta estimulante del crecimiento de la radícula u hormesis (Bagur-González *et al.* 2011). Por otro lado, los sitios E4, E5 y E6, presentaron los siguientes valores negativos: E4 (-0.32) > E5 (-0.28) y E6 (-0.048). Los sitios E4 y E5 se consideran con una toxicidad moderada, mientras que el sitio E6, con una toxicidad baja (Bagur-González *et al.* 2011; **Fig. 4**). En general, puede inferirse que los primeros tres sitios de estudio (E1, E2 y E3) presentaron valores de IER positivos debido a la presencia de las mayores concentraciones de nutrientes (**Fig. 2**). Los sitios de la parte más baja presentaron una toxicidad de moderada a baja. En las partes bajas de los ríos se acumula una mayor concentración de compuestos que se arrastran a través de los procesos de lixiviación durante la época lluviosa. Este estudio se realizó durante el mes de agosto, que corresponde a dicha época. El sitio E4 obtuvo el valor de IER más bajo, lo que indica que en este sitio se presentó la mayor toxicidad (-0.33), sin embargo, se clasifica dentro de la categoría de moderada.

Los valores de toxicidad de ambos índices (IGN e IER) son muy similares para el sitio E4 (moderada) y coinciden con una toxicidad baja para los sitios E5 y E6. De acuerdo con el IGN, los sitios E1, E2 y E3 presentan una toxicidad moderada con inhibición en la germinación de semillas, mientras que los valores positivos del IER indican un fenómeno potencial de hormesis para la elongación radical en estos mismos sitios de estudio. Como ya se indicó, el sitio 2 presentó los valores más altos de nitrógeno amoniacal, especie química nitrogenada que produce fitotoxicidad en el proceso de germinación, por lo cual el IGN muestra los valores negativos (toxicidad moderada) en la parte alta del Río Chalma. Una vez que las semillas con mayor resistencia a los efectos tóxicos del amonio llevaron a cabo el proceso de germinación, se inició entonces el desarrollo tanto del epicotilo como de la radícula. La parte alta del río presenta aguas ricas en nutrientes, por lo que el IER mostró hormesis para estos sitios de estudio.

El ACP confirma las tendencias observadas, ya que además indicó que las variables de calidad del agua se relacionan con los diferentes índices medidos (**Fig. 2**). El sitio E4 se asoció a los valores más altos de pH y se correlacionó de forma negativa con los valores del IG, CRR, IER, longitud de la radícula y los nutrientes (nitrógeno y fósforo), lo que pone de manifiesto que este sitio presenta el mayor impacto

(**Fig. 2**). El ACP mostró también que los sitios E5 y E6 se asociaron a la mayor dureza y cloruros, así como a los valores más altos de la longitud del epicotilo, GRS e IGN.

El análisis de similitud por distancia euclidiana mostró la conformación de los sitios de estudio en tres grupos (**Fig. 5**). El grupo I (sitios E1, E2 y E3) estuvo correlacionado con las concentraciones más altas de nutrientes (N y P) y mostró también los valores más altos de CRR, toxicidad moderada para la germinación de las semillas y hormesis para el crecimiento de la radícula. El grupo II lo representa el sitio E4, que mostró los valores más bajos de IER y se asoció con los valores más altos de pH. Finalmente, el grupo III que lo forman los sitios E5 y E6, se caracterizó por presentar los valores más bajos de toxicidad de acuerdo con IER e IGN, así como las concentraciones más bajas de nutrientes. El grupo II presentó la mayor disimilitud con los otros dos grupos.

De esta forma, tanto el ACP como el análisis de similitud mostraron la presencia de tres zonas perfectamente diferenciadas en el Río Chalma: 1) la parte alta caracterizada por concentraciones altas de nutrientes, en particular de amonio (indicador de descargas de aguas residuales domésticas) que podría inhibir la germinación de las semillas de *L. sativa*, pero promover el crecimiento de la radícula,

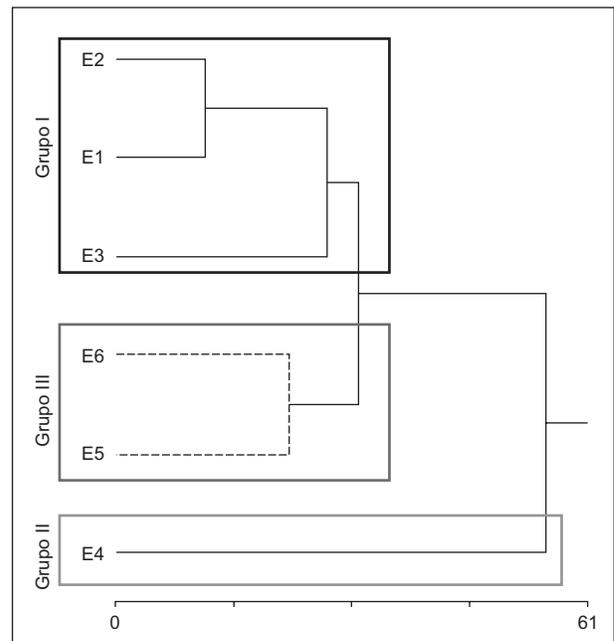


Fig. 5. Dendrograma de similitud de distancia euclidiana de los sitios de estudio del río Chalma basado en las respuestas biológicas de *Lactuca sativa* (Long. Epicotilo, Long. Radícula, IG, GRS, CRR, IGN e IER), con un nivel de corte igual a 30

2) la parte media representada por el sitio E4 con toxicidad moderada que generó tanto inhibición en la germinación como un pobre crecimiento radicular y 3) la parte baja que muestra los valores más bajos de toxicidad.

Estos resultados mostraron que la sensibilidad del bioensayo de germinación de las semillas de *Lactuca sativa* generó respuestas biológicas integradoras asociadas con la exposición de las semillas a muestras de agua procedentes de ambientes sujetos a diferente presión antrópica. Los resultados de esta investigación podrían utilizarse para la evaluación de riesgos ecotoxicológicos (Gong *et al.* 2001, Angelopoulos *et al.* 2009, Gvozdemac *et al.* 2011, Kungolos *et al.* 2011).

CONCLUSIONES

La integración de las diferentes respuestas biológicas que se observaron en el bioensayo de *Lactuca sativa* permitió identificar tres zonas en el Río Chalma. Una zona eutrofizada en la parte alta del río por efecto de una carga elevada de nutrientes con altas concentraciones de nitrógeno amoniacal. Una zona media caracterizada por una fitotoxicidad moderada que inhibe tanto los procesos de germinación como de crecimiento de la radícula de *Lactuca sativa* y finalmente una parte baja con mínima fitotoxicidad.

La integración de todas las respuestas medidas en el bioensayo con *L. sativa* permitió identificar que el sitio E4 está sujeto a un conjunto de agentes estresantes que inhiben de forma significativa tanto la germinación como el crecimiento radicular.

Se recomienda el uso conjunto de los índices de fitotoxicidad (IGN e IER), ya que pueden generar respuestas diferentes a factores que podrían enmascarse si sólo se aplica uno de ellos.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al fondo mixto CONACyT-Estado de Morelos, el financiamiento al proyecto: "Determinación del estado de salud e indicadores biológicos para la evaluación de la recuperación del río Apatlaco, Morelos", Clave Mor-2011-C02-173996 y el financiamiento otorgado por la Secretaría de Investigación y Posgrado (SIP) del Instituto Politécnico Nacional, al proyecto: "Determinación del estado de salud e indicadores biológicos para la evaluación de la recuperación del río Apatlaco, Morelos", Clave SIP: 20121087.

Los autores agradecen a la Comisión de Operación y Fomento de Actividades Académicas del IPN (COFAA-IPN), al Programa EDI (Programa de Estímulos al Desempeño de los Investigadores-IPN) y al Sistema Nacional de Investigadores (SNI-CONACyT).

REFERENCIAS

- Al-Maskri A., Al-Kharusi L., Al-Miqbali H. y Mumtaz Khan M. (2010). Effects of salinity stress on growth of lettuce (*Lactuca sativa*) under closed-recycle nutrient film technique. *Int. J. Agric. Biol.* 12, 377-380.
- Angelopoulos K., Paraskeva C.A. y Emmanouil C. (2009). Phytotoxicity of olive mill wastewater fractions and their potential use as a selective herbicide, paper work, www.srcosmos.gr/srcosmos/showpub.aspx.
- APHA (2005). Standard methods for the examination of water and wastewater. 20a ed. American Public Health Association. Washington, EUA, 1325 pp.
- Bagur-González M.G., Estepa-Molina C., Martín-Peinado, F. y Morales-Ruano, S. (2011). Toxicity assessment using *Lactuca sativa* L. bioassay of the metal(loid)s As, Cu, Mn, Pb and Zn in soluble-in-water saturated soil extracts from an abandoned mining site. *J. Soil. Sediment.* 11, 281-289.
- Bowers N., Pratt J.R., Beeson D. y Lewis M. (1997). Comparative evaluation of soil toxicity using lettuce seeds and soil ciliates. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 207-213.
- CONAGUA (2010). Organismo de cuenca Balsas. Comisión Nacional del Agua. <http://conagua.gob.mx/ocb/>, 31/05/13
- Cheung Y.H., Wong M.H. y Tam N.F.Y. (1989). Root and shoot elongation as an assessment of heavy metal toxicity and Zn equivalent value of edible crops. *Hydrobiologia* 188/189, 377-383.
- Demir I. y Mavi K. (2008). Effect of salt and osmotic stresses on the germination of pepper seeds of different maturation stages. *Braz. Arch. Biol. Techn.* 51, 897-902.
- Di Salvatore M., Carafa A.M. y Carratù G. (2008). Assessment of heavy metals phytotoxicity using seed germination and root elongation tests: a comparison of two growth substrates. *Chemosphere* 73, 1461-1464.
- Dutka B. (1989). Short-term root elongation toxicity bioassay. En: *Methods for toxicological analysis of waters, wastewaters and sediments* (B. Dutka, Ed.) National Water Research Institute (NWRI). Environment Canada, Canadá, pp. 120-122.
- Fletcher J.S., Muhitch M.J., Vann D.R., McFarlane J.C. y Benenati F.E. (1985). Review: PHYTOTOX database evaluation of surrogate plant species recommended by the U.S. Environmental Protection Agency and the

- Organization of Economic Cooperation and Development. *Environ. Toxicol. Chem.* 4, 523-532.
- Fuentes A., Lloréns M., Sáez J., Aguilar M.I., Ortuño J.F. y Meseguer V.F. (2004). Phytotoxicity and heavy metals speciation of stabilised sewage sludges. *J. Hazard. Mater. A.* 108, 161-169.
- Gong P., Wilke B.M., Strozzi E. y Fleischmann S. (2001). Evaluation and refinement of a continuous seed germination and early seedling test for the use in the ecotoxicological assessment of soils. *Chemosphere* 44, 491-500.
- Gvozdenac S., Indić D., Vuković S., Grahovac M., Vrhovac M., Bošković Ž. y Marinković N. (2011). Germination, root and shoot length as indicators of water quality. *Acta Agric. Serb.* 16, 33-41.
- Hoekstra N.T., Bosker T. y Lantinga E.A. (2002). Effects of cattle dung from farms with different feeding strategies on germination and initial root growth of cress (*Lepidium sativum* L.). *Agricult. Ecosys. Environ.* 93, 189-196.
- INEGI (2013). Mapa Digital de México V5. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. <http://gaia.inegi.org.mx/mdm5/viewer.html>, 31/05/13
- Kanae S. (2009). Global warming and the water crisis. *J. Health Sci.* 55, 860-864.
- Kebede Y.K. y Kebede T. (2012). Application of principal component analysis in surface water quality monitoring. En: *Principal Component Analysis - Engineering Applications*. (P. Sanguansat, Ed.) InTech.
- Kowalkowski T., Zbytniewski R., Szpejna J., Buszewski B. (2006). Application of chemometrics in river water classification. *Water Res.* 20, 744-752.
- Kungolos A., Emmanouil, C., Bakopoulou A. y Petala M. (2011). Bioassays as a means of ecotoxicological evaluation of wastewater quality. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 74, 188-194.
- Li W., Liu X., Khan M.A. y Yamaguchi Sh. (2005). The effect of plant growth regulators, nitric oxide, nitrate, nitrite and light on the germination of dimorphic seeds of *Suaeda salsa* under saline conditions. *J. Plant Res.* 118, 207-214.
- Mahmood S., Hussain A., Saeed Z. y Athar M. (2005). Germination of seedling growth of maize (*Zea mays* L.) under varying levels of copper and zinc. *Int. J. Environ. Sci. Tech.* 2, 269-274.
- Mayer A.M. y Poljakoff-Mayber, A. (1982). The germination of seeds, Third, ed. Pergamon Press, Oxford, Inglaterra. 224 pp.
- Pallet K., Cole J., Oberwalder C. y Porch J. (2007). Performance of potential non-crop or wild species under OECD 208 testing guideline study conditions for terrestrial non-target plants. *Pest Manage. Sci.* 63, 134-140.
- Plaza G., Nalecz-Jawecki G., Ulfig K. y Brigmon R.L. (2005). The application of bioassays as indicators of petroleum-contaminated soil remediation. *Chemosphere* 59, 289-296.
- Sobrero M.C. y Ronco A. (2008). Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga *Lactuca sativa* L. En: *Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. La experiencia en México.* (P. Ramírez Romero y A. Mendoza Cantú, Comp.). Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, México pp. 55-68
- Tal A. (2006). Seeking sustainability: Israel's evolving water management strategy. *Science* 313, 1081-1084.
- Walter I., Martínez F. y Cala V. (2006). Heavy metal speciation and phytotoxic effects of three representative sewage sludges for agricultural uses. *Environ. Pollut.* 139, 507-514.
- Wang W. (1991). Literature review on higher plants for toxicity testing. *Water Air Soil Pollut.* 59, 381-400.
- Wang X., Sun C., Gao Sh., Wang L. y Shokui H. (2001). Validation of germination rate and root elongation as indicator to assess phytotoxicity with *Cucumis sativus*. *Chemosphere* 44, 1711-1721.
- White A.L., Boutin C., Dalton R.L., Henkelman B. y Carpenter D. (2008). Germination requirements for 29 terrestrial and wetland wild plant species appropriate for phytotoxicity testing. *Pestic. Manage. Sci.* 65, 19-26.
- Wong M.H., Cheung Y.H. y Cheung C.L. (1983). The effects of ammonia and ethylene oxide in animal manure and sewage sludge on the seed germination and root elongation of *Brassica parachinensis*. *Environ. Pollut. Ser. A.* 30, 109-123.