

UTILIZACION DE *LACTUCA SATIVA* Y *PANAGRELLUS REDIVIVUS* PARA EL ESTUDIO ECOTOXICOLOGICO DE LOS RIOS SALADO Y NEGRO (CHACO, ARGENTINA).

Alicia S. POI de NEIFF⁽¹⁾ y Abel O. RAMOS⁽¹⁾

RESUMEN: Los ríos Salado y Negro corren por la planicie del Chaco Oriental. El primero atraviesa campos naturales usados para la ganadería donde la ocupación humana es baja. El segundo, un afluente del río Paraná altamente poblado, recibe efluentes urbanos e industriales. La inundación en la región es distintivamente estacional dependiendo de las lluvias de verano. En aguas bajas ambos ríos tienden a ser poco profundos y la concentración salina aumenta. En este estudio usamos bioensayos con *Lactuca sativa* y *Panagrellus redivivus* para determinar la toxicidad de los sedimentos y del agua de ambos ríos durante aguas altas y bajas. El bioensayo con lechuga está basado en la habilidad de las semillas para germinar y producir raíces al entrar en contacto con la solución problema. En el ensayo con nemátodos, el crecimiento y desarrollo de los organismos es lento o se detiene bajo condiciones adversas del medio. En Puerto Tirol (río Negro) hubo decrecimiento de la maduración de los nemátodos y de la elongación de la raíz respecto del control (efectos subletales) usando agua sin tratamiento, extracto de sedimentos y agua concentrada (5 veces). En el río Salado los efectos subletales fueron medidos sólo en la fase de aguas bajas usando agua concentrada y extracto de sedimentos. Se discute la utilidad de ambos bioensayos en ríos que presentan fases de aguas bajas con alta salinidad.

ABSTRACT: Use of *Lactuca sativa* and *Panagrellus redivivus* for the ecotoxicological study of Salado and Negro rivers (Chaco, Argentine).

The Salado and Negro rivers run along the flatland of eastern Chaco. The first crosses natural field used for livestock, where the human occupation is low. The second, a highly populated affluent of the Paraná River, receives urban and industrial effluents in the lower stretch. Flooding in the region is distinctly seasonal depending on summer rains. At low water both rivers tend to be shallow and salinity concentration increase. In this study we use *Lactuca sativa* and *Panagrellus redivivus* bioassays in order to assess both water and sediment toxicity during low and high water phases of Salado and Negro rivers. Lettuce test is based on the ability of seeds to germinate and produce a root when placed in contact with the testing solution. The basis of the nematode test is that under adverse conditions the growth and development of the nematode slow or stop. At Puerto Tirol (Negro River) there were decrease in the nematode maturation and in the root elongation respect to control (sublethal effects) during low and high water phases using water directly without modification, sediment extracts and concentrate water sample (5 X). At Salado River sublethal effects was only measured during low water phase using concentrate water and sediment extracts. The usefulness of both bioassays in rivers that have low water phase with high salinity are discussed.

Palabras claves: Bioensayos, toxicidad, ríos subtropicales, Chaco.

Key words: Bioassays, toxicity, subtropical rivers, Chaco.

INTRODUCCIÓN

Los ríos Negro y Salado atraviesan la planicie del Chaco Oriental separados por pocos kilómetros para desembocar en el río Paraná. Ambos tienen marcadas fluctuaciones de caudal dependiendo de las lluvias en la cuenca y elevada salinidad durante la fase de aguas bajas.

(1) Area Ecología. Asignatura Limnología. FACENA (UNNE) y CECOAL (CONICET). C.C. 291 (3400) Corrientes, Argentina.

La actividad en la cuenca del Salado está basada en ganadería sobre pasturas naturales siendo la agricultura secundaria. El tramo bajo del río Negro recibe efluentes industriales y domésticos provenientes de la ciudad de Resistencia ubicada en sus márgenes. Durante los años lluviosos el excedente de agua que recibe el río Negro es derivado al Salado para evitar inundaciones en el Gran Resistencia. Esta alternativa puede producir la dispersión de los contaminantes en la cuenca del Salado.

En este trabajo se evaluó la toxicidad del agua (directamente sin modificaciones y concentrada 5 veces) y de los sedimentos de ambos cursos de agua en diferentes períodos hidrológicos utilizando como especies diagnóstico a *Lactuca sativa* (lechuga) y *Panagrellus redivivus* (nemátodos).

Las semillas de *L. sativa*, se utilizan en los ensayos de toxicidad por recomendación de la EPA (EPA/600/3-88/029) y de la OECD (1984). Después de 96 horas se puede medir el efecto letal y subletal sobre la germinación y la elongación de la raíz.

P. redivivus tiene un ciclo de vida corto (entre 6 y 7 días) y los adultos alcanzan un tamaño comprendido entre 750 y 1000 μm . Esta especie tiene poca variabilidad genética debida a la endogamia usando la técnica estandarizada (Samoiloff *et al.*, 1980). En un período de 96 horas los recién nacidos (J_2) crecen a estado adulto pasando por estadios intermedios J_3 y J_4 los que pueden ser identificados por su categoría de tamaño. Mediante el monitoreo de una población de 100 animales en estado J_2 se puede medir tanto el efecto letal (porcentaje de supervivencia) como subletal (porcentaje de maduración) de la muestra testada respecto del control (Samoiloff, 1990).

Existen estudios ecotoxicológicos para el río Reconquista (Buenos Aires, Argentina) donde se utilizaron bioensayos con embriones de anfibios (Herkovits y Perez-Coll 1993; Herkovits *et al.*, 1996 y 1997) para medir toxicidad aguda y crónica. En el citado río se estudió también el efecto de distintas concentraciones de Zinc (Loez *et al.*, 1995) sobre la estructura y crecimiento de las algas. A nivel regional se aplicaron bioensayos con microalgas como especie diagnóstico para medir la respuesta en una laguna afectada por efluentes textiles (Asselborn y Zalokar, 2000). No se registran antecedentes para los ríos del nordeste de Argentina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras utilizadas en los bioensayos fueron colectadas en el río Salado en su intersección con la ruta 11 ($27^{\circ}32'06''\text{S}-59^{\circ}13'15''\text{W}$), en el río Negro en las cercanías de la ruta 16 ($27^{\circ}13'06''\text{S}-59^{\circ}13'15''\text{W}$) y en la localidad de Puerto Tirol ($27^{\circ}22'25''\text{S}-59^{\circ}05'06''\text{W}$) en diferentes periodos hidrológicos.

Los sedimentos superficiales del fondo del río fueron extraídos con una draga tipo Mud-Snapper y el agua fue colectada a 0,5 m de profundidad utilizando botellas horizontales de tipo Van Dorn. La extracción y procesamiento de las muestras se efectuó según Dutka (1988) y Kwan y Dutka (1992). El pH y la conductividad del agua fueron registrados en campo con peachímetro digital Metrohm 604 y conductímetro portátil Corning Checkmate 90, respectivamente. La concentración de aniones y cationes así como la de nitrito, nitrato, amonio y fósforo total fueron medidas de acuerdo a técnicas estandarizadas (APHA; 1995).

El extracto de sedimentos se obtuvo por centrifugación a 10000 rpm durante 20 minutos previa adición de 25 ml de solvente (di metil sulfóxido, Kwan y Dutka, 1992) utilizándose una dilución al 1% para el test de semillas y al 10% para el test de nemátodos. El agua proveniente de los distintos sitios fue utilizada directamente sin modificaciones y concentrada 5 veces con rotavapor a 45°C después de pasar por filtros Whatman GF/C.

En los ensayos con *L. sativa* (variedad great lakes 366) se colocaron 20 semillas en cada caja de Petri acondicionadas sobre papel de filtro (Whatman N°3) a las que se le agregaron 5,5 ml de la muestra o igual cantidad de agua destilada, en las usadas como control negativo de toxicidad. Se efectuaron además controles positivos para toxicidad con cloruro de cadmio en distintas concentraciones (10, 100 y 200 ppm), con metanol y con dimetilsulfóxido. Después de incubar las cajas a 22°C en oscuridad durante 96 horas se contó el número de semillas germinadas y se midió la longitud de las raíces. Se consideraron no tóxicas a las muestras en las cuales germinaron más del 90% respecto del control con agua destilada, tóxicas a las que presentaban valores comprendidos entre 75% y 90% y muy tóxicas a las que tenían menos del 75% de germinación respecto del control. La inhibición de elongación de la raíz (*El*) se calculó dividiendo la elongación promedio (n=20) en la muestra menos la elongación promedio en el control sobre la elongación promedio del control con agua destilada.

El = 0 indica que la muestra no presenta toxicidad aguda. Si *El* da un valor negativo hay inhibición de la elongación de la raíz y la muestra es considerada tóxica. Valores positivos de *El* superiores a 0 indican estimulación de la elongación de la raíz.

En los bioensayos con *P. redivivus* se utilizaron nemátodos recién nacidos (*J*₂) de hembras grávidas y colocados en solución reguladora con micropipetas. Por cada muestra se utilizaron 10 recipientes de fondo aplanado y 2,5 ml de capacidad. A cada recipiente se transfirieron 10 *J*₂ y se agregó 0,5 ml de la muestra diluida en medio de crecimiento o de los control positivos de toxicidad diluidos en el mismo medio. El control negativo para toxicidad se realiza colocando en los recipientes 0,5 ml del medio de crecimiento (Levadura, agua destilada, cloruro de sodio, sulfato de magnesio, fosfato monobásico de potasio y fosfato dibásico de sodio). Transcurridas 96 horas se evalúa el porcentaje de organismos vivos en la población expuesta a un tratamiento determinado respecto del control (supervivencia) y el porcentaje de organismos *J*₄, de la población expuesta, que llegan a estado adulto (maduración). Esto implica la medición de 100 nemátodos por muestra. Se consideran tóxicas a las muestras con porcentaje de maduración menor de 60% respecto del control con agua destilada. El bioensayo con nemátodos no es sensible para supervivencia pero es muy sensible para testar efectos subetales. Los registros de supervivencia resultan de importancia para verificar la validez del bioensayo.

RESULTADOS

La conductividad eléctrica y la salinidad de los ríos estudiados fue elevada durante la fase de aguas bajas (*E*₁, *E*₃ y *E*₅, Tabla 1) y los iones sulfato, cloruro y sodio fueron dominantes. En aguas altas la salinidad disminuye y aumenta la proporción de bicarbonato (*E*₂, *E*₄ y *E*₆, Tabla 1). Comparativamente la concentración de fósforo total

fue más elevada en aguas bajas que en aguas altas. El pH del agua utilizada en los bioensayos fue ligeramente ácida o neutra en la mayoría de las muestras (Tabla 1) excepto en E₁.

Tabla 1: Características físicas y químicas del agua del agua.

	E ₁	E ₂	E ₃	E ₄	E ₅	E ₆
pH	8,2	6,2	7,5	6,9	6,2	6,15
Bicarbonato (HCO ₃ ⁻ , mg.l ⁻¹)	77,0	28,7	156,4	58,8	164,0	40,0
Cloruro (Cl ⁻ , mg.l ⁻¹)	372,0	23,0	156,0	12,0	189,0	11,0
Sulfato (SO ₄ ⁼ , mg.l ⁻¹)	936,0	40,0	218,0	27,0	500,0	24,0
Calcio (Ca ⁺⁺ , mg.l ⁻¹)	69,0	1,4	38,0	3,3	32,0	1,6
Magnesio (Mg ⁺⁺ , mg.l ⁻¹)	0,1	2,2	0,2	2,4	13,0	1,8
Sodio (Na ⁺ , mg.l ⁻¹)	540,0	31,0	244,0	23,0	265,5	16,0
Potasio (K ⁺ , mg.l ⁻¹)	20,3	9,0	22,8	9,7	88,0	10,0
Nitrato y nitrito [N-(NO ₃ +NO ₂), μg.l ⁻¹]	5,2	60	15	45	n.d.	65
Amonio [(N-NH ₄) ⁺ , μg.l ⁻¹]	22	40	40	n.d.	n.d.	20
Fósforo total (μg.l ⁻¹)	410	260	1050	550	3000	480
Conductividad (μS.cm ⁻¹)	2200	145	1050	125	1600	88

Referencias:

E₁:Río Salado en aguas bajas, E₂: Río Salado en aguas altas, E₃: Río Negro (cruce Ruta 16) en aguas bajas, E₄: Río Negro (cruce Ruta 16) en aguas altas, E₅: Río Negro (Puerto Tirol) en aguas bajas, E₆: Río Negro (Puerto Tirol) en aguas altas.

Utilizando agua sin ningún tratamiento sólo se registró toxicidad en las muestras provenientes de Puerto Tirol (Tabla 2, E₅ y E₆) cuando se midió la elongación de la raíz de *L. sativa* y la maduración de *P. redivivus*. En estos bioensayos no se registró disminución en la germinación de las semillas ni en la supervivencia de los nemátodos lo que indica ausencia de efecto letal. En los ensayos E₁, E₂ y E₃ (Tabla 2) hubo mayor crecimiento de la radícula respecto del control (estimulación) debido a la disponibilidad de nutrientes en el agua.

Utilizando el extracto de los sedimentos se detectó toxicidad en el mismo sitio (Puerto Tirol) resultando muy tóxicas con ambos bioensayos la muestra obtenida en aguas bajas (Tabla 2, E₅). También fueron positivos para toxicidad los ensayos realizados con nemátodos durante la fase de aguas bajas en el río Negro en su intercepción con la ruta 16 y en el río Salado (Tabla 2, E₁ y E₃). La ausencia en la maduración de los nemátodos indica la incapacidad de éstos para usar su información genética ante la presencia de alguna sustancia tóxica en la muestra.

Tabla 2: Porcentaje de germinación (A) y elongación relativa de la raíz (B) de *Lactuca sativa* y porcentaje de supervivencia (C) y de maduración (D) de *Panagrellus redivivus* en las muestras de agua sin tratamiento, en el extracto de sedimento y en el agua concentrada 5 veces.

Agua sin tratamiento	% de germinación respecto del control (A)	Elongación relativa de la raíz respecto del control (B)	% de supervivencia respecto del control (C)	% de maduración respecto del control (D)
E ₁	100 nd	0,25 est	100 nd	88,8 nd
E ₁	93 nd	1,15 est	91 nd	63,4 nd
E ₂	100 nd	0,35 est	100 nd	93,7 nd
E ₂	90 nd	1,36 est	100 nd	98,0 nd
E ₃	97 nd	0,28 est	100 nd	99,7 nd
E ₃	113 nd	0,12 est	100 nd	75,5 nd
E ₄	100 nd	0 nd	93 nd	78,8 nd
E ₄	100 nd	0 nd	100 nd	92,0 nd
E ₅	80 T	-0,60 T	95 nd	30,1 T
E ₆	95 nd	-0,13 T	100 nd	59,7 T
Extracto de sedimentos				
E ₁	100 nd	0,04 est	100 nd	56,8 T
E ₁	113 est	0,57 est	94 nd	33,6 T
E ₂	100 nd	0,44 est	100 nd	87,9 nd
E ₂	100 nd	0,54 est	100 nd	89,8 nd
E ₃	90 nd	0,06 est	95 nd	46,0 T
E ₃	92 nd	0,25 est	97 nd	67,0 nd
E ₄	93 nd	0,12 est	100 nd	76,5 nd
E ₄	100 nd	0,46 est	100 nd	84,0 nd
E ₅	66 T	-0,47 T	100 nd	0 T
E ₆	95 nd	-0,18 T	100 nd	52,3 T
Concentrada 5 veces				
E ₁	86,6 T	-0,34 T	100 nd	53,4 T
E ₁	73,3 T	-0,60 T	100 nd	39,6 T
E ₂	95,0 nd	0,03 nd	100 nd	88,7 nd
E ₂	95,0 nd	0,14 nd	100 nd	85,8 nd
E ₃	75,0 T	-0,60 T	100 nd	45,9 T
E ₃	75,0 T	-0,77 T	90 nd	58,2 T
E ₄	95,0 nd	0 nd	100 nd	79,3 nd
E ₄	95,0 nd	0 nd	100 nd	62,5 nd
E ₅	35,0 T	-0,79 T	100 nd	0 T
E ₆	90,0 nd	-0,29 T	100 nd	54,8 T

Referencias: est= estimulación, T= tóxica, nd= no detectado.

Utilizando agua concentrada 5 veces se registra toxicidad en el río Salado en aguas bajas (E₁), en el río Negro en la intersección con la ruta 16 en aguas bajas (E₃) y en Puerto Tirol en ambos períodos hidrológicos (E₅ y E₆). En este sitio los resultados del test de nemátodos fueron semejantes a los obtenidos utilizando agua extraída de los

sedimentos pero la disminución en el porcentaje de germinación de las semillas en aguas bajas fue mayor (Tabla 2).

CONCLUSIONES

Las muestras provenientes de Puerto Tirol resultaron tóxicas en ambas fases hidrológicas y en todos los tratamientos. En esta localidad operaban industrias tanínicas que al momento de realizarse los muestreos vertían los efluentes al río Negro. En el período octubre 1992 -1997 se midieron en el efluente de Puerto Tirol concentraciones de tanino de hasta 8000 mg.l⁻¹ (Ruberto, 1999) lo que representó hasta 100 mg.l⁻¹ en el curso del río. Estos datos son muy significativos debido a la baja capacidad de dilución del río Negro en Puerto Tirol si se tiene en cuenta las oscilaciones de caudal (entre 0,18 y 117,8 m³.s⁻¹) durante el período 1992-1997 (Ruberto, 1999).

En los restantes sitios se detectó toxicidad en aguas bajas con el extracto de sedimentos utilizando como especie test *P. redivivus* y con el agua concentrada 5 veces en ambos bioensayos. Estos resultados indican que, valores de conductividad eléctrica superiores a 5000 $\mu\text{S cm}^{-1}$ resultan tóxicos para las especies utilizadas en este trabajo.

En estos ríos la utilización de bioensayos de toxicidad deberían realizarse en ambas fases del hidroperíodo para poder descartar el efecto de la elevada salinidad sobre el crecimiento de la raíz y la maduración de los nemátodos. En el Salado y otros ríos del Chaco Oriental se registran especies autóctonas eurihalinas que alcanzan elevada densidad (Poi de Neiff, 1990; Poi de Neiff *et al.*, 2001) en condiciones extremas de salinidad (19 g.l⁻¹). La selección de algunas de estas especies tendría ventajas para el diagnóstico de la contaminación en aguas bajas cuando se produce la concentración de sales y de las posibles sustancias tóxicas.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Bernard Dutka (National Water Research Institute, Ontario, Canadá) por facilitarnos la cepa de nemátodos utilizada en los bioensayos. Al Dr. R. Mc Innis (National Water Research Institute) por el asesoramiento en la implementación de los cultivos y en los procedimientos para la utilización de *P. redivivus*.

REFERENCIAS

- ASSELBORN V.M. y Y. ZALOKAR de DOMITROVIC, 2000. Aplicación de bioensayos algales uniespecíficos para evaluar los efectos de un efluente textil y la calidad del agua de una laguna receptora (Corrientes, Argentina). Pp. 353-364. En: Espíndola *et al.* (eds.): *Ecotoxicología, perspectiva para o Século XXI*. Universidad de San Carlos, Brasil.
- APHA, AWWA, WEF, 1995. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 19° Edition. Eaton, A.D., L.S. Clesceri y A.E. Greengerg (Eds). Washington DC.

- DUTKA, B.J., 1988. *Methods for microbiological and toxicological analysis of water, wastewater and sediment*. Dep. of Environment River Research Branch. National Water Res. Institute, Burlington, Ontario. Canadá.
- EPA/600/3-88/029, 1989. Protocols for short term toxicity screening of hazardous waste sites. *US Environmental Protection Agency*, Corvallis: 84-93.
- HERKOVITS, J. y C. PÉREZ-COLL, 1993. Stage dependent susceptibility to Cadmium on *Bufo arenarum* embryos. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 50: 608-611.
- HERKOVITS, J., C. PÉREZ-COLL y F.D. HERKOVITS, 1996. Ecotoxicity in the Reconquista River, Province of Buenos Aires, Argentina. A preliminary Study. *Environmental Health Perspectives*, 104 (2):186-189.
- HERKOVITS, J., F. HERKOVITS y C. PÉREZ-COLL, 1997. Identification of Aluminum toxicity and Aluminum-Zinc interaction in amphibian *Bufo arenarum* embryos. *Environmental Sciences*, 5 (1): 57-64.
- KWAN, K.K. y B.J. DUTKA, 1990. Simple two-step sediment extraction procedure for use in genotoxicity and toxicity bioassays. *Toxicity Assessment: Ann. International Journal*, 5: 395-404.
- LOEZ, C.A., M.L. TOPALIÁN y A. SALIBIÁN, 1995. Effects of Zinc on the structure and growth dynamics of a natural freshwater phytoplankton assemblage reared in the laboratory. *Environmental Pollution*, 88: 275-281.
- OECD, 1984. Guideline 208 for testing chemicals: terrestrial plant, growth test.
- POI de NEIFF, A., 1990. Categorización funcional de los invertebrados en ríos de llanura del Chaco Oriental (Argentina). *Rev. Brasil. Biol.*, 50 (4): 875-882.
- POI de NEIFF, A., Y. ZALOCAR de DOMITROVIC, S.M. FRUTOS de GUTIERREZ y V. ASSELBORN, 2001. Características limnológicas del río Salado (Chaco, Argentina) en condiciones extremas de salinidad. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas*. Universidad Nacional del Nordeste (resúmenes expandidos), 4 p.
- RUBERTO, A., 1999. Hidroquímica en la cuenca inferior del río Negro (Chaco). Tesis de Maestría. M. en Gestión Ambiental y Ecología. Facultad de Arquitectura y Urbanismo. Universidad Nacional del Nordeste. 37 pp. y Anexos.
- SAMOILOFF, M.R., 1990. The nematode toxicity assay using *Panagrellus redivivus*. *Tox. Assess*, 5: 309-318.
- SAMOILOFF, M.R., S. SCHULZ, Y. JORDAN, K. DENICH y E. ARNOTT, 1980. A rapid simple long-term toxicity assay for aquatic contaminants using the nematode *Panagrellus redivivus*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 37: 1167-1174.

Recibido/Received: Feb-02
Aceptado/Accepted: Jun-2002