

Estandarización de métodos de cultivo y exposición para estudios de biomonitoreo

Gabriel Zeballos¹, Mauricio Zaballa Romero², A. De la Rocha³, M. Cuadros⁴, Susana Del Granado⁵, Rafael Anze⁶ & Margot Franken⁷.

Unidad de Calidad Ambiental, Instituto de Ecología, Universidad Mayor de San Andrés,
La Paz, Bolivia

e-mail: gabriel_zeballos@gmx.de

Resumen

En el presente trabajo se sintetizan las experiencias obtenidas para el rediseño y adecuación de métodos estandarizados para el cultivo y exposición controlada de *Lolium multiflorum*, *Raphanus sativus*, *Tradescantia pallida* y *Vicia faba* con el objeto de utilizarlos como bioindicadores activos de calidad del aire en las ciudades de La Paz y El Alto.

Palabras clave: biomonitoreo, estandarización de métodos de bioindicación, Bolivia, bioindicadores, *Lolium multiflorum*, *Tradescantia pallida*, *Raphanus sativus*, *Vicia faba*, VDI, cultivo, exposición, protocolo..

1 Información General

El uso de bioindicadores para medir los efectos de la contaminación atmosférica es un pilar en la gestión de la calidad ambiental [24], y es una alternativa para el monitoreo del riesgo que la contaminación ambiental viene causando a la salud de la población humana y de los ecosistemas [24][11]. Los múltiples métodos de bioindicación han sido

¹ Tesista de la Carrera de Biología, Unidad de Calidad Ambiental, Universidad Mayor de San Andrés, La Paz, Bolivia. E-mail: gabriel_zeballos@gmx.de

² Investigador Asociado de la Unidad de Calidad Ambiental del Instituto de Ecología de la Universidad Mayor de San Andrés, La Paz, Bolivia. E-mail: mzaballa@gmail.com

³ Tesista de la Carrera de Biología, Unidad de Calidad Ambiental, Universidad Mayor de San Andrés, La Paz, Bolivia. E-mail: amdela-rocha@gmail.com

⁴ Tesista de la Carrera de Biología, Unidad de Calidad Ambiental, Universidad Mayor de San Andrés, La Paz, Bolivia. E-mail: mangiex@gmail.com

⁵ Investigadora Asociada, Unidad de Calidad Ambiental del Instituto de Ecología, Universidad Mayor de San Andrés, La Paz, Bolivia. E-mail: susanadgp@yahoo.com

⁶ Investigador Asociado de la Unidad de Calidad Ambiental del Instituto de Ecología de la Universidad Mayor de San Andrés, La Paz, Bolivia. E-mail: rafael_anze@simbiosis.com.bo

⁷ Docente Investigadora de la Unidad de Calidad Ambiental del Instituto de Ecología de la Universidad Mayor de San Andrés, La Paz, Bolivia. E-mail: mvfranken@yahoo.com

desarrollados a lo largo de las últimas décadas para obtener información acerca de las condiciones de los ecosistemas, la identificación de los contaminantes, de los daños que causan, y de los responsables [6] [24]. Estos métodos han sido elaborados en países industrializados, de regiones templadas, dentro del contexto de su propia realidad, de su biodiversidad y de sus limitaciones económicas y sociales.

Actualmente los países con economías en desarrollo, en particular aquellos de regiones tropicales y subtropicales, experimentan un incremento de las actividades industriales y un aumento acelerado de tráfico vehicular. Tal es el caso de las ciudades de La Paz y El Alto [5]. Pese a esto, los mecanismos tecnológicos de reducción, degradación y mitigación de las emisiones de contaminantes son aún demasiado costosos de implementar y en algunos casos tampoco se cuenta con regulaciones legales ni con mecanismos efectivos de control. Sin embargo, en nuestro medio, la evaluación de los daños y efectos de los contaminantes puede ser realizada a través del uso de bioindicadores [12][11][19][3].

La aplicación de los métodos de bioindicación en un principio viene acompañada de una serie de dificultades en cuanto al cultivo y cuidado de las plantas. Las variaciones climáticas extremas, las deficiencias nutricionales y el ataque de parásitos se consideran los principales problemas [11][3]. Por esta razón, en el proceso de selección de los bioindicadores es mejor tomar en cuenta con preferencia a aquellos que ya estén aclimatados al área de estudio [20][3].

Las ciudades de El Alto y La Paz se encuentran en la región tropical, una al lado de la otra, en una altiplanicie y un valle, de orientación norte-sur, respectivamente, desde 4.000 hasta 3.200 m.s.n.m., y presenta 6 subcuencas principales. Ocupan tres pisos ecológicos, puna, prepuna y valle seco interandino, y su morfología incluye altiplano, quebradas, planicies abiertas, valles bajos, valles altos, mesetas, corredores y serranías [3][7][15], al sureste y en forma paralela se extiende el valle de Achocalla, cuya cuenca se conecta con la de La Paz en el sur [15].

En La Paz se aplican métodos de bioindicación atmosférica desde 1992, y desde entonces se han realizado varias evaluaciones de los efectos de la contaminación del aire incluyendo la adecuación y estandarización de métodos [8][10][9][18][2]. A partir de 2001 y de 2004, los gobiernos municipales de las ciudades de El Alto y de La Paz, respectivamente, operan la “Red de Monitoreo de la Calidad del Aire” (Red MoniCA). Esta Red monitorea las concentraciones de Ozono troposférico (O_3), óxidos de Nitrógeno (NO_x) con tubos pasivos, y Material Particulado en suspensión de diámetro aerodinámico menor a 10 micrómetros (PM_{10}). Actualmente se implementa un biomonitoreo en los puntos de la existente Red MoniCA utilizando: a) *Lolium multiflorum*, para el análisis de bioacumulación de metales pesados en hojas [21], b) *Tradescantia pallida*, para la evaluación de los efectos genotóxicos de los contaminantes a través del test de micronúcleos en células madre de pólenes [11][27][17][16], c) *Vicia faba* para el estudio de los efectos de la contaminación por ozono [1] y d) *Raphanus sativus* para el estudio de los efectos de todos los contaminantes en general [13].

En el presente artículo se reúne la información, sobre la estandarización y el establecimiento de los métodos activos de bioindicación atmosférica, tomando en cuenta las condiciones de trabajo existentes en el país.

2 Experiencias en bioindicación activa

En los trabajos de Anze [2][5] y Del Granado [9] se emplearon métodos de bioindicación activa, que estuvieron basados en los lineamientos de la Asociación Alemana de Ingenieros (VDI, por sus siglas en alemán) [26][25][24][21]. En el primer estudio Anze midió el efecto de la contaminación atmosférica sobre tres especies de líquenes propias del valle de La Paz. Se evaluaron los síntomas visibles como ser los cambios de coloración, de crecimiento y fisiológicos, como la variación en la respiración después de la exposición. Por otra parte, Del Granado [9] realizó una evaluación de la calidad del aire en la ciudad de La Paz aplicando el cultivo estandarizado de gramíneas con *Lolium multiflorum* cv. Lema. Este trabajo tuvo como objetivo medir: a) la feofitinización de la clorofila por efecto del SO₂; y b) medir la bioacumulación de plomo y cadmio en las hojas de la planta. Catorce sitios en la ciudad de La Paz fueron escogidos y categorizados según el tipo de tráfico vehicular y la proximidad a industrias.

3 Métodos de bioindicación aplicables en la ciudad de La Paz

3.1 Acumulación de metales pesados en *Lolium multiflorum*

Lolium multiflorum (Familia Graminae) es utilizado por la VDI como bioacumulador de metales pesados [26][25][24][21]. El método también es aplicable en la ciudad de La Paz al haber sido estandarizado y aplicado por Del Granado [9].

El cultivo de *Lolium multiflorum* cv. Lema se describe en los lineamientos de la VDI 3957-parte 2 [26]. El sustrato recomendado es el de tierra tipo 0, que no tiene nutrientes, y es fertilizado con KH₂PO₄, KNO₃ y NH₄NO₃. La duración de la exposición es de dos a cuatro semanas, posteriormente se realiza un análisis de los metales pesados acumulados en sus hojas.

3.2 Test de micronúcleos en *Tradescantia*, Trad-MCN

Este test se utiliza para evaluar el efecto genotóxico del ambiente. El ensayo se basa en el registro de micronúcleos en las tétradas de las células madre de los pólenes de varios clones y especies de *Tradescantia* (Familia *Commelinaceae*). Los micronúcleos se forman por la quiebra de cromosomas provocada por distintas sustancias mutagénicas durante la meiosis [12]. La frecuencia de formación de micronúcleos representa una medida del potencial genotóxico del ambiente [17][12]. El test fue desarrollado principalmente por Ma [12], y es ahora empleado mundialmente para la evaluación de agentes químicos, de radiación, aguas residuales y contaminación atmosférica [17].

La especie *Tradescantia pallida* (Rose) Hunt. cv. purpurea Boom también es aplicable para el método Trad-MCN [20]. Esta planta, originaria de México y Centroamérica [11],

ha sido introducida en nuestro medio como planta ornamental. El cultivo se realiza en un sustrato estandarizado con o sin fertilización [14][27]. La exposición del clon 4430 de *Tradescantia* se realiza en esquejes, por el lapso de 30 horas, en solución de Hoagland (1:3) [27]. *T. pallida*, por su parte, se expone durante 3 a 5 meses en macetas con tierra estandarizada [11].

3.3 Evaluación de efectos del ozono en *Vicia faba*

Vicia faba (Familia *Leguminosae*) es utilizada para evaluar efectos de SO₂ y O₃ [1]. Los parámetros que indican la presencia de estos gases son tanto de reacción visible como aquellos de cambios fisiológicos, bioquímicos y de crecimiento: daño foliar, tasa de transpiración, producción y alteración de pigmentos fotosintéticos, metabolitos, enzimas y biomasa. Entre los daños visibles más característicos se hallan la aparición de manchas cloróticas y necróticas de forma irregular en la superficie foliar, la disminución de la tasa de crecimiento, y de biomasa. *Vicia faba* es un buen indicador de contaminación debido a su alto requerimiento de humedad, lo que genera una apertura de los estomas que permite un mayor ingreso de los contaminantes atmosféricos en el cuerpo de la planta [1].

Vicia faba var. major (ecotipo usnayo) ha sido escogida como biomonitor de contaminación para la Red MoniCA por ser nativa de los Andes y porque es ampliamente cultivada en la región.

3.4 Evaluación de efectos de la contaminación en *Raphanus sativus*

Raphanus sativus (Familia *Brassicaceae*) al ser expuesto a contaminantes, sufre cambios morfológicos y fisiológicos. El estudio con esta planta se basa en mediciones del tamaño de hojas, hipocótilo y raíces, además de estimación de la biomasa, que es el mayor bioindicador de contaminación para rábano [13].

R. sativus L. cv. "Cherry Belle" es utilizada como bioindicador de estrés ambiental, particularmente de contaminantes atmosféricos. Esta planta tiene características inmejorables de un biomonitor, como por ejemplo un ciclo de crecimiento entre 30 a 34 días, una rápida aclimatación a distintas duraciones del día y de la noche, un tamaño pequeño, que permite numerosos tratamientos y/o réplicas, un número limitado de hojas con formas bastante regulares y una distribución de biomasa distinta entre el vástago y el órgano de almacenamiento, formando un patrón claro de partición entre fuente y sumidero [13]. Su sensibilidad a O₃, SO₂ y NO₂ está reconocida [13].

4 Resultados y Discusión

4.1 Adaptación de protocolos VDI

Como base para la estandarización del cultivo, la exposición de las plantas bioindicadoras y el procesamiento de los resultados se usan los protocolos de la VDI (Asociación Alemana de Ingenieros) debido a su amplia experiencia, su base experimental y precisión. Como estas normas fueron desarrolladas en un país desarrollado con clima templado, los protocolos deben ser adaptados a las condiciones

de Bolivia. A continuación se desarrollan los principales problemas existentes para la aplicación de estos métodos.

4.1.1 Material Vegetal

Una de las primeras limitantes que suele presentarse al momento de aplicarse métodos internacionales de bioindicación, es la adquisición del material vegetal certificado. Las semillas de algunas plantas bioindicadoras pueden ser importadas y cultivadas en viveros e invernaderos para tener disponibilidad continua de las mismas. Sin embargo, si esta alternativa no es factible, entonces se debe conseguir especies con características similares y que crezcan en el área de estudio. En el estudio con líquenes de Anze [4] se consiguieron especies de los alrededores de una laguna en un valle contiguo al valle de la ciudad de La Paz. Los líquenes escogidos tuvieron las mismas características morfológicas que las de las especies especificadas en los protocolos de la VDI 3799-parte 2 [24]. Los líquenes fueron sometidos por seis meses a un proceso de adaptación en Cota Cota, barrio de la zona Sur con baja concentración de contaminantes [8][9][10][18][28][5].

Para nuestra Red de Biomonitorio se buscaron semillas orgánicas certificadas. Se consiguieron semillas de *Vicia faba var. major* (ecotipo) certificadas en La Paz. *Lolium multiflorum cv. Lema* es recomendada por la VDI 3957-parte 2 [26], y es importada directamente desde la empresa especificada en el protocolo VDI 3957-parte 2 [25]. *Raphanus sativus* variedad Cherry Belle, es recomendada como bioindicador por Kostka-Rick [13] por su sensibilidad frente a contaminantes atmosféricos y su pequeño tamaño; también es importada desde Estados Unidos porque en el país sólo se consiguen semillas tratadas con pesticidas a base de mercurio. Los individuos de *Tradescantia pallida* fueron obtenidos en un jardín de la ciudad. Una vez identificada la especie se procedió a la propagación asexual de las plantas madre; esta especie fue avalada como bioindicadora en São Paulo [20].

4.1.2 Cultivo

Las plantas que son biomonitores de la red MoniCA de El Alto y La Paz se cultivan en la zona de Achocalla, asumiendo que este valle presenta escasa contaminación atmosférica. Por otro lado, se encuentra en una altitud intermedia de 3.800 m.s.n.m., entre los puntos de exposición seleccionados para las dos ciudades, 3.400 y 4.000 m.s.n.m. Esto garantiza la adaptación de las plantas a los climas respectivos y sobretodo a la amplia oscilación diurna de la temperatura. El cultivo debe realizarse en viveros abiertos; de este modo las plantas se adaptan a las condiciones climáticas de la región.

Con respecto al sustrato para el cultivo y la exposición, Del Granado [9] utilizó una mezcla de turba vegetal y arcilla, en una relación volumétrica de 70 y 30% respectivamente. Esta mezcla, carente de nutrientes, corresponde a la tierra tipo 0 que se utiliza en Alemania según los lineamientos VDI [26][25][24]. Tal como lo determina la VDI, se fertilizó el sustrato con KH_2PO_4 , KNO_3 y NH_4NO_3 . Estos compuestos

químicos son costosos en el mercado boliviano, además su importación puede demorar de uno a varios meses. Por otro lado, Del Granado [9] reporta daños a las plantas debido a la aplicación de las soluciones nutritivas. La tierra utilizada por Del Granado no fue apta para otros biomonitores, como fue el caso de *Tradescantia*. Por este motivo, se utilizó como sustrato para el cultivo de los biomonitores a la mezcla usada por los invernaderos del Gobierno Municipal de El Alto, que consta de: 4 volúmenes de tierra negra, 1 de limo, 1 de cascarilla de arroz, 1 de turba vegetal y 1 de abono de vaca. Así se garantiza que el sustrato responda a los diferentes requerimientos de nutrientes por las diferentes plantas y asimismo se aporte la cantidad de nutrientes suficiente para el tiempo de cultivo y exposición. Se preparó un volumen de sustrato suficiente para un año de exposición de los cuatro biomonitores.

Tradescantia pallida se cultiva a partir de esquejes vegetativos de longitud definida, que son plantados y cultivados en las macetas en las que serán expuestos. Las plantas madre, a partir de las cuales se toman los esquejes, deben crecer todas en un espacio único para disminuir la desviación estándar en la línea base de formación de micronúcleos [14].

Vicia faba se desarrolla a partir de semillas, que son sembradas 2 a 3 semanas antes de llevarlas a exposición. El cultivo se realiza en el mismo sustrato y maceta en el que se realizará la exposición, evitando generar estrés en la planta debido a un eventual trasplante.

Raphanus sativus, en cambio, no requiere de un tiempo cultivo previo a la exposición. La siembra de semillas se realiza junto con el inicio de la exposición.

4.1.3 Exposición

Para la exposición de los biomonitores, Del Granado [9] hizo fabricar: 1) macetas con arcilla cocida, tal como lo describe la VDI [21]; y 2) envases plásticos de PVC, para contener el agua de riego semiautomático, siguiendo las mismas medidas que indica la VDI [26][23][21]. En la Red de biomonitoreo, que se implementa en las ciudades de El Alto y La Paz, se utilizan macetas de plástico siguiendo las indicaciones de los últimos protocolos VDI [26][23].

El sistema de riego semiautomático, según la VDI, es realizado con mechas de fibra de vidrio, que al no existir este material en el mercado boliviano, fue adaptado con mechas de poliéster [9]. Debido a que el poliéster no se sumerge fácilmente en el agua, Del Granado [9] ató las mechas a pequeños cilindros de PVC para mantenerlas siempre sumergidas en el fondo del envase. En el Instituto de Botánica de São Paulo, Brasil, se utiliza exitosamente sogas tipo Perlón. Por lo tanto, este tipo de sogas fueron implementadas para la Red de Biomonitoreo.

La altura de los expositores se definió a 3 m sobre el suelo, en vez de 1,5 m, como se indica en los métodos internacionales [22]. Esta decisión se debe principalmente a razones de seguridad.

Se han diseñado techos de red de semisombra con el fin de proteger a las plantas de la radiación ultravioleta, que es de mayor intensidad en ciudades de altura. La VDI recomienda este tipo de protección únicamente para la exposición de *Tradescantia*.

4.1.4 Formato de los protocolos

Se elaboraron protocolos estandarizados de cultivo, exposición y análisis de laboratorio para cuatro bioindicadores (*Tradescantia pallida*, *Vicia faba*, *Raphanus sativus* y *Lolium multiflorum*), en base al formato de la organización de Ingenieros Alemanes (VDI), con los siguientes capítulos:

- 1 INTRODUCCIÓN
- 2 BASES DEL PROCEDIMIENTO
 - 2.1 Principio del procedimiento
 - 2.2 Antecedentes
 - 2.3 Aplicabilidad
- 3 CULTIVO DE LAS PLANTAS
 - 3.1 Materiales: Material vegetal, especie, variedad, tipo de semilla, fuente de semillas, sustratos de cultivo, nutrientes, agua de riego (dureza), macetas: forma y tamaño
 - 3.2 Cultivo: Tipo de riego, horas luz, sombra, tiempo de desarrollo, estado óptimo para la exposición, aplicación de nutrientes
 - 3.3 Medidas de Sanidad: Como evitar el ataque de plagas, uso de repelentes naturales, intervalo requerido entre aplicación eventual de pesticidas y exposición.
 - 3.4 Preparación de las plantas para la exposición
- 4 EXPOSICION CONTROLADA
 - 4.1 Diseño Experimental: zonas de muestreo, número de réplicas y controles
 - 4.2 Implementación
 - 4.2.1 Materiales: Soporte de exposición, techos, materiales para el riego automático.
 - 4.2.2 Implementación del equipo: Altura, distancia de los obstáculos, seguridad y orientación
 - 4.2.3 Observaciones durante la exposición (Anexo)
 - 4.2.4 Tiempo de exposición
- 5 MUESTREO Y ANÁLISIS
 - 5.1 Materiales y equipos de laboratorio
 - 5.2 Recolección de Muestra
 - 5.3 Transporte y Almacenamiento de la Muestra
 - 5.4 Preparación para análisis
 - 5.5 Análisis de laboratorio
 - 5.6 Reporte de datos (unidades, cálculos y análisis estadísticos)
 - 5.7 Medidas que aseguran la calidad del análisis (esquejes de plantas sanas, diferencia significativa entre los grupos de la evaluación de los niveles de mutación)
 - 5.8 Evaluación e interpretación de los resultados

5 Consideraciones generales

- a) El formato VDI fue escogido como base para los protocolos, por ser la fuente más detallada y debido a su exitosa aplicación desde hace más de 25 años en los países de Europa.
- b) Los métodos que se aplican en la red de biomonitoreo, a pesar de ser reconocidos y estar estandarizados en varios países desarrollados, requieren de un proceso de adaptación a las condiciones específicas de cada región o país, como es el caso de Bolivia.
- c) Las semillas orgánicas certificadas, libres de pesticidas y genéticamente homogéneas, recomendadas por la bibliografía, son escasas en Bolivia. Por otro lado, falta realizar estudios con las variedades existentes en el país. Por lo que, aún es necesario importar semillas.
- d) Es necesario definir con mayor precisión la mezcla e ingredientes a utilizar para cada biomonitor. Esto permitirá en futuro próximo contar con proveedores de tierra de cultivo estandarizada.

6 Agradecimientos

Los autores agradecen al Instituto de Ecología, a Swisscontact, al personal de la Red MoniCA de los Gobiernos Municipales de El Alto y La Paz que hicieron y hacen posible este estudio.

Referencias

- [1] Agrawal, M. 1985. *Plant factor as indicator of SO₂ and O₃ Pollutants*. Symp. Biomonitoring State Environ: 225- 231.
- [2] Anze, R. 1993. *Ensayos para la utilización de líquenes del valle de La Paz como indicadores de contaminación atmosférica por dióxido de azufre*. Tesis de Licenciatura en Biología. U.M.S.A. La Paz – Bolivia. 10- 89 p.
- [3] Anze, R. 1996. *Propuesta para la implementación de una red de biomonitoreo para contaminación atmosférica en la ciudad de La Paz*. Tesis de Maestría en Ecología y Conservación. U.M.S.A. La Paz-Bolivia.
- [4] Anze, R. 1997. *Líquenes del valle de La Paz como bioindicadores de contaminación atmosférica*. Ecología en Bolivia 28: 65-80.
- [5] Anze, R. 1997. *Evaluación rápida de fuentes de contaminación atmosférica en la ciudad de La Paz*. Ecología en Bolivia 29: 51-70.
- [6] Arndt, U., W. Nobel y B. Schweizer. 1987. *Bioindikatoren: Möglichkeiten, Grenzen und neue Erkenntnisse*. Verlag Eugen Ulmer. Alemania. 378 pp.
- [7] Beck, S. y E. García. 1991. *Flora y vegetación en los diferentes pisos altitudinales*. 65 – 108 pp. En: E. Forno & M. Baudoin (eds). *Historia Natural de un Valle en los Andes: La Paz*. Instituto de Ecología, La Paz.

- [8] Canseco, A. 2004. *Comunidades de líquenes: indicadoras del nivel de calidad del aire en la ciudad de La Paz*. Tesis de Licenciatura. U.M.S.A. La Paz – Bolivia.
- [9] Del Granado, S. 2004. *Evaluación de la calidad del aire en distintos puntos de la ciudad de La Paz, por detección de contaminantes gaseosos (con énfasis en SO₂) y metales pesados (Pb y Cd), utilizando biomonitoreo activo con *Lolium multiflorum* (Graminae) y monitoreo con filtros SAM*. Tesis de Licenciatura, Carrera de Biología, U.M.S.A. La Paz – Bolivia.
- [10] Garrett, A. 2004. *Biomonitoreo pasivo de la contaminación atmosférica por Plomo y Cadmio en la ciudad de La Paz mediante análisis de hojas en *Populus balsamifera* (Salicaceae)*. Tesis de Licenciatura para la carrera de biología. U.M.S.A. La Paz – Bolivia.
- [11] Guimarães, E.T. 2003. *Polução Atmosférica urbana de la cidade de São Paulo e mutagenesis avaliação de riscos utilizando bioindicadores vegetais do genero Tradescantia*. Tesis de Doctorado. Faculdade da Medicina da Universidade de São Paulo. São Paulo – Brasil. 117 pp.
- [12] Klumpp, A., W. Ansel y G. Klumpp (eds). 2004. *Eurobionet, European Network for the Assessment of Air Quality by the Use of Bioindicator Plants, Final report*. University of Hohenheim, Stuttgart. Pp 15-31.
- [13] Kostka-Rick, R., y W. J. Manning. 1993. *Radish (*Raphanus sativus* L.): A model for studying plant responses to air pollutants and other environmental stresses*. Environmental Pollution 82: 107-138
- [14] Lobo, D.-J. 2005. *Manual práctico para utilização de Tradescantia como Biomonitor*. No publicado.
- [15] Lorini, J. 1991. Clima. 27-46 pp. En: Forno E. y M. Baudoin (eds). *Historia natural de un valle de los Andes: La Paz*. Instituto de Ecología UMSA La Paz - Bolivia
- [16] Ma, T.-H. 1979. *Tradescantia Micronuclei (Trad-MCN) Test*. 191-214 pp. En: A. R. Kolber, M. K. Wong, L. D. Grant, R. S. Del Joskin & J. Hughes (Eds.). *In Vitro Toxicity Testing of Environmental Agents. Current and Future Possibilities. Part A: Survey of Test Systems*. Plenum Press. New York and London.
- [17] Ma, T.-H., G.L. Cabrera, R. Chen, B.S. Gill, S.S. Sandhu, A.L. Vandenberg y M.F. Salamone. 1994. *Tradescantia micronucleus bioassay*. Mutation Research 310: 221-230
- [18] Pinto M.R. 2000. *Biomonitoreo de contaminación atmosférica por material particulado en árboles y arbustos ornamentales de la ciudad de La Paz*. Tesis de Licenciatura .U.M.S.A. La Paz – Bolivia.
- [19] Steubing, L., R. Godoy y M. Alberdi. 2001. *Métodos de Ecología Vegetal*. Editorial Universitaria S. A. Santiago de Chile. 243-261 p.
- [20] Suyama, F., E.T. Guimarães, D.-J.A. Lobo, G.S. Rodrigues, M. Domingos, E.S. Alves, HA. Carvalho y P.H.N. Saldiva. 2002. *Pollen mother cells of Tradescantia clone 4430 y Tradescantia pallida var. purpurea are equally sensitive to the clastogenic effects of X-rays*. Brazilian Journal of Medical and Biological Research (2002) 35: 127-129.

-
- [21] VDI. 3792. 1978. *Verfahren der standardisierten Graskultur*. Blatt 1. Beuth Verlag GmbH. Berlin.
- [22] VDI. 3792. 1991. *Measurement of the response dose of ambient lead in plants with standardized grass cultures*. Part 3. Beuth Verlag GmbH. Berlin.
- [23] VDI. 3799. 1991. *Measurement and Evaluation of Phytotoxic Effects of Ambient Air Pollutants (Immissions) with Lichens: Method of Standardized Lichen Exposure*. Part 2. Dusseldorf. 14 p.
- [24] VDI 3957. 1999. *Biologische Messverfahren zur Ermittlung und Beurteilung der Wirkung von Luftverunreinigungen auf Pflanzen (Bioindikation) Grundlagen und Zielsetzung*. Blatt 1. Beuth Verlag GmbH. Berlin.
- [25] VDI 3957. 2001. *Biologische Messverfahren zur Ermittlung und Beurteilung der Wirkung von Luftverunreinigungen auf Pflanze (bioindikation) Verfahren der standardisierten Graskultur*. Borrador. Blatt 2. Beuth Verlag GmbH. Berlin.
- [26] VDI 3957a. 2003. *Biological measuring techniques for the determination and evaluation of effects of air pollutants on plants (bioindication) Method of standardized grass exposure*. Part 2. Beuth Verlag GmbH. Berlin.
- [27] VDI 3957b. 2003. *Tradescantia*. Borrador. Blatt 16. Beuth Verlag GmbH. Berlin.
- [28] Zaballa M. 1999. *Contaminación atmosférica en la ciudad de La Paz por deposición de polvo y metales pesados. Su distribución por el sistema de vientos locales*. Tesis de Licenciatura. U.M.S.A. La Paz - Bolivia. 80- 136 p.