

Evaluación ecotoxicológica de las aguas del refugio de fauna “San Miguel de Parada” mediante los biomodelos *Lactuca sativa* L. y *Artemia* sp. en Santiago de Cuba, Cuba

Ecotoxicology evaluation of the waters of “San Miguel de Parada” fauna refuge through the *Lactuca Sativa* L. and *Artemia* sp. biomodels in Santiago de Cuba, Cuba

Recibido: julio 16 de 2015 | Revisado: agosto 16 de 2015 | Aceptado: setiembre 22 de 2015

YULEIDIS GONZÁLEZ PÉREZ¹
ELIZABETH RODRÍGUEZ LEBLANCH¹
INÉS FERNÁNDEZ RODRÍGUEZ²
GEORGE ARGOTA PÉREZ³

ABSTRACT

During the germination and first days of growth of the plantlet, numerous physiological processes occur in which the presence of a toxic substance can interfere altering the survival and normal development of the plant. Also, the larval statuses of the different species are more susceptible to the effects of environmental contamination. In this study we evaluated the possible toxic effects on the water from five critical points located at Fauna's Refuge San Miguel of Parada from the province of Santiago of Cuba, in lettuce seeds *Lactuca sativa* L and larvae of *Artemia* sp. Once the biological essays were finished, it became evident than in the case of the lettuce there were inhibitory effects on the germination and the growth of the radicle, but not in the growth of the hypo-cotyle, which showed a stimulation regarding the negative control. It was notorious than in the point five there was no germination due to the elevated concentration of salts, which should have made impossible the development of the lettuce plantlets. In relation to the essay with *Artemia*, there a biological behavior marked by an increase in the mortality from points one to four, and an evident survival in the point 5 given its estuary characteristics of high salinity and tolerance from this crustacean to said traits.

Key words: ecotoxicology, fauna's refuge San Miguel of Parada, biomodels, *Lactuca sativa* L., *Artemia* sp., Santiago de Cuba-Cuba

RESUMEN

Durante la germinación y los primeros días de crecimiento de la plántula, ocurren numerosos procesos fisiológicos en los que la presencia de una sustancia tóxica puede interferir alterando la supervivencia y el desarrollo normal del vegetal. Asimismo, los estados larvales de las diferentes especies son más susceptibles a los efectos de la contaminación ambiental. En este estudio se evaluaron los posibles efectos tóxicos de las aguas de cinco puntos críticos ubicados en el Refugio de Fauna San Miguel de Parada de la provincia de Santiago de Cuba, en semillas de lechuga *Lactuca sativa* L. y larvas de *Artemia* sp. Luego de realizados los bioensayos se evidenció que en el caso de la lechuga hubo efectos inhibitorios sobre la germinación y el crecimiento radicular, no así en el crecimiento del hipocotilo el cual mostró una estimulación con respecto al control negativo. Fue notorio que en el punto cinco no hubiera germinación debido a la elevada concentración de sales, las cuales debieron imposibilitar el desarrollo de las plántulas de lechuga. En relación al ensayo con *Artemia* hubo un comportamiento biológico marcado por incremento en la mortalidad en los puntos del uno al cuatro y una supervivencia evidente en el punto cinco dada sus características estuarinas de alta salinidad y la tolerancia de este crustáceo a las mismas.

Palabras clave: ecotoxicología, refugio de fauna San Miguel de Parada, biomodelos, *Lactuca sativa* L., *Artemia* sp, Santiago de Cuba-Cuba

1 Centro de Toxicología y Biomedicina. TOXIMED. Autopista Nacional Km. 11/2. Apartado: 4033 Santiago de Cuba. Código Postal: 90400. Cuba.

Correos electrónicos: yuleidis@toximed.scu.sld.cu; elizabeth@toximed.scu.sld.cu

2 Especialista de Conservación. Empresa Nacional para la Protección de la Flora y la Fauna, Santiago de Cuba. Ave. Los Libertadores N° 101 Esq. Ave. José Martí. Reparto Sorribe. Santiago de Cuba, Cuba. Correo electrónico: ines@ffauna.co.cu

3 Dirección general. Centro de Investigaciones Avanzadas y Formación Superior en Educación, Salud y Medio Ambiente “AMTAWI”. Correo electrónico: george.argota@gmail.com

Introducción

El bioensayo con semillas de lechuga (*Lactuca sativa L.*), es un ensayo estático de toxicidad aguda en el que se evalúan los efectos fitotóxicos de compuestos puros o de una mezcla compleja en el proceso de germinación de las semillas y en el desarrollo de las plántulas durante los primeros días de crecimiento. Como puntos finales para la evaluación de los efectos fitotóxicos, se determina la inhibición en la germinación y la inhibición en la elongación de la radícula y del hipocotilo. La información generada a partir de este ensayo proporciona datos acerca de posible efecto de los contaminantes en las comunidades vegetales cercanas, esta es también una especie interesante de considerar por su importancia desde el punto de vista hortícola. Además es de fácil y rápida germinación, por lo que es posible desarrollar el ensayo en pocos días. El mismo ha sido recomendado y aplicado por diferentes organismos de protección ambiental para la evaluación ecotoxicológica de muestras ambientales y compuestos puros, así como la del efecto fitotóxico de pesticidas sobre especies no blancos, siendo necesarias para el registro de los mismos (OECD, 1984; Wang, 1987; USEPA, 1989).

En el caso de la *Artemia sp.* es un crustáceo que, normalmente, constituye un excelente alimento para los peces en sistemas de acuicultura y ecosistemas marinos naturales resulta un organismo representativo de las cadenas tróficas de estos últimos. Se convierte así en un elemento básico exitosamente empleado en el estudio de los efectos de productos químicos, aguas superficiales y muestras ambientales. Por tanto, el ensayo de toxicidad aguda en *Artemia sp.*, método al-

ternativo aplicado a la ecotoxicología, es muy empleado en los últimos tiempos con meritorios resultados en las investigaciones de contaminación y control como método de screening de sustancias químicas, también con fines regulatorios. A partir de datos obtenidos utilizando *Artemia sp.* se ha podido predecir la sensibilidad de otras especies de crustáceos a un contaminante determinado y evaluar la toxicidad aguda de efluentes industriales. Su selección se sugiere sobre la base de criterios prácticos de disponibilidad durante todo el año, fácil manutención, conveniencia para la prueba, entre otros factores relevantes de tipo económico, biológico y ecológico (McLaughlin, Lingling y Anderson, 1998).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la ecotoxicología de las aguas del refugio de fauna San Miguel de Parada mediante los biomodelos *Lactuca sativa L.* y *Artemia sp.* en Santiago de Cuba, Cuba.

Método

Objeto de investigación y periodo de estudio

El refugio de fauna "San Miguel de Parada" (Figura 1), es el humedal de mayor extensión que se encuentra ubicado en la parte oeste de la bahía de Santiago de Cuba-Cuba. En el mismo se asienta un bosque de mangles, que rodea a la ensenada de Miradero con una extensión de 333 ha (112 ha marinas y 221 ha terrestres), así como una zona de amortiguamiento de 615 ha (101.9 ha marinas y 513.4 ha terrestres). El trabajo se desarrolló durante el mes de octubre del 2012, el cual pertenece al periodo de lluvia y por tanto las concentraciones de elementos tóxicos deberán estar en concentraciones diluidas.

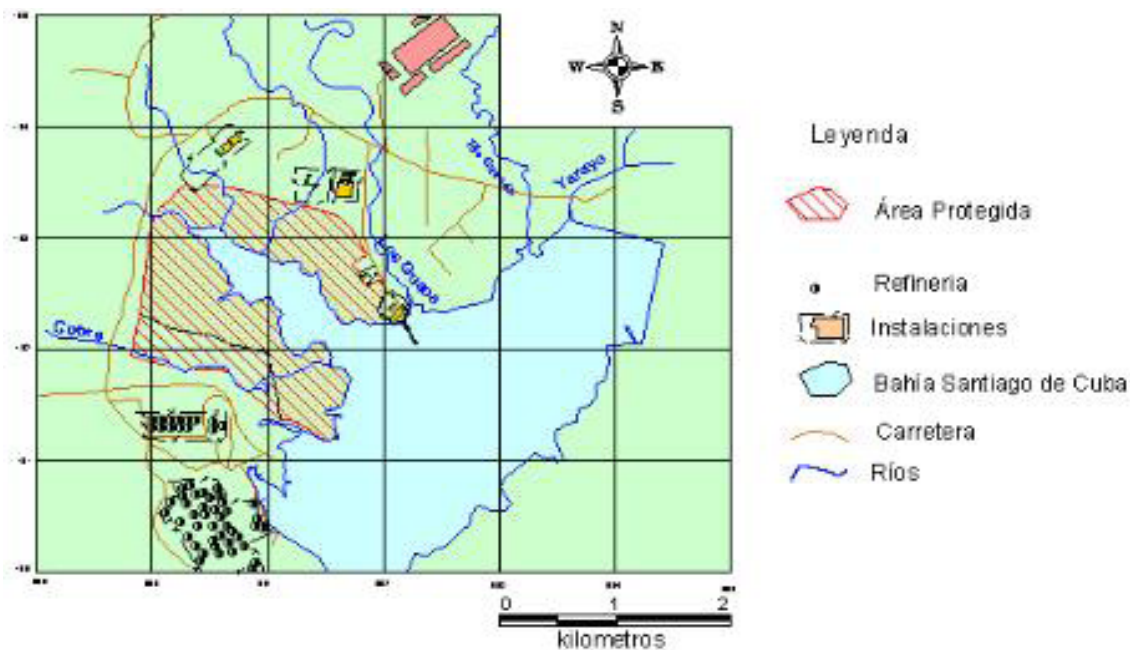


Figura 1. Ubicación geográfica del refugio de fauna "San Miguel de Parada"

Fuente: ecoportal.net

Análisis de variables

Se analizó como variable ambiental, el efecto ecotoxicológico que presenta las aguas del refugio de fauna, el cual se genera por emisiones de efluentes contaminados (Tabla 1) para lo cual se determinó como parámetros, toxicidad

letal y subletal en los biomodelos *Lactuca sativa L.* y *Artemia sp.*

En el caso de la *Lactuca sativa L.* los parámetros medidos fueron germinación en la elongación de la radícula e hipocotilo y para *Artemia sp.* fue cuantificada la mortalidad.

Tabla 1

Fuentes contaminantes y principales afectaciones

Punto de muestreo	Industria tributaria	Estado de funcionamiento		Principales afectaciones
		Sí	No	
Vertimiento procesadora de Soya	Procesadora de soya	x		Muerte del manglar, afecta la nidificación de las aves.
Vertimiento refinadora de aceite (Laguna interior)	Refinadora de aceite	x		Contaminación de las aguas de la laguna interior cercana.
Ensenada de Miradero	Frigorífico Antonio Maceo	x		Derrame de hidrocarburos de embarcaciones que atracan en el muelle, contaminación de las aguas por desbordamiento de fosa ubicada en el perímetro del frigorífico.
Río Cobre (Entrada al humedal)	Varias fuentes (Laguna oxidación Hospital Grillo, comunidades próximas, Minas del Cobre)	x		Deterioro calidad de agua (Vertimiento residuales albañales, altas concentraciones de metales pesados).
Laguna Punta de Sal	Refinería Hermanos Díaz	x		Muerte del manglar, alteración de las características del suelo.

La toma de muestras de aguas superficiales se realizó según la norma ISO 5667-2 (1991): Calidad del agua. Muestreo. Parte II: Guía para las técnicas de muestreos.

En la Tabla 2 puede mostrarse las condiciones establecidas para los bioensayos.

Condiciones experimentales y tratamiento de los resultados.

Para los bioensayos, se estableció un grupo control (negativo) y cinco muestras de aguas superficiales, las cuales corresponden a los tratamientos, cuyas concentraciones fueron

expresadas en forma logarítmica.

La expresión de los resultados, consistió en que cada punto final fue evaluado comparando el efecto generado en los organismos expuestos a las muestras con respecto a la respuesta en los organismos del control negativo sujetos a las mismas condiciones de ensayo (ausencia de muestra a tratar).

En el bioensayo con *Lactuca sativa L.*, terminado el período de exposición (120 horas), se cuantificó el efecto en la germinación en la elongación de la radícula, así como del hipocotilo.

Tabla 2

Condiciones de los bioensayos

Bioensayo de toxicidad aguda mediante <i>Lactuca sativa L.</i>			Bioensayo de toxicidad aguda mediante <i>Artemia sp.</i>		
	Aspectos	Características		Aspectos	Características
1	Tipo de ensayo	Estático	1	Tipo de ensayo	Agudo
2	Temperatura	22± 2 °C	2	Temperatura	25± 2 °C
3	Cantidad de luz	oscuridad	3	Cantidad de luz	Oscuridad
4	Volumen de solución de prueba	3 ml	4	Volumen de solución de prueba	10 ml
5	Agua de dilución	Agua destilada	5	Agua de dilución	-
6	Número de semillas por réplica	20	6	Número de larvas por réplica	10
7	Número de réplicas	3	7	Número de réplicas	3
8	Duración de la prueba	120 h	8	Duración de la prueba	24 h
9	Efectos medidos	Inhibición en la elongación de la radícula e hipocotilo. Inhibición en la germinación	9	Efectos medidos	Mortalidad
10	Resultado final	CL ₅₀ % inhibición	10	Resultado final	CL ₅₀ % Letalidad
11	Aceptabilidad de los resultados	Germinación > 90%	11	Aceptabilidad de los resultados	Mortalidad < 10%

Fuente: Dutka, 1989; OECD, 1993; EPA, 1993.

Para el análisis de los parámetros de crecimiento (considerados indicadores de efectos subletales), se determinó el porcentaje de inhibición para cada parámetro medido a partir de la fórmula siguiente:

$$\text{Inhibición} = \frac{\text{Muestra} - \text{Control}}{\text{Control}} \times 100$$

(% EIr y Eih)

Donde:

- Muestra: promedio de la longitud de la raíz o hipocotilo según sea en cada caso, teniendo en cuenta que n = 20 para cada concentración donde se presente crecimiento (mm).
- Control: promedio de la longitud de la raíz o hipocotilo según sea en cada caso, teniendo en cuenta que n = 20 para el grupo control (mm).

En el caso del bioensayo con *Artemia sp.* se cuantificó la mortalidad en cada tratamiento después de 24 horas de exposición.

Tabla 3

Porcentaje de germinación del bioensayo en *Lactuca sativa L.*

Tratamientos	Número de semillas			T	Tg	G
	Placa 1	Placa 2	Placa 3			
Control	20	20	18	60	58	96.6
Punto 1	19	19	19	60	57	95
Punto 2	19	19	20	60	58	96.6
Punto 3	18	18	19	60	55	91.6
Punto 4	19	20	16	60	55	91.6
Punto 5	0	0	0	60	0	0

T: total de semillas expuestas; Tg: total de semillas germinadas para cada concentración; G: porcentaje de germinación para cada tratamiento.

Al analizar los resultados fitotóxicos encontrados en los órganos de crecimiento que representan indicadores subletales para determinar la capacidad de desarrollo de la planta según Sobrero y Ronco (2004), fue notorio la existencia

Resultados

Bioensayos con *Lactuca sativa L.*

Según Dutka (1989), el bioensayo de toxicidad con semillas de *Lactuca sativa L.* es considerado válido cuando el porcentaje de germinación en el grupo control es mayor del 90% y el coeficiente de variación de la longitud de la radícula, menor del 30%. En este caso, el primer parámetro tuvo un valor de 96.6% y el segundo 5.14 %, por lo que fue considerado como válido donde además se produjo un crecimiento normal y libre de malformaciones.

Como puede observarse en la Tabla 3 la clasificación de las muestras de los diferentes puntos de muestreo en cuanto al parámetro de la germinación, (que mide la letalidad en este ensayo) se consideraron no tóxicas las muestras de los puntos correspondientes a 1 hasta 4 (fuentes tributarias). Fue el punto 5 quien presentó mayor toxicidad con un 100% de inhibición.

de una afectación importante en el sistema radicular de *Lactuca sativa L.*, observándose que este parámetro es el más sensible, lo cual tiene una estrecha relación con la estructura y función de este órgano en los vegetales (Tabla 4).

Tabla 4

Porcentaje de inhibición de la elongación de la radícula, hipocotilo y germinación.

Tratamientos	IEr	IEh	Ig
Control	0	0	3.4
Punto1	-30.23	+ 45	5 NT
Punto 2	-37.21	+ 40	3.4 NT
Punto 3	-39.53	+ 35	8.4 NT
Punto 4	-32.56	+ 25	8.4 NT
Punto 5	-	-	100 MT

IEr: porciento de inhibición de la elongación de la raíz; **IEh:** porciento de inhibición de la elongación del hipocotilo; **Ig:** porciento de inhibición de la germinación de las semillas

En la Tabla 4 puede observarse signos que corresponden a la siguiente clasificación: parámetros de crecimiento, la clasificación es: (+): estimulación; (-): Inhibición. En el caso de la germinación la clasificación es: NT: No Tóxica; T: Tóxica; MT: Muy tóxica. Se consideraron tóxicas las concentraciones donde se obtuvieron valores de inhibición en la germinación entre el 10% y el 25% y muy tóxicas, superiores al 25%.

En lo que respecta a la elongación del hipocotilo se evidencia un efecto estimulatorio para todas las muestras, obteniéndose el máximo valor en la muestra del punto 1 (+ 45 %), lo cual puede relacionarse con un posible incremento de nutrientes presentes en la misma aún a pesar de las características organolépticas observadas referidas anteriormen-

te. Además se observaron en las muestras del 1-4 ligeros cambios de coloración en las raíces, radículas raquílicas y engrosamiento del hipocotilo, aunque estas anomalías no fueron encontradas en toda la población expuesta.

Bioensayo con *Artemia* sp.

El porcentaje de mortalidad observado en los controles fue del 10% por lo que se considera válida la prueba según la EPA (1993).

En la Tabla 4 puede observarse que los resultados obtenidos al final del experimento. En cada parte de agua probada se comprobó el efecto adverso medido (mortalidad) y la muestra del punto 3 mostró un 100 % de mortalidad. En la muestra del punto 5, se observó el mínimo efecto letal con un 23 %.

Tabla 5

Mortalidad según bioensayo de toxicidad aguda en *Artemia* sp.

Tratamientos	Número de <i>artemias</i> vivas por pocillo			T	P
	1	2	3		
Control	9	9	9	27	10
Punto1	1	0	5	6	80
Punto 2	2	3	1	6	80
Punto 3	0	0	0	0	100
Punto 4	1	0	2	3	90
Punto 5	6	8	9	23	23

T: Número total de *artemias* vivas al final del ensayo; P: % de mortalidad al final del ensayo

Los resultados obtenidos reflejan que se encontró efecto inhibitorio en todos los puntos muestreados para los parámetros de germinación y elongación radicular; no así para la elongación del hipocotilo, indicándose que ello no quiere decir que las aguas presentan toda la calidad requerida.

Discusión

Las pruebas de fitotoxicidad empleando plantas terrestres no son frecuentemente usadas en ecotoxicología. Las tres características más importantes de los ensayos con plantas terrestres son: que se les puede usar con muestras coloreadas o turbias en ensayos estático, semiestático y de flujo continuo y con un mínimo costo de mantenimiento en el laboratorio (Wang, 1991). Los ensayos de fitotoxicidad con semillas son simples, versátiles y útiles para evaluar la toxicidad de aguas y sedimentos (Walsh, Weber, Simon y Brashers, 1991).

Bioensayo de toxicidad aguda con *Lactuca sativa L.*

El análisis de los resultados obtenidos, se corresponde con lo planteado por Pérez (2010), sobre el bajo rendimiento en diferentes cultivos, incluido la lechuga, en relación con el contenido de sales presentes en el agua. Además la lechuga es una planta propia de agua potable que para su desarrollo normal necesita características específicas en cuanto a temperatura, humedad y frecuencia de riego según lo referido por Huerres y Caraballo (1987).

Como todo ser vivo, los vegetales funcionan como un todo único, de modo que la radícula al ser la primera en tener contacto con los contaminantes, es la más afectada implicando una repercusión negativa para el desarrollo saludable de la planta; ya que se afectan como consecuencia procesos vitales que mantienen un equilibrio en el suministro constantes de nutrientes a las plantas aun cuando estos tengan concentraciones muy bajas. Correspondiéndose a lo planteado por Navarro, (2006),

donde refiere que la prolongación de la raíz es inhibida a concentraciones más bajas de las sustancias tóxicas que para el caso de la germinación de las semillas, puede ser un indicador más sensible de efectos biológicos.

Estos resultados son extrapolables a todos los cultivos de interés económico, aunque esta especie no sea propiamente de ecosistemas acuáticos, pues este bioensayo ha sido recomendado y aplicado por diferentes organismos de protección ambiental para la evaluación ecotoxicológica de muestras ambientales y de la calidad del agua (Sobrero, 2004). De igual modo existen múltiples estudios realizados que apoyan esta afirmación según Poi de Neiff y Ramos (2001); Navarro, Arrieta y Maldonado (2006); Iannacone y Alvarino (2004) y Torres, Rodríguez, Melián, Hernández y Fernández (2006), quienes han demostrado la sensibilidad que presenta esta especie comparada con otras especies de plantas frente a los contaminantes ambientales, reiterándose su importancia desde el punto de vista hortícola, rápida germinación, fácil manutención en condiciones de laboratorio, amplia aplicación en muestras de diferentes características y orígenes, sencillez, corta duración del bioensayo, así como buena correlación con otros sistemas de prueba. Además, es uno de los bioensayos sugeridos por la Red Internacional WaterTox realizada en International Development Research Center (IDRC), Ottawa, Canadá entre los diferentes países de Latinoamérica, conformando la batería de ensayos propuestos para evaluar calidad del agua en ecotoxicología.

Bioensayo de toxicidad letal aguda con *Artemia sp.*

Para la protección del ambiente marino son necesarios métodos de ensayos ecotoxicológicos simples y confiables para determinar el impacto potencial sobre la biota marina de sustancias xenobióticas (Törökné, Vasdinnyei y Asztalos, 2007). Además, la implementación correcta de medidas regulatorias, tanto en el ámbito nacional como

internacional, requiere que los métodos toxicológicos usados sean confiables y reproducibles (Vanhaecke y Persoone, 1984, Loschau y Kratke, 2005).

Las larvas de *Artemia sp.* Se han utilizado por más de 40 años en estudios toxicológicos y ecotoxicológicos (Törökne, Vasdinnyi y Asztalos, 2007), estudiándose su biología y usos potenciales en diversos campos investigativos como un método práctico y económico para la determinación de bioactividad de compuestos sintéticos y productos naturales (Lhullier, Horta y Falkenberg, 2006).

Los resultados obtenidos arrojaron que el comportamiento de la especie puede estar relacionado con las características de alta salinidad presentes en el punto cinco, demostrando la tolerancia de este crustáceo a las mismas debido a su hábitat, resultados que se corresponden con lo planteado por Amat (1985).

Vanhaecke y Persoone (1984), laborando en el Centro de Referencia de *Artemia* en Bélgica, desarrollaron un ensayo estándar de toxicidad aguda a corto plazo, conocido como ARC-TEST o ensayo del Centro de Referencia de *Artemia*. Este ensayo está basado en la determinación de la CL_{50} a las 24 horas de las larvas de una cepa específica de *Artemia sp.* El procedimiento fue sometido a un estudio colaborativo que involucró centros de investigaciones en Europa y América para determinar el grado de estandarización del protocolo experimental propuesto. Al comparar los resultados de este estudio con los obtenidos utilizando los organismos diana

de uso común en pruebas toxicológicas, se determinó que la repetitividad y reproducibilidad son al menos iguales que las de una prueba a corto plazo usando *Daphnia sp.* y aproximadas en algunos casos a los valores obtenidos utilizando *Brachydanio sp.* Sin embargo, la prueba con *Artemia sp.* fue nueva para las dos terceras partes de los 70 laboratorios participantes, reconociéndose que esta especie requiere poca experiencia y no consume mucho tiempo, aunque la sensibilidad del ensayo fue relativamente baja. Los autores concluyeron que este bioensayo es un valioso instrumento como prueba en una primera evaluación para categorizar la toxicidad de productos químicos y como prueba de referencia para el ambiente marino.

Conclusiones

Las muestras de agua evaluadas mostraron mediante los biomodelos utilizados, efectos tóxicos letales donde la muestra cinco para el caso del bioensayo con *Lactuca sativa L.*, mostró el 100 % de inhibición de la germinación, mientras que para el bioensayo con *Artemia sp.* la muestra tres mostró un máximo efecto letal.

Se apreció en el bioensayo con *Lactuca sativa L.*, efectos fitotóxicos subletales referido a inhibición en el crecimiento radicular, así como anomalías en el crecimiento del hipocótilo aunque el mismo presentó estimulación con respecto al control.

En el bioensayo con *Artemia sp.* se observó tanto un efecto letal como incremento en la supervivencia de las larvas atribuidas a la muestra tres y cinco respectivamente.

Referencias

- Amat, F. (1985). Biología de *Artemia*. *Informes Técnicos de Investigación Pesquera*, 126-127: 3-59.
- Dutka, B. (1989). *Short-Term Root Elongation Toxicity Bioassay. Methods for Toxicological Analysis of Waters, Wastewaters and Sediments*. National Water Research Institute, Environment Canada.
- Huerres, C. y Caraballo, N. (1987). *Horticultura*. La Habana, Cuba: Pueblo y Educación.
- Iannacone, O.J. y Alvaríño, L. (2004). Efecto ecotoxicológico de tres metales pesados sobre el crecimiento radicular de cuatro plantas vasculares. *Agricultura Técnica*, 26, 198-203.
- ISO 5667-2. (1991). *Calidad del agua. Muestreo. Parte II: Guía para las técnicas de muestreo*.
- Lhullier, C., Horta, P.A. & Falkenberg, M. (2006). Avaliação de extratos de macroalgas benthicas do litoral catarinense utilizando o teste de letalidade para *Artemia salina*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 16(2), 158-163.
- Loschau, M & Kratke, R. (2005). Efficacy and toxicity of self-polishing biocide-free antifouling paints. *Environmental Pollution*, 138, 260-267.
- McLaughlin, J. L., Lingling, L. R. & Anderson, J. E. (1998). The use of biological assays to evaluate botanicals. *Drug Information Journal*, 32, 513-524.
- Navarro, A.R.; Arrieta, R.G. y Maldonado, M.C. (2006). Determinaciones de efectos de diferentes compuestos a través de ensayos de fitotoxicidad usando semillas de lechuga escarola y achicoria. *Revista de Toxicología*, 23, 125-129.
- Organization for Economic Cooperation and Development: OECD. (1984). *Terrrestrial Plants: Growth Test. Guideline for Testing of Chemicals No. 208* (OECD Publications Service, Paris).
- Pérez, G.N. (2010). *Evaluación de los residuales de micotoxinas y sus efectos ambientales* (Trabajo para optar el título de Ingeniera Química, Universidad de Oriente. Santiago de Cuba).
- Poi de Neiff, A. y Ramos, A. (2001). Utilización de bioensayos para el estudio ecotoxicológico de los ríos Salado y Negro (Chaco, Argentina). Recuperado de <http://www.unne.edu.ar/unnevieja/Web/cyt/cyt/2001/6-Biologicas/B-019.pdf>
- Sobrero, M.C. y Ronco, A. (2004). Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga (*Lactuca sativa L.*). En G. Castillo (Ed.), *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas* (pp.71-79). Ottawa, Canadá.
- Törökné, A., Vasdinnyi, R. & Asztalos, B.M. (2007). A Rapid Microbiotest for the Detection of Cyanobacterial Toxins. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22(1), 64-68.
- Torres, M.T., Rodríguez, M., Melián, N.M., Hernández, P.M. y Fernández, N. (2006). Toxicidad aguda de lixiviados acuáticos mediante un ensayo con *Lactuca sativa L.* *Higiene y Sanidad Ambiental*, 6, 170-172.
- U.S. Environmental Protection Agency: EPA. (1989). *Protocols for short term toxicity screening of hazardous waste sites* (EPA, Corvallis).
- U.S. Environmental Protection Agency: EPA. (1993). *Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms* (Fourth edition). Washington D.C.
- Vanhaecke, P. & Persoone, G. (1984). The ARC-Test: a standardized short-term routine toxicity test with *Artemia nauplii*. Methodology and evaluation. *Ecotoxicological Testing for the Marine Environment*, 2, 143-157.
- Walsh, G.E., Weber, D.E., Simon, T.L. & Brashers, L.K. (1991). Toxicity test of effluents with marsh plants in water and sediments. *Environmental Toxicology Chemistry*, 10, 517.
- Wang, W. (1987). Root elongation method for toxicity testing of organic and inorganic pollutant. *Environmental Toxicology & Chemistry*, 6, 409-414.
- Wang, W. (1991). Literature review on higher plants for toxicity testing. *Water, Air and Soil Pollution*, 59, 381-400.