



## El uso de bioindicadores en el diagnóstico de la calidad ambiental: su aplicación en la práctica escolar

Nancy Andrioli\* y Marta Dolores Mudry\*\*

Universidad Nacional de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.  
Dpto. de Cs. Biológicas. Grupo de Investigaciones en Biología Evolutiva (GIBE)

\*Lic. en Cs. Biológicas. Consultora Ambiental de la Universidad Tecnológica Nacional.  
Regional Delta. Campana, Pcia. de Bs. As.

\*\*Dra. en Cs. Biológicas. Prof. Asociada FCEyN, UBA. Miembro de la Carrera del Inv.  
Científico de CONICET. Director del GIBE.

### Resumen

La temática ambiental fue incorporada en los últimos años a la currícula educativa, abordándose desde varias asignaturas por tratarse de un "tema transversal". La contaminación ambiental es un aspecto tratado más frecuentemente por la Química, para caracterizar el origen y la estructura de los contaminantes. Poca atención se ha dado a los tópicos relacionados con la Toxicología, y a los métodos de evaluación de la misma. El presente trabajo tiene como propuesta didáctica el abordar conceptos de bioindicación utilizando un organismo vegetal mediante el Test de *Allium cepa*, que posee características que hacen adecuada su implementación en la dinámica áulica permitiendo la evaluación de la ecotoxicidad y de la genotoxicidad de sustancias químicas o mezclas por parte de los alumnos. Esta actividad es un buen disparador para abordar el tema ambiental desde todas las áreas, además de introducir los conceptos de bioindicador y de toxicología genética, que no se encuentran actualmente incorporados en los programas de educación y son parte de la vida diaria.

### Abstract

The environmental issue has been incorporated to the educational programme in the past few years and has been dealt with in several subjects as it has been considered a "transversal theme". Pollution of the environment is one of the aspects more frequently covered in chemistry to characterise the origin and the structure of the pollution agents. Little attention has paid to the evaluation methods. The present work has as a methodological aim tackling the concepts of biological monitoring when we use a vegetal organism by means of the *Allium cepa* test, which make it suitable to be used in class, as it allows students to evaluate the ecotoxicology and the genotoxicity of chemical compounds. This activity is a good trigger to deal with the topic of environment from all areas besides introducing the concepts of bioindicator and the genetic toxicology, which are not included in the school syllabus and are part of everyday life.

### Introducción

La temática ambiental fue incorporada en los últimos años en los programas de educación en todos los niveles y abordada en distintas asignaturas, siendo por este motivo, considerado como un "tema transversal".

Uno de los aspectos de la problemática ambiental es la contaminación debida fundamentalmente al incremento las actividades antrópicas (Albert, 1997). Este tema ha sido tratado tradicionalmente por la Química, dada la necesidad de caracterizar, el origen y la estructura de las sustancias contaminantes, la degradación de los distintos cuerpos receptores o los problemas globales que se generan en consecuen-

cia tales como el efecto invernadero, adelgazamiento de la capa de ozono (Bottani, E. 1991; Bulwick & Lastres, 1993). En este marco conceptual es de destacar que poca atención se le ha otorgado al aspecto toxicológico, ignorando incluso, el efecto dañino sobre los organismos. La acción del agente, que puede ser tóxica, está condicionada por características tanto cualitativas como cuantitativas. Como parte de la educación ciudadana en general y de aquella que atañe a la escuela, en particular, sería oportuno conocer no sólo qué cantidades de una determinada sustancia son tóxicas sino también realizar la caracterización de las mismas analizando distintos aspectos en un sistema de prueba.



En los últimos años se han buscado modelos con características definidas que ofrezcan la posibilidad de evaluar ya no sólo las sustancias químicas, sino también los efectos físicos y biológicos de los agentes presentes en el medio ambiente. El cumplir con este requisito permite utilizar los modelos biológicos como sustrato indicador del daño. Los indicadores pueden ser el organismo entero o parte del mismo, y por ello se los conoce como "bioindicadores". Según el diseño experimental, los bioindicadores podrán ser de exposición, de susceptibilidad o de pronóstico. El uso de bioindicadores para monitoreo de exposición como su nombre lo indica, tiene como objetivo caracterizar el daño asociado al agente en estudio.

La evaluación de daño por un potencial genotóxico, se puede implementar con ensayos de corto o de largo plazo. Los ensayos de corto plazo, conocidos como "short test term" (stt) son los más empleados por su bajo costo y la alta información que otorgan.

En esta oportunidad se contribuye con un modelo adecuado para el trabajo en el aula como es *Allium cepa* (la cebolla) ya que el mismo es ampliamente utilizado, tanto en el ámbito de la investigación como en el de control industrial, para evaluar el efecto no deseado de sustancias tóxicas o de mezclas complejas (Smaka- Kincl et al., 1996). Dos ejemplos muy ilustrativos de estas últimas son el aire de las grandes urbes y las aguas superficiales que se ven impactadas por la recepción de descargas puntuales (industriales y domiciliarias) y no puntuales (sedimentos y deposición atmosférica) (Rank & Nielssen, 1993). Las sustancias que forman parte de estas mezclas pueden comprometer las funciones vitales de los organismos que en ellas habitan o reciben su influencia y aún provocar la muerte celular.

Dado que un efecto importante es la acción que ejercen estos posibles tóxicos sobre el material genético, es una rama de la Toxicología y de la Genética, la Genética Toxicológica, se ocupa de analizar de que forma se compromete la integridad del material heredable mediante ensayos de genotoxicidad en diferentes modelos experimentales.

El modelo de *Allium cepa* como sistema de prueba para genotoxicidad fue introducido por

Levan (1938) investigando el efecto de la colchicina. Desde entonces el sistema fue implementado con frecuencia en el monitoreo genotóxico y luego modificado para estudios de monitoreo ambiental ya que permite en un mismo experimento evaluar la toxicidad de la muestra elegida y el riesgo genotóxico o mutagenicidad que pueda presentar la misma. El primero se mide macroscópicamente por inhibición del crecimiento de la raíz y el segundo, por observación microscópica de células en división (análisis cromosómico) (Fiskesjo, 1985).

La prueba de *Allium cepa* posee varias ventajas respecto de otros ensayos dignas de destacar, tales como: fácil disponibilidad y cultivo, bajo costo, ser un vegetal que posee cromosomas grandes y produce un gran número de raíces en corto tiempo, características que facilitan su uso en poco tiempo y con buena visibilidad del posible daño infringido (Rank & Nielssen, 1993). Para evaluar calidad de aguas superficiales la muestra no necesita ser concentrada, siendo este un procesamiento previo que es requerimiento indispensable para la correcta implementación de otros ensayos de prueba (Rank & Nielssen, 1993).

Un criterio antropocentrista, puede cuestionar el uso de modelos experimentales tan alejados de otros seres vivos, como ser mamíferos de mediano o grana tamaño, con el objetivo de evaluar daño inducido sea por exposición accidental o laboral o por estilos de vida. Sin embargo, a pesar de sus posibles distancias filogenéticas, este modelo vegetal, posee sistemas enzimáticos que activan promutágenos (Fiskesjo, 1985). Esta situación, que es una ventaja desde el punto de vista técnico al permitir una evaluación de genotoxicidad más amplia, también es relevante ya que tanto el hombre como una gran variedad de animales consumen plantas tratadas químicamente posibilitando este tipo de mecanismos (Plewa, 1982).

Otra ventaja importante es tener un sistema genético bien conocido, cuyo cariotipo con un bajo número de cromosomas permite observar fácilmente las alteraciones presentes así como la relación entre células en división y células totales, índice de efecto citotóxico correlacionable con la inhibición en el crecimiento.



Tales características lo convierten en un modelo adecuado para un ensayo de corto término, como "preescrining" o formando parte de una batería de ensayos para decidir el efecto tóxico y genotóxico de químicos, presentando una sensibilidad del 82% respecto a otros métodos (Fiskesjo, 1985; Rank & Nielssen, 1994).

Grant (1982) propone que el "Test de *Allium cepa*" se incluya entre aquellos ensayos de rutina para evaluar el daño cromosómico inducido por algunos químicos. Tanto *Allium cepa* como otros sistemas vegetales han sido incluidos en el programa "Gene-Tox" de la EPA<sup>1</sup>.

Considerando todas estas características se eligió esta prueba como herramienta pedagógica para evaluar un posible nivel de contaminación como sería el caso de algún cuerpo de agua superficial cercano a la escuela. Esta propuesta es aplicable a los siguientes niveles de enseñanza:

**Media, que correspondería al 3° ciclo de Educación General Básica** en las materias de Ciencias Naturales, la aplicación de esta propuesta es adecuada para la evaluación toxicológica cualitativa a través del registro de la longitud alcanzada por raíces expuestas a los posibles genotóxicos (mezcla compleja proveniente del cuerpo de agua próximo a la escuela) que se desean evaluar, comparado con los valores alcanzados por el control. Se podrá interactuar con otras materias tales como Matemática ya que es imprescindible el registro de los datos en una tabla de valores y se pueden graficar los datos en un eje cartesiano o gráfico de barras para visualizar las diferencias. Es una experiencia que demanda dos semanas de duración, considerando que poseen una carga horaria de por lo menos 4 horas semanales.

En el último año de este ciclo se puede incorporar el reconocimiento de las fases de la mitosis en *Allium cepa* por observación directa de los preparados cromosómicos realizados por el docente, no utilizado como bioensayo de genotoxicidad sino como ejercitación de temas de biología celular tales como mitosis, morfología celular, tejidos epiteliales, entre otros.

De este modo los alumnos estarían en condiciones de adquirir más habilidad práctica en el

manejo del microscopio y la búsqueda de células en distintas fases de división.

**Media, correspondiente al Polimodal** en la materia específica Biología o en un proyecto extracurricular interdisciplinario entre las materias: Biología, Química, Geografía y Matemática. En este nivel se incorpora el entrenamiento en la técnica de obtención de preparados cromosómicos y la aplicación de la metodología descrita en la propuesta para evaluar genotoxicidad. Mediante la cuantificación de las células en división respecto de las células totales observadas, se obtienen valores que permitirían comparar los valores obtenidos en las muestras del cuerpo de agua cercano a la escuela (muestra expuesta) respecto a los valores obtenidos en el agua de canilla (muestra control) e inferir si el agua evaluada muestra efecto genotóxico al modificar la capacidad de división de las células de cebolla. La duración de la experiencia es de cuatro semanas considerando una carga horaria de 3 horas semanales. En cursos donde la modalidad permite un tratamiento más profundo de los conceptos de Biología, puede avanzarse en la interpretación de las figuras que indican daño cromosómico, como puentes, cromosomas dicéntricos, rezagados o en forma de anillo, cuantificar tales observaciones y realizar gráficos comparativos. En este caso, el tiempo de la práctica se extendería a 6 semanas.

### **Objetivos del docente para aplicar la presente propuesta**

Que los alumnos:

Conozcan y valoren la utilidad de los bioensayos en la evaluación de la calidad ambiental, adquiriendo destreza en el manejo de técnicas sencillas e interpretación de los resultados.

#### **Objetivos de conocimiento**

Conocer el efecto negativo que puede ejercer la absorción de agua de baja calidad sobre el crecimiento de la raíz.

Adquirir el conocimiento básico para reconocer células en división a partir de un preparado histológico (en 3° ciclo de EGB) para reconocer las fases de la mitosis en ápices de raíz de cebolla (*Allium cepa*) e identificar las estructu-

1. EPA (Environmental nnnn Asociation)



ras que deben ser cuantificadas en una evaluación de genotoxicidad (en Polimodal).

### **Objetivos de habilidades intelectuales y destrezas motoras.**

Comprender las pautas establecidas en la realización un trabajo experimental.

Reconocer y repetir los pasos a seguir en la técnica de preparación de material biológico, (preparados citológicos de ápice de *Allium cepa*).

Reconocer las ventajas y limitaciones del modelo aplicado en esta práctica.

Analizar la diferencia entre un trabajo de carácter científico y uno de investigación escolar.

Diseñar una publicación de transferencia de conocimiento y habilidades.

### **Objetivos de actitud.**

Despertar: el interés por los fundamentos teóricos que dan soporte al trabajo experimental.

El compromiso con el cuidado del ambiente desde la promoción de trabajos con rigurosidad científica.

Adquirir un mayor interés por los temas curriculares de la ciencia al comprender la potencialidad de su aplicación en temas conflictivos relacionados a la dinámica social y a la productividad de la comunidad en la que viven.

Transferir a su entorno (familiar, escolar, barrial, municipal, etc.) experiencias nuevas tendientes a mejorar la calidad de vida, fundadas en la incorporación de nuevos conocimientos de forma sistemática y rigurosa.

## **Materiales y métodos**

Para este ensayo se requieren bulbos de *Allium cepa* que se pondrán a crecer en la solución de prueba a monitorear (mezcla compleja del cuerpo de agua cercano a la escuela)

10 Bulbos de *Allium cepa* de tamaño regular (1,5 a 2 cm)

Una serie de elementos son indispensables para el trabajo experimental:

10 Frascos de 3 o 4 cm de diam. y 10 a 15 cm de alto; aireador de pecera; distribuidor de ga-

ses; espátulas; pinzas; agujas de disección; tijeras; cuaderno de anotaciones; porta y cubre objetos; colorante:orceina acética; fijador: Carnoy (etanol: acético en proporción: 3:1); ácido clorhídrico (10 %); agua destilada.

A fin de poner en práctica este bioensayo se dispone de la Guía para el ensayo con *Allium cepa*, basada fundamentalmente en Rank & Nielssen, 1994.

1. Poner a germinar los bulbos de cebolla en agua de control por 48 hs cambiando el agua cada 24 hs y con aireación.
2. Pasar los bulbos a sendas soluciones de prueba, que son dos muestras tomadas en sitios diferentes del cuerpo de agua cercano a la escuela rotulando a las mismas como "Muestra 1" y "Muestra 2".
3. Luego de 24 hs de exposición, cortar 3 raicillas de cada bulbo (el resto dejarlas crecer 5 días más).
4. Enjuagar con agua destilada y colocar en Carnoy (etanol - acético 3:1) de 12 a 24 hs.
5. Enjuagar nuevamente y almacenar en etanol 70 % en heladera.
6. En el momento de realizar el preparado, colocar las raicillas en un vidrio de reloj con ácido clorhídrico 10 % para disolver el cemento péptico, durante 5 minutos.
7. Enjuagar con agua destilada.
8. Cortar ápices blancos y colocarlos en un portaobjetos con una gota de colorante orceína acética.
9. Colocar el cubre y hacerlo girar sobre su eje para disgregar el tejido y separar células.
10. Envolver en un papel de filtro el preparado y aplastar con los dedos para realizar el proceso de aplastamiento, técnicamente conocido como "squash".
11. Flamear en mechero (la T° no debe pasar los 50° C).
12. Controlar el preparado e identificar con (+) o (-) según el caso.
13. Sellar con parafina.
14. Observar las células para realizar el análisis utilizando la guía de observación.

Para el análisis macroscópico se utilizan las raíces que se dejaron crecer durante 5 días más y se procede de la siguiente manera:

1. Se mide la longitud de 10 raicillas por cada bulbo.



- Establecer el promedio, para cada muestra y para el control.
- Hacer un gráfico comparativo (gráfico de barras) con las medias de longitud de las raíces en el eje de ordenadas y la estación control en el eje de abscisas.
- Establecer la comparación entre las distintas muestras, analizando si el crecimiento de las raíces en las Muestras 1 y 2 poseen diferencias mayores al 50 % en relación al control (muestra del agua de canilla).
- Realizar una curva colocando las muestras en orden creciente de acuerdo a los valores

de longitud de las raíces procediendo luego a la interpretación de la curva, relacionando las características de la muestra (por ej. distancia a un sitio de descarga de contaminantes en el caso de agua superficial) con los valores de crecimiento de las raíces.

### Registro de datos

Se observan los preparados y se procede a completar los siguientes cuadros.

	Long. promedio de raíces	Rango
Control		
Muestra 1		
Muestra 2		

Cuadro 1 Registro de crecimiento de raíces de *Allium cepa*.

	Nº total de células observadas. (Total de células que se contaron)				Nº de células en % mitóticas
	Profase	Metafase	Anafase	Telofase	
Control					
Muestra 1					
Muestra 2					

Cuadro 2 Análisis de proporción de células en cada fase de la mitosis

	Nº de células observadas				Nº de células con estructuras anormales
	anillos	rezagados	dicéntricos	puentes	
Control					
Muestra 1					
Muestra 2					

Cuadro 3 Registro de células con anomalías

### Discusión y conclusiones

La media del crecimiento de la raíz permite evaluar la toxicidad de las muestras analizadas, aportando a los alumnos del nivel EGB 3 la idea de daño al genoma como imposibilidad de crecer y vivir. En el ensayo de genotoxicidad

implementado, a partir del nivel Polimodal es posible avanzar analizando la fracción de células totales que realizan la división mitótica, aspecto que naturalmente se relaciona positivamente con el crecimiento de la raíz, es así que este ensayo permite que se observe y cuantifique el mismo efecto con dos metodolo-



gías de diferente complejidad, permitiendo al docente evaluar y diferenciar el aprendizaje entre los dos niveles de enseñanza.

La observación de figuras cromosómicas anormales permite analizar los efectos no deseados de manera más detallada. Así, por ejemplo, se visualiza el efecto del agente o de los agentes dañinos como ruptura de los cromosomas, formación de rezagados o mala separación de las cromátidas asociado a la formación de puentes.

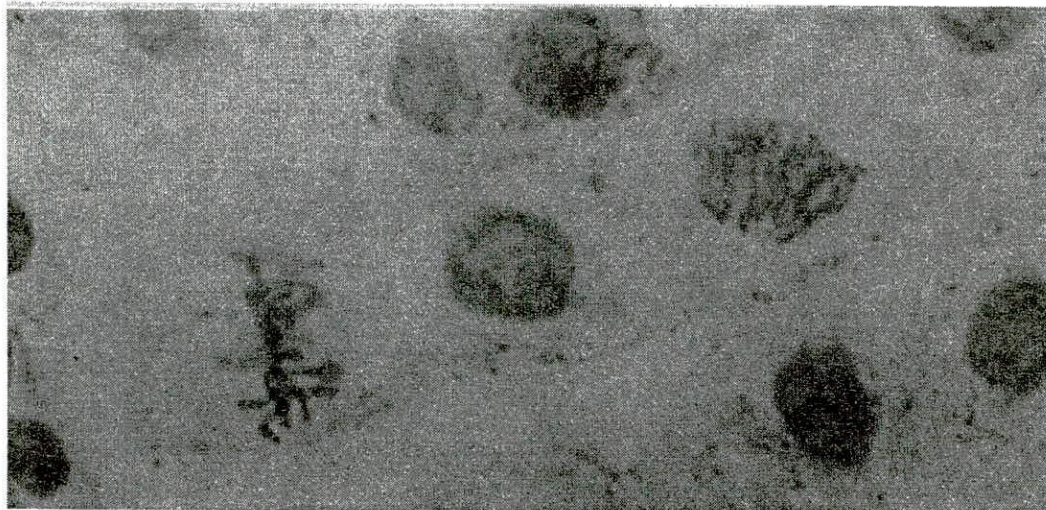
El bioensayo con *Allium cepa* permite al docente llevar al aula el problema ambiental, en este caso la contaminación del agua, bajo otro enfoque. La participación activa del alumno en determinar la contaminación de un cuerpo de agua de su localidad, permite un aprendizaje más comprometido que la simple exposición del tema a partir de la lectura de su texto o aún, de la investigación bibliográfica ampliada.

Los conocimientos y la práctica adquiridos en la obtención de preparados mitóticos y reconocimientos de los estadios, son aprendizajes que podrán aplicar en el futuro con otros fines dis-

tintos al de un biomonitoreo ambiental. Sin embargo, es fundamental el concepto de daño provocado en el material genético como un listado de posibles consecuencias a largo plazo, como enfermedades degenerativas, cáncer y malformaciones en recién nacidos de madres expuestas antes y/ o durante la gestación.

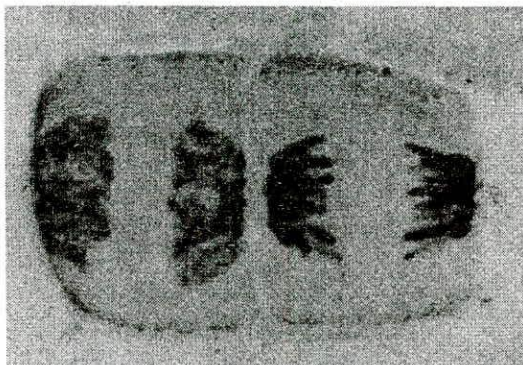
Todo esto permite a los alumnos tomar conciencia de la importancia de su participación en el control de todo aquellos que ingresa o se mantiene en el entorno, en contacto con el organismo. En este sentido tendrá en cuenta los agentes químicos y sus vías de ingreso: ingestión, inhalación y absorción por piel, así como los agentes físicos: niveles de radiación causados por centrales nucleares o radiación solar. Los alumnos también podrán asociar los agentes genotóxicos con los estilos de vida, permitiéndoles reconsiderar los hábitos de fumar o exponerse exageradamente al sol o a lámparas de luz ultravioleta, automedicación, como algunos de los posibles temas relacionados a su cotidianidad.

**Figuras.** Fases de la mitosis en raíces *Allium cepa* (400X)



a) Cromosomas en placa ecuatorial.





b) Imagen de telofase temprana



c) Imagen de anafase y núcleos interfásicos

## Agradecimientos

La inquietud por concretar esta publicación, surgió con motivo de los cursos de capacitación para docentes dictados por la Dra. Lidia Gallagosky (CEFIEC), FCEyN, UBA a quien le agradecemos la lectura crítica de la propuesta del diseño del TP para un curso regular de la carrera de Ciencias Biológicas de la que fue adaptada la presente propuesta. Al mismo tiempo agradecemos la actualización realizada en el presente año en los laboratorios de la FCEyN, UBA, en el marco de la materia de grado Genética Toxicológica, vinculando los diferentes niveles educativos y maximizando los recursos disponibles.

## Bibliografía

- Albert, L. A. 1997. Introducción a la Toxicología Ambiental. México.
- Bottani, E. 1991. *Programa promoción y difusión de la ciencia*. Calidad Ambiental a través de la Química. Comisión de Investigaciones Científicas. Pcia. de Bs. As. La Plata.
- Bulwick, M., Lastres, L. 1993. Química Ambiental. CENCAD. M.C.E., Bs. As.
- Fiskesjo G. 1985. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas*. 102, pp. 99-112.
- Grant, W. F. 1982. Chromosome aberration assay in *Allium*. A report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox program. *Mutation. Research*. 99(3), pp. 273-291.
- Levan, A. 1938. The effect of colchicine on root mitoses in *Allium*. *Hereditas* 24:471-486.
- Plewa, M. J. 1982. Specific locus mutation assay in *Zea mays*. *Mutation Research* 99, pp. 317-337.
- Rank, J. and Nielssen, M. H. 1993. Screening of toxicity and genotoxicity in wastewater by the use of the *Allium cepa* test. *Hereditas*; 121(3), pp. 187-192.
- Rank, J. and Nielssen, M. H. 1993. A modified *Allium* test as a tool in the screening of the genotoxicity of complex mixtures. *Hereditas* 118, pp. 49-53.
- Rank, J. and Nielssen, M. H. 1994. Evaluation of the *Allium* anaphase-telophase test in relation to genotoxicity screening of industrial wastewater. *Mutat Res*. 312 (1), pp. 17-24.
- Smaka-Kincl V., Stegnar P., Lovka M., Toman M. J. 1996. The evaluation of waste, surface and ground water quality using the *Allium cepa* test procedure. *Mutation. Research*; 368(3-4), pp. 171-179.