

Vicia Faba L.: Capacidad bioindicadora de contaminación de agua por metilmercurio

M. D. ÁLVAREZ MENÉNDEZ; J. MATEOS MARTÍN;
M. V. PEINADO DE DIEGO y M. A. CAPÓ MARTÍ

Sección de Sanidad Ambiental. Instituto Universitario de Ciencias Ambientales (IUCA, UCM)

Recibido: 7 de noviembre de 2005

Aceptado: 7 de febrero de 2006

RESUMEN

El mercurio es el más peligroso de los metales pesados, fácilmente absorbido por las plantas en su forma orgánica. El metilmercurio altera la capacidad de germinación del haba (*Vicia faba L.*), que se emplea como alimento humano y como forraje para el ganado. En este trabajo se estudia la utilidad de *Vicia faba* como bioindicador de la presencia de metilmercurio en el agua de riego, la alteración de la capacidad de germinación permite una detección temprana de la presencia de mercurio en el ambiente.

Palabras clave: Mercurio, metilmercurio, *Vicia faba*, bioindicador.

Vicia Faba L.: Biomonitoring capacity of water pollution caused by methylmercury

ABSTRACT

Mercury is the most dangerous of the heavy metals, easily absorbed by the plants in his organic form. Methyl-mercury changes the ability of germination of the *Vicia faba L.*, which is used as human food and as forage for the cattle. In this work the utility of *Vicia faba* as bioindicator of the presence of methyl-mercury in irrigation water is studied, the changes in the ability of germination allows an early detection of the presence of mercury in the environment.

Keywords: Mercury, methyl-mercury, *Vicia faba*, bioindicator.

Vicia Faba L.: Capacité bioindicatueur da contamination d'eauper metilmercurio

RÉSUMÉ

Le mercure est le plus dangereux des lourds métaux, facilement absorbés par les plantes dans la forme organique. Le methyl-mercure change la capacité de germination du *Vicia faba L.*, qui est utilisé comme l'alimentation humaine et comme le fourrage pour le bétail. Dans ce travail est étudiée l'utilité de *Vicia faba* comme bioindicateur de la présence de methyl-mercure dans l'eau d'irrigation, le changement de la capacité de germination permet une première détection de la présence de mercure dans l'environnement.

Mots clé: Mercure, metil-mercure, *Vicia faba*, bioindicateur.

SUMARIO: 1. Introducción. 2. Objetivos. 3. Material y métodos. 4. Resultados. 5. Discusión. 6. Conclusiones. 7. Referencias

1. INTRODUCCIÓN

El mercurio está considerado el veneno ambiental más peligroso de todos los metales pesados cuya presencia en el cuerpo humano resulta tóxica a partir de ciertos umbrales críticos que dependen, fundamentalmente, de un conocimiento de las relaciones dosis-efecto y dosis-respuesta. Asimismo, depende del conocimiento de las variaciones en la exposición, absorción, metabolización y excreción en cualquier situación dada. (Español Cano, 2001.)

Su peligrosidad para la salud humana y ambiental se fundamenta en la multiplicidad de fuentes de emisión (antropogénicas y naturales), toxicidad, movilidad en el ambiente, y en la tendencia a la biomagnificación y bioacumulación en los ecosistemas terrestres y acuáticos (Cobbett, 2003; Frescholtz *et al*, 2003).

El mercurio sufre procesos de liberación desde sedimentos y suelos contaminados a ríos, lagos y otras fuentes de agua, (Kim *et al*, 1996), procesos que pueden estar incrementando esta liberación como consecuencia del calentamiento global. El mercurio puede llegar en cantidades apreciables a las regiones agrícolas con lodo, fertilizantes, cal, y abonos, pero la fuente más importante de contaminación del suelo agrícola es el uso de fungicidas mercuriales orgánicos como prevención de enfermedades fúngicas en las semillas. En las concentraciones bajas recomendadas para los tratamientos la presencia del mercurio favorece la capacidad de la germinación, pero basta un ligero incremento de la dosis para que produzcan lesiones a la semilla, lesiones que aumentan en proporción directa a los índices de aumento de su utilización.

En general, la presencia de mercurio en plantas se podía relacionar con el nivel de contaminación. Con niveles bajos de contaminación por mercurio, las cantidades en los tejidos vegetales están por debajo de los niveles permitidos. Las plantas, sobre todo las acuáticas, han demostrado ser bioacumuladoras de mercurio (Who, 1996). En las plantas vasculares acuáticas de agua dulce, las tasas de absorción dependen de la especie, los cambios estacionales de la velocidad de crecimiento y el ión metálico presente en el medio. Las concentraciones tisulares de mercurio en las plantas son siempre mayores cuando el metal se encuentra en forma orgánica (Patra M. y Sharma A., 2000).

En las plantas vasculares, los efectos más notables de la contaminación por mercurio son:

- Alteración de la fotosíntesis
- Inhibición del crecimiento
- Alteración en la captación de K (www.Sagan-gea.org, 2004)

La alteración en la fotosíntesis se produce como consecuencia de la sustitución del átomo central de la clorofila, el magnesio, por el mercurio (Patra y Sharma, 2000)

Los mecanismos más importantes causales de la toxicidad del mercurio son:

- Cambios en la permeabilidad de la membrana celular
- Reacción de los grupos sulfhidrilo (-SH) con cationes
- Afinidad para reaccionar con grupos fosfato y actividad de grupos de ADP o ATP.
- Sustitución de iones esenciales.

La exposición de las plantas a compuestos mercuriales puede deberse a:

- Administración directa de agentes antifúngicos.
- Tratamientos de las semillas o de las hojas mediante aspersión o atomización de compuestos mercuriales.

Los efectos tóxicos de los metales pesados en *Vicia faba* a nivel de las células meristemáticas de la raíz de las habas en la mitosis celular son bien conocidos. El mercurio acorta el intervalo de la etapa mitótica pero prolonga la etapa de interfase, con lo que el tiempo entre las divisiones celulares es más largo y como consecuencia el índice mitótico (IM) disminuye (Duan y Wang, 1995). El Hg^{2+} inhibe el IM a cualquier concentración, pero dependiendo de las concentraciones, también producen aberraciones cromosómicas y presencia de micronúcleos en las células meristemáticas radiculares (Duan *et al* 1999).

Czuba *et al*, 1987, demostraron que el metilmercurio produce alteraciones microscópicas consistentes en disrupción de los microtúbulos celulares.

2. OBJETIVOS

1. Estudiar esta leguminosa como posible bioindicadora de daños toxicológicos producidos por el MeHg presente en el ambiente.
2. Determinar su potencial bioindicador.
3. Cuantificar los factores de riesgo de no-germinación y metilmercurio en relación a los diferentes niveles tóxicos.
4. Comprobar la idoneidad de la metodología utilizada en este estudio.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Se han utilizado semillas de haba obtenidas directamente en el mercado. Para la siembra se han utilizado semilleros de 5 y 9 cm de diámetro situados en el interior de una cámara de seguridad de presión negativa dotada de tubos fluorescentes Gro-lux

con ciclo de 12 horas de luz y 12 de oscuridad. El resto del material (Matraces, pipetas, pinzas, placas de Petri, etc.) son los habituales de un laboratorio de biología.

El tratamiento estadístico de los datos se ha llevado a cabo con el programa estadístico SPSS, instalado sobre un ordenador PC-compatible con sistema operativo Windows-2000.

Como paso previo se efectuaron pruebas de siembra en distintos sustratos (tierra, arenas de diferentes granulometrías, vermiculita y sepiolita), observando que el medio más adecuado para los experimentos a realizar era la sepiolita.

Germinación: Se ha considerado germinada aquella semilla plantada que desarrolla un primordio germinal superior a 1 mm de longitud durante un período de tiempo establecido (7 días). Esto no significa que el resto de las semillas sean estériles, sino que es posible que su retardo en la germinación sea superior.

No-germinación: Se ha considerado no germinada aquella semilla plantada que no ha alcanzado un primordio germinal igual o inferior a 1 mm en el tiempo de estudio.

Para el estudio de las habas, se sembraron 220 semillas distribuidas de la siguiente forma:

- A) Un grupo control, formado por 40 semillas y regado solamente con agua.
- B) Nueve grupos de experimentación, formados por 20 semillas por grupo y regados con las distintas concentraciones del tóxico.

En la siembra se utilizaron recipientes de 9 cm de diámetro. En cada uno de ellos se ponían 10 semillas que se cubrían con sepiolita, se regaban con agua, en el caso del grupo control y con las diferentes concentraciones tóxicas en los otros grupos para a continuación introducirlos en la cámara de presión negativa. Para cada concentración del tóxico se utilizaron dos recipientes (20 semillas por concentración) y para los controles cuatro (40 semillas). El volumen de riego era idéntico para todos los grupos, tanto experimentales como control.

Las concentraciones del tóxico utilizadas fueron de 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.62, 7.81, 3.90 y 1.95 ppm (Fig. 1).

4. RESULTADOS

Los resultados generales obtenidos de las 220 semillas de habas plantadas y distribuidas en un grupo control ($n = 40$; ppm metilmercurio=0) y 9 concentraciones progresivas de metilmercurio (rango = 1.95-500 ppm; $n/_{(concentración)} = 20$) se muestran en la tabla I.

De las 220 semillas de habas plantadas, no germinó el 25.9%. El mayor porcentaje de germinación se obtuvo en la concentración 3.90 ppm (100 %) y el menor en la concentración 500 ppm (0 %). Los porcentajes en las diferentes concentraciones variaron significativamente ($\chi^2 = 108.6$; $gl = 9$; $p < 0.001$) (Tabla II).

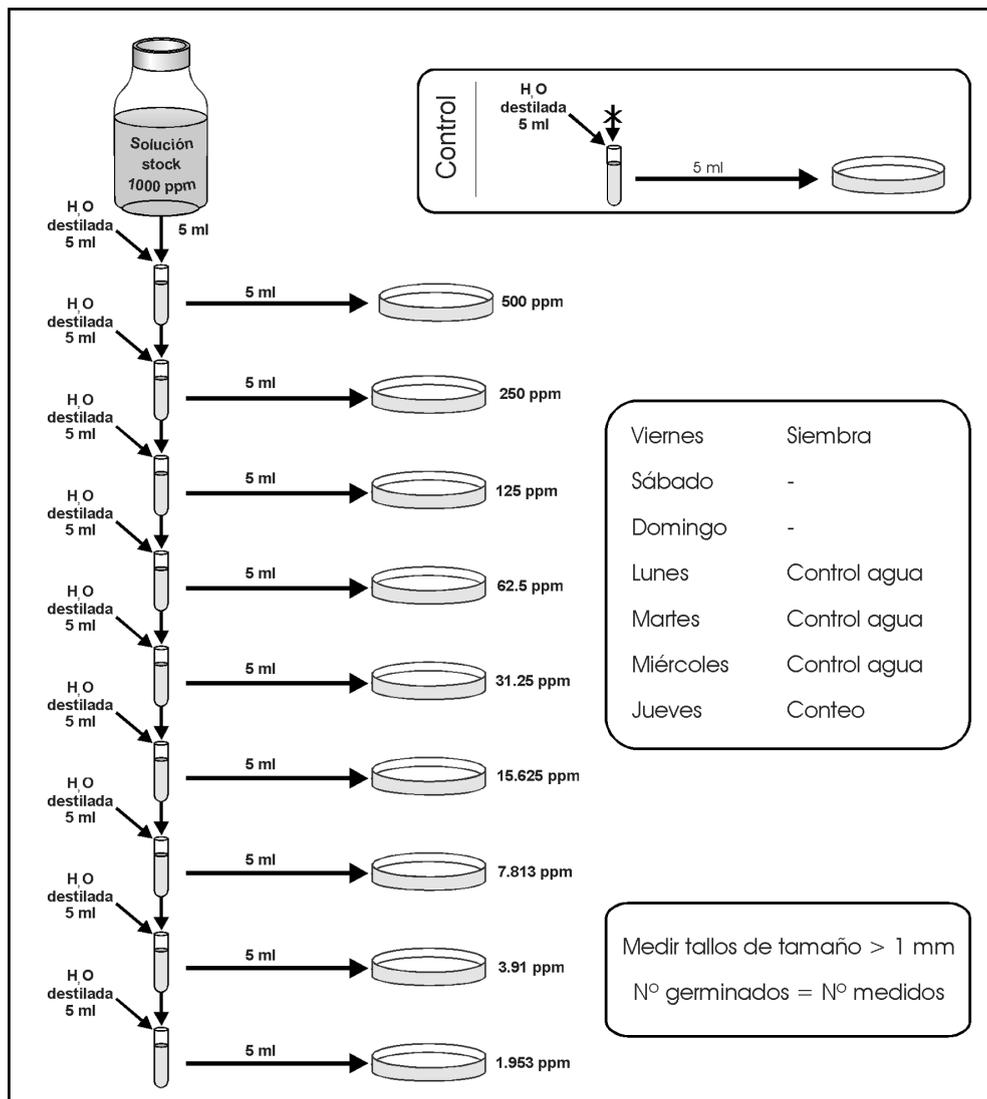


Figura 1. Secuencias de diluciones de metilmercurio

Los porcentajes de germinación del haba se ajustaron a una distribución normal ($z = 0.94$; $p = 0.34$). El estudio de regresión del metilmercurio sobre la inhibición germinativa (IG), cuyo diagrama de dispersión muestra la Fig. 2, mostró una correlación directa y significativa, con un mejor ajuste logrado mediante la curva cuadrática ($r^2 = 0.965$; $gl = 7$; $p < 0.001$) (Fig. 3). De forma que:

$$[\text{MeHg}] = 19.718 - 0.558 (\text{IG}_{\text{V. faba}}) - 0.048 (\text{IG}_{\text{V. faba}})^2$$

TABLA I										
Germinación y Longitud del tallo (mm) de <i>Vicia faba</i>										
Nº de semilla	Concentraciones de MeHg (ppm)									
	Control	1,95	3,9	7,81	15,62	31,25	62,5	125	250	500
1	253	250	210	232	205	215	182	122	41	0
2	230	200	195	207	192	209	180	87	36	0
3	219	193	190	182	152	197	177	85	34	0
4	210	170	187	173	146	190	138	74	32	0
5	209	168	177	155	114	126	130	66	21	0
6	202	162	168	134	111	117	126	65	0	0
7	197	159	163	122	107	72	114	60	0	0
8	192	141	132	114	82	72	102	54	0	0
9	186	131	132	96	63	70	92	48	0	0
10	185	92	110	92	53	61	73	30	0	0
11	183	75	98	80	42	50	68	25	0	0
12	182	62	97	68	40	42	65	20	0	0
13	175	59	93	56	39	41	59	18	0	0
14	170	55	82	55	37	36	36	16	0	0
15	167	53	71	36	22	24	35	0	0	0
16	152	51	53	21	20	23	31	0	0	0
17	151	41	35	0	0	16	30	0	0	0
18	146	35	32	0	0	0	0	0	0	0
19	145	27	30	0	0	0	0	0	0	0
20	142	0	30	0	0	0	0	0	0	0
21	142	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	141	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	134	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	122	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	121	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	117	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27	106	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	96	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29	96	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30	96	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31	81	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32	75	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33	72	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34	60	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35	56	-	-	-	-	-	-	-	-	-
36	51	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37	47	-	-	-	-	-	-	-	-	-
38	38	-	-	-	-	-	-	-	-	-
39	32	-	-	-	-	-	-	-	-	-
40	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total semillas	40	20	20	20	20	20	20	20	20	20

TABLA II Porcentajes de germinación de <i>Vicia faba</i>					
			Germinación		Total
			Sí	No	
[MeHg]	Control	N (%)	39 97.5%	1 2.5%	40
	[1.9]	N (%)	19 95.0%	1 5.0%	20
	[3.9]	N (%)	20 100.0%	- -	20
	[7.8]	N (%)	16 80.00%	4 20.0%	20
	[15.6]	N (%)	16 80.0%	4 20.0%	20
	[31.25]	N (%)	17 85.0%	3 15.0%	20
	[62.5]	N (%)	17 85.0%	3 15.0%	20
	[125]	N (%)	14 70.0%	6 30.0%	20
	[250]	N (%)	5 25.0%	15 75.0%	20
	[500]	N (%)	- -	20 100.0%	20
Total		N (%)	163 74.1%	57 25.9%	220 100.0%

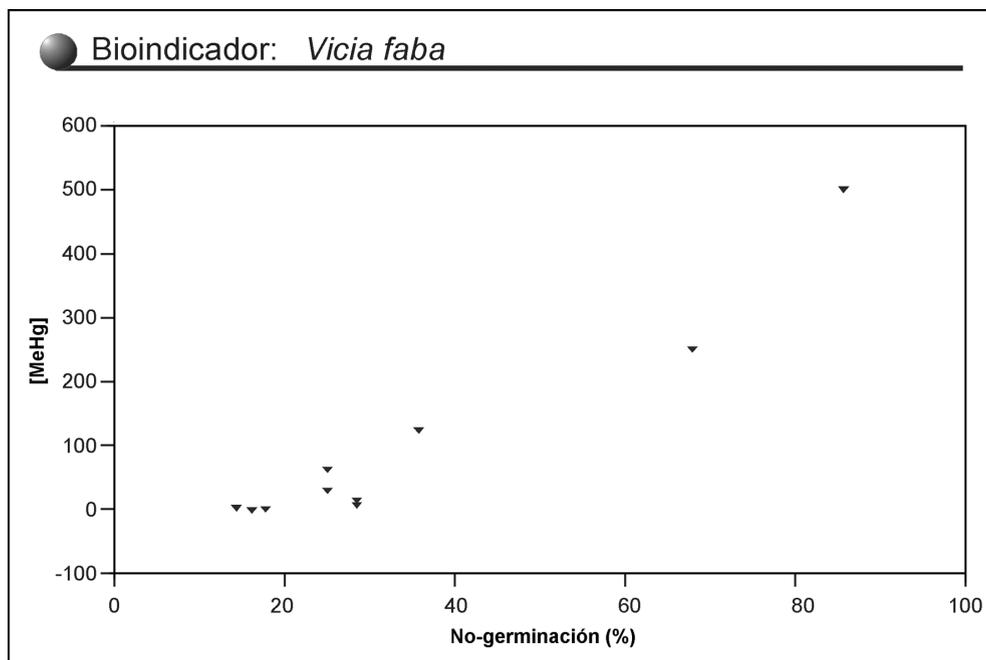


Figura 2. Diagrama de dispersión de [MeHg] y no germinación

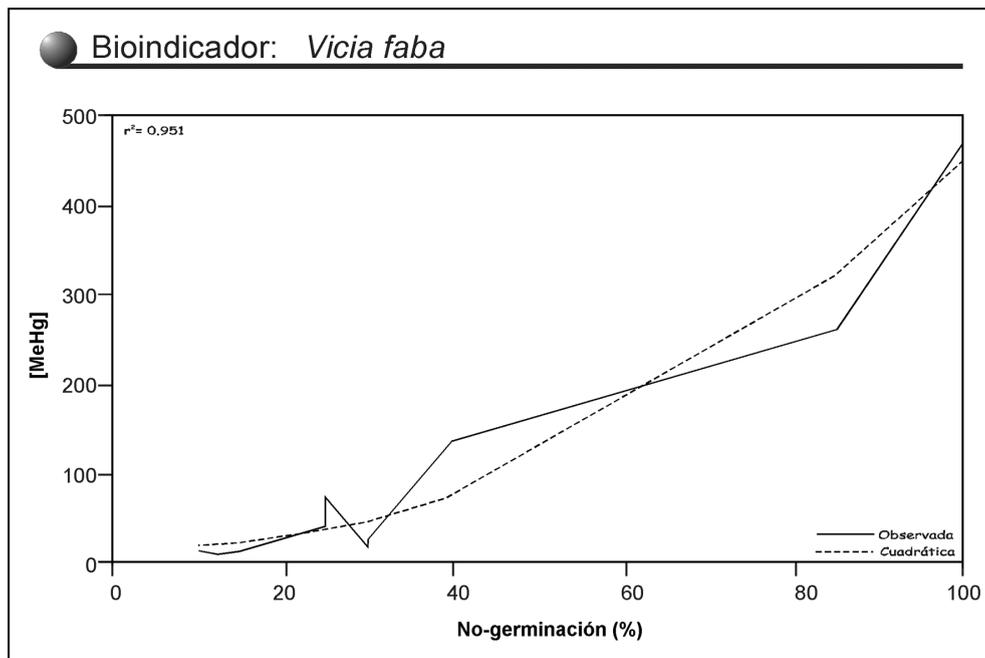


Figura 3. Ajuste de la curva de regresión de [MeHg] sobre la no-germinación

La tabla III muestra el modelo regresivo y el análisis de riesgos. Contrastados con el control se comportaron como factores significativos de riesgo las concentraciones 7.8 ppm (OR = 9.75; IC 95% = 1.01-94.1), 15,6 ppm (OR = 9.75; IC 95% = 1.01-94.1) y a partir de la 125 ppm, los riesgos de no-germinación crecieron significativa y exponencialmente. La concentración 3.90 ppm se comportó como factor de protección con OR indeterminado al germinar la totalidad de las semillas. La concentración 500 ppm fue por el contrario letal, asimismo con OR indeterminado.

Sobre las predicciones individuales del modelo regresivo se calculó, tras obtener una tasa de no-germinación del 25.9, el punto de corte óptimo (0.30) cuya matriz de clasificación acreditó: sensibilidad = 0.614; especificidad = 0.969; valor predictivo positivo = 0.875; valor predictivo negativo = 0.078; clasificación correcta: 0.877. La curva ROC obtenida mostró un área bajo ella de 0.89 ± 0.02 . (Fig. 4).

En cuanto al crecimiento longitudinal del tallo, la mayor altura media fue alcanzada por el control (137.9 ± 58.4 mm). La concentración 500 ppm fue letal. No se pudo demostrar que la altura del haba fuese significativamente influida por la interacción de las diferentes concentraciones utilizadas y la germinación ($F=1.09$; $p=0.36$). Por el contrario, cuando se analizaron las diferencias de altura (tabla IV), sin considerar el efecto del factor germinación (fig. 5), se demostró una muy elevada significación ($F=4.18$; $p<0.001$). La tabla V muestra las diferencias intergrupos.

TABLA III				
Modelo regresivo de no-germinación de <i>Vicia faba</i>				
(-2LL = 138.0; bondad de ajuste = 180.0; χ^2 del modelo = 113.9; gl = 8; p < 0.001)				
Variable	β	ES	OR	IC 95%
Concentración				
Control	-	-	1	-
1.95	0.719	1.44	2.05	0.12 – 34.6
3.90	- 6.539	36.7	ind	ind
7.81	2.272	1.15	9.75	1.01 – 94.1
15.6	2.277	1.15	9.75	1.01 – 94.1
31.25	1.929	1.19	6.88	0.66 – 71.0
62.5	1.929	1.19	6.88	0.66 – 71.0
125	2.816	1.12	16.71	1.84 – 151.3
250	4.762	1.13	117.0	12.6 – 1085.9
500	13.866	36.74	ind	ind
β_0	- 3.663	1.01	-	-

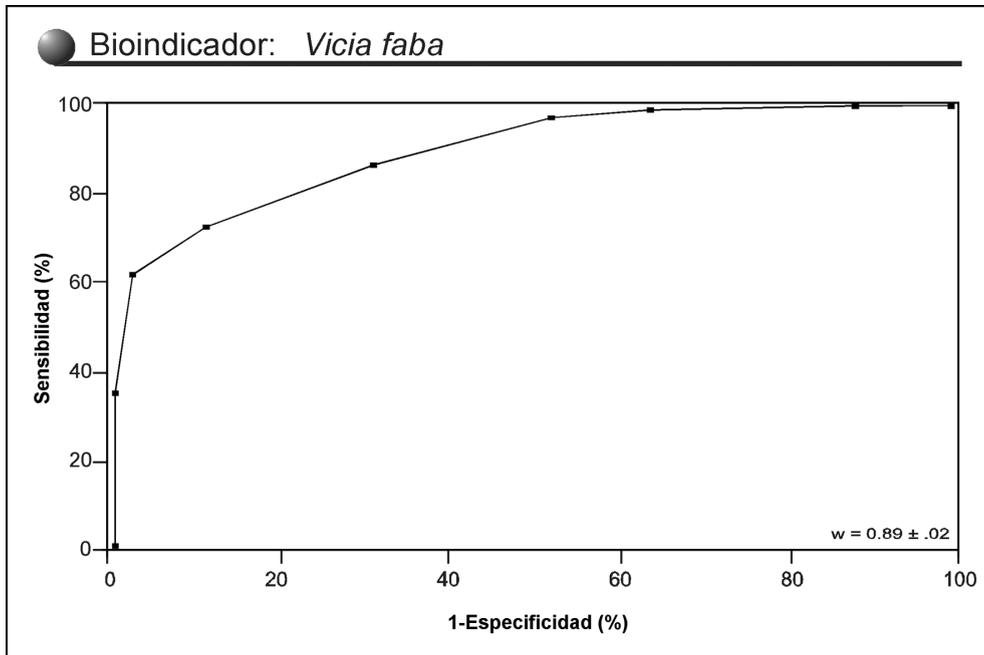


Figura 4. Curva ROC

TABLA IV			
Alturas medias (mm) de <i>Vicia faba</i> y [MeHg]			
ALTURA	N	Media	± DS
Control	39	137.92	58.49
1.9	19	111.79	67.28
3.9	20	114.25	61.34
7.8	16	113.94	62.44
15.6	16	89.06	59.89
31.25	17	91.82	70.10
62.5	17	96.35	52.89
125	14	55.00	31.27
250	5	32.80	7.40
Total	163	105.33	63.20

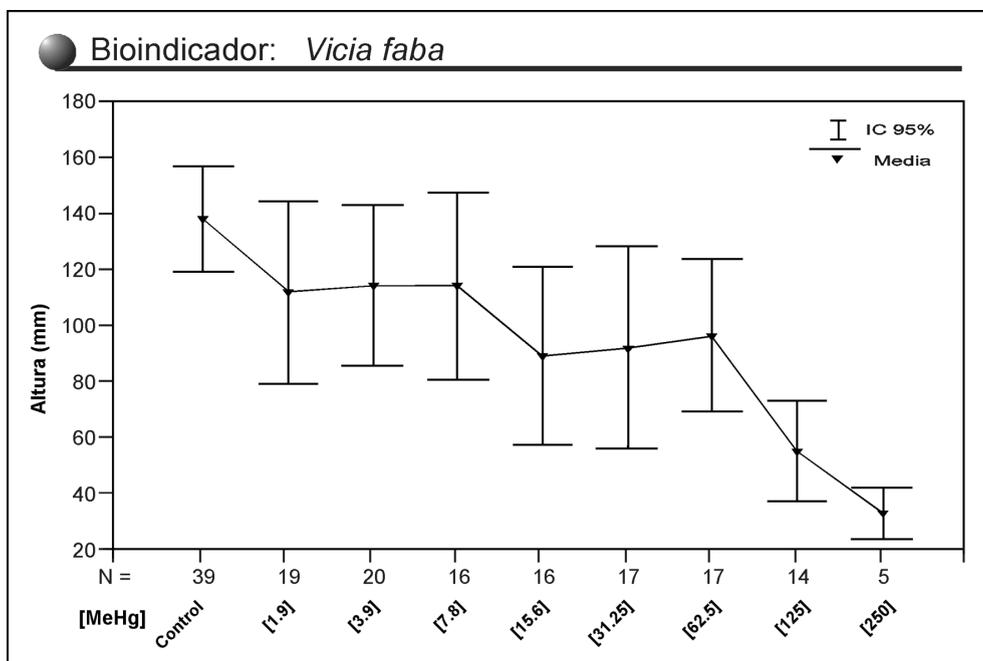


Figura 5. Altura media de las plantas en relación al factor [MeHg]

Tabla V
Comparaciones múltiples de la altura de plantas germinadas de *Vicia faba*
 (Estadístico de Tahnane)

Concentración A	Concentración B	Dif ^a (A-B)	±DS	p
Control	1.95	26.13	16.43	0.999
	3.90	23.67	16.15	0.998
	7.81	23.99	17.4	1.0
	15.6	48.46	17.4	0.30
	31.25	46.10	17.0	0.60
	62.5	41.57	17.0	0.38
	125	82.92	18.3	< 0.001
	250	105.12	27.9	< 0.001
1.95	3.90	-2.46	18.8	1.00
3.90	7.81	0.31	19.7	1.00
7.81	15.6	24.88	20.7	1.00
15.6	31.25	-2.76	20.4	1.00
31.25	62.5	-4.53	20.1	1.00
62.5	125	41.3	21.2	0.350
125	250	22.2	30.6	0.59
250	500	32.8	-	-

Las alturas medias de las habas germinadas (A) se ajustaron a la normalidad ($z=0.59$; $p=0.86$) y guardaron, en la regresión lineal de [MeHg] sobre ellas, una correlación inversa y significativa, con un mejor ajuste exponencial, ($r_{-}=0.917$; $gl=8$; $p<0.001$) (fig. 6). De forma que:

$$[\text{MeHg}] = 19.718 - 0.558 (\text{IG}_{V. \text{faba}}) - 0.048 (\text{IG}_{V. \text{faba}})^2$$

5. DISCUSIÓN

Queda claramente demostrada la toxicidad del metilmercurio en cuanto a las condiciones normales de germinación de *Vicia faba*. Todas las concentraciones tóxicas se comportaron como factores irregulares de riesgo ($\text{OR}>1$), excepto la concentración 3.90 ppm (OR indeterminado), que desde la concentración 125 ppm tienden a incrementarse significativamente de forma exponencial, siendo letal la concentración 500 ppm. Estos riesgos de inhibición germinativa son estadísticamente predecibles con una fiabilidad del 88%. Al influirse significativamente su desarrollo por la concentración de metilmercurio ($p<0.001$) la planta tiene posibilidades de utilización como bioindicador de contaminación mercurial ambiental. En el aspecto cuantitativo las diferencias con el control comienzan en la concentración 125 ppm ($p<0.001$).

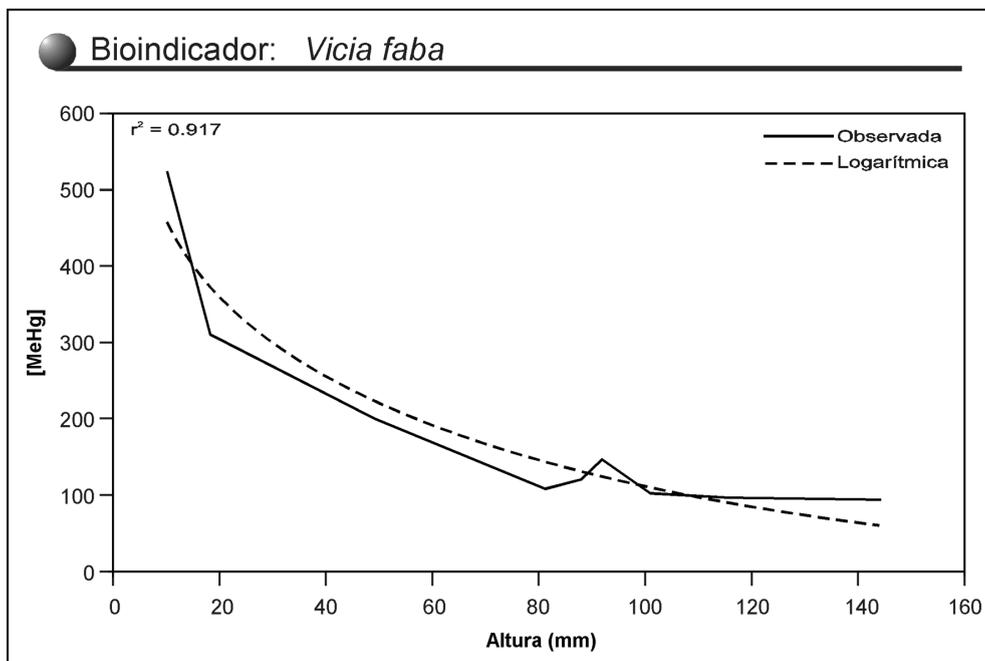


Figura 6. Ajuste de la curva de regresión de [MeHg] sobre la altura media de las plantas

Por otra parte, la correlación significativa entre las diferentes concentraciones de metilmercurio con la tasa de no-germinación de forma directa y cuadrática ($r^2=0.95$) y con el desarrollo en altura de la planta de forma inversa y exponencial ($r^2=0.91$) pone de manifiesto capacidad biomedidora semi-cuantitativa de la concentración a la que se encuentra expuesta.

6. CONCLUSIONES

1. Las semillas de las habas se pueden utilizar como bioindicadoras de la contaminación por metilmercurio a través de la inhibición de la germinación.
2. La planta tiene capacidad bioindicadora por influirse significativamente su capacidad germinativa en presencia de metilmercurio.
3. Las habas poseen capacidad biomedidora semi-cuantitativa de la concentración de metilmercurio, que permite calcular los factores de riesgo de no-germinación.
4. Las conclusiones obtenidas nos permiten validar la idoneidad de la metodología utilizada para este estudio.

7. REFERENCIAS

- COBBETT, C. (2003): Heavy metals and plants - model systems and hyperaccumulators. *New Phytologist* 159 (2), 289-293.
- CZUBA, M.; SEAGULL, R. W.; TRAN, H. y CLOUTIER, L. (1987): Effects on methyl mercury on arrays of microtubules and macromolecular synthesis in *Daucus carota* cultures. *Ecotoxicol Environ Saf.* 1987 Aug, 14 (1): 64-72.
- DUAN, C. y WANG, H. (1995): Cytogenetical Toxical Effects of Heavy Metals on Vicia faba and Inquires into the Vicia Micronucleus. *Acta Botánica Sinica*, 37 (1): 14-24.
- DUAN, C.; HU, B.; WANG, H. y JIANG, H. (1999): Micronucleus frequency in vicia faba from four generations of continuously growing in toxic metal polluted soil and their dose-effects to mutagens. (Biology Department, Yunnan University, Kunming, Yunnan, 650091, China). *VI International Botanical Congress*. July 1999 by Kurt Stüber
- ESPAÑOL CANO, S. (2001): Toxicología del mercurio. Actuaciones preventivas en Sanidad Laboral y Ambiental. *Jornada Internacional sobre el impacto ambiental del mercurio utilizado por la minería aurífera artesanal en Iberoamérica*. Lima, Perú.)
- FRESCHOLTZ, T. T.; GUSTIN, M. S.; SCHORRAN, D. E. y FERNANDEZ, G. C. J. (2003): Assessing the Source of Mercury in Foliar Tissue of Quaking Aspen. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22: 2114-2119.
- <http://www.Sagan-gea.org/hojaredsuelo/paginas/20hoja.html>, con acceso el 21 de Junio de 2004.
- KIM, K.-H.; HANSON, P. J.; BARNETT, M. O. y LINDBERG, S. E. (1996): Biogeochemistry of mercury in the air-soil-plant system. In Sigel H, Sigel A, eds, *Metal Ions in Biological Systems*, Vol 34-Mercury and Its Effects on Environment and Biology, Basel, Hong Kong, pp. 185-212.
- PATRA, M. y SHARMA, A. (2000): Mercury Toxicity In Plants. *Bot. Rev.* 66: 379-422.
- WHO, E. (1996): Bioavailability of heavy metals and decontamination of soils by plants. *Appl Geochem* 11: 163-167.