



Evaluación del impacto de la contaminación en el medio ambiente

10 grupos de estudiantes
Ref.ED-905

1. OBJETIVO DEL EXPERIMENTO

Los estudiantes explorarán los problemas de la contaminación del medio ambiente mediante el desarrollo y la realización de un bioensayo que evalúa los efectos de diferentes concentraciones de tóxicos en el crecimiento de las plantas.

2. COMPONENTES para 10 grupos de estudiantes

COMPONENTES	CONSERVACIÓN
Radish Seeds A (Semillas de rábano)	Temperatura ambiente
Plant Growth Medium B (Medio crecimiento de plantas)	+4°C
Antifungal Powder C	-20°C
Zinc Solution 2 D	Temperatura ambiente
Nickel Solution E	Temperatura ambiente
Copper Solution F	Temperatura ambiente
Salt Solution G	Temperatura ambiente
Simulated Acid Rain Solution H	Temperatura ambiente
Detergente (Tween) I	Temperatura ambiente
Tubo cónico 50 ml	Temperatura ambiente
Gasas (cheese cloth)	Temperatura ambiente
Placas de Petri	Temperatura ambiente
Pipetas serológicas de 25 ml	Temperatura ambiente
Tubos cónicos 15 ml	Temperatura ambiente
Microtubos de 1.5 y 2.0 ml	Temperatura ambiente
Pipetas de transferencia 3.5 ml	Temperatura ambiente
Small Loops (asas estériles)	Temperatura ambiente
Papel de pH	Temperatura ambiente

2.1 Material requerido y no suministrado

- Microondas o placa calefactora.
- Baño de agua.
- Aspirador para pipetas.
- Etanol 70%.
- Agua destilada.
- Lejía.
- Micropipetas 200-1000 ul y puntas (recomendado).
- Parafilm.
- Cuerda.
- Reglas.
- Guantes y gafas de seguridad.
- Balanza analítica (opcional).
- Lámpara de crecimiento (opcional)

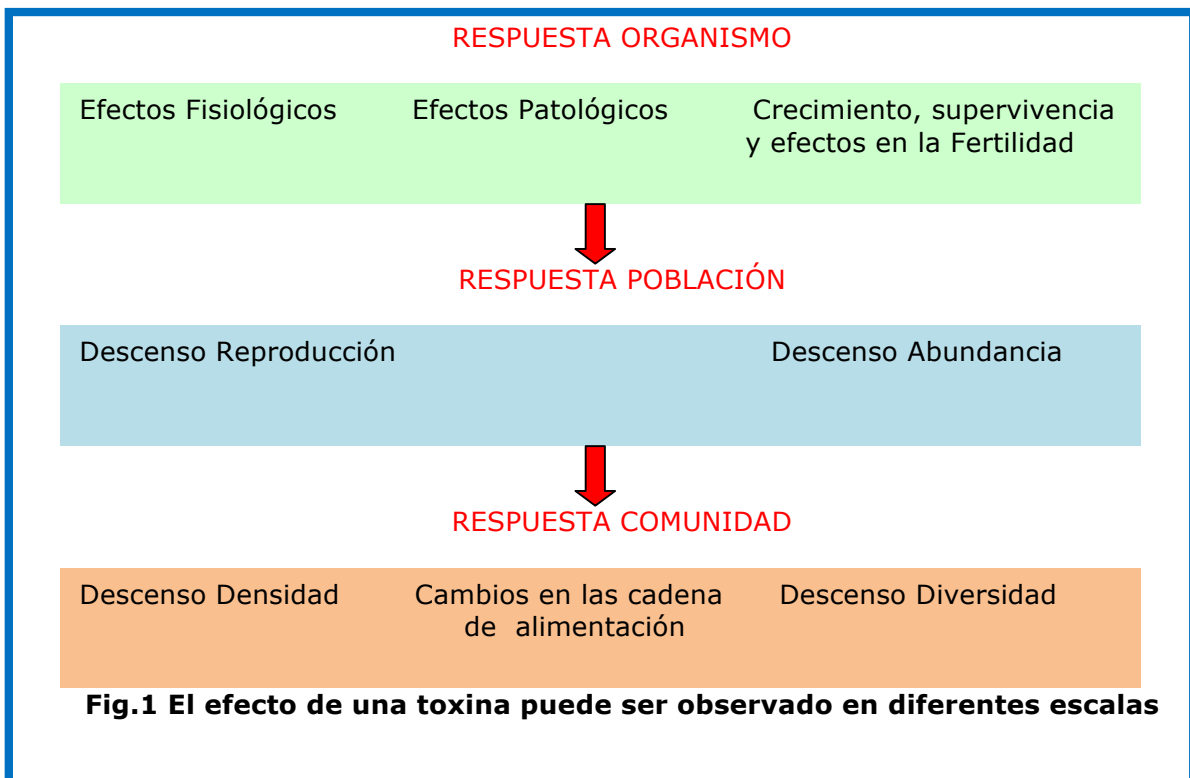
3. INTRODUCCIÓN

TOXICOLOGÍA AMBIENTAL

En 1962, Rachel Carson publicó "Silent Spring", que describía el efecto perjudicial de los pesticidas como el DDT en el medio ambiente. El libro ayudó a lanzar el campo multidisciplinario de la toxicología ambiental. Este campo explica cómo los químicos se mueven dentro del medio ambiente y cómo afectan a los sistemas biológicos. Las preguntas comunes que se hacen los toxicólogos ambientales son:

- ¿Qué químicos son peligrosos? ¿Qué nivel de exposición causará el daño?
- ¿Cuáles son los efectos negativos de la exposición a un químico en particular?
- ¿Cuáles son los destinos ambientales y biológicos de diferentes sustancias químicas?

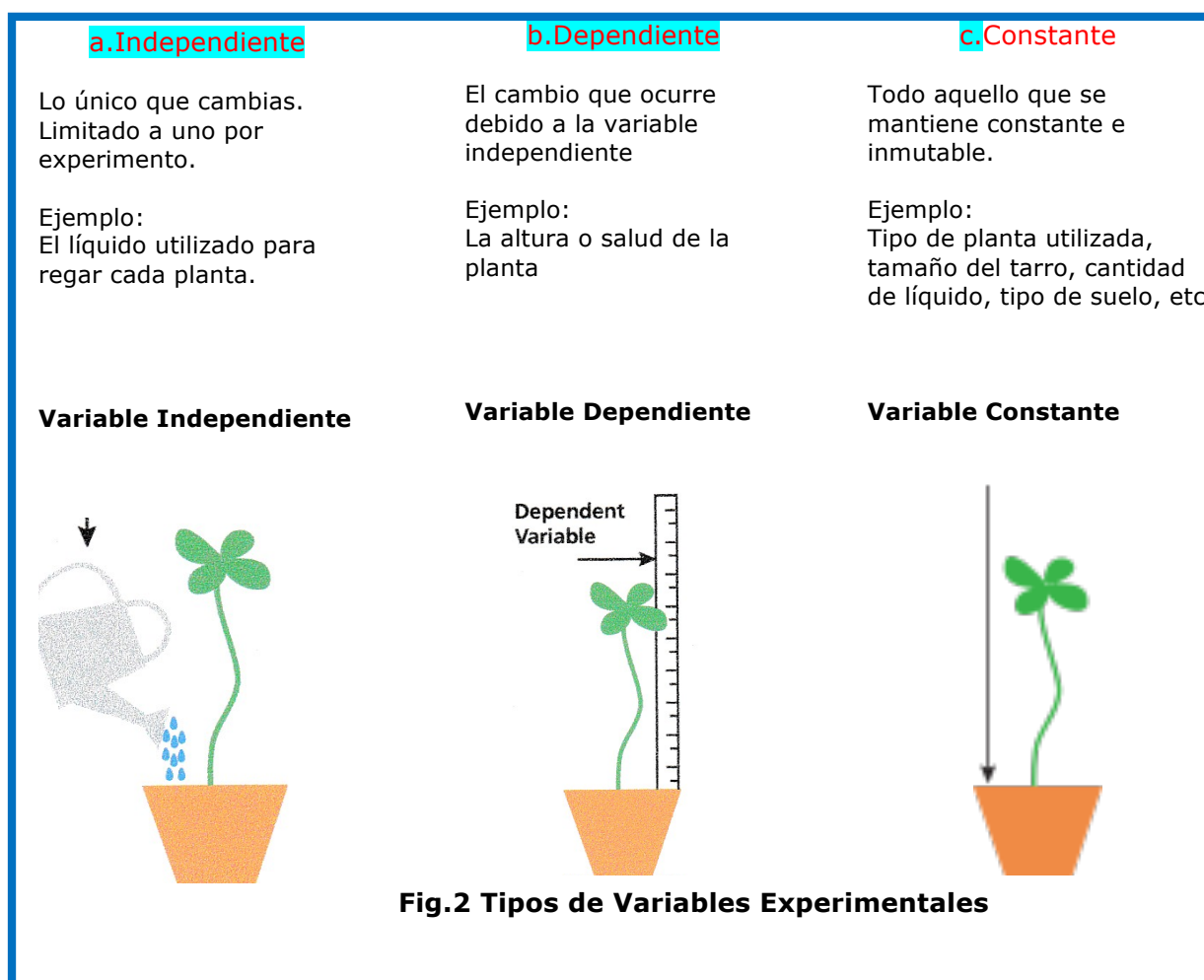
Para responder a estas preguntas, los científicos deben estudiar los sistemas biológicos desde diferentes perspectivas. A pequeña escala, pueden estudiar los mecanismos celulares y moleculares de la intoxicación en organismos individuales. A nivel del ecosistema, los científicos pueden examinar los cambios en la diversidad en un área que resulta de las diferentes susceptibilidades de las especies a una sustancia química introducida. La Figura 1 ilustra los efectos en cascada de una toxina a diferentes escalas. Juntos, estos estudios proporcionan pistas sobre el mecanismo y el impacto más amplio de las toxinas ambientales.



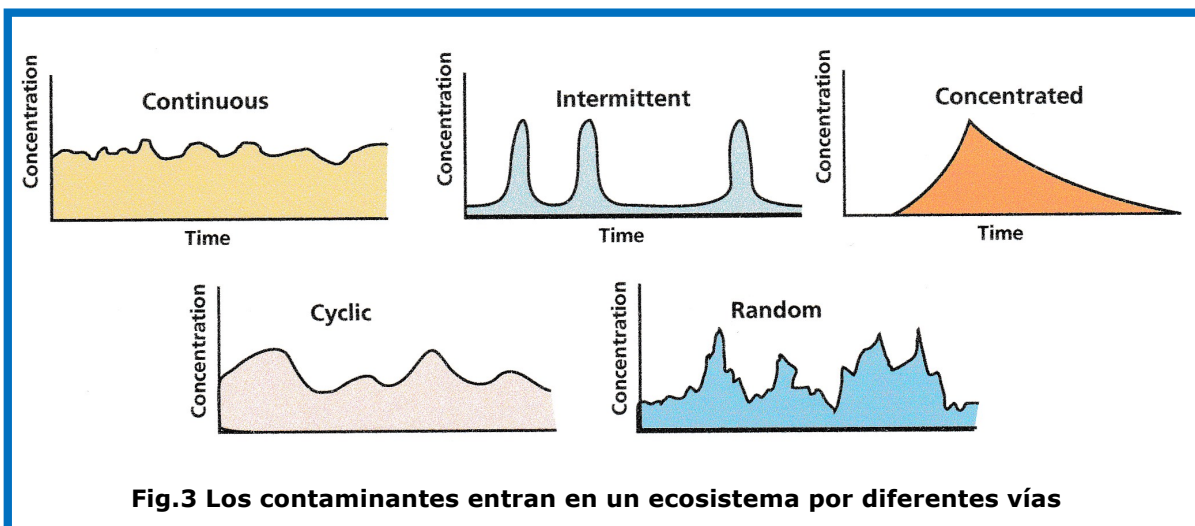
Una situación donde las toxinas ambientales pueden tener efecto devastador es cuando ingresan al suministro de agua de un ecosistema o de un municipio. La contaminación del agua puede implicar cualquier cambio (químico, biológico o físico) que tiene un efecto dañino en el ambiente acuático y cualquier organismo vivo que dependa de él. **Los científicos que investigan la contaminación del agua a menudo se basan en un ensayo biológico, o bioensayo. Este experimento mide los efectos de una sustancia en organismos vivos, o indicador de especies, que sirven como marcadores para la salud de un ecosistema.**

Las especies indicadoras utilizadas en bioensayos necesitan ser monitorizadas fácilmente en el laboratorio o campo y sensible a las condiciones ambientales cambiantes. Las opciones son peces juveniles, moluscos bivalvos y semillas de plantas. Durante un bioensayo, varios individuos de una especie indicadora se exponen a la sustancia que se prueba durante un tiempo predeterminado y luego se compara con un grupo de control que no estuvo expuesto a la sustancia. **Si los organismos en el grupo de prueba muestran efectos tales como crecimiento lento, movimiento reducido o muerte, y si estos efectos no se observan en el control, entonces la sustancia que se está probando puede ser tóxica.**

Al diseñar bioensayos, los científicos deben especificar tres tipos de variables: independiente, dependiente y constante. La variable independiente (Figura 2a) es la que los científicos manipulan. Idealmente, debería haber solo una variable independiente para saber que esta variable está causando los resultados. La variable o variables dependientes (Figura 2b) son las que los científicos observan. Los valores de las variables dependientes son causados por y dependen del valor de la variable independiente, de ahí su nombre. Finalmente hay variables constantes (Figura 2c). Estas son variables que también pueden afectar las variables dependientes y por lo tanto se mantienen iguales durante todo el experimento.



Un concepto central de la toxicología es que todos los productos químicos son tóxicos en ciertas cantidades. Esto se resume con el advenimiento "La dosis hace al veneno". Por ejemplo, cantidades traza de muchos metales pesados "tóxicos" son necesarios para la supervivencia de ciertos organismos. Por el contrario, incluso el agua pura puede ser un veneno cuando se consume en exceso. Por lo tanto, los toxicólogos deben considerar la concentración, la frecuencia y la duración de la exposición al investigar la toxicidad de un contaminante (Figura 3).



Los contaminantes en el agua comúnmente se miden e informan como partes por millón (ppm). Esta es una notación que representa la proporción de un químico en relación con la muestra completa. Es similar al porcentaje, excepto que la escala es de un millón en lugar de cien. Por ejemplo, una solución que contiene dos gramos de plomo en un millón de gramos de agua es una solución de 2 ppm. Debido a ciertas propiedades del agua, 1 ppm es siempre igual a 1 mg del contaminante en 1 L de agua.

La otra consideración al hablar de tóxicos implica la respuesta de un organismo a la dosis. Por ejemplo, la mortalidad es una respuesta biológica fácil de observar y rastrear. Los toxicólogos ambientales pueden medir el LD50 de un químico, la cantidad de sustancia necesaria para matar al 50% de la población de prueba. Sin embargo, los científicos también están interesados en respuestas subletales tales como un cambio en el comportamiento o el deterioro fisiológico. La Tabla 1 enumera varias respuestas comunes al estrés químico de los vegetales. Con el tiempo, estas respuestas provocan cambios en la población, incluida una distribución alterada, cambios en la estructura de edad y alteraciones en los genes. Juntos, estos efectos pueden llevar a la erradicación de una especie del medio ambiente y a una disminución de la diversidad.

Estado	Síntomas
Germinación	<ul style="list-style-type: none"> • Bajo vigor de semilla / emergencia pobre • Plántulas hinchadas, retorcidas o distorsionadas • Hoja dañada tipo quemadura
Crecimiento vegetativo	<ul style="list-style-type: none"> • Hojas distorsionadas o descoloridas • Puntos de muerte en las hojas • Crecimiento lento excesivo • Pequeños sistemas de raíz
Desarrollo reproductivo	<ul style="list-style-type: none"> • Frutas distorsionadas y descoloridas • Crecimiento del tubo del polen atrofiado

Tabla 1. Daños a las plantas asociados con la exposición de tóxicos

FUENTES COMUNES DE CONTAMINACIÓN DEL AGUA

La contaminación del agua es una gran preocupación en todo el mundo. Los contaminantes presentes en el agua contaminada abarcan una amplia variedad de compuestos químicos, desechos sólidos y microorganismos. La contaminación ingresa al suministro de agua a través de dos vías principales (resumidas en la Figura 4). La contaminación del agua de se refiere a cualquier contaminante que ingresa al suministro de agua desde una única fuente fácilmente identificable "Puntual", como una planta de fabricación o una planta de tratamiento de agua. Este desecho, llamado efluente, es un material complejo que comprende aguas residuales y / o subproductos químicos. Dado que la práctica común es liberar efluentes en cuerpos de agua cercanos, la composición de estas aguas residuales es monitoreada y regulada estrictamente por las agencias gubernamentales. Por el contrario, la contaminación "no puntual" no se puede remontar a una única fuente identificable; a menudo resulta de actividades cotidianas. La contaminación típica no puntual surge de tanques sépticos que fallan, corrimientos de carreteras y granjas, y la deposición atmosférica de las emisiones de los vehículos.

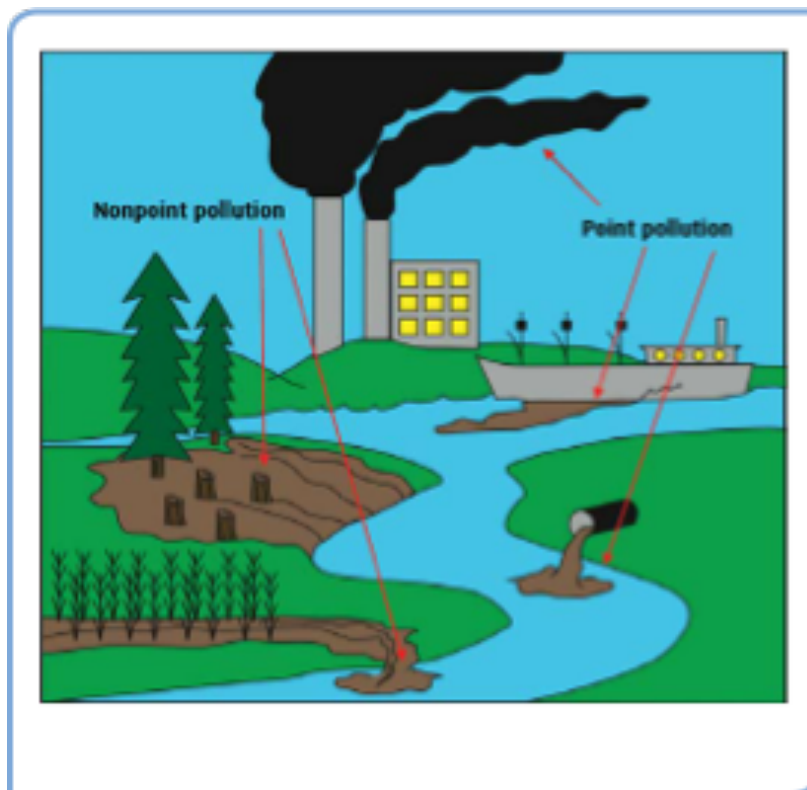


Fig.4 Fuentes puntuales y no puntuales de la contaminación del agua

Tanto las fuentes puntuales como no puntuales afectan áreas locales, aunque también pueden perturbar el medio ambiente a cientos de millas de distancia de la fuente (conocida como contaminación transfronteriza). Una forma común de contaminación transfronteriza es la lluvia ácida, que puede dañar las plantas, los animales y la infraestructura humana. La lluvia ácida es causada por el dióxido de azufre y el óxido de nitrógeno emitidos por la quema de combustibles fósiles. La mayoría de las veces, los nutrientes base en el suelo como el calcio, el potasio y el magnesio pueden neutralizar la acidez por un tiempo. Sin embargo, cuando los ecosistemas están expuestos a la acidificación crónica, estos productos químicos se agotan. Con el tiempo, la lluvia ácida disminuye el crecimiento y daña la vida vegetal porque el cambio en el pH altera la biología y la química del suelo: los iones de hidrógeno eliminan los nutrientes esenciales y movilizan otras toxinas como el aluminio.

Los metales se encuentran de forma natural en la tierra pero se concentran como resultado de la actividad humana. La exposición al cadmio, al mercurio, al plomo y al arsénico es motivo de gran preocupación pública debido a sus efectos conocidos, graves y adversos para la salud. Por ejemplo, en 2016, la ciudad de Flint Michigan declaró un estado de emergencia después de que el plomo de las tuberías envejecidas se filtrara al suministro de agua.

Para muchas personas, la contaminación por metales pesados es un problema asociado con áreas de industria intensiva. Sin embargo, las carreteras y los automóviles también son una fuente de estos contaminantes. Por ejemplo, los frenos liberan cobre, mientras que el desgaste de los neumáticos libera zinc. En la superficie de la carretera, la mayoría de los metales pesados se adhieren a la superficie del polvo de la carretera u otras partículas. Cuando llueve, los metales se disolverán o serán arrastrados fuera del camino con el polvo. En cualquier caso, los metales entran al suelo o se canalizan hacia un drenaje pluvial. Las plantas se exponen a las toxinas a través de la absorción de agua. Una vez dentro de la planta, las toxinas pueden unirse e inhibir componentes celulares tales como proteínas estructurales, enzimas y ácidos nucleicos.

La salinización es la acumulación gradual de sal en el suelo y el agua. La sal puede acumularse de muchas fuentes, incluida de los compuestos utilizados para eliminar la nieve y el hielo de las carreteras o las técnicas de riego inadecuadas. En concentraciones determinadas, las sales representan un riesgo para las plantas, los animales y el medio ambiente acuático. A medida que aumenta la concentración de sal en el suelo, el agua no fluye tan libremente en las raíces de las células, lo que provoca condiciones similares a las de la sequía en la planta. Además, cuando la sal se disuelve en el agua, los iones de sodio y cloruro se separan y pueden transportarse a las hojas donde se acumulan y causan quemaduras en las hojas: un oscurecimiento de los tejidos y una coloración amarillenta de las venas.

Este práctica se centra en el efecto que producen los contaminantes comunes del agua sobre la salud de las plantas, concretamente en brotes de *Raphanus sativus* (rábano). Los estudiantes explorarán variables independientes, dependientes y constantes en un bioensayo dirigido. Cada grupo diseñará y ejecutará un bioensayo utilizando varias concentraciones de un contaminante para determinar su daño ambiental. Se proporcionan toxinas comunes como zinc, níquel, cobre, sal y agua acidificada, que se pueden analizar con este bioensayo. Alternativamente, los estudiantes también pueden evaluar los efectos de la contaminación puntual y no puntual de importancia regional por sus efectos sobre la vida de las plantas. Por ejemplo, los estudiantes pueden investigar las refinerías o fábricas locales para formar una hipótesis sobre qué tipo de desechos se pueden liberar en los ríos locales (contaminación puntual). También se puede explorar la contaminación no puntual debida a la eliminación inadecuada de productos comunes de limpieza o cuidado personal. Después de realizar el experimento, los estudiantes analizarán los datos para determinar la concentración de la sustancia química que es tóxica para la vida de la planta.

4. DESCRIPCIÓN DEL EXPERIMENTO

Los estudiantes explorarán los problemas de la contaminación del medio ambiente mediante el desarrollo y la realización de un bioensayo que evalúa los efectos de diferentes concentraciones de tóxicos en el crecimiento de las plantas.

4.1 Precauciones

1. Llevar gafas y guantes de laboratorio mientras se trabaja.
2. **NO PIPETEAR CON LA BOCA**, utilizar los dispositivos adecuados.
3. Extremar las precauciones cuando se trabajan con equipos que utilizan conjuntamente calor y mezcla de reactivos.
4. Lavarse las manos con jabón y agua después de haber trabajado en el laboratorio o utilizado reactivos o materiales biológicos.



4.2 Preparaciones Previas

Módulo 1: Planificación de un Bioensayo. 30 minutos

Elección de la variable independiente

En este kit proporcionamos material para manipular la concentración de zinc, níquel, cobre y sal. También proporcionamos una solución de "lluvia ácida" que se puede usar para cambiar el valor de pH de los medios. Cada uno de estos cinco contaminantes puede ser probado por dos grupos. Otros posibles contaminantes para analizar pueden ser productos de limpieza de casas, productos de cuidado personal, medicinas, muestras de aguas de arroyos locales y otros productos químicos seguros. Para determinar la concentración de cualquier contaminante adicional, consulte el Apéndice B. Tenga en cuenta que el medio de cultivo proporcionado contiene agar polimerizado, que puede colapsar a niveles bajos de pH o en presencia de detergentes concentrados. Si usa cualquiera de estos posibles contaminantes, recomendamos mantener los niveles de pH por encima de 2.5 y los niveles de detergente por debajo de 1000 ppm (0.1%).

Elección de las variables dependientes

La longitud de la raíz y el éxito en la germinación son las variables más probadas en los bioensayos de plantas. Otras mediciones potenciales son la longitud del brote, la longitud total de la planta, la relación raíz / brote y la masa final de la planta. Decidir si estas variables variarán de un grupo a otro o serán universales para establecer las comparaciones entre grupos. Si decides las mismas variables de toda la clase,

asegúrate de especificar cómo la clase define la germinación. Además, la estructura de la raíz en las plántulas de rábano suele ser de raíz común pero a veces puede ser fibrosa. Antes de realizar el experimento, decidir si combinar las medidas de múltiples raíces largas.

Determinar las variables constantes

Orientación: Sugerimos una orientación horizontal si usamos un jabón o detergente como contaminante ya que el agar se puede colapsar cuando está vertical. Sin embargo, la orientación vertical permite una fácil visualización y medidas de las plantas en crecimiento, así como un almacenamiento más compacto. Si vas a mantener la orientación vertical, necesitarás crear una cámara para sostener las placas de Petri. Pueden ser útiles las cajas vacías de puntas de 1000 μL o una botella de refresco de 1 litro que ha sido cortada como vemos en la imagen de abajo también funcionará.



Volúmenes: para obtener los mejores resultados, recomendamos preparar placas de Petri que contengan 1 ml de contaminante y 14 ml de medio de crecimiento vegetal. Usando estos volúmenes, este kit proporciona suficientes medios de crecimiento de plantas para cuarenta placas de crecimiento.

Luz: la variación en la exposición a la luz puede afectar significativamente la tasa de crecimiento en cada placa. Considere cambiar regularmente las posiciones de las placas si la fuente de luz es el sol de una ventana. Alternativamente, crear una cámara de crecimiento de la planta (Apéndice A) o usar una luz de crecimiento puede ayudar a mantener constante la intensidad de la luz en las placas.

Temperatura: las semillas de rábano germinan y crecen mejor en temperaturas entre 12 ° C y 24 ° C. Asegúrese de que las clases mantengan estas temperaturas durante las noches y los fines de semana.

Tiempo de crecimiento: las semillas de rábano generalmente germinan en tres días. Luego crecen rápidamente y desinhibidas pueden alcanzar longitudes de 15 cm en una semana. Las plantas crecerán aún más rápido en una cámara de crecimiento. El riesgo de contaminación aumenta con tiempos de crecimiento más largos.

Determinar el número de repeticiones

Encontramos que cinco semillas son óptimas para las placas verticales y que nueve semillas son óptimas para las placas horizontales. Hemos incluido plantillas para esto en las instrucciones del Módulo II. Este kit proporciona suficientes semillas para cuarenta placas con 9 semillas cada una.

Módulo 2: Realización del Bioensayo. 60 minutos. El crecimiento de las plantas 1 semana.

Esterilizar agua

Se necesitarán 500 ml de agua estéril para este experimento. Si tiene acceso a un autoclave, le recomendamos que esterilice el agua a 121 ° C durante 40 minutos. Alternativamente, el agua puede esterilizarse en su mayor parte hirviéndola durante 15 minutos. Una opción final es comprar agua estéril comercial.

Preparar y alicuotar los reactivos

1. Alicuotar 5 ml de agua estéril en diez tubos de 15 ml y ETIQUETE cada tubo como "agua estéril".
2. Prepare el concentrado de contaminantes para los diez grupos:
 - a) Alicuotar 1.8 ml de Solución de Zinc (Componente D) en dos tubos de 2 ml. ETIQUETE cada tubo "10,000 ppm de Zinc".
 - b) Alicuotar 1.8 ml de solución de níquel (componente E) en dos tubos de 2 ml. ETIQUETE cada tubo "1,000 ppm de níquel".
 - c) Alicuotar 1.8 ml de solución de cobre (componente F) en dos tubos de 2 ml. ETIQUETE cada tubo "1,000 ppm de Cobre".
 - d) Alicuotar 1.8 ml de solución salina (componente G) en dos tubos de 2 ml. ETIQUETE cada tubo "10,000 ppm de sal".
 - e) Alicuotar 1.8 ml de solución de lluvia ácida simulada (componente H) en dos tubos de 2 ml. ETIQUETE cada tubo "pH Ácido 1.35".
 - f) Alicuotar cualquier contaminante adicional y etiquetar apropiadamente.

Esterilizar semillas

Esterilice las semillas el día del Módulo II ya que estas semillas germinan rápidamente.

1. Generar la solución de esterilización MEZCLANDO 15 ml de lejía, 15 ml de agua estéril y todo el tubo **de Tween (Componente I)** en los tubos de 50 ml cónicos.
2. PREPARAR seis cuadrados con las gasas (cheese cloth). Cada cuadrado debe tener al menos 5x5 cm y 3 o 4 hojas de grosor.
3. AGREGUE las **semillas de rábano (Componente A)** al tubo cónico de 50 ml.
4. INCUBACIÓN de 5 a 10 minutos. Agite suavemente el tubo de vez en cuando para hacer rotar las semillas.
5. Colocar un cuadrado de gasa sobre la parte superior del tubo y vierta la solución de esterilización.
6. LLENAR el tubo con agua estéril.
7. LAVE las semillas en agua estéril balanceando suavemente el tubo durante 1 minuto.
8. COLOCAR un nuevo cuadrado de gasa sobre la parte superior del tubo y vierta el agua.
9. REPETIR los pasos 6 a 8 al menos cuatro veces más.
10. TRASLADAR el número apropiado de semillas a diez tubos de centrífuga de 1,5 ml con un asa estéril.
(25 para grupos que usan placas verticales, 45 para grupos que usan placas horizontales).

Preparación del medio de crecimiento de las plantas

1. CONFIGURAR un baño de agua a 60 ° C.
2. AFLOJAR, pero no quite los tapones de los frascos de Plant Growth Medium B (Medio de crecimiento de plantas) para permitir que el vapor se ventile durante el calentamiento. **PRECAUCIÓN: No aflojar el tapón antes de calentar el envase pueda llevar a que la botella se rompa o explote.**
3. Colocar en el microondas todas las botellas de medios de crecimiento de plantas durante 60 segundos para fundir el agar. Retire cuidadosamente las botellas del microondas y MEZCLE haciendo girar las botellas. Continúe CALENTANDO el medio en

- intervalos de 30 segundos hasta **que el agar esté completamente disuelto (la solución de color amarillo debe estar limpia y libre de partículas pequeñas).**
4. Permita que los medios se enfríen a 60 ° C colocándolos en el baño de agua.
 5. AGREGAR el tubo de polvo antifúngico (Antifungal Powder Componente C) a cada botella y mezcle por agitación suave.
 6. AÑADIR 14 ml de medio a cada tubo cónico con tapa de rosca de 15 ml (4 tubos por grupo, 40 tubos en total).
 7. COLOCAR los tubos de medio fundido en el baño de agua a 60 ° C para evitar que el agar solidifique.

NOTA: El agar DEBE mantenerse caliente todo el tiempo. Si los medios se solidifican en la botella o en los tubos de 15 ml se puede recalentar cuidadosamente en el microondas con intervalos de 10 segundos. Recuerde aflojar las tapas antes de calentar.

Material que recibe cada grupo en el módulo 2

- 4 placas de Petri
- 3 tubos de microcentrífuga de 2 ml
- 1 Pipeta de transferencia envuelta individualmente
- Asa de siembra
- Un tubo de semillas de rábano
- 5 ml de agua estéril
- 1.8 ml de contaminante
- Parafilm o cinta de papel
- 4 tubos de 15 ml con medio de crecimiento de plantas
- Solo para los grupos de prueba de lluvia ácida: 4 tiras de pH

Módulo 3: Análisis de los resultados del Bioensayo. 45 minutos

En esta sección, los estudiantes calcularán los promedios, las desviaciones estándar y los valores aproximados de la TC50 utilizando papel de gráficos y una calculadora estándar o un programa de gráficos.

5. PRÁCTICA

Módulo 1: Planificación de un Bioensayo.

Se diseñará y realizará un bioensayo para determinar a qué concentración un contaminante ambiental es tóxico para el crecimiento de una planta. Use la siguiente hoja de trabajo para desarrollar su experimento antes de comenzar el Módulo II.

Formular una pregunta: la respuesta a la pregunta se obtiene mediante la experimentación y el razonamiento. En la pregunta se debe especificar qué contaminante interesa probar y qué especies indicadoras piensa utilizar. Investiga los tóxicos potenciales o use uno de los cinco provistos con el kit. Para este experimento, hemos proporcionado semillas de rábano, pero puede elegir una especie de planta alternativa si lo desea.

Ejemplo: "¿A qué concentración el plomo es tóxico para las plantas de rábano?"

Formular una hipótesis: esta es una posible respuesta a su pregunta y una predicción de lo que cree que sucederá. Recuerde que está realizando un bioensayo donde observará la respuesta de un organismo a una cambiante dosis química.

Ejemplo: "La germinación de la semilla de rábano y el crecimiento de la planta de rábano disminuirán al aumentar las concentraciones de plomo".

Elegir una variable independiente: este es el factor que cambiarás en tu experimento. Idealmente, solo hay una variable independiente. En este bioensayo, la dosis química es la variable independiente.

Ejemplo: "La concentración de plomo".

Elegir variables dependientes: estos son los factores que se predicen que cambiarán como resultado de la variación en su variable independiente. Puede haber varios. Utilizar la Figura 5 para anticipar qué cambios se pueden observar y cuantificar.

Ejemplo: "Supondremos que la cantidad de semillas que germinarán y la longitud de sus raíces cambiarán como resultado de la variación de las concentraciones de plomo. Definimos la germinación como cuando aparece la radícula (raíz primaria) y mediremos la longitud de la raíz al milímetro.

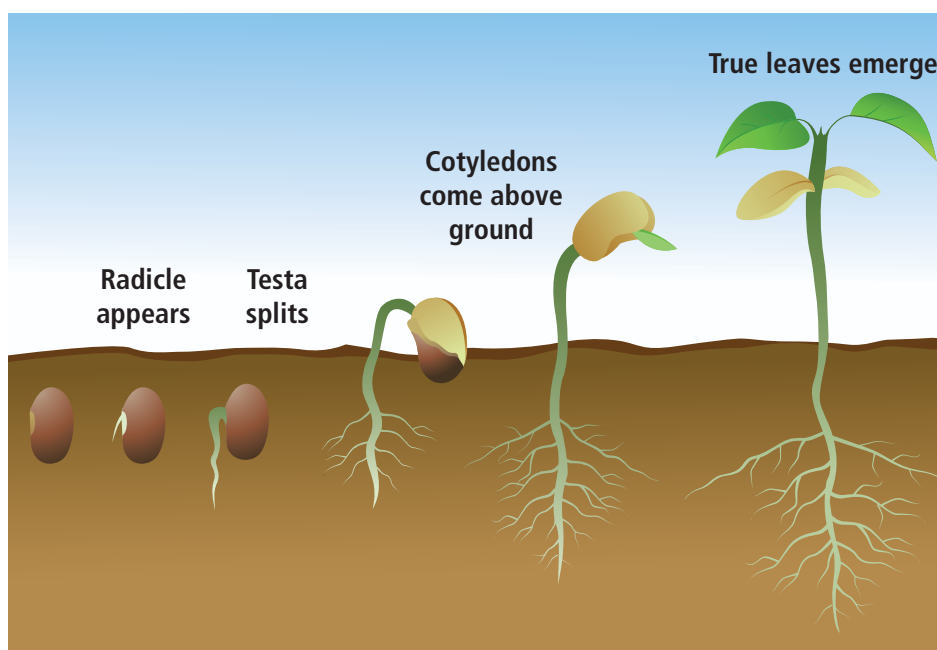


Fig.5 Pasos clave en la germinación y crecimiento de la planta

Especificar las constantes: estos son los factores que no cambian. La orientación de la placa de Petri (vertical vs. horizontal) y el tiempo de crecimiento deben decidirse aquí. Sugerimos encarecidamente que las plantas crezcan en 15 ml de gel de agar compuesto por 14 ml de medio de crecimiento de plantas y 1 ml de líquido contaminante.

Ejemplo: "Las plantas crecerán durante una semana en placas de Petri verticales. Cada placa tendrá la misma temperatura, humedad y exposición a la luz. 14 ml de medio de crecimiento de la planta y 1 ml de contaminante líquido se agregarán a cada placa".

Planificar el tratamiento: la variable independiente debe probarse en al menos dos grupos, y cada grupo debe recibir diferentes concentraciones de contaminantes. Recomendamos probar al menos tres concentraciones. A menudo es conveniente probar una serie de diluciones para cada grupo de contaminante. Creemos que una serie de diluciones 1:10 proporcionará un buen nivel de contraste entre las condiciones. Si su grupo decide no usar una serie de dilución 1:10, los contaminantes suministrados de metales pesados generarán una placa con una concentración de 1.000 ppm (cobre y níquel) o 10.0000 ppm (zinc y sal) cuando 1 ml de la solución concentrada se combine con 14 ml de los medios de crecimiento de la planta. La solución de lluvia ácida se proporciona a un pH inicial de 1,35. Para el contaminante de lluvia ácida simulado, se clasificará la acidez de cada condición experimental (por ejemplo, baja, media y alta) en el Módulo I y luego medirá el pH de sus diluciones en el Módulo II.

Ejemplo: "Condiciones experimentales 1 - 100 ppm Plomo. Condición experimental 2 - 10 ppm Plomo. Condición experimental 3 - 1 ppm de plomo."

Condiciones experimentales 1 EC1	
Condiciones experimentales 2 EC2	
Condiciones experimentales 3 EC3	

Elegir un control: este servirá como estándar de comparación. Si el grupo de control se trata de manera idéntica a los grupos experimentales, esto supondrá que cualquier diferencia en el resultado es causada por la presencia de las condiciones experimentales.

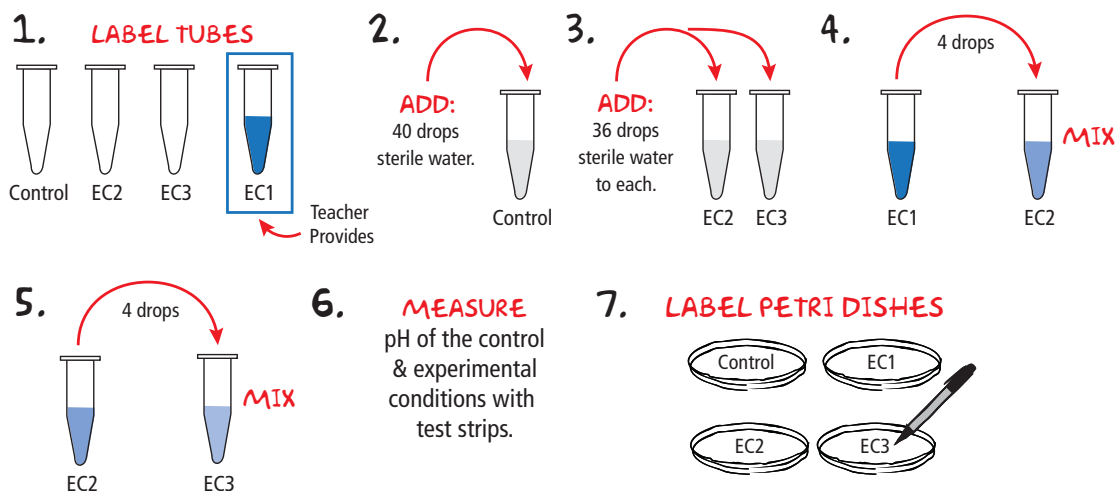
Ejemplo: "Control - 0 ppm de plomo (agua pura)".

Control	
---------	--

Decidir el número de réplicas: estas réplicas serán expuestas exactamente a las mismas condiciones del experimento. En este experimento, la cantidad de repeticiones será la cantidad de semillas plantadas en una placa de Petri. Las repeticiones adicionales a menudo aumentan la precisión y la fiabilidad de las estadísticas de resumen. Sin embargo, cada réplica requiere recursos tales como espacio y nutrientes.

Ejemplo: "5 semillas por placa".

Módulo 2: Realización del Bioensayo.

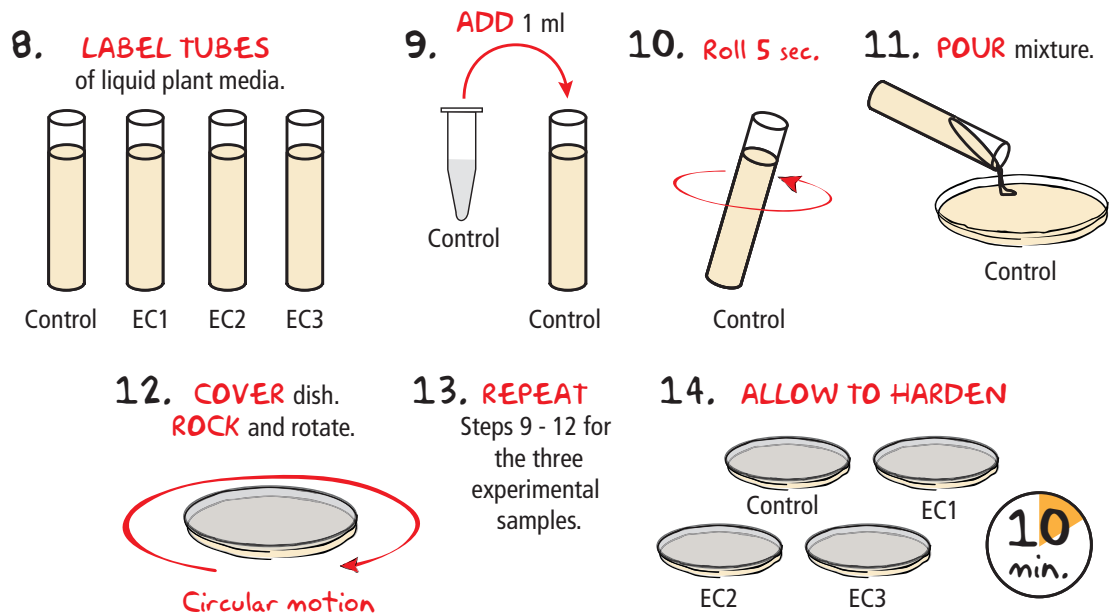


Si el laboratorio dispone de micropipetas de volumen variable **SE RECOMIENDA** trabajar con ellas preferiblemente antes que con las pipetas de transferencia que van en el kit

1. Marcar o etiquetar 3 microtubos vacíos de 2.0 ml como control, EC2 y EC3. El profesor proporcionará el microtubo EC1 el cual contiene la concentración mayor del contaminante.
2. Añadir 40 gotas (1.6 ml) de agua estéril al control utilizando una pipeta de transferencia o micropipeta.
3. Añadir agua estéril a los microtubos EC2 y EC3. Si se está realizando una serie de diluciones 1:10 el volumen será de 36 gotas (1.44 ml). Este volumen, así como los volúmenes en los pasos 4 y 5, serán diferentes si está utilizando un factor de dilución diferente o otras concentraciones.
4. Utilizando una pipeta de transferencia o micropipeta añadir 4 gotas (160 ul) del microtubo EC1 al microtubo EC2. Mezclar bien pipeteando arriba-abajo.
5. Utilizando una pipeta de transferencia o micropipeta añadir 4 gotas (160 ul) del microtubo EC2 al microtubo EC3. Mezclar bien pipeteando arriba-abajo.
6. Si tu grupo está probando la lluvia ácida como contaminante, utilizar el papel de pH para medir el control y cada condición experimental.
7. Marcar o etiquetar cada placa de Petri con el número de identificación del grupo, contaminante, condición experimental o control y la fecha.

Condición experimental 1 (EC1) 1:1 dilución	Condición experimental 2 (EC2) 1:10 dilución	Condición experimental 3 (EC3) 1:100 dilución
1.6 ml del contaminante concentrado	1.44 ml de agua estéril + 160 ul de dilución 1:1	1.44 ml de agua estéril + 160 ul de dilución 1:10

Tabla. Serie de diluciones 1:10



8. Coger 4 tubos de 15 ml con el medio de crecimiento de plantas del baño a 60°C. **TRABAJAR rápidamente ya que el medio se enfría y puede solidificar.** Marcar cada tubo EC1, EC2, EC3 y control.
9. Añadir 1 ml de la solución control al tubo de 15 ml marcado como control.
10. Agitar con cuidado para mezclar los líquidos. Evitar introducir burbujas en el medio.
11. Rápidamente añadir el contenido del tubo en la placa control.
12. Coloque la tapa y girar suavemente la placa en las manos con movimientos circulares para dispersar todo el medio por toda la placa.
13. Repetir los pasos del 9 al 12 con cada una de las 3 condiciones experimentales.
14. Permitir que el medio de crecimiento de plantas solidifique por al menos durante 10 minutos.

OPCIONAL PUNTO DE STOP: Las placas de Petri pueden ser conservadas a 4°C hasta una semana. Mantener las placas tapadas, en posición horizontal y envueltas en plástico para evitar que se sequen o contaminen.

NOTA IMPORTANTE:

- Es importante prevenir la contaminación del medio de crecimiento de plantas limitando el contacto con el aire.
- Utilizar guantes.
- Lavar las áreas de trabajo con etanol 70%.

SEMBRAR Y CULTIVAR LAS SEMILLAS

1. Utilizando un asa de siembra, COLOQUE suavemente las semillas en cada placa de Petri. Las semillas deben descansar en la superficie de los medios durante al menos 5 minutos. A continuación, se proporciona una plantilla para la colocación de semillas de cinco y nueve.
2. Cuidadosamente sellar cada placa de Petri con parafilm, plástico o cinta alrededor del borde para ayudar a mantener el ambiente húmedo. Incluso con un manejo suave, las semillas pueden moverse fuera de lugar.
3. COLOQUE las placas en un lugar bien iluminado donde puedan crecer sin ser perturbadas durante todo el experimento. Las semillas de rábano prefieren crecer bajo la luz solar directa, en una cámara de crecimiento o bajo una luz de crecimiento.

INTERPRETACIÓN DE LOS DATOS DEL BIOENSAYO

1. REVISAR su control para confirmar que (a) las semillas crecieron en condiciones adecuadas y (b) que la comparación entre los resultados del grupo es apropiado.

Trabajar con organismos vivos inevitablemente introduce variabilidad. Sin embargo, si menos del 80% de las semillas en su placa de control germinaron, algo puede haber salido mal en el experimento. También comparar los promedios variables dependientes para su control con otros grupos. Debido a que todas las placas de control deben tener agua en lugar de un contaminante, estos valores deben ser similares.

2. CREAR gráficas de barras con los resultados usando los valores promedio de las variables dependientes. Los datos se pueden trazar a mano o mediante un programa de gráficos por ordenador.

Usar estos gráficos para identificar tendencias o resultados inesperados. ¿La toxicidad de su contaminante aumenta / disminuye / permanece igual de una concentración a la siguiente? ¿Hay algún cambio que no esperabas? ¿Cuál podría ser una posible explicación para estos cambios?

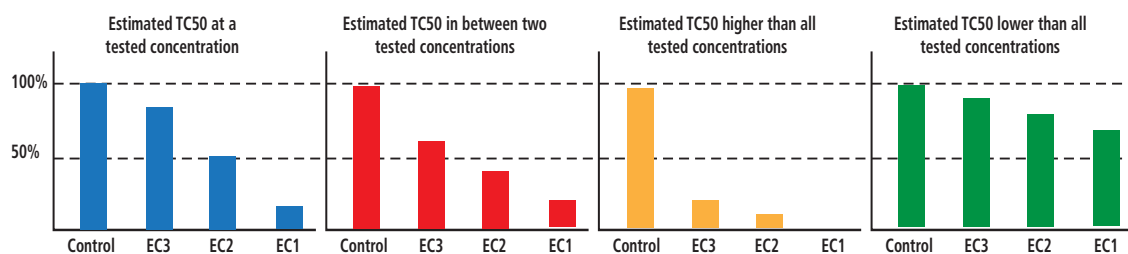
3. EXAMINAR la variabilidad.

Los valores promedio aportan información importante, pero también es útil observar los puntos de datos individuales para ver cuánta variabilidad existía dentro de una condición experimental. Como se mencionó anteriormente, los bioensayos inevitablemente tendrán cierta variabilidad debido a las diferencias biológicas entre individuos.

Los errores humanos, como una persona que mide una longitud ligeramente diferente que otra, también puede introducir variabilidad. Las grandes diferencias entre las condiciones experimentales son menos significativas cuando también hay un alto nivel de variabilidad dentro de las condiciones experimentales.

4. (Opcional) CALCULAR el valor TC50.

El valor TC50 es la concentración que causa una caída del 50% en el crecimiento o la salud de los organismos de prueba. Utilice gráficos para estimar la concentración que produce tasas de germinación o crecimiento de aproximadamente la mitad de los grupos de control. Este valor puede estar en una concentración probada, entre dos de las concentraciones probadas, más alta que todas las concentraciones probadas, o menor que todas las concentraciones probadas. Esto se ilustra en gráficos como el ejemplo de a continuación.



5. COMPARAR los resultados con otros grupos de estudiantes y, si es posible, clasifique cada contaminante de mayor a menor como tóxico para las semillas de rábano.

6. RESULTADOS

Módulo 1: Planificación de un Bioensayo.

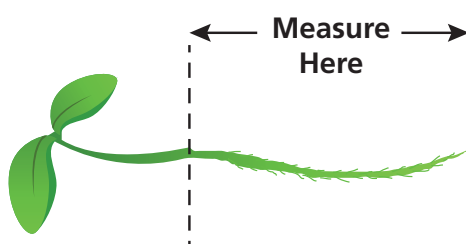
Las respuestas serán únicas para cada grupo de estudiantes. Como ejemplo el caso del cobre.

Haga una pregunta: "¿A qué concentración el cobre se vuelve tóxico para las plantas de rábano?"

Formule una Hipótesis: "La germinación de la semilla de rábano y el crecimiento de la planta de rábano disminuirán al aumentar las concentraciones de cobre".

Elija una variable independiente: "La concentración de cobre".

Elija Variable (s) dependiente (s): "La cantidad de semillas que germinan y la longitud de sus raíces. Definimos la germinación como cuando aparece la radícula (raíz primaria) y mediremos la longitud de la raíz , como se muestra.



Especifique las constantes: "Temperatura, humedad, intensidad de la luz, orientación vertical de la placa, tiempo de crecimiento de 1 semana, 14 ml de medio de crecimiento de la planta y 1 ml de contaminante líquido".

Condiciones:

Condiciones experimentales EC1	1000 ppm de cobre
Condiciones experimentales EC2	100 ppm de cobre
Condiciones experimentales EC3	10 ppm de cobre

Control:

Control	0 ppm de cobre
---------	----------------

Decidir sobre el número de réplicas: "5 semillas por placa"

Módulo 3: Análisis de los resultados del Bioensayo

Estos son resultados representativos de un bioensayo interno en el que se cultivaron semillas de rábano a diferentes concentraciones de cobre durante siete días. Los efectos del cobre se muestran en detalle. La longitud de la raíz se usa para ilustrar un enfoque efectivo de gráficos y análisis estadístico.



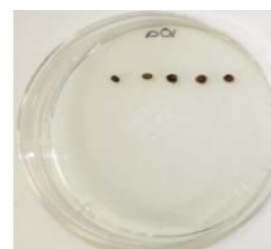
Control



Cobre 10 ppm



Cobre 100 ppm



Cobre 1000ppm

Dependent Variable: Root Length (mm)

	1	2	3	4	5	Average	Std. Dev.
Copper_Control	80	49	85	79	68	72.2	14.4
Copper_10 ppm	20	60	67	61	65	54.6	19.6
Copper_100 ppm	1	8	9	31	29	15.6	13.5
Copper_1,000 ppm	0	0	0	0	0	0.0	0.0

Dependent Variable: Stem Length (mm)

	1	2	3	4	5	Average	Std. Dev.
Copper_Control	64	1	41	49	64	43.8	25.9
Copper_10 ppm	7	45	38	50	30	34.0	16.9
Copper_100 ppm	4	13	12	13	18	12.0	5.1
Copper_1,000 ppm	0	0	0	0	0	0.0	0.0

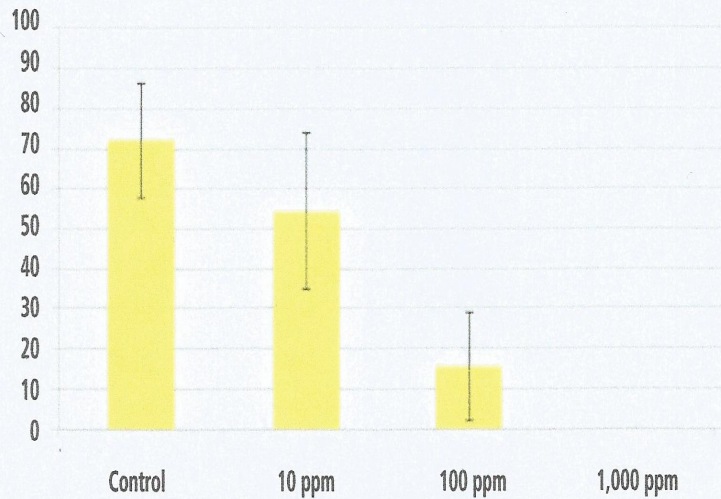
Dependent Variable: Plant Wet Weight (mg)

	1	2	3	4	5	Average	Std. Dev.
Copper_Control	160.5	88.3	176.6	144.5	128.4	139.7	33.9
Copper_10 ppm	30.1	93.4	101.7	96.5	98.6	84.1	27.1
Copper_100 ppm	2.1	16.8	18.9	64.9	60.8	32.7	25.3
Copper_1,000 ppm	11.8	14.4	10.8	9.6	13.2	12.0	1.7

Dependent Variable: Germination

	1	2	3	4	5	%	Std. Dev.
Copper_Control	yes	yes	yes	yes	yes	100	NA
Copper_10 ppm	yes	yes	yes	yes	yes	100	NA
Copper_100 ppm	yes	yes	yes	yes	yes	100	NA
Copper_1,000 ppm	no	no	no	no	no	0	NA

Efecto de la concentración del cobre en la longitud de la raíz (mm)



In this experiment the TC50 for radish seed root length lies somewhere between 10 ppm and 100 ppm.

*Calculating Standard Deviation for Control:

- (1) Average of replicates: $(80+49+85+79+68)/5 = 72.2$
- (2) Replicate 1: $(80-72.2)^2 = 60.84$
 Replicate 2: $(49-72.2)^2 = 538.24$
 Replicate 3: $(85-72.2)^2 = 163.84$
 Replicate 4: $(79-72.2)^2 = 46.24$
 Replicate 5: $(68-72.2)^2 = 17.64$
- (3) Combine replicates divided by four: $(60.84+538.24+163.84+46.24+17.64)/4 = 206.7$
- (4) Square root of step 3 results: 14.38

*Calculating Standard Deviation for Copper 10 ppm:

- (1) Average of replicates: $(20+60+67+61+65)/5 = 54.6$
- (2) Replicate 1: $(20-54.6)^2 = 1197.16$
 Replicate 2: $(60-54.6)^2 = 29.16$
 Replicate 3: $(67-54.6)^2 = 153.76$
 Replicate 4: $(61-54.6)^2 = 40.96$
 Replicate 5: $(65-54.6)^2 = 108.16$
- (3) Combine replicates divided by four: $(1197.16+29.16+153.76+40.96+108.16)/4 = 305.84$
- (4) Square root of step 3 results: 19.55

*Calculating Standard Deviation for Copper 100 ppm:

- (1) Average of replicates: $(1+8+9+31+29)/5 = 15.6$
- (2) Replicate 1: $(1-15.6)^2 = 213.16$
 Replicate 2: $(8-15.6)^2 = 57.76$
 Replicate 3: $(9-15.6)^2 = 43.56$
 Replicate 4: $(31-15.6)^2 = 237.16$
 Replicate 5: $(29-15.6)^2 = 179.56$
- (3) Combine replicates divided by four: $(213.16+57.76+43.56+237.16+179.56)/4 = 182.8$
- (4) Square root of step 3 results: 13.52

7. PREGUNTAS

1. En el campo de la toxicología ambiental, ¿qué es un experimento de bioensayo?

Un bioensayo es una prueba que evalúa los efectos físicos de un contaminante en una especie indicadora. Durante la prueba, los individuos de las especies indicadoras están expuestos ya sea a varias concentraciones del contaminante o a una solución neutra como el agua. Si los individuos expuestos al contaminante muestran un crecimiento más lento, movimiento reducido o una mortalidad más alta que los individuos expuestos a la solución neutra, entonces la sustancia puede ser tóxica.

2. Nombre y defina las tres categorías principales de variables experimentales.

Las tres categorías principales de variables experimentales son independientes, dependientes y constantes. La variable independiente es la que variará durante el experimento por parte del investigador. Las variables dependientes son las que se medirán. Son variables que el investigador cree que se verán afectadas por la variable independiente. Las variables constantes son condiciones experimentales que no se modifican durante el experimento.

3. ¿Qué significa el dicho "la dosis hace el veneno"?

Este refrán significa que los efectos beneficiosos o perjudiciales que un producto químico tienen en un organismo dependen parcialmente de la cantidad de producto químico al que está expuesto el organismo.

4. ¿Qué significa ppm? Calcule la concentración de plomo en ppm en una solución de agua si 1 miligramo se disuelve en 2 L de agua.

PPM significa partes por millón. En agua, 1 ppm equivale a 1 mg / L, por lo que en este caso la concentración sería de 0.5 ppm.

5. ¿Cuál es la diferencia entre la fuente puntual y la contaminación no puntual?

Si bien la contaminación de las fuentes puntuales se puede remontar a una única ubicación identificable (como una tubería, una zanja o una chimenea de humo de fábrica) la contaminación de fuentes no puntuales proviene de fuentes difusas.

6. Dependiendo de su contaminante responda una de las siguientes preguntas:

(a) ¿Qué causa la lluvia ácida? ¿Por qué los efectos de la lluvia ácida no siempre se ven de inmediato en un ecosistema?

La lluvia ácida es causada por el dióxido de azufre y el óxido de nitrógeno que se libera cuando se queman los combustibles fósiles. Sus efectos no siempre se ven de inmediato en un ecosistema porque los nutrientes base en el suelo neutralizan la acidez por un tiempo.

(b) ¿Cómo afectan los contaminantes metálicos como el cobre, el zinc y el níquel a las células vegetales? Mencione una forma en que pueden ser introducidos en el medio ambiente.

El cobre, el zinc y el níquel se unen y dañan los ácidos nucleicos, las enzimas y las proteínas estructurales dentro de las células vegetales. Una forma en que el cobre y el zinc se introducen en el medio ambiente es mediante la construcción y mantenimiento de carreteras.

(c) Nombre dos fuentes de contaminación de sal. ¿Cómo afecta la sal a la vida de las plantas?

La contaminación salina puede provenir de técnicas de riego inadecuadas y de tratamientos de nieve / hielo en carreteras. La sal puede reducir el flujo de agua hacia las raíces de las plantas. Dentro de las plantas, la sal también puede separarse en iones que dañan el tejido de las hojas.

(d) ¿Qué contaminante trajiste de casa? ¿Cómo esperabas que el contaminante afectara el crecimiento de la planta?

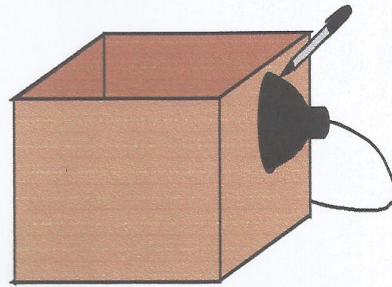
Las respuestas variarán

APÉNDICES

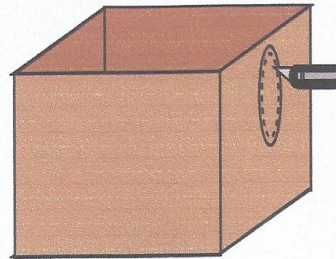
Creación de una cámara de crecimiento de plantas

A plant growth chamber can help ensure success with Module II of this experiment.

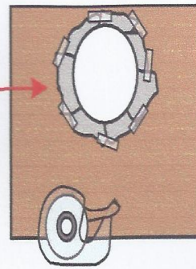
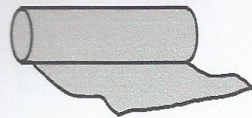
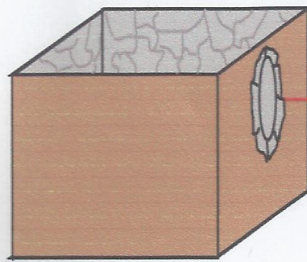
1. Place the reflector lamp on the top center of one of the sides of a small cardboard box. Use a marker or pen to trace a circle around the lamp.



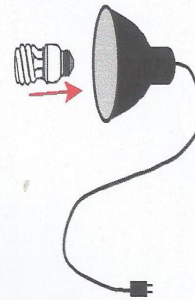
2. Cut a circle 1 cm smaller than the traced circle.



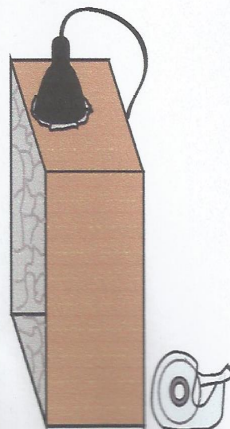
3. Use aluminum foil to line the inside of the box. Use extra pieces to cover the hole. Tape foil in place.



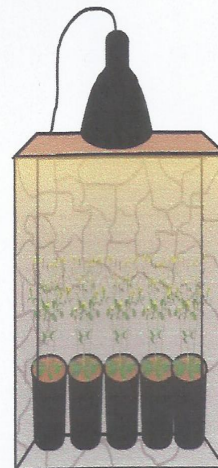
4. Screw the CFL bulb into the lamp.



5. Place the lamp over the hole. Secure with tape.



6. The plant growth chamber is ready to go! Use a small box or riser to adjust the proximity of the potted seeds to the light depending on the seed type and the lighting requirements.



Materials Needed:

- Open top cardboard box (18x18x18 or similar)
- Marker
- Aluminum foil
- Tape
- Reflector lamp
- 23W Compact Fluorescent bulb (CFL bulb)
- Razor or sharp knife

Ejemplo de resultados experimentales

Se muestran los resultados experimentales utilizando 5 semillas en placas verticales y diferentes medidas.

Pollutant: Zinc	Root Length Average	Root Length Std. Dev.	Stem Length Average	Stem Length Std. Dev.	Plant Wet Weight Average	Plant Wet Weight Std. Dev.	Germination Success
Control	63.4 mm	40.8 mm	31.8 mm	18.3 mm	100.0 mg	62.5 mg	80%
100 ppm	50.6 mm	16.2 mm	31.6 mm	16.56 mm	78.3 mg	34.0 mg	100%
1,000 ppm	14.8 mm	5.4 mm	7.4 mm	2.41 mm	34.2 mg	14.3 mg	100%
10,000 ppm	6.6 mm	2.4 mm	2.6 mm	2.2 mm	20.5 mg	9.3 mg	100%
Pollutant: Nickel	Root Length Average	Root Length Std. Dev.	Stem Length Average	Stem Length Std. Dev.	Plant Wet Weight Average	Plant Wet Weight Std. Dev.	Germination Success
Control	49.2 mm	30.3 mm	31.4 mm	22.6 mm	62.5 mg	41.7 mg	100%
10 ppm	19.2 mm	7.8 mm	20.4 mm	3.7 mm	59.8 mg	17.1 mg	100%
100 ppm	12.0 mm	5.0 mm	6.8 mm	4.1 mm	24.9 mg	12.5 mg	100%
1,000 ppm	12.2 mm	4.8 mm	5.4 mm	4.3 mm	24.0 mg	13.3 mg	100%
Pollutant: Salt	Root Length Average	Root Length Std. Dev.	Stem Length Average	Stem Length Std. Dev.	Plant Wet Weight Average	Plant Wet Weight Std. Dev.	Germination Success
Control	52.6 mm	25.8 mm	38.4 mm	15.6 mm	84.6 mg	38.4 mg	100%
100 ppm	18.8 mm	12.8 mm	18.4 mm	14.4 mm	57.6 mg	41.0 mg	80%
1,000 ppm	13.6 mm	9.8 mm	11.0 mm	6.52 mm	31.1 mg	20.8 mg	100%
10,000 ppm	2.2 mm	4.9 mm	0.6 mm	1.3 mm	12.9 mg	32.3 mg	20%
Pollutant: Acid Rain	Root Length Average	Root Length Std. Dev.	Stem Length Average	Stem Length Std. Dev.	Plant Wet Weight Average	Plant Wet Weight Std. Dev.	Germination Success
Control (pH 5.0)	58.6 mm	18.8 mm	31.6 mm	18.8 mm	83.9 mg	44.1 mg	100%
pH 4.5	20.0 mm	18.6 mm	20 mm	19.6 mm	54.5 mg	58.1 mg	60%
pH 3.7	29.4 mm	19.4 mm	29.4 mm	19.4 mm	60.1 mg	40.0 mg	100%
pH 2.3	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm	13.3 mg	1.9 mg	0%