



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

BIOENSAYOS CON *Cyperus elegans* PARA LA
DETERMINACION DEL POTENCIAL FITOTOXICO DE
SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS
EN EL PANTANO DE SANTA ALEJANDRINA,
VERACRUZ

T E S I S

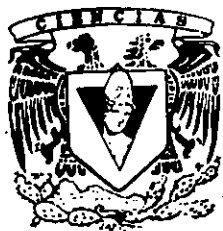
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

PRESENTA:

MAURICIO ORTIZ OCAMPO

DIRECTOR: M. en C. RAUL URIBE HERNANDEZ





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

MAT. MARGARITA ELVIRA CHÁVEZ CANO
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis: "Bioensayos con Cyperus elegans para la determinación del potencial fitotóxico de suelos contaminados con hidrocarburos en el pantano de Santa Alejandrina, Veracruz."

realizado por Ortiz Ocampo Mauricio

con número de cuenta 9560502-9 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

M.en C. Raúl Uribe Hernandez

Propietario

Q.B.P. Juan Antonio Zermeno Eguia Lis

Propietario

M. en C. Nelly Diego-Pérez

Suplente M.en C. Maria Guadalupe Barajas Guzmán

Suplente

Dra. Margarita Collazo Ortega

FACULTAD DE CIENCIAS

U.N.A.M.

Consejo Departamental de Biología

Edna Maria Suarez Diaz



DRA. EDNA MARIA SUAREZ DIAZ DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

*A mis padres, con profunda e infinita gratitud,
por su gran cariño incondicional inquebrantable,
su calidad humana y su constante apoyo, aliento,
generosidad y confianza para la realización
de este trabajo.*

*A mi hermano, por el tiempo que compartimos,
por su fortaleza, Tenacidad y valor
ante la vida.*

*A Karen, por el inmensurable amor,
paciencia, creatividad y tiempo para conmigo,
incrementado aún mas durante el desarrollo
de este estudio.*

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Mexicano del Petróleo, por el apoyo brindado para la realización de este trabajo a través del Programa Maestro para la Formación de Recursos Humanos para la Industria Petrolera.

A todas las personas de quienes recibí su generosa y desinteresada amistad, asistencia, aportaciones y asesoría valiosa, especialmente a: Raúl Uribe, Juan A. Zermeño, Víctor E. Martínez, Alejandro Montes de Oca, Benjamín Chávez, Gloria E. Avelino, Angélica Guerrero, Karla D. Rosas, Ivonne Alonso, Anel M. Flores, Uby

INDICE

RESUMEN

	Página
1. INTRODUCCIÓN.	6
1.1 Aspectos Generales de Contaminación Ambiental.	6
1.2 Contaminación del Suelo: Causas y Principales Contaminantes.	7
1.2.1 El Caso de México.	9
1.3 Principales Procesos Naturales de Movilidad de los Contaminantes en el Suelo.	10
1.3.1 Lixiviación.	10
1.3.2 Adsorción-Desorción.	10
1.3.3 Volatilización.	10
1.3.4 Bioacumulación.	10
1.4 El Suelo, su Papel en los Ecosistemas.	11
1.5 Algunas Propiedades Principales de los Suelos.	12
1.5.1 Textura.	12
1.5.2 Densidad.	12
1.5.3 Captación de Agua.	12
1.5.4 pH.	13
1.5.5 Contenido de Materia Orgánica.	14
1.5.6 Color.	14
1.5.7 Capacidad de Intercambio Iónico.	14
1.6 Ecotoxicología de los Suelos Contaminados.	14
1.7 Generalidades de las Tecnologías de Tratamiento para la Descontaminación de Suelos.	16
1.7 Fitotoxicidad, aspectos generales.	20
1.8 Bioindicadores.	20
1.8.1 Las Plantas como Bioindicadores de Contaminación.	21
1.9 Algunos Aspectos de la Fisiología Vegetal Considerados en la Evaluación de la Fitotoxicidad de un Contaminante.	22
1.9.1 Germinación.	22
1.9.2 Elongación Radicular.	22
1.9.3 Crecimiento.	22
1.9.4 Contenido de Clorofila y Fotosíntesis.	23
1.10 Pruebas para Determinar la Toxicidad de una Sustancia.	23
1.10.1 Letales.	23
1.10.2 Subcrónicas y Crónicas.	23
1.11 Protocolos Estandarizados para Evaluar Efectos Fitotóxicos.	25

INDICE

	Página
2. ANTECEDENTES	28
2.1 Los Hidrocarburos. Aspectos Generales.	28
2.2 Estudios de Fitotoxicidad de los Hidrocarburos.	30
2.2.1 Especies Vegetales Comúnmente Utilizadas en Estudios de Fitotoxicidad con Hidrocarburos.	31
2.3 Biología del género <i>Cyperus</i> .	33
2.4 <i>Cyperus</i> y el Metabolismo C ₄ .	34
2.5 <i>Cyperus</i> en el Pantano de Santa Alejandrina y las Plantas Ruderales.	36
2.6 Pantano de Santa Alejandrina: Descripción General del Área.	39
3. JUSTIFICACIÓN.	43
4. HIPOTESIS.	45
5. OBJETIVOS.	47
6. MATERIAL Y METODO.	50
6.1. Extracción de los Hidrocarburos Totales del Petróleo (HTP).	52
6.1.1 Extracción por Soxhlet.	52
6.1.2 Extracción por Agitación.	53
6.2 Cuantificación de los HTP por Espectrofotometría Infrarroja.	54
6.3. Técnicas para la Caracterización de Suelos.	54
6.3.1 Análisis Textura.	54
6.3.2 Análisis pH.	56
6.3.3 Análisis Materia Orgánica.	56
6.3.4 Análisis de Porosidad, Densidad Real y Aparente.	57
6.4 Fraccionamiento de los Hidrocarburos Contenidos en las muestras de Suelo Contaminado.	58
6.5 Protocolos de Prueba Utilizados para la Evaluación de la Germinación, Elongación Radicular y Crecimiento. Comentarios y Modificaciones para este Estudio.	59
6.6 Extracción y Determinación del Contenido de Clorofila.	66
7. RESULTADOS Y ANÁLISIS.	69
7.1 Presentación.	69
7.2 Discusión.	87
8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.	98
REFERENCIAS.	100
INDICE DE TABLAS, FIGURAS Y GRAFICAS.	107
ANEXOS.	109

RESUMEN

El pantano de Santa Alejandrina, área de 76 km² aproximadamente, ubicado al sureste de la refinería General Lázaro Cárdenas en Minatitlán Veracruz, se encuentra afectado por la disposición de hidrocarburos y algunos derivados. En este trabajo se evaluó el potencial fitotóxico de muestras de suelo del área a través de bioensayos de germinación, elongación radicular, crecimiento y contenido de clorofila en plántulas de Cyperus elegans, especie autóctona de ese lugar. Las plántulas se expusieron a diferentes concentraciones de Hidrocarburos Totales del Petróleo (HTP) en un intervalo de 25 a 97,376 ppm, observándose efectos poco significativos en los parámetros fisiológicos mencionados. De la información derivada de los resultados referentes a la elongación radicular y el contenido de clorofila se apreciaron diferencias estadísticas en los tratamientos con HTP, aunque no es concluyente respecto al grado de efecto de los mismos. La aparente tolerancia de esta ciperácea a dichos compuestos orgánicos, aunado a su gran adaptabilidad inherente a condiciones de perturbación, por un lado, limita considerablemente su potencialidad para ser utilizada como bioindicador sensible, por el otro, representa una ventaja que puede considerarse para su aprovechamiento en la fitorremediación del pantano. La reducción de la biodisponibilidad de los hidrocarburos en función del tiempo es un factor que puede influir sustancialmente en la toxicidad de un suelo contaminado.

1. Introducción

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Aspectos Generales de Contaminación Ambiental.

Los contaminantes ambientales están representados por una amplia variedad de sustancias que se encuentran en el ambiente como resultado de las múltiples actividades de la sociedad.

Los ecosistemas están continuamente expuestos a factores o fuerzas naturales de perturbación tales como incendios, heladas, inundaciones, huracanes, etc., lo cual les ha conferido un carácter dinámico, cambiante, acorde con las condiciones imperantes. Sin embargo, cuando la frecuencia o la naturaleza de dichos disturbios es alterada, o bien, cuando llegan a introducirse factores de estrés antropogénicos, xenobióticos químicos (del griego *Xenon*, extraño o ajeno, y *bios*, vida) y exceso de nutrientes por ejemplo, los ecosistemas pueden experimentar cambios que en ocasiones resultan irreversibles.

En otras palabras, los sistemas ecológicos mantienen capacidades de carga limitadas para asimilar sustancias, las cuales, muy a menudo son sobreestimadas por el hombre.

Contrariamente a lo que ocurre en la naturaleza, en la cual no se generan residuos puesto que los remanentes de un proceso biológico se aprovechan en otro, la humanidad, desde sus inicios, ha consumido y utilizado recursos para satisfacer sus necesidades de los cuales no utiliza el 100%. Esto ha dado lugar a que siempre se produzcan residuos.

En un principio, la velocidad moderada de producción de desechos antropogénicos permitía que estos se desintegraran e incorporaran al ambiente sin modificarlo de manera apreciable. No obstante, en la actualidad, debido a la sobrepoblación y a la evolución cultural y tecnológica, se desarrollan actividades y procesos productivos ineficientes que demandan grandes cantidades de energía, agua y/o materias primas que, de manera concomitante, producen volúmenes importantes de materiales o sustancias que son emitidas al aire, al agua o al suelo y cuya desintegración o estabilización natural es nula o limitada, originándose así alteraciones en el equilibrio del entorno y presentándose un proceso de contaminación (Cairns *et al*, 1992).

La persistencia ambiental de una sustancia química se relaciona con su tendencia o capacidad para permanecer en el medio debido a su resistencia a la degradación física, química o biológica asociada a los procesos naturales.

En nuestros días, todos los sectores de las sociedades, desde las labores domésticas hasta los diversos procesos industriales y de servicios, generan residuos (Arcos *et al*, 1994).

Al respecto, la legislación mexicana a través de la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente, define en su artículo primero a un *residuo* como, *cualquier material generado en los procesos de extracción, beneficio, transformación, producción, consumo, utilización, control o tratamiento, cuya calidad no permita utilizarlo nuevamente en el proceso que lo generó* (Fernández, 1998; Fuad, 1995).

Ahora bien, se considera *peligroso* a un residuo (sea sólido, líquido o gaseoso), *cuando sus propiedades físicas, químicas o infecciosas ocasionan o contribuyen significativamente a incrementar la mortalidad o las enfermedades serias, irreversibles o que produzcan incapacidad y, por tanto, represente una amenaza sustancial o potencial para la salud humana y/o al ambiente cuando es tratado, almacenado, transportado o dispuesto inadecuadamente* (Arcos et al, 1994).

De acuerdo con la Norma Técnica Ecológica 001/88, un residuo considerado peligroso presenta una o más de las siguientes características:

- Inflamabilidad
- Corrosividad
- Reactividad
- Explosividad
- Toxicidad

Sin embargo, es evidente que toda sustancia química puede encerrar peligros para la salud y los ecosistemas si alcanza una concentración determinada y la exposición se prolonga el tiempo suficiente para que ejerza sus efectos.

Cabe señalar también, que los términos *tóxico* y *peligroso* no son intercambiables. Las sustancias peligrosas pueden tener propiedades intrínsecas y extrínsecas. Por ejemplo, las propiedades extrínsecas de explosividad, inflamabilidad y reactividad no están referidas a la toxicidad química. En suma, la "toxicidad" denota la *capacidad* de una sustancia para producir alguna alteración o daño, mientras que "peligroso" alude a la *probabilidad* de que el daño resulte por el uso o contacto con la sustancia (Espíndola, 1994). Algunos autores se refieren a la probabilidad de que ocurra un daño como *Riesgo* (Cairns et al, 1992; Rodríguez, 1998).

En el comercio mundial existen más de 100,000 sustancias y paradójicamente para un número reducido de ellas se cuenta con información referente a su peligrosidad y requerimientos para su manejo apropiado (Arcos, 1994).

1.2 Contaminación del Suelo: Causas y Principales Contaminantes.

Como ocurre de manera similar con el agua y el aire, la contaminación del suelo puede ser o no deliberada. No obstante, el utilizar a un suelo como vertedero de desechos resulta ser una práctica muy común (Walker et al, 1996). Al respecto, Ibararán, y col. (1996) han señalado que las causas de la presencia de contaminantes o sustancias tóxicas en los suelos obedecen principalmente a:

- La disposición masiva de materiales o residuos en él, usualmente de origen industrial y que no tuvieron un tratamiento adecuado previo
- Derrames accidentales de productos

De igual manera, Van Straalen *et al* (1998) consideran también como fuentes de contaminación del suelo:

- Humo y polvo (ricos en sustancias orgánicas e inorgánicas) que son transportados por el aire y posteriormente depositado en áreas circundantes a los sitios de emisión (una industria, una carretera, por ejemplo)
- Agua contaminada proveniente de ríos o mares que eventualmente inunde áreas terrestres marginales
- Aplicación intensiva y extensiva de plaguicidas en suelos agrícolas

Por otro lado, existe una amplia variedad de sustancias que contaminan los suelos. Fernández y colegas (1998) presentan los principales agentes químicos identificados en una muestra de 1035 suelos contaminados en Estados Unidos, de acuerdo al estudio que realizó la Agencia de Protección Ambiental de ese país (US EPA) en 1991. Las sustancias encontradas en orden decreciente de incidencia, se indican en el cuadro 1.

Cuadro 1. Principales contaminantes localizados en 1035 suelos en Estados Unidos según estudios de la Agencia de Protección Ambiental (USEPA), junio 1991.

SUSTANCIA	INCIDENCIA
Tricloroetileno.	246
Plomo	230
Cromo	173
Bifenilos Policlorados	156
Metales Pesados	147
Tetracloroetileno	138
Benceno	137
Tolueno	131
Compuestos Orgánicos Volátiles	129
Arsénico	119
Cadmio	100
Tricloroetano	86
Cobre	74
Zinc	71
Cloruro de Vinilo	68
Xileno	67
Cloroformo	65
Fenoles	64
Dicloroetano	60
Solventes	57
Cianuros	53
Níquel	43
Dicloroetileno	45
Etilbenceno	45

Fuente: Fernández, G. *et al*, 1998. *Residuos peligrosos*, CENAPRED, fascículo 6, México, pp. 15

Cabe señalar que, por lo general, los compuestos antes señalados se encuentran en el suelo mezclados e interactuando, lo que dificulta o complica la evaluación y las estrategias de restauración del daño o riesgo producido. De hecho, existen residuos que intrínsecamente representan una mezcla. El petróleo, por ejemplo, es un conjunto complejo de una amplia variedad de hidrocarburos y otros elementos en menores proporciones como el azufre, nitrógeno y oxígeno.

1.2.1 El Caso de México.

Ibarrarán y col. (1996), comentan que el problema de los suelos contaminados en nuestro país representa un aspecto al que no se le ha dado la suficiente importancia. Muestra de lo anterior -- argumentan-- se apoya en el hecho de que actualmente no se tienen identificados los lugares con *mayor índice* de contaminación, mencionándose únicamente los sitios con *mayor probabilidad* de estarlo en función del tipo de industria o proceso que se lleva cabo en ese lugar. Las áreas en las cuales es *muy probable* encontrar importantes problemas de contaminación, son las zonas donde se ubica la Industria del Petróleo y sus derivados, constituyendo así uno de los principales focos de atención (Fernández *et al*, 1998).

Al parecer, el marco legal correspondiente no proporciona la normatividad necesaria para calificar si un suelo está o no contaminado, ni los procedimientos de evaluación, limpieza y restauración, por lo que resulta necesario que las normas que se expidan al respecto aseguren el adecuado manejo y control de los suelos contaminados y que sean técnica y económicamente viables, además de verificables (Fuad *et al*, 1995).

La Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente que entró en vigor el 1 de marzo de 1988, en los artículos 134 al 144 del Capítulo Cuarto, incluye ahora lo referente a la prevención y control de la contaminación del suelo en las nuevas modificaciones a la Ley en diciembre de 1996 (Fernández, *et al*, 1998). En este sentido, la Procuraduría Federal de Protección al Ambiente (PROFEPA) junto con el Instituto Nacional de Ecología (INE) y algunas Instituciones de Educación Superior (IES) recientemente conformaron un grupo de trabajo enfocado a la normatividad de restauración de suelos contaminados, dentro de este marco se generaron y propusieron *criterios interinos* para la restauración de suelos contaminados con hidrocarburos así como las especificaciones de análisis de laboratorio (metodologías) aplicables a cada caso.

Además de lo anteriormente planteado, se puede comentar que los programas de rehabilitación de los ecosistemas contaminados se dirigen principalmente a ríos, lagunas, costas y atmósfera (Ibarrarán, 1996), que si bien es cierto son los más dañados o más fácilmente identificados, los esfuerzos que se hagan serán insuficientes si se descuida la prevención y/o tratamiento de los suelos contaminados.

1.3 Principales Procesos Naturales de Movilidad de los Contaminantes en el Suelo.

Existen principalmente tres rutas o vías a través de las cuales los xenobióticos ingresan a los ecosistemas (Walker *et al*, 1996):

- Por su descarga en cuerpos de agua.
- Por contaminación del suelo.
- Por su liberación a la atmósfera.

Particularmente en el caso del suelo (y aplicable en cierta medida también a los otros dos medios), algunos de los procesos naturales que poseen una participación importante en la movilidad de los contaminantes son (INE/SEMARNAP, 1996):

- La lixiviación.
- La adsorción-desorción.
- La volatilización.
- La bioacumulación.

1.3.1 La *lixiviación* consiste en la transferencia o separación de un componente soluble de un sólido a un disolvente. Las sustancias o xenobióticos hidrosolubles contenidas en un suelo pueden ser transferidas con rapidez a los cuerpos de agua naturales subterráneos por este proceso (Duffus, 1983).

1.3.2 La *adsorción* es el proceso mediante el cual una sustancia se transfiere o incorpora de un fluido (líquido o gas) a un líquido o sólido, quedando disuelta en él. La desorción es el proceso inverso.

1.3.3 La *volatilización* consiste en la evaporación parcial de un componente el cual genera o se incorpora a una fase gaseosa. Los compuestos con punto de ebullición cercano a la temperatura ambiente se vaporizan fácilmente y se les denomina, por tanto, volátiles (Fernández *et al*, 1998). Muchos xenobióticos ingresan al aire de esta manera y pueden ser depositados en otra área o ser inhalados posteriormente.

1.3.4 La *bioacumulación* es el proceso de almacenamiento o retención (por cualquier mecanismo o vía) de contaminantes existentes en el ambiente por parte de los organismos. En este estado, la sustancia no se encuentra disponible, en el sentido de que no interactúa (no se biotransforma) con el metabolismo del individuo. Por lo anterior, generalmente no se observan efectos a corto plazo (Phillips, 1998) sino hasta que el xenobiótico es liberado de los sitios de almacenamiento en el individuo (pudiéndole ocasionar toxicidad) o bien, cuando se transfiere o dispersa a través de las cadenas y redes tróficas (biomagnificación).

Es claro que el estudio de los procesos mencionados refleja y permite comprender la dinámica de los contaminantes en el ambiente. En el caso particular de los

hidrocarburos que están presentes en un suelo contaminado, se puede comentar que, en general :

- Las fracciones o mezclas ligeras (de bajo peso molecular, como los constituyentes de la gasolina) se caracterizan por poseer una alta solubilidad en agua, un potencial de sorción bajo y ser volátiles (Bossert *et al*, 1986). Por tanto, se ha visto que este tipo de hidrocarburos virtualmente no es adsorbido por las partículas de suelo y migran (se lixivian) fácilmente hacia los cuerpos de agua subterráneos, contaminándolos, o bien pasan a formar parte del aire atmosférico. Los hidrocarburos ligeros no presentan una tendencia considerable a bioacumularse debido a su bajo Coeficiente de Partición (K_{ow}).
- Las fracciones o mezclas pesadas (de alto peso molecular, como los constituyentes del Diesel) tienden a ser mas persistentes en el suelo puesto que tienen una solubilidad y volatilidad limitada además de una gran capacidad de adsorción (principalmente en suelos arcillosos y limosos con elevado contenido de materia orgánica y mineral, Kesley *et al*, 1997). Por tanto, los hidrocarburos con estos atributos tienen poca movilidad en el suelo. Su potencial de bioacumulación es mayor, el cual comúnmente está relacionado de manera proporcional a su coeficiente de partición que también guarda cierto vínculo con el peso molecular.

En México, existen pocas experiencias de estudios sistemáticos sobre el efecto al ambiente causado por residuos peligrosos, su tiempo de residencia en los ecosistemas, su flujo, destino final y sus posibles impactos sobre la biota y la salud humana (INE/SEMARNAP, 1996).

Por todo lo anterior, resulta evidente que la dinámica de cualquier proceso de contaminación siempre plantea cierto grado de complejidad y en ocasiones su evolución revela dimensiones poco exploradas, impredecibles e incluso desconocidas, provocando efectos en la salud tan preocupantes como los originados en los ecosistemas. De ahí también se hace evidente que el control y evaluación de la contaminación sea un ejercicio costoso y muchas veces no todo lo exitoso o efectivo que se desea.

1.4 El Suelo, su Papel en los Ecosistemas.

Sin duda, es claro que un mismo término posee diferente significado según el contexto o el área del conocimiento en que se aborde o aplique, por tanto, una definición generalmente refleja o denota un punto de vista acotado y específico, dirigido a las características que se quieren distinguir, resaltar o atribuir a la entidad en cuestión.

En este trabajo, se considera al suelo como un sistema abierto complejo, en el cual ocurre un continuo intercambio y flujo de materia y energía, resultado de la interacción conjunta y recíproca de las partículas minerales, materia orgánica, organismos vivos y el clima. Si se compara con los cuerpos de agua y el aire

atmosférico, el suelo tiene una movilidad relativamente menor y es espacialmente más heterogéneo. La vida en el suelo es muy diversa en términos taxonómicos y de nichos ecológicos (Krebs,1985; Salisbury, 1994; Walker *et al*,1996)

De acuerdo con Van Straalen y col.(1998), las principales funciones del suelo, consideradas desde un punto de vista ecológico, son las siguientes:

- Descomposición de la materia orgánica
- Mineralización de nutrientes
- Síntesis de compuestos húmicos

Asimismo, las fases o etapas esenciales de los ciclos del nitrógeno, fósforo y azufre tienen lugar en el suelo (Odum, 1978), independientemente del papel del mismo en el ciclo de nutrientes. Cabe señalar también que el proceso de formación del suelo es crucial para el soporte de la vida vegetal y la estabilización de las partículas minerales (Van Straalen *et al*,1998).

Ahora bien, generalmente resulta difícil discernir o separar las causas y los efectos que determinan un tipo de suelo en un área determinada (Krebs,1985). Por ejemplo, el suelo resulta afectado por la vegetación que crece en él y a su vez, ejerce influencia en ella.

1.5 Algunas Propiedades Principales de los Suelos.

Los suelos presentan una amplia variedad de propiedades susceptibles de ser evaluadas y determinadas, lo cual ha posibilitado caracterizarlos y clasificarlos de manera sistemática. A continuación se mencionan algunas de sus propiedades principales:

1.5.1 Textura: Es una propiedad física que permite evaluar y caracterizar a los suelos desde la perspectiva de la proporción relativa de los diferentes tamaños de partículas minerales que los conforman, sin importar su origen, composición química o estructura. Existen alrededor de 12 clases texturales (Chapman,1979). La textura determina la capacidad de filtración y permeabilidad, absorción de agua, aire y nutrientes. Suelos de textura fina (arcillosos o limosos) tienen elevada capacidad de retener hidrocarburos y otros contaminantes debido a que ofrecen una mayor superficie de adsorción.

1.5.2 Densidad: Se refiere a la relación que existe entre el peso de un suelo y el volumen que ocupa. La porosidad está relacionada de manera inversamente proporcional con la densidad, asimismo ocurre con la permeabilidad y filtración (Ibarrarán *et al*,1996).En este sentido, un suelo poco denso (mas poroso) retiene mas contaminantes.

1.5.3 Captación de Agua: Esta capacidad se encuentra relacionada de manera inversamente proporcional a la densidad y textura. Es decir, suelos de textura fina o alta densidad generalmente no mantienen una humedad elevada (Chapman,1979).

1.5.4 pH: El pH es una propiedad química del suelo. Se refiere a la concentración de iones hidrógeno (hidrogeniones, H^+) que está presente en la interfase líquida del suelo, dentro de la interacción de los componentes sólidos y líquidos. La concentración de hidrogeniones es fundamental en los procesos físicos, químicos y biológicos del suelo. El rango de pH que comprende a la mayoría de ellos está entre 4 y 10, sin embargo se han reportado valores tan bajos como 2 y tan altos como 12 (Chapman, *et al*/1979). Por lo general tienden a estar en el rango ácido (Bossert, 1984). El pH del suelo influye en la biodisponibilidad y solubilidad de los contaminantes contenidos en él.

1.5.5 Contenido de Materia Orgánica: La materia orgánica presente en un suelo está relacionada muy estrechamente con el tipo de vida que soporta, puesto que está compuesta de los restos de plantas, animales y microorganismos muertos. Este factor es importante ya que interviene directamente en la capacidad de retención de agua y nutrientes (Krebs, 1985). Asimismo, por su naturaleza predominantemente hidrófoba, los contaminantes orgánicos como los hidrocarburos generalmente quedan adsorbidos a las partículas orgánicas del suelo, por lo que, un suelo con gran proporción de materia orgánica retiene mayores cantidades de xenobióticos orgánicos.

1.5.6 Color: El color del suelo refleja algunas de las propiedades físicas, químicas y biológicas del mismo. Está influido por el contenido de materia orgánica, el material parental, el clima, el drenaje y la aireación. El color afecta directamente la temperatura, el grado de humedad y estructura de éste, e indirectamente, al crecimiento de las plantas y a la actividad microbiana (Chapman, 1979).

1. 5. 7. Capacidad de Intercambio Iónico: En el suelo se lleva a cabo una gran cantidad de reacciones que involucran intercambios iónicos, principalmente *catiónicos*. El pH es un factor importante a tomarse en cuenta: a un pH alto, los iones hidrógeno localizados en arenas y material húmico se separan y pueden ser reemplazados por otros cationes que a su vez muy posiblemente también se sustituyan por otros. Entre los cationes más comunes que se encuentran en el suelo están: Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , Al^{3+} , H^+ . En especial el calcio, es uno de los cationes más abundantes en la naturaleza (Ibarrarán *et al*, 1996).

También tienen lugar los intercambios de *aniones*, aunque su frecuencia es relativamente menor con respecto a los *catiónicos* y se llevan a cabo involucrando mecanismos más complejos que en los primeros es decir, no únicamente por atracción electrostática (Ibarrarán *et al*, 1996; Chapman *et al*, 1979).

1.6 Ecotoxicología de los Suelos Contaminados.

Una vez comentadas las funciones que desempeña el suelo en los ecosistemas resulta más evidente el vislumbrar su ecotoxicología.

Primeramente puede comentarse que la *Ecotoxicología* es una disciplina relativamente contemporánea, como su nombre lo indica, representa una integración del conocimiento generado por la Ecología y la Toxicología, enfocado hacia el estudio de la dinámica ambiental (movilidad, transporte y destino final) de los diferentes xenobióticos que existen y sus impactos e interacciones potenciales y/o sustanciales con los sistemas biológicos o ecosistemas, a cualquier nivel. El obtener y aportar tal información permite construir un panorama o escenario en el que pueda valorarse y estimarse de una manera objetiva los riesgos que suponen la presencia de estas sustancias en el ambiente. El término ecotoxicología fue introducido por Truhaut en 1969 (Walker *et al*, 1996), lo cual reflejó un floreciente interés y preocupación por los efectos de los contaminantes ambientales en otras especies diferentes al hombre.

Dado que una gran variedad de los constituyentes del suelo posee una capacidad considerable para retener contaminantes del ambiente, especialmente aquellos suelos que contienen moléculas no polares o bien, iones divalentes o trivalentes con carga positiva (Van Staelen *et al*, 1998), es posible inferir que la cantidad de elementos o componentes presentes en el suelo con las características mencionadas necesariamente guardan relación estrecha con el contenido de partículas minerales, materia orgánica y el pH. Asimismo, la textura interviene también en forma significativa en la retención. En general, cuando más pequeñas sean las partículas del suelo (textura fina) tanto más tiempo persistirán la sustancias tóxicas, ya que existe una mayor área superficial para la adsorción de los productos químicos, proceso que de ordinario ejerce un efecto estabilizador (Duffus, 1983).

Consecuentemente, el suelo actúa como un gran vertedero para muchos xenobióticos y, por ende, no es de difícil comprensión el hecho de encontrar mayores concentraciones de sustancias en él que en ningún otro compartimiento ambiental.

Por otra parte, el agua del subsuelo depende directamente de la superficie, dado que la fuente principal de agua de los acuíferos proviene de la lluvia que se percola a través de la capa de suelo adyacente (Lett, 1993). Este proceso, por tanto, representa un mecanismo de lixiviación y transferencia de los xenobióticos contenidos en el suelo a los cuerpos de agua. De las diversas sustancias químicas encontradas en las aguas subterráneas, los compuestos orgánicos son los que representan el mayor riesgo por sus efectos en el ambiente y en la salud humana. Dentro de este grupo, los disolventes industriales y los hidrocarburos son los más comunes (INE/SEMARNAP, 1996). Esto último, se explica por el hecho de que los derrames de disolventes, hidrocarburos y otros compuestos orgánicos, son una fuente importante de contaminación de los suelos y que generalmente no se tratan

de recuperar o no se aplica un tratamiento de restauración de los mismos (Ibarrarán, 1996). La cinética de desorción de contaminantes a la fase acuosa del suelo, ha sido objeto de intensa investigación (Williamson, 1998).

Si bien, un contaminante del suelo puede permanecer en él o lixiviarse, también puede volatilizarse* y ser transportado por el aire en ocasiones a distancias considerables, pudiéndose depositar en el suelo nuevamente, en el follaje, alcanzar superficies de agua, o ser inhalado.

Ahora bien, durante el transporte, movilidad y destino final de los xenobióticos en los diferentes compartimientos ambientales, puede ocurrir, a través de procesos físicos y químicos, su degradación (a compuestos más inertes y sencillos), o bien, ser modificados de manera tal que su toxicidad se active o aumente sustancialmente¹. Asimismo, es factible que el contaminante se transfiera a los organismos, en donde puede tener lugar, por un lado, 1) la *detoxificación* del elemento (pérdida o disminución de su potencialidad tóxica) ó 2) la *intoxicación* del individuo (por la bioactivación del compuesto, es decir, la producción de metabolitos activos)². Por el otro lado, es plausible además la *bioacumulación* del compuesto con la probabilidad inherente de *biomagnificarse* en las cadenas y redes tróficas mediante las relaciones presa-predador, de lo cual no está excluido el hombre (entre muchos otros ejemplos, se ha visto que algunos cereales de consumo generalizado -como lo es la avena y el trigo- provenientes de campos de cultivo cercanos a zonas urbanas o industriales, contienen Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (Tuominen, 1988; Wagrowsky, 1996).

Asimismo, se puede comentar, que de la inmensa variedad de plantas, hongos, animales, virus, bacterias, etc., que existen en el suelo, algunos desarrollan únicamente en él una parte de su ciclo de vida, mientras que otros son habitantes permanentes.

Los resultados de todo lo anteriormente planteado pueden manifestarse (a corto, mediano o largo plazo) en un desequilibrio o alteración en la diversidad y riqueza de los ecosistemas así como en sus flujos de materia y energía. Lo cual también permite evidenciar que, el entender o determinar la ecotoxicología de un suelo resulta una tarea bastante complicada, puesto que además, el conocimiento actual que se tiene de los ecosistemas, su diversidad, estructura y función, resulta

* la volatilización de una sustancia a partir del suelo está en función de su presión de vapor correspondiente, la cual está determinada principalmente por la temperatura, su solubilidad y las propiedades fisicoquímicas del suelo (Schwartz, *et al.*, 1997)

¹ Se sabe, por ejemplo, que las conocidas propiedades tóxicas y mutagénicas de algunos hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) se intensifican cuando sufren modificaciones en su estructura (oxidación) inducidas por la exposición a la radiación solar. De ahí que se considere que la fotomodificación de los HAPs más que ser un proceso de degradación, es un mecanismo de activación el cual incrementa, en lugar de disminuir, el riesgo ambiental (Huang, *et al.*, 1995).

² El Benzo(a)pireno por ejemplo, uno de los HAP más conocidos y estudiados, es inocuo de manera intrínseca, sin embargo, cuando es bioactivado (enzimáticamente) se forman epóxidos que son considerablemente carcinógenos y mutagénicos (Kalf, *et al.*, 1997).

insuficiente para predecir las consecuencias de su afectación parcial o total. Por consiguiente, aunque por necesidades prácticas es esencial definir límites de seguridad en relación con los organismos, dichos parámetros deben ser susceptibles de modificarse a medida que se obtiene o genera mayor información.

1.7 Generalidades de las Tecnologías de Tratamiento para Suelos Contaminados.

Como se ha mencionado, existe una gran variedad de xenobióticos que contaminan los suelos y que generalmente se encuentran en él en forma de mezcla interactuando mutuamente. Esta condición, por lo general, dificulta las labores de tratamiento y restauración (Lee,1993). Asimismo, para la aplicación exitosa de alguna tecnología orientada a ese fin, es preciso realizar previamente análisis cuantitativos y cualitativos para determinar la sustancias presentes y sus concentraciones. En este sentido, la adecuada selección y éxito de las técnicas de tratamiento depende de la consideración premeditada de ciertos factores intrínsecos y extrínsecos del problema al que van dirigidos, entre los cuales se puede mencionar:

- La naturaleza del residuo
- El equipo básico necesario
- El equipo auxiliar
- El pre o pos tratamiento requerido
- La efectividad y el costo

Actualmente, existe una gran diversidad de tecnologías disponibles para la limpieza de sitios contaminados con residuos peligrosos. Básicamente, estas tecnologías pueden agruparse en dos categorías principales (Chen, 1997):

- 1) Técnicas de Aislamiento y Confinamiento
- 2) Técnicas de Limpieza

Las Técnicas de Aislamiento y Confinamiento se fundamentan en la utilización de barreras físicas y químicas para aislar el o los contaminantes y prevenir su dispersión o fuga. Este tipo de estrategia de remediación no *reduce* la cantidad del contaminante en el ambiente aunque sí el *riesgo* potencial de daño que impone su presencia.

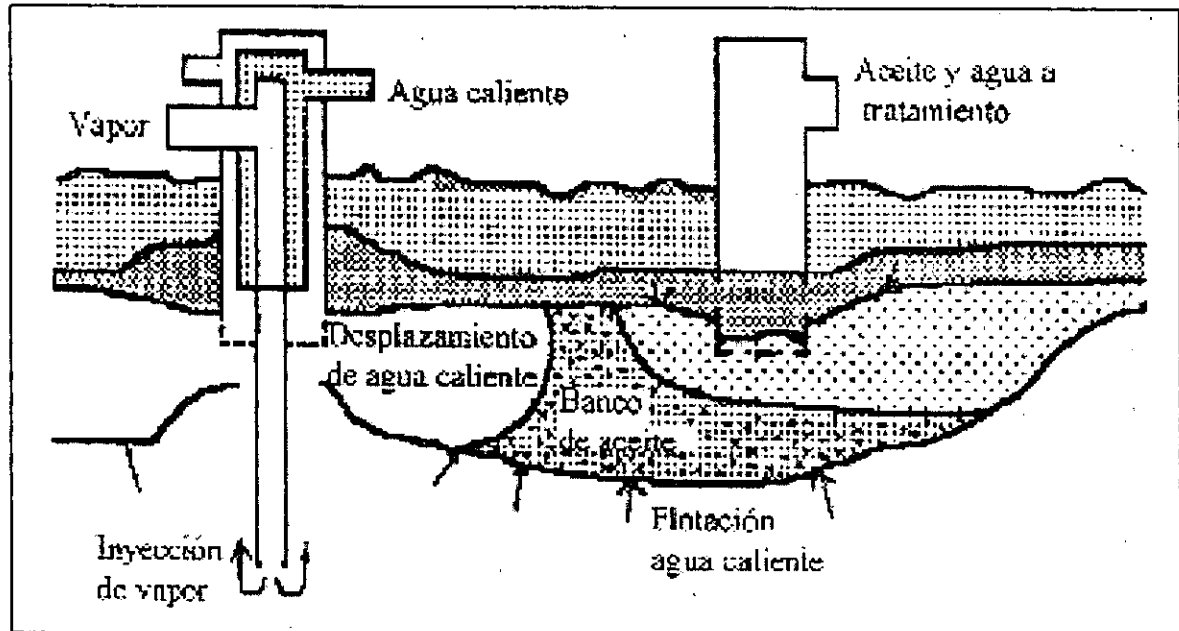
Las Técnicas de Limpieza, como su nombre lo sugiere, están orientadas a *disminuir* la cantidad de los contaminantes presentes, dando oportunidad, consecuentemente, a la *restauración* del sitio. Las tecnologías para el tratamiento de suelos contaminados, en su mayoría, pueden catalogarse dentro de este grupo.

Si bien, la descripción detallada y exhaustiva de las tecnologías de tratamiento de suelos contaminados está fuera de los objetivos y alcances de este trabajo, puede comentarse que su clasificación está basada en tres grupos principales, en función del tipo de proceso que utilicen (Ibarrarán *et al*, 1996; Fernández *et al*,1998):

- 1) Técnicas de Inyección Directa
- 2) Técnicas de Extracción por Solventes
- 3) Técnicas Biológicas

1) *Técnicas de Inyección Directa*: El principio básico que utilizan es el acarreo de sustancias volátiles alojadas en el suelo mediante la inyección de fluidos gaseosos (aire o vapor) a una temperatura elevada para facilitar de esta manera, que los contaminantes se evaporen y emigren a la superficie, acompañados del agente acarreador, para su posterior recuperación y confinamiento (figura 1). Esta técnica está restringida a suelos de una gran porosidad que contengan contaminantes volátiles.

Figura 1. Esquema del *Proceso Crow* para descontaminación del suelo. Site Tech. Profile. Research Institute, James Speight. Nov. 1991.



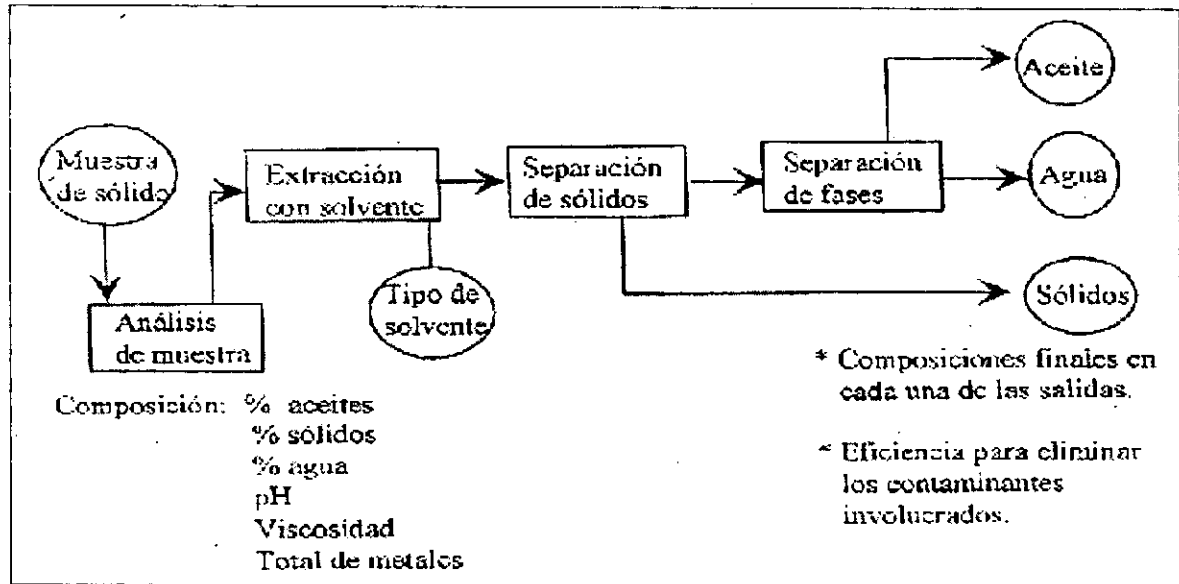
Fuente: Fernández, G. et al., 1998. Residuos peligrosos, Fascículo 9, CENAPRED, México, pp.16.

En ocasiones, la instalación del sistema de inyección en algunos terrenos es problemática. (Ibarrarán et al,1996).

2) *Técnicas de Extracción por Solventes*: Estas técnicas, como su nombre lo indica, se basan en la propiedad de solubilidad que es característica para cualquier sustancia. Por ejemplo, los contaminantes orgánicos son solubles en mayor grado en solventes orgánicos, debido a la similitud de polaridades entre ellos. De esta manera, lo más importante en el éxito de esta técnica es conocer el tipo o naturaleza de contaminantes presentes en el suelo en cuestión para poder determinar el solvente más adecuado. Una vez hecho esto, se realiza la extracción y posteriormente la separación de la fase sólida (suelo limpio) y acuosa (solvente con los contaminantes). El solvente utilizado se recupera (recicla) y puede emplearse nuevamente (Figura 2).

La aplicación de esta técnica, sin embargo, puede representar grandes costos dependiendo del volumen y tipo de solvente a ocupar, así como de las sustancias químicas implicadas para la estabilización del extracto.

Figura 2: Planteamiento para realizar una técnica de descontaminación de suelos por Extracción. Lanny D. Weimer. Compañía de Conservación de Recursos, Ellicot, junio, 1991.



Fuente: Ibararán, C. et al., 1996. *Tecnologías de Tratamiento para la Descontaminación de Suelos*, Cuaderno de Investigación 29, CENAPRED, México, pp. 26.

3) *Técnicas Biológicas*: La *biorremediación* es un tratamiento -desarrollado en la década de los 80 - que utiliza como herramienta el dirigir o inducir el metabolismo de organismos (bacterias y hongos microscópicos principalmente) para degradar y/o transformar en biomasa y compuestos más sencillos (H_2O , CO_2 , CH_3 , y sales inorgánicas), las sustancias orgánicas existentes en los suelos contaminados (Calabrese et al, 1992).

Si bien, casi todos los contaminantes orgánicos son biodegradables, se presentan algunas dificultades y detalles que requieren solucionarse para poder utilizar y obtener eficiencias adecuadas de biorremediación (buen desempeño microbiológico). Por esta razón, en la mayoría de los casos se modifica el ambiente en donde actúan los microorganismos, propiciando un hábitat adecuado para la mejor adaptabilidad y función de éste, aunque en ocasiones resulta complicado.

Rogers y col. (1993) esbozan un protocolo para la biorremediación de un suelo en donde contemplan la mayoría de los factores físicos y químicos que en un momento dado juegan un papel determinante para la viabilidad y eficiencia de esta técnica.

En México, actualmente se está aplicando la biorremediación para el tratamiento

de suelos contaminados con hidrocarburos (Fernández *et al*, 1998), que si bien esta tecnología ha demostrado ser prometedora para un número de compuestos semi volátiles y no volátiles, no lo ha sido tanto para los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP) que son algunos de los compuestos más recalcitrantes y tóxicos (Chen,1997).

Ahora bien una variante de la biorremediación, es la *Fitorremediación*. En términos amplios, es definida *como el uso de plantas para remover, contener o reducir la toxicidad de contaminantes ambientales* (Chen,1997; Lee,1993).

Observaciones recientes, han sugerido que la vegetación juega un papel preponderante en la biorremediación de las superficies de suelos contaminados a través de diferentes mecanismos (Hedge, 1996; Fletcher,1995; Chen, 1997; Lee, 1993):

- Mejorando las propiedades físicas y químicas de los suelos alterados
- Incrementando la población microbiana edáfica de interés por la liberación radicular de exudados, excreciones y mucilago ricos en nutrientes. Proceso que típicamente tiene lugar en los casos de contaminación del suelo con hidrocarburos
- Favoreciendo la aireación por medio de la liberación de oxígeno en la zona de las raíces
- Interceptando, retardando o transfiriendo el movimiento de químicos orgánicos y algunos metales
- Estimulando transformaciones cometabólicas de compuestos recalcitrantes (Bencenos halogenados, Bifenilos Policlorados e Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos, por ejemplo) a metabolitos de menor toxicidad
- Reducción en la migración vertical de xenobióticos hacia los cuerpos acuíferos subterráneos por medio de la absorción del exceso de agua e invirtiendo el gradiente hidráulico vertical

Cabe señalar, que la capacidad para realizar estas funciones puede variar según la especie vegetal en cuestión y la fase de desarrollo en la que se encuentre.

Las técnicas biológicas, al igual que los dos tipos de tecnología anteriores, presentan ventajas y desventajas. Entre las primeras se pueden mencionar su bajo costo de operación, mantenimiento y monitoreo, es aplicable a grandes extensiones y es ambientalmente compatible. Sin embargo, los resultados de las tecnologías biológicas no son inmediatos y pueden ser alterados por las condiciones climáticas y estacionales. La toxicidad de algunos de los compuestos biotransformados en ocasiones es incierta.

La Fitorremediación no es muy efectiva para sitios altamente contaminados puesto que las plantas pueden resultar intoxicadas. Al parecer, está resultando ser una opción adecuada en términos técnicos y económicos para el tratamiento de suelos contaminados con hidrocarburos (Chen, 1997).

1.7 Fitotoxicidad, Aspectos Generales.

La Fitotoxicidad generalmente se refiere a la manifestación o aparición de una o más respuestas adversas o desfavorables en las plantas, resultado de la exposición (por una o varias vías) a una sustancia o mezcla de ellas (Kapustka, 1998).

La Fitotoxicidad de un xenobiótico, por tanto, es evaluada a través del análisis cualitativo y cuantitativo del efecto provocado en uno o más parámetros fisiológicos que se consideran relevantes o representativos. En este sentido, es común que las pruebas de fitotoxicidad estén orientadas a la valoración de: 1) la mortalidad (toxicidad aguda), 2) el índice de germinación, 3) la elongación radicular, 4) el crecimiento o producción de biomasa, 5) el contenido de clorofila y 6) la tasa fotosintética, principalmente.

El conocer los efectos fitotóxicos que provoca un compuesto, permite valorar y determinar los factores de riesgo asociados a su exposición así como el grado de tolerancia o sensibilidad de la planta examinada, lo cual, en conjunto puede aportar mayor certeza, aunque no contundente, para vislumbrar el impacto ambiental y, en un momento dado, poder también atribuirle a una especie el papel de *bioindicador ambiental* para un xenobiótico o conjunto de ellos en particular.

Cabe mencionar que, pese al nicho ecológico tan importante que poseen las plantas (productores primarios), existe un número relativamente reducido de trabajos de fitotoxicología (Wang, 1995) y de los cuales, las algas ha sido el grupo más comúnmente empleado (Wang, 1997) al parecer por su aplicación en estudios de calidad del agua (Kapustka, 1998). A este respecto, un ejemplo claro es el que presenta Wang y col. (1997) donde señala que, en la base de datos de *PHYTOTOX*, existen un total de 3500 artículos publicados entre 1929 y 1984 en más de 200 revistas de 30 países aproximadamente, mientras que documentos referentes a pruebas de toxicidad en animales se reportan más de 500 por año, tan sólo en el *Annual Review Series* del *Journal of Water Environment Research*.

1.8 Bioindicadores.

Un *bioindicador* puede estar representado por cualquier organismo que, por su respuesta ante la presencia o exposición de alguna sustancia o mezcla, permita realizar una evaluación cuantitativa de la calidad ambiental que prevalece en una ocasión espacio-temporal determinada (Bierkens, 1998). En otras palabras, un bioindicador constituye una herramienta que permite cuantificar e interpretar, en términos biológicos, los efectos relacionados con la existencia de concentraciones o niveles de contaminación particulares. Algunos ejemplos de bioindicadores son:

Líquenes: el crecimiento de los líquenes se ha utilizado como indicador de contaminación atmosférica principalmente en lo que se refiere al dióxido de azufre. La aparición de líquenes en un área previamente contaminada es indicio de un descenso en la concentración de tóxicos en el aire (Krebs, 1985).

Protozoarios: algunos de ellos como los representantes del género *Bodo* son indicadores de aguas contaminadas por un excesivo aporte de materia orgánica, ya que son bacteriofagos (Barnes, 1989).

Se pueden mencionar muchos más como, *las coníferas* (lluvia ácida), *lirio acuático* (agua eutrofizada), *arrecifes coralinos* (turbidez anormal, contaminantes diversos). Desde luego, el basarse únicamente en una sola respuesta biológica o bioindicador no aportaría un escenario completo ni preciso de la calidad del ambiente, puesto que no se contaría con la suficiente base discriminatoria ni una incertidumbre reducida.

1.8.1 Las Plantas como Bioindicadores de Contaminación.

El uso de las plantas como indicadores de la calidad ambiental no es nuevo, ya los primeros trabajos documentados al respecto se registran en los principios del siglo XX (Powell, 1997). A pesar de ello, las plantas no han tenido una participación preponderante en la tarea de evaluación y monitoreo ambiental tradicionalmente debido a la subestimación de su sensibilidad con respecto a la de los animales. Esta idea ya se demostró que es errónea e incluso, se ha visto que en algunos casos la sensibilidad de las plantas es mayor. Estudios a nivel celular, utilizando inhibición de crecimiento y muerte como respuestas finales de toxicidad, han producido resultados similares, lo cual ha sugerido en ocasiones la sustitución de algunas pruebas en animales por la utilización de plantas (Kristen, 1997).

Muchas Agencias Regulatorias (OCDE, US EPA, ASTM, FDA, etc.) ya incluyen pruebas de fitotoxicidad en los trabajos de ecotoxicología que realizan. Sin embargo, están presentes dos problemas: por un lado, la limitada cantidad de estudios fitotóxicos existentes dificulta las comparaciones entre los resultados, por el otro, dichas agencias, de manera independiente, han diseñado, estructurado y publicado protocolos de prueba de toxicidad para plantas terrestres, lo cual ha dado lugar a la existencia de diferencias entre los procedimientos y criterios que aplican, y por tanto, la información generada a través de ellos no es muy comparable. En general, las especies de interés económico (lechuga, bróccoli y avena) tienen cierta preferencia para utilizarse en estos protocolos (Wang, 1995).

Resulta peculiar la observación de Kapustka y col. (1998) en el sentido de que ninguna agencia contempla en sus protocolos la utilización de especies leñosas (únicamente herbáceas), dado el nivel de atención que se concede a los bosques del mundo. Quizá un factor a considerar es que este tipo de plantas no son fácilmente manipulables en condiciones de laboratorio (crecimiento lento, gran tamaño, ciclo de vida largo, etc.).

1.9 Algunos Aspectos de la Fisiología Vegetal Considerados en la Evaluación de la Fitotoxicidad de un Contaminante.

Así como ocurre con los animales, existen diferentes aspectos de la fisiología de una planta más vulnerables que otros, que permiten identificar, determinar y correlacionar los efectos y modos de acción de diversas sustancias. Resulta comprensible entonces que los parámetros o procesos fisiológicos que representen de una manera más tangible y expedita un estado alterado o de estrés (sea inducido o no) serán los más adecuados para ser valorados.

1.9.1 En este sentido, *la germinación* representa un estado sensible y crucial en el ciclo de vida de una planta puesto que representa la reanudación del crecimiento activo del embrión, lo cual, en términos generales, conlleva a establecer un intercambio de materia y energía con el medio externo. Si una sustancia altera o inhibe esta fase puede resultar afectada la reproducción y por ende, el tamaño poblacional de esa especie. Sin embargo, desde una perspectiva ecológica, la germinación puede tener un significado poco o muy importante dependiendo de la especie vegetal implicada. Cabe señalar que la evaluación de la germinación es un objetivo muy generalizado en las pruebas de fitotoxicidad con plantas vasculares, de hecho, es un parámetro utilizado ampliamente desde que los protocolos estandarizados fueron introducidos (Walker, *et al.*, 1996; Wang, *et al.*, 1995).

1.9.2 *Elongación radicular.* Se sabe que las raíces son órganos esenciales para la planta puesto que se utilizan como estructura de fijación y absorción de agua y nutrientes. Si bien el crecimiento es un término bastante empleado y conocido, refiere un fenómeno complejo que conlleva al menos tres procesos diferentes. Primeramente un *incremento* en el número de células (división celular). Sin embargo, el aumentar la cantidad de células sin acrecentar proporcionalmente el *tamaño* de las mismas contribuiría muy poco al crecimiento general de la planta, de ahí que la *elongación celular* se considera el segundo proceso asociado al crecimiento (Salisbury, *et al.*, 1994). Por último, ocurre la *diferenciación* de las células para realizar y conformar diferentes funciones y órganos.

De lo anterior, se desprende que el crecimiento de las raíces es el producto de muchos procesos conjuntos (proliferación, elongación y diferenciación celular activa) lo cual le confiere cierta vulnerabilidad ante la exposición a xenobióticos. Es de suponerse que este parámetro sea más sensible que la germinación, debido entre otros factores a que la vía de exposición a un contaminante puede ser más directa puesto que la testa de las semillas, en cierta manera, representa una barrera física y química.

La longitud de las raíces, al igual que la germinación, es un parámetro frecuentemente considerado en la evaluación fitotóxica de una sustancia.

1.9.3 El *crecimiento* en las plantas, al igual que en los animales, está influenciado y regulado por la interacción de muchos factores físicos y químicos intrínsecos y

extrínsecos. Por lo tanto, el estrés provocado por una variedad de sustancias puede manifestarse en un aumento o reducción anormal del crecimiento, siendo susceptible de evaluarse. El crecimiento es también un parámetro comúnmente considerado en las pruebas de fitotoxicidad de los protocolos de las agencias regulatorias, determinándose generalmente como producción de biomasa (en peso fresco o seco). Algunos autores argumentan que un 50% en la inhibición de la biomasa o en el crecimiento observado en laboratorio no necesariamente tiene un efecto ecológico significativo, especialmente si se reestablece cuando el estrés tóxico es eliminado (Wang, 1995).

1.9.4 Contenido de clorofila y fotosíntesis. Se ha asumido que el contenido de clorofila y la eficiencia de la fotosíntesis, por su papel tan importante en los vegetales, conceptualmente representan un parámetro de referencia que puede evidenciar adecuadamente el estado fisiológico de una planta frente a distintos factores de estrés por exposición a diferentes condiciones y contaminantes ambientales (Salvetat *et al.*, 1998). No obstante, el establecimiento práctico de una relación entre fotosíntesis y productividad vegetal ha sido difícil, no siendo diferente al querer aplicarlo al estrés ambiental (Kapustka, *et al.*, 1998), puesto que, ecológicamente, las plantas exhiben amplias diferencias en su eficiencia fotosintética, contenido de clorofila, tasa de asimilación de carbono, adaptación a las condiciones de luz, y temperatura, humedad, salinidad, fotoperíodo, etc. (Ascon-Bieto, *et al.*, 1993). Pese a lo anterior, es plausible utilizar el contenido de clorofila y la eficiencia fotosintética como indicadores bioquímicos de estrés cuando pueden acotarse o delimitarse razonablemente las demás fuentes de variación. Cabe señalar también, que estos dos parámetros no necesariamente están correlacionados entre sí.

Resulta interesante la observación de Kapustka y col. (1998) al denotar que la mayoría de las pruebas fitotóxicas emitidas por las agencias regulatorias generalmente no contemplan la realización de evaluaciones fisiológicas a nivel bioquímico del efecto de los xenobióticos.

1.10 Pruebas para Determinar la Toxicidad de una Sustancia.

Para la toxicología y la toxicología ambiental (ecotoxicología) es de primordial importancia la relación que existe entre la *cantidad* del agente químico al cual está expuesto un organismo y la naturaleza y grado de los *efectos adversos* ocasionados por el mismo (Calow, 1998; Walker, *et al.*, 1996; Duffus, 1983).

1.10.1 Existen muchas maneras por las cuales la toxicidad puede ser determinada, una de las más comunes es la medida de la *letalidad a corto plazo* y se le denomina *Toxicidad Aguda*. Las pruebas de toxicidad aguda o *letales* permiten conocer los efectos adversos totales producidos por una sustancia administrada en forma de dosis única. Dichos efectos generalmente son de carácter discreto y binario, es decir, vivo/muerto o activo/inactivo, por ejemplo. Al utilizar varias concentraciones suministradas en una sola dosis y cuantificando sus efectos, se puede construir estadísticamente una curva dosis-respuesta e

identificar la concentración letal para el 50% (CL₅₀) de la población experimental con respecto al control. La CL₅₀ es un parámetro de referencia muy utilizado en toxicología, su valor es inversamente proporcional a la toxicidad de la sustancia en cuestión. El índice de germinación observado en semillas expuestas a una determinada dosis de un xenobiotico, constituye un ejemplo de prueba de toxicidad aguda.

Sin duda, puede ocurrir también que una sustancia sea letal únicamente cuando la dosis sea muy alta, pero produzca efectos adversos significativos a concentraciones relativamente bajas o por largos tiempos de exposición. En este caso, la evaluación de la toxicidad aguda no aportaría suficiente resolución en el sentido de que no ofrece un indicio de las concentraciones que pueden determinar daños subletales, únicamente proporciona una base, aunque aproximada (el valor de la CL₅₀ no es constante*), para la evaluación inicial del peligro por riesgo potencial de una sustancia.

1.10.2 Una Prueba *Subcrónica* ó *Crónica*, tiene como propósito evaluar los posibles efectos dañinos que se originen antes de que sobrevenga la letalidad del organismo prueba, es decir, su objetivo es valorar la toxicidad a *mediano y largo plazo* respectivamente, lo cual implica un exposición *continua* por un periodo más prolongado. Como es de suponerse, una prueba de esta naturaleza abarca una mayor proporción de fases del ciclo de vida de los individuos experimentales, teniendo mayor duración. Por lo anterior, resulta evidente entonces que la determinación subcrónica o crónica de la toxicidad de una sustancia supone mucho más esfuerzo de laboratorio, sin embargo, ofrece generalmente información más completa y útil, aunque también presenta ciertos inconvenientes:

- En ocasiones, los efectos o la letalidad a largo plazo atribuible a la sustancia de prueba es difícil establecerlo puesto que pueden presentarse otros factores que propicien o aceleren un estado debilitado del organismo, no necesariamente inducidos por aquella
- Por lo general, se requiere mantener organismos en condiciones constantes de laboratorio durante periodos prolongados, lo que puede resultar complicado o costoso
- Comúnmente la exposición continua a un xenobiótico a concentraciones fijas y en condiciones constantes, es una situación poco común en la naturaleza, lo cual puede dar lugar a una sobre o subestimación de los efectos observados (Cairns,1992)

Por lo anterior, algunos autores como Ramanathan y Burks (1996), consideran, por un lado, que las pruebas de toxicidad aguda son probablemente el mejor medio para realizar una rápida evaluación preliminar del grado y distribución de la

* La CL₅₀ o EC₅₀ representan una *estimación experimental* de la tolerancia de una *población* determinada frente a un xenobiótico, por lo que el valor de estos parámetros está determinado e influenciado necesariamente por una serie de interacciones complejas entre las tolerancias *individuales*, la estructura genética de la población y el medio, es decir, está compuesto por la suma de las respuestas de cada uno de los individuos de la población experimental.

contaminación en un lugar determinado y, por el otro, no representan indicadores adecuados de los efectos potenciales en ciertos períodos críticos del ciclo de vida de los individuos. Asimismo, las pruebas crónicas de toxicidad tienen mayor sensibilidad que las pruebas agudas y pueden representar una herramienta útil para predecir niveles de "no efecto" y "seguros" de contaminación, además de simular más fielmente las condiciones de exposición real comparado con aquellas.

1.11 Protocolos Estandarizados para Evaluar Efectos Fitotóxicos.

Si bien anteriormente ya se hizo referencia a la existencia de protocolos diseñados por las diferentes agencias regulatorias para evaluar efectos fitotóxicos, no se ha dado una definición de ellos.

Primeramente, de acuerdo con Willard y col. (1988), se puede definir al *procedimiento* como un conjunto de instrucciones escritas para aplicar un método. Los métodos estandarizados desarrollados por la ASTM (American Society for Testing and Materials) por ejemplo, son en realidad procedimientos normalizados o estandarizados. Un procedimiento esboza sin demasiado detalle los pasos a seguir, es decir, se asume que el usuario tiene o cuenta con cierto conocimiento previo de la metodología analítica.

Un *protocolo*, siguiendo a Willard, es la descripción más específica de un método en el cual deben seguirse -sin excepción- las directrices detalladas y recomendaciones si es que los resultados deben ser aceptados para un propósito particular, tal como un análisis ambiental para satisfacer los requisitos de la US EPA (United States Environmental Protection Agency).

Por otro lado, los protocolos estandarizados para pruebas fitotóxicas han sido diseñados para utilizarse con algas, plantas vasculares acuáticas y terrestres por diversas autoridades, principalmente durante los últimos quince años. Los protocolos para plantas terrestres que han tenido mayor desarrollo en su diseño, son aquellos que están orientados a realizar pruebas de germinación, elongación radicular y crecimiento vegetativo a nivel laboratorio, aunque todavía no han sido utilizados ni evaluados ampliamente. Como ya se había comentado, la mayoría de las plantas experimentales sugeridas por estos protocolos son de interés económico (agricultura), en especial la lechuga (*Lactuca sativa*), bróccoli (*Brassica oleracea*), avena (*Avena sativa*) y la gramínea *Lolium perenne* (Kapustka, et al., 1998).

De las agencias internacionales más importantes que han diseñado por lo menos un protocolo fitotoxicológico para plantas terrestres son:

- La Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (US EPA)
- La Administración de Drogas y Alimentos de Estados Unidos (FDA)
- La Sociedad Americana para Pruebas y Materiales de Estados Unidos (ASTM)
- La Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico (OCDE)

2. Antecedentes

2. ANTECEDENTES.

2.1 Los hidrocarburos, aspectos generales.

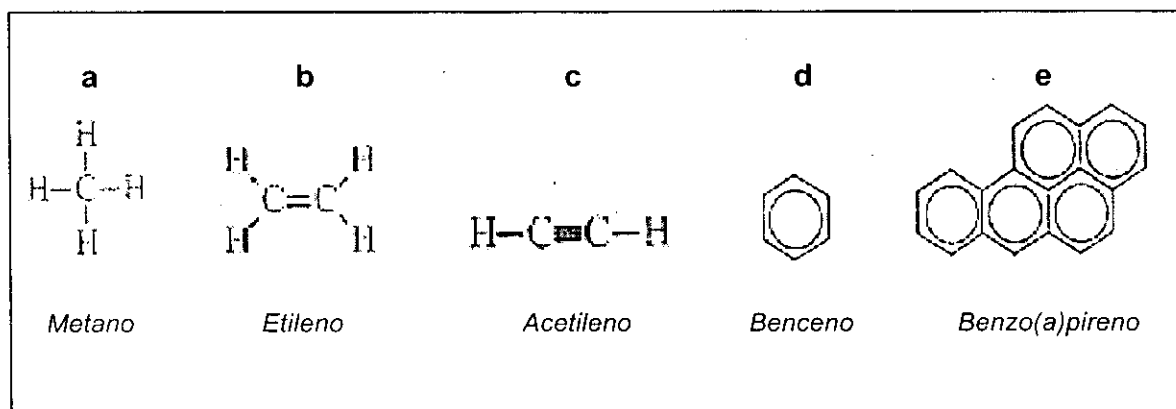
El carbono tiene la capacidad de formar y constituir una gran diversidad de moléculas, muchas de las cuales representan la base de los organismos vivos. La gran mayoría de los compuestos que contienen carbono se denominan *orgánicos*^{*} siendo excepción algunas moléculas sencillas como el CO₂ y el CO (Morrison *et al.*, 1990).

Los hidrocarburos son compuestos orgánicos constituidos por carbono e hidrógeno. Algunos de ellos son de bajo peso molecular (metano, etano, etileno, por ejemplo) y existen como gases en condiciones estándar de temperatura y presión. Sin embargo, una mayor proporción de hidrocarburos son líquidos y sólidos, ambos de mayor peso molecular. Por lo general, los hidrocarburos tienen baja polaridad (carga eléctrica) y por consiguiente poca solubilidad en agua. Pueden dividirse en dos clases principales:

- 1) Hidrocarburos alifáticos
- 2) Hidrocarburos aromáticos

Los hidrocarburos agrupados en la primera clase pueden ser saturados (como el metano, figura 3a) o insaturados. Estos últimos pueden tener enlaces carbono-carbono dobles (como el etileno, figura 3b) o triples (como el acetileno, figura 3c). Los hidrocarburos saturados se denominan *alcanos*, los insaturados con doble enlace son los *alquenos* y *alquinos* aquellos con triple enlace carbono-carbono. Todos pueden existir como cadenas sencillas, ramificadas o cerradas (anillos). Los alquenos y alquinos son químicamente más reactivos debido a que son insaturados (tienen electrones de valencia disponibles) y también pueden existir como gases, líquidos o sólidos según el número de carbonos que contengan.

Figura 3. Ejemplos de hidrocarburos alifáticos (a, b, c) y aromáticos (d, e).



^{*} lo cual no significa necesariamente atribuir un carácter biogénico a estos compuestos.

La característica principal que distingue al segundo grupo es la presencia de uno o más anillos de benceno (Figura 3d) en su estructura. Los anillos de benceno son moléculas constituidas por seis átomos de carbono (unidas en cadena cerrada, cíclica) insaturados, en el sentido de que las valencias (cuatro) del carbono no están completamente utilizadas en el enlace con el hidrógeno, por lo cual siempre existen electrones deslocalizados (desapareados) moviéndose (resonando) en el sistema del anillo.

Los hidrocarburos aromáticos existen como líquidos o sólidos únicamente, con puntos de ebullición por debajo de los 80 ° C a una atmósfera de presión. Presentan menor reactividad, siendo poco susceptibles a transformaciones químicas y bioquímicas. Cuando un hidrocarburo aromático está constituido por tres o más anillos de benceno unidos directamente (figura 3e), se dice que es un Hidrocarburo Aromático Policíclico (HAP), muchos de los cuales son potentes carcinógenos y mutágenos (Edwards, 1983; Neilson, 1998).

Las fuentes naturales principales de hidrocarburos son los depósitos de petróleo y de gas ubicados en los estratos superiores de la corteza terrestre en los cuales predominan los hidrocarburos no-aromáticos aunque pueden contener cantidades significativas de HAP. Una fuente importante de estos últimos está representada por la combustión incompleta de otros compuestos orgánicos, por ejemplo, quema de carbón, madera (incendios forestales), combustión de gasolina en los motores, humo del cigarro, etc.

El petróleo.

Como ya se ha comentado, el petróleo es una mezcla compleja de hidrocarburos principalmente (cuadro 2), pudiendo contener además derivados del azufre, compuestos nitrogenados y metales como el fierro, níquel, cromo, vanadio y cobalto, aunque en menores proporciones. El petróleo crudo, varía mucho en su composición dependiendo del tipo de yacimiento proveniente, sin embargo, en promedio se puede considerar que contiene entre 83 y 86% de carbono y entre 11 y el 13% de nitrógeno. Tanto mayor sea la proporción de carbón en relación con el hidrógeno, así también será la cantidad de productos pesados que contenga. Esto depende de la antigüedad y de las características de yacimiento, no obstante, se ha comprobado que a medida que se incrementa la antigüedad del crudo posee más hidrocarburos gaseosos y sólidos y menos líquidos entran en su composición (Chow, 1998).

Ahora bien, sin duda, la Industria del Petróleo es una industria de riesgo, puesto que las labores y maniobras de exploración, producción, tratamiento, transportación y almacenamiento del crudo necesariamente tienen una probabilidad asociada de sufrir fallas o accidentes técnicos y/o humanos, lo cual es posible *minimizar* más no *eliminar* completamente. La contaminación del ambiente por petróleo se ha incrementado considerablemente en la última década (Chen, 1997), situación que obedece a la gran demanda energética y tecnológica de este recurso.

Cuadro 2. Constituyentes principales del petróleo. El petróleo es una mezcla de hidrocarburos principalmente, la cual se puede separar por destilación en varias fracciones. Nótese que cada fracción continúa siendo una mezcla de hidrocarburos aunque dentro de un intervalo más definido.

FRACCIÓN	TEMPERATURA de DESTILACIÓN (20 °C)	NÚMERO de CARBONOS
Gas	Bajo 20	C ₁ - C ₄
Éter de Petróleo	20 - 60	C ₅ - C ₆
Ligroína (nafta ligera)	60 - 100	C ₆ - C ₇
Gasolina Natural	40 - 205	C ₅ - C ₁₀ y cicloalcanos
Queroseno	175 - 325	C ₁₂ - C ₁₈ y aromáticos
Gasóleo	Sobre 275	C ₁₂ y superiores
Aceite Lubricante	Líquidos no volátiles	Probablemente cadenas largas unidas a estructuras cíclicas
Asfalto o Coque de Petróleo	Sólidos no volátiles	Estructuras policíclicas

Fuente: Morrison, R. & R. Boyd. (1990). *Química orgánica, Addison-Wesley iberoamericana, E. U. A., 5ª edición.*

2.2 Estudios de Fitotoxicidad de los Hidrocarburos.

Como ya se ha mencionado anteriormente, la cantidad de trabajos de Fitotoxicidad que existen en la literatura comparada con la relativa a la evaluación de la toxicidad en animales por ejemplo, es relativamente menor aunque no necesariamente escasa.

Dentro del marco de estudios de toxicología vegetal, se puede apreciar que las interacciones y efectos que tienen los hidrocarburos en las plantas han sido estudiados de manera cualitativa y cuantitativa, abordándose desde diversos ángulos y técnicas. Entre los principales objetivos sobre los que han versado las investigaciones realizadas con hidrocarburos y plantas se pueden mencionar:

- Evaluación de efectos fisiológicos, como la germinación, crecimiento (producción de biomasa), elongación radicular, contenido de clorofila, tasa fotosintética y características anatómicas
- Principales rutas de ingreso de los hidrocarburos (raíces, tallo y hojas) y sus mecanismos de movilidad, translocación y bioacumulación
- Identificación de metabolitos secundarios de degradación de hidrocarburos
- Comparación de la fitotoxicidad entre algunos hidrocarburos "intactos" y fotomodificados por radiación solar simulada o natural
- Establecimiento de asociaciones o correlaciones entre

- Valoración de la calidad de un suelo contaminado antes y después de la aplicación de algún proceso de remediación
- Estudio de factibilidad de la fitorremediación y ecotoxicología de suelos contaminados con hidrocarburos

Resulta interesante señalar que una mayoría significativa de dichos estudios se ha realizado con Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP), entre ellos Naftaleno, Pireno, Benzo(a)pireno, Antraceno, Fenantreno, Fluoranteno, Benzo(a)antraceno y Criseno. Esto se puede explicar a la luz de la alta toxicidad, mutagenicidad y carcinogenicidad potencial que presentan una amplia variedad de ellos y su movilidad, persistencia y omnipresencia en el ambiente. No obstante, lo anterior no debería justificar la escasez de trabajos de laboratorio realizados con *mezclas* de hidrocarburos (como lo es la gasolina, diesel, petróleo crudo, etc.), puesto que por lo general no ocurre la contaminación del suelo con un solo hidrocarburo o fracción de ellos.

Un razonamiento bastante lógico y común es evaluar individual o conjuntamente algunos de los constituyentes más representativos de una mezcla y en función de esto asumir o extrapolar el o los efectos a la mezcla entera (Heath,1993), sin embargo, dicho ejercicio proporciona únicamente un estimación aproximada (cualitativa) y no cuantitativa de los efectos potenciales reales. Se puede ver entonces que, la evaluación global de la toxicidad de una mezcla no es una tarea sencilla puesto que, entre otras cosas, en una mezcla de hidrocarburos:

- Pueden ocurrir interacciones entre los constituyentes que den lugar a un sinergismo o antagonismo en la toxicidad total
- La volatilidad, biodisponibilidad y la biodegradabilidad diferencial de los constituyentes, supone un cambio en el tiempo de la composición original y por ende, de la toxicidad en conjunto

Algunos trabajos realizados con *mezclas* de hidrocarburos son los de: Dorn, *et al.*, 2000; Dorn,*et al.*, 1998; Ramanathan, *et al.*, 1996; Salanitro, *et al.*, 1997; Bossert, *et al.*,1985., en los cuales se reportan efectos inhibitorios y en otros estimulatorios en la germinación, elongación radicular y crecimiento dependiendo de la concentración y tipo de petróleo utilizado por cada investigador. Algunos de estos autores también informan anomalías anatómicas y alteraciones en la orientación (geotropismo) de las raíces y tallos.

2.2.1 Especies Vegetales que se han Utilizado en Estudios de Fitotoxicidad con Hidrocarburos.

En la literatura revisada correspondiente a estudios de toxicidad vegetal con hidrocarburos se puede observar una amplia variedad de plantas que se han utilizado (cuadro 3), mostrando una sensibilidad diferencial frente a la exposición. Esto ha permitido, por un lado, que algunas de ellas sean susceptibles de

utilizarse como indicadores de contaminación por hidrocarburos, por ejemplo, la leguminosa *Vicia faba* (haba) al parecer es un buen candidato (Malallah, *et al.*, 1996). Por el otro, ha evidenciado que los procesos y factores implicados en el ingreso y translocación de los hidrocarburos (y otros xenobióticos) en las plantas son similares, sólo siendo específico de cada especie, el metabolismo y la fitotoxicidad (Topp, *et al.*, 1986; Briggs *et al.*, 1982).

Algunas de las especies (incluyendo la anterior) que se han utilizado en pruebas de fitotoxicidad con hidrocarburos son:

Cuadro 3. Algunas especies vegetales utilizadas en pruebas de toxicidad con Hidrocarburos.

<i>Allium cepa</i> (cebolla)	<i>Lolium perenne</i>
<i>Anetum graveolens</i> (eneldo)	<i>Lupinus polyphyllus</i> (antraliz)
<i>Avena sativa</i> (avena)	<i>Mendicago sativa</i> (alfalfa)
<i>Brassica oleracea</i> (bróccoli)	<i>Nicotiana tabacum</i> (tabaco)
<i>Brassica napus</i> (colza)	<i>Oryza sativa</i> (arroz)
<i>Capsicum annum</i> (chile)	<i>Pisum sativum</i> (chícharo)
<i>Cucumbis sativus</i> (pepino)	<i>Raphanus sativus</i> (rábano)
<i>Daucus carota</i> (zanahoria)	<i>Secate cereale</i> (ballico)
<i>Festuca arundinacea</i> (tall fescue)	<i>Trifolium repens</i> (trebol)
<i>Glycine max</i> (soya)	<i>Triticum aestivum</i> (trigo)
<i>Lactuca sativa</i> (lechuga)	<i>Zea mays</i> (maíz)
<i>Lemna gibba</i> (lenteja de agua)	
<i>Lemna minor</i> (lenteja de agua)	

De las especies que se mencionaron, algunas también corresponden a las recomendadas por los protocolos de pruebas de fitotoxicidad emitidos por las agencias regulatorias. Principalmente los criterios considerados en la selección de plantas-prueba están relacionados con:

- Su importancia económica
- Su crecimiento rápido y ciclo de vida relativamente corto (como es el caso de la lechuga, rábano, las leguminosas en general, etc.)
- La identificación de síntomas o efectos de estrés muy específicos y expeditos, de sencilla valoración (el número de hojas, como indicador de crecimiento en *Lemna gibba*, se considera un procedimiento altamente confiable y representativo para evaluar toxicidad por HAP. Mallakin, *et al.*, 1999)
- La existencia de una metodología de evaluación específica ya estructurada para una planta determinada. La guía estándar para conducir pruebas de toxicidad con *Lemna gibba* de la ASTM, es un ejemplo (Wang, *et al.*, 1995).

En otras palabras, la selección de un especie o de otra, está orientada principalmente en función de su adaptabilidad a las condiciones de laboratorio (Kristen, *et al.*, 1997), en un contexto ecotoxicológico, esta prioridad ha dado lugar

a que en ocasiones las especies evaluadas sean ajenas al ecosistema real de interés y por tanto no sean representativas de él, pudiendo dar a interpretaciones o estimaciones ambientales poco objetivas (Cairns, *et al.*, 1992).

2.3 Biología del Género *Cyperus*.

Se ha señalado que en los suelos contaminados del pantano de Santa Alejandrina Veracruz, se observa la presencia dominante de plantas que se identificaron como especies miembros de los géneros *Cyperus* y *Echinochloa*. Algunos ejemplares de *Cyperus*, como planta de estudio de este trabajo, se identificaron como *Cyperus elegans* L., de acuerdo con la especialista en ciperáceas Nelly Diego-Pérez de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México. La taxonomía de esta especie es la siguiente:

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Liliopsida
Orden	Cyperales
Familia	Cyperaceae
Género	<u>Cyperus</u>
Especie	<u>C. elegans</u>

La familia Cyperaceae cuenta con aproximadamente 115 géneros, distribuidos en todo el mundo y en diferentes condiciones ecológicas. Tan sólo en el Estado de Guerrero-México, se tienen registradas 14 de ellos y 124 especies (Diego-Pérez *et al.*, 1997). Por lo general, los miembros de esta familia son hierbas perennes o anuales y recuerdan por su aspecto a las gramíneas. Presentan flores poco vistosas reunidas en inflorescencias, a menudo carecen de cubiertas florales o éstas son rudimentarias, el fruto es seco y monospermo, tallo trigono. Una descripción más detallada de la familia Cyperaceae se encuentra en el trabajo de Diego-Pérez y Fonseca(1997).

Estos mismos autores describen a *Cyperus elegans* como:

Hierbas perennes, cespitosas, verde glauco, de 20 a 75 cm. de altura, viscosas. Tallos trigonos o subcilíndricos, de 1.5 a 3.5 mm de ancho en la base, estriados, glabros. Hojas de 3 a 6, septado nodulosas, de 20 a 70 cm. de largo y 1 a 4 mm. de ancho. Subcoriáceas, márgenes escábridos, e involutos, vainas color verdoso a pardo rojizo de 1.5 a 18 cm de largo, algunas veces infladas en la base. Brácteas 3 a 5, desiguales, de 2.5 a 46 cm de largo y 1 a 4.5 cm de ancho, márgenes escábridos. Inflorescencias en umbelas de espigas capitadas, de 2.5 a 22 cm de largo y 5 a 14 cm de ancho; radios primarios 4 a 10, desiguales de 1 a 12 cm de largo o ausentes, radios secundarios 2 a 4 de 0.5 a 3 cm de largo o ausentes; espigas de 1 a 1.8 cm de largo y ancho con 8 a 22 espiguillas. Espiguillas oblongas a lanceoladas, de 3 a 15 mm de largo y 2.5 a 4 mm de ancho, con 6 a 20 glumas; raquillas rectas, sin alas; glumas verde con manchas pardo rojizas, ovadas, mucronadas, cuspidadas, de 2.5 a 3 mm de largo y ancho, cartilaginosas, con 7 a 9 nervios, denticuladas hacia el ápice; mucrón de 0.2 a 0.3 mm de largo; estambres 3, filamentos de 1.5 a 2.2 mm de largo, anteras de 0.5 a 1 mm de largo, conectivo pardo rojizo; ovario tricarpelar, estilo de 1.5 a 2 mm de largo, estigmas 3, de 1 a 1.5 mm de largo. Aquenios negros, anchamente

obovoides, trigonos, apiculados, ángulos redondeados, lados cóncavos, estipitados, de 1.4 a 1.8 mm de largo y 0.7 a 1 mm de ancho, viscosos, lisos.

Distribución: Sur de Estados Unidos, México (Baja California, Baja California Sur, Campeche, Chiapas, Colima, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Quintana Roo, San Luis Potosí, Sinaloa, Sonora, Tabasco, Tamaulipas, Veracruz, Yucatán), América Central, Antillas y América del Sur.

Altitud: 0 a 100 msnm.

Tipos de vegetación: acuática y subacuática, zonas húmedas de las siguientes comunidades: bosque tropical caducifolio, vegetación halófila costera y cultivos.

Hábitat: pantanos salobres abiertos, potreros estacionalmente inundables, en su mayor parte acerca del mar (Adams, 1994).

Fenología: florece y fructifica de febrero a noviembre.

Reproducción: principalmente por tubérculos.

El género *Cyperus* incluye aproximadamente 700 especies ampliamente distribuidas en todo el mundo, tanto en hábitat húmedos como secos de regiones tropicales y templadas. El género es taxonómicamente complejo agrupando especies con metabolismo C_3 y C_4 aunque predominando principalmente este último. La apropiada clasificación del género en subgéneros todavía es un tema debatido (Li, *et al.*, 1999).

La utilización de caracteres anatómicos y bioquímicos para ayudar a comprender la filogenia de las plantas es una tendencia cada vez más acentuada en los estudios taxonómicos, la diferenciación del metabolismo C_3 y C_4 ha sido ampliamente aplicado en las gramíneas y entre las Ciperáceas (Li, *et al.*, 1999; Medina, *et al.*, 1976)

2.4 *Cyperus* y el Metabolismo C_4 .

Como se sabe, las plantas C_4 reciben ese nombre porque el producto primario de la fotosíntesis que realizan consta de cuatro carbonos (oxaloacetato). Este grupo de plantas se caracteriza por una alta eficiencia fotosintética e hídrica, por su bajo punto de compensación de CO_2 y mínima fotorrespiración lo que también se traduce en una gran capacidad productiva (maíz, sorgo, caña de azúcar, por ejemplo). Esto además les ha conferido una gran adaptación y competitividad en hábitat secos, cálidos con alta irradiación e inclusive pobres en nutrientes (Salisbury, *et al.*, 1994). Existe amplia literatura en fisiología vegetal que se ocupa de la explicación y el análisis detallado referente a esta ruta fotosintética.

Cabe señalar que el metabolismo C_4 al parecer ha evolucionado en múltiples ocasiones y se encuentra en un amplio rango de familias de plantas vasculares. Aproximadamente existen 8000 especies C_4 comprendidas en 20 familias de dicotiledóneas y 5 de monocotiledóneas.

El género *Cyperus* (perteneciente a la clase Liliopsida, monocotiledóneas) agrupa predominantemente especies con vía C_4 (> 70%), a pesar de esta dominancia, la ruta C_3 se presume ser ancestral en este género. Asimismo, dado que casi el total de las especies C_3 y la gran mayoría de las C_4 se encuentran en áreas inundables o muy húmedas, se concluye que el metabolismo C_4 evolucionó en un hábitat de estas características dentro del género *Cyperus* (Li *et al.*, 1999). Este mismo autor plantea que la vía C_4 junto con la alta eficiencia del uso del nitrógeno, son los principales factores asociados a la exitosa evolución y ecología de las especies de este género, por lo que no resulta sorprendente que algunas ciperáceas comúnmente sean consideradas malezas o malas hierbas de los cultivos puesto que se trata de plantas con una gran adaptabilidad a las condiciones adversas, tienen altas tasas de propagación (por tubérculos con una viabilidad de hasta tres años) y por tanto, compiten exitosamente con las especies de interés económico. Su control con herbicidas generalmente no es efectivo debido a que su principal estrategia de propagación es por tubérculos y su período de reproducción dura varios meses, por lo que la persistencia de los químicos aplicados al suelo resulta insuficiente para abatir la viabilidad de las últimas plantas de la temporada (Jansen, 1971). La defoliación tampoco es eficaz puesto que los tubérculos quedan intactos en el suelo. Se ha visto que una medida eficiente es el reducir temporalmente la luz disponible (ensombrecer) en los cultivos (Wills, 1975). Desde luego, esta estrategia es muy lógica puesto que se trata de plantas C_4 , el costo energético de este metabolismo en comparación con el C_3 , lo excluye de los hábitat sombreados (Li *et al.*, 1999).

Por otro lado, resulta muy razonable la idea de Grime (1982) en el sentido de que concluye que la mayoría de las *malas hierbas* que acompañan a los cultivos ya habían evolucionado en hábitat sometidos a formas "naturales" de perturbación, lo cual está apoyado en el hecho de que muchas de estas malezas son comunes en hábitat alterados, en pantanos y en la orilla del mar (es decir, en ámbitos con cambios frecuentes y severos). Esta situación, sin duda, está representada en el género *Cyperus* y por tanto, no resulta tan sorprendente el hecho de encontrar a *Cyperus elegans*, entre otras ciperáceas, en los suelos contaminados con hidrocarburos del pantano de Santa Alejandrina, lo mismo ocurre para algunas especies de gramíneas (figura 4).

Figura 4. Ciperáceas y gramíneas en el Pantano de Santa Alejandrina.



Foto cortesía Juan A. Zermeño

2.5 *Cyperus* en el Pantano de Santa Alejandrina y las Plantas Ruderales.

De acuerdo con Grime (1982), los factores externos que influyen y regulan la cantidad de materia vegetal viva y muerta presente en cualquier hábitat, prácticamente pueden clasificarse en dos categorías:

- *Las restricciones*, representadas por aquellos fenómenos que limitan la producción fotosintética, como la deficiencia de agua, luz, nutrientes minerales o bien la ausencia de temperatura óptima
- *Las perturbaciones*, ejemplificadas por las actividades o procesos que ocasionan la destrucción parcial o total de la biomasa vegetal, como los efectos de la herbivoría, la aparición de agentes patógenos, condiciones meteorológicas extremas (heladas, sequías, inundaciones, huracanes, incendios, etc.), el pisoteo, sesgado, arado y contaminación por parte del hombre, etc.

Cómo puede verse, los límites existentes entre estas dos categorías no son discretos ni excluyentes puesto que un mismo factor o condición puede producir restricciones y perturbación, lo cual está determinado por la severidad y/o frecuencia con que ocurra.

Ahora bien, en respuesta a estas contingencias o circunstancias las plantas han evolucionado, adoptando principalmente tres estrategias* lo cual implicó, desde luego, cierta especialización. Por un lado, existen las plantas con *alta capacidad competitiva*, adaptadas a explotar eficientemente condiciones de *pocas* restricciones y *baja* perturbación (maximizan la obtención de recursos). Otras plantas son *tolerantes a las restricciones*, es decir, son capaces de sobrevivir con éxito en ambientes con *muchas* limitaciones pero *reducida* perturbación (maximizan la conservación de los recursos). Finalmente otro tipo de plantas son las *ruderales*, cuyas adaptaciones están dirigidas hacia la sobrevivencia en situaciones donde imperan *escasos* factores limitantes aunque *alta* perturbación (maximizan su capacidad reproductiva, porque existe un alta mortalidad). Planteado lo anterior, no resulta difícil inferir que *Cyperus elegans* presenta características de una planta ruderal.

Si bien, las plantas pertenecientes a cada especialización presentan respuestas y características particulares, únicamente se comentarán aquí aquéllas comúnmente atribuidas a las ruderales, en el cuadro 4.

* Desde luego, estas tres estrategias representan los tres extremos de especialización evolutiva pudiendo existir entonces estrategias secundarias que evolucionaron en hábitat con intensidades intermedias de competencia, alteración y restricciones.

Cuadro 4: Algunas características de las plantas ruderales. *Cyperus elegans* comparte características de este tipo de plantas.

I Morfología:

- a) *Forma de vida:* herbácea.
 b) *Morfología del vástago:* pequeña estatura, expansión lateral limitada.
 c) *Forma de la hoja:* variada (a menudo mesomórfica).

II Ciclo de vida:

- a) *Longevidad de la fase establecida:* muy corta.
 b) *Longevidad de las hojas y raíces:* corta (figura 5.)
 c) *Fenología de la hoja:* corta fase de producción foliar en un periodo de alta productividad potencial.
 d) *Fenología de la floración:* las flores se producen tempranamente en el ciclo de vida (figura 6).
 e) *Frecuencia de la floración:* alta.
 f) *Proporción de la producción anual destinada a las semillas:* grande, a expensas de una considerable reducción del desarrollo vegetativo.
 g) *Condición de perenne:* semillas latentes.
 h) *Estrategias regenerativas:* banco persistente de semillas, numerosas semillas pequeñas o esporas, dispersadas por el viento. Una falla en la producción rápida de semillas reduce la posibilidad de rehabilitación después de alteración.

III Fisiología:

- a) *Máxima tasa potencial relativa de crecimiento:* rápido.
 b) *Respuesta a restricciones:* rápido acortamiento del crecimiento vegetativo, desvío de los recursos para utilizarlos en la floración.
 c) *Fotosíntesis y obtención de nutrientes minerales:* oportunista, coincide con el crecimiento vegetativo.
 d) *Adaptaciones en fotosíntesis, nutrición mineral y robustez de los tejidos ante los cambios estacionales en temperatura, luz y suministro de humedad:* desarrollo débil.
 e) *Almacenamiento de los nutrientes minerales para la fotosíntesis:* confinado a las semillas.

IV Otros:

- a) *Grado de sabor agradable para herbívoros no especializados:* variado, a menudo bajo.

Fuente: Grime, et al., (1982). Estrategias de adaptación de las plantas y procesos que controlan la vegetación, LIMUSA, México, pp. 19-77.

Resulta evidente entonces que, las características de las plantas ruderales están asociadas a un ciclo de vida corto y con alta producción de semillas como una estrategia adaptativa a los ambientes rigurosamente alterados pero potencialmente con cierta productividad, atributos que comparte *Cyperus elegans* y que le confieren una capacidad de respuesta rápida y plástica, sumamente ventajosa en circunstancias específicas asociadas a condiciones de perturbación.

2.6 Pantano de Santa Alejandrina. Descripción general del área.

El pantano de Santa Alejandrina representa un área de aproximadamente 76 kms² localizada en el municipio de Minatitlán, Veracruz, al sureste de la refinería Lázaro Cárdenas.

De acuerdo con la Síntesis Geográfica del Estado de Veracruz (1986) éste último se localiza en la porción oriental del país, entre los 17° 03' 56" y los 22° 27' 18" de latitud Norte y entre los 93° 36' 13" y 98° 36' 00" de longitud Oeste. Por el Norte limita con Tamaulipas, al Este con el Golfo de México, al Oeste con San Luis Potosí, Hidalgo y Puebla, al Sur y Suroeste con Oaxaca y al Sureste con Chiapas y Tabasco. La extensión que comprende es de 72,410. 05 Kms², área que lo sitúa en el décimo lugar con respecto a las demás entidades de la República Mexicana.

La división municipal del estado de Veracruz desde 1940 hasta nuestros días ha experimentado pocas variaciones ya que en más de cuatro décadas se han creado sólo seis municipios adicionales y ninguno ha desaparecido. El municipio 108 corresponde a Minatitlán, cuya superficie es de 3092. 64 Km². Los climas *cálidos húmedos* y los *subhúmedos* son los que comprenden una mayor área, aproximadamente un 80% del territorio veracruzano. La temperatura del mes más frío es superior de los 18 °C y la media anual es mayor de 22 °C.

De los climas cálidos húmedos se distinguen dos tipos: los *abundantemente lluviosos en verano* y los *lluviosos todo el año*. El municipio de Minatitlán está comprendido en la región del primer tipo.

Dentro de los tipos de vegetación que se desarrollan en el estado, en orden decreciente de abundancia se encuentran: selva alta perenifolia, baja caducifolia y mediana subperenifolia; bosque mesófilo, manglar, sabana, bosques de pino-encino, de encino-pino y de pino; tular, palmar, popal, vegetación de dunas costeras y matorral con izotes.

Figura 5. Pantano de Santa Alejandrina. Obsérvese la gran producción de materia seca, característica muy común entre las plantas ruderales, rasgo que parece facilitar la conclusión rápida del ciclo de vida y maximizar la producción de semillas (Grime, 1982).

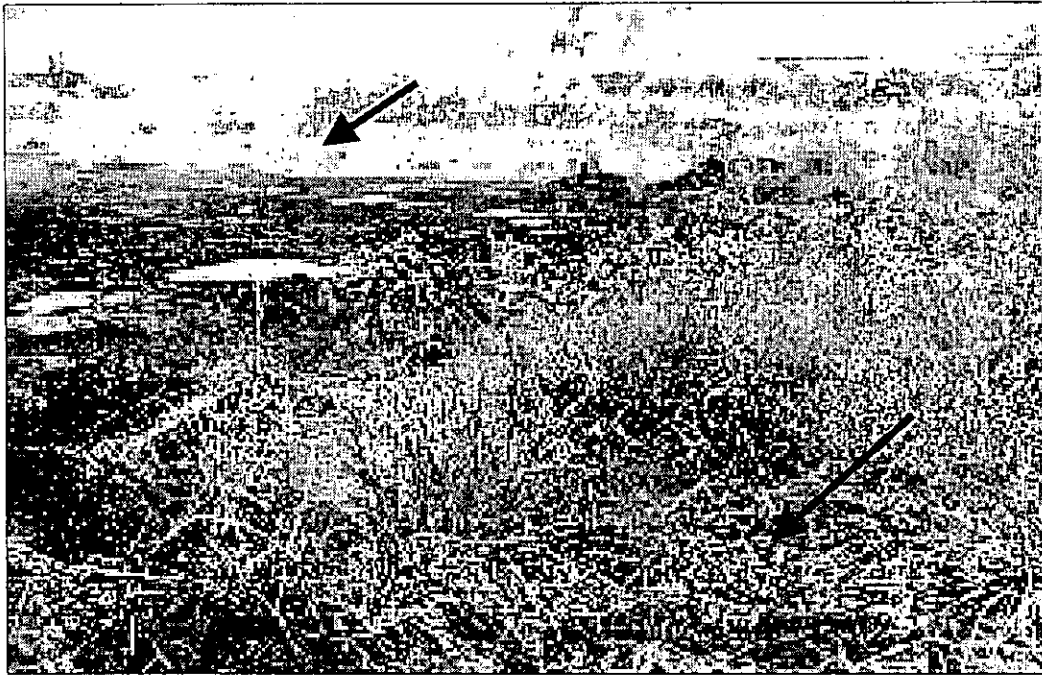
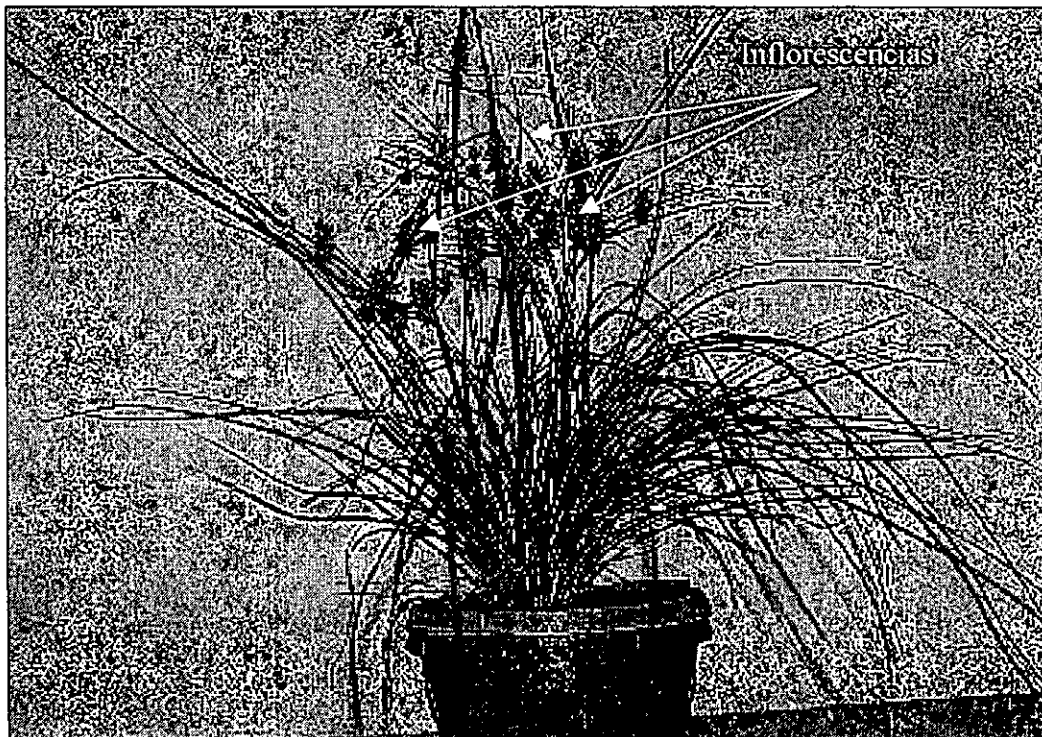


Foto cortesía Juan A. Zermeño

Figura 6. Ejemplar de *Cyperus elegans* (a partir de semilla) de aproximadamente 90 días de edad. Nótese la cantidad considerable de inflorescencias producidas. En las plantas ruderales la floración ocurre tempranamente.



Al sur de Minatitlán se encuentran comunidades secundarias principalmente arbóreas, en su mayoría forman un mosaico con pastizales cultivados y agricultura temporal o nómada. La precipitación pluvial varía entre los 1500 y los 4500 mm anuales y la temperatura anual entre 24 y 26 °C. La estación climatológica 51 ubicada en Minatitlán aporta los siguientes datos (véase también anexo 1):

Cuadro 5. Datos climáticos registrados en la Estación Climatológica 51, ubicada en Minatitlán, Veracruz. Dependencia: Servicio Meteorológico Nacional, clave DGGTENAL 30-066. Clave Estado: 30 (Veracruz).

TEMPERATURA °C			PRECIPITACION mm				
Media Mensual más alta	Media Mensual más baja	Media Anual	Máximo Anual	Año	Mínima Anual	Año	Media Anual
28.72	23.02	26.10	3854.70	1933	1524.5	1950	2409.43

Fuente: Carta Hidrológica de Aguas Superficiales. (1988). Hoja Villahermosa, escala 1: 1,000,000, INEGI, México.

El área de interés se ubica en el margen derecho del río Coatzacoalcos, con una elevación aproximada de 5 metros sobre el nivel medio del mar. Sus coordenadas geográficas son: 17° 59' 50" latitud Norte y 94° 30' 00" longitud Oeste (véase anexo 3). El período del año en el que se registran las mayores lluvias comprende los meses de julio a septiembre, la precipitación pluvial media anual es de 2000 a 2500 mm. El río Coatzacoalcos es la principal corriente que drena el área de estudio, moldea la planicie costera con infinidad de meandros, transporta los materiales de las lomas y crea llanuras de inundación y zonas pantanosas.

El pantano de Santa Alejandrina se encuentra afectado por la disposición de hidrocarburos y algunos derivados de éstos, en este sentido, Petróleos Mexicanos (PEMEX) ha realizado esfuerzos importantes para la mitigación y saneamiento del mismo. Los resultados analíticos obtenidos abarcan el 71% del total de pantano en donde el 85% de las muestras colectadas contienen menos del 35% de Hidrocarburos Totales del Petróleo (HTP). Se reporta que no existe un grado significativo de contaminación por metales en el área y por tanto la contaminación es sólo debido a la presencia de hidrocarburos.

El tipo de suelo de esta zona se clasificó como "migajón arcillo-limoso", por lo cual existe una tendencia a compactarse conforme aumenta el grado de contaminación, eso explica el predominio de los hidrocarburos en la superficie. Considerando la distribución de la concentración de hidrocarburos por profundidades, se observa que no existe infiltración significativa de éstos ya que aproximadamente el 90% de los mismos se encuentra dentro de los primeros 25 centímetros de profundidad.

3. Justificación

3. JUSTIFICACIÓN.

La utilización de plantas y microorganismos para degradar o disminuir la concentración de hidrocarburos en suelos contaminados se ha considerado como un procedimiento de menor riesgo para el ambiente y económicamente más competitivo, comparado con otros tratamientos.

Se han realizado estudios experimentales aunque no suficientes, cuyos objetivos fundamentales han versado en torno a los impactos que presentan los hidrocarburos en las plantas y el suelo, paralelamente también, a la búsqueda, determinación y comparación del potencial que poseen diferentes especies de plantas para degradar y/o metabolizar hidrocarburos, pudiéndose establecer de esta manera criterios de eficiencia que permitan en un momento dado seleccionar las especies que sean óptimas para la fitorremediación de suelos contaminados. Los ejemplares vegetales estudiados para ambos casos han sido de amplia gama de características: anuales, perennes, monocotiledóneas, dicotiledóneas, de sistema radicular primario o fibroso, estacionales, cultivadas o malezas.

El pantano de Santa Alejandrina, área de 76 Km² aproximadamente localizada al sureste de la refinería Lázaro Cárdenas en Minatitlán Veracruz, ha sido afectada por la disposición de hidrocarburos y algunos derivados. Petróleos Mexicanos (PEMEX) ha realizado esfuerzos importantes para la mitigación y saneamiento del mismo conjuntamente con la participación del Instituto Mexicano del Petróleo (I. M. P.) e Instituciones de Educación Superior como la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa (UAM-I).

Dentro del marco del proyecto del pantano de Santa Alejandrina se contempla la utilización de tecnologías combinadas entre las que destaca la Fitorremediación. Esta última se considera plausible de aplicar debido al hecho de que se han encontrado e identificado especies vegetales locales (entre ellas las ciperáceas y las gramíneas) resistentes a las condiciones actuales que imperan en el pantano y se ha evidenciado que tienen un efecto estimulante sobre las comunidades microbianas del suelo, principalmente aquéllas involucradas en la degradación de hidrocarburos y en los ciclos del carbono. En este sentido, el conocimiento y determinación de la fitotoxicidad potencial de los hidrocarburos resulta indispensable para obtener un panorama predictivo y un parámetro de referencia cuantitativo para orientar y aplicar eficientemente la fitorremediación del suelo, proceso cuyo éxito depende prioritariamente de que los contaminantes estén presentes en el sitio a niveles no fitotóxicos.

Por otro lado, la información generada a través de la realización de bioensayos de fitotoxicidad con hidrocarburos contribuye, dentro de un contexto ecotoxicológico, al establecimiento de ciertos criterios analíticos dirigidos y aplicados a vislumbrar los posibles impactos, peligros o riesgos potenciales al ambiente (biótico y abiótico) originados por la contaminación del suelo con estos compuestos orgánicos y, en esa medida también, puedan ser considerados en una legislación ambiental de vanguardia la cual permita prevenir que dichas sustancias alcancen niveles tóxicos o dañinos o bien, minimizar sus efectos.

3. Objetivos

3. Objetivos.

General.

- Evaluar el potencial fitotóxico que presenta el suelo contaminado con hidrocarburos del pantano de Santa Alejandrina, a través de bioensayos de germinación, elongación radicular, crecimiento y contenido de clorofila, en la especie *Cyperus elegans*, nativa de ese lugar.

Específicos.

- Realizar la caracterización básica de las propiedades físicas y químicas de las muestras de suelo del área de estudio, así como la cuantificación y el fraccionamiento de los hidrocarburos contenidos en las mismas.
- Comparar el grado de toxicidad que generan los hidrocarburos a diferentes concentraciones en los parámetros fisiológicos mencionados de *Cyperus elegans*.
- Determinar la curva dosis-respuesta correspondiente a cada parámetro, calculando la concentración que indujo un 50% de efecto (EC_{50}), así como el Valor Mínimo con Efecto y el Valor Máximo sin Efecto.
- Valorar la respuesta de *Cyperus elegans* a los hidrocarburos y su factibilidad de uso para la fitorremediación del pantano, asimismo indagar su posible potencial como bioindicador de contaminación por hidrocarburos.

5. Hipótesis

5. Hipótesis.

Si bien la susceptibilidad frente a las sustancias tóxicas varía con la fase del desarrollo en la que se encuentra un organismo, siendo máxima en la fase embrionaria, larval y senil, en las plantas se ha observado que la etapa germinativa no resulta ser considerablemente vulnerable o susceptible a las sustancias tóxicas:

- a) muchas sustancias químicas no logran atravesar la testa de la semilla.
- b) durante la germinación, el embrión reanuda su desarrollo y crecimiento por asimilación de reservas almacenadas internamente en la semilla, por tanto, se encuentra aislado, en cierto sentido*, del medio externo.

Con base en lo anterior puede suponerse que, por un lado, la naturaleza hidrófoba de la mayoría de los componentes del petróleo no lograrán atravesar la testa (hidrofílica) de la semilla y por tanto no afectarán al embrión ni a la germinación, por el otro, no podría descartarse la posibilidad de que las propiedades hidrofílicas y de permeabilidad de la testa pueden resultar afectadas y consecuentemente reflejarse en una hidratación incompleta de la semilla (lo cual no activaría la germinación), o bien, un intercambio de gases ineficiente (situación que impediría la respiración adecuada del embrión), efectos que estarían relacionados de manera directamente proporcional a la concentración de los hidrocarburos en el suelo.

Ahora bien, se sabe que el desarrollo y crecimiento del sistema radicular y aéreo (tallos y hojas) de una planta necesariamente es el resultado de procesos conjuntos de proliferación, elongación y diferenciación celular, además de estar regulados hormonalmente. Asimismo, las raíces, tallos y hojas de una planta representan órganos expuestos, más vulnerables por ende, a la influencia de las sustancias químicas externas. En este sentido, puede inferir entonces que el efecto de los hidrocarburos en estos dos parámetros (crecimiento y elongación radicular) estará relacionado proporcionalmente a su concentración en el suelo puesto que:

- A mayor concentración de ellos, por su naturaleza hidrófoba e impermeabilidad al oxígeno, pueden agudizarse condiciones de hipooxigenación en el suelo lo cual se reflejaría adversamente en el crecimiento generalizado de la planta (incluyendo a las raíces, desde luego)
- Las hormonas del crecimiento (como las auxinas) generan efectos

* En respuesta a la hidratación (Imbibición) de la semilla el embrión se activa, su metabolismo (reducido hasta este momento) se modifica y no continúa siendo anaerobio puesto que ya se detectan reacciones del ciclo de Krebs y cadena respiratoria. Por lo cual la testa debe ser característicamente permeable al agua y gases como el O_2 , CO_2 , etc. (Salisbury, 1994).

antagónicos dependiendo de su concentración: bajas concentraciones estimulan el crecimiento, altas concentraciones lo inhiben (Salisbury, 1994). Se ha observado que algunos de los componentes del petróleo o sus productos de degradación exhiben estructuras químicas y efectos similares a estas hormonas (Bossert, *et al.* 1985; Salanitro, 1997) por lo cual, a concentraciones mayores de HTP posiblemente se incrementará la probabilidad de que dichos compuestos ejerzan efectos análogos a estos fitorreguladores.

El contenido de clorofila, por su papel tan importante en la fotosíntesis, conceptualmente representa un parámetro de referencia sensible que puede evidenciar el estado fisiológico de la planta frente a una condición de estrés (Salvetat, 1998). Autores como Huang (1996) han reportado reducción en el contenido de clorofila como respuesta a la exposición por hidrocarburos, luego entonces al incrementar la cantidad de hidrocarburos presentes en el suelo se esperaría inducir un estado alterado que podría reflejarse en un contenido de clorofila menor en las plántulas de *Cyperus elegans*.

6. Material y Método

6. Material y Método.

El desarrollo de los objetivos planteados implicó una distribución de las actividades a realizar en tres partes o fases principales:

- Análisis básico de las propiedades físicas y químicas del suelo utilizado, así como la cuantificación y el fraccionamiento de los HTP contenidos en él
- Montaje y seguimiento de las series experimentales de exposición de las plantas *Cyperus elegans* a los hidrocarburos para evaluar su respuesta fisiológica con los parámetros mencionados
- Análisis estadístico de los resultados

Estas labores se llevaron a cabo de manera secuencial o paralela dependiendo de la codependencia que existiera entre ellas para efectuarse (véase diagrama de flujo, cuadro 6).

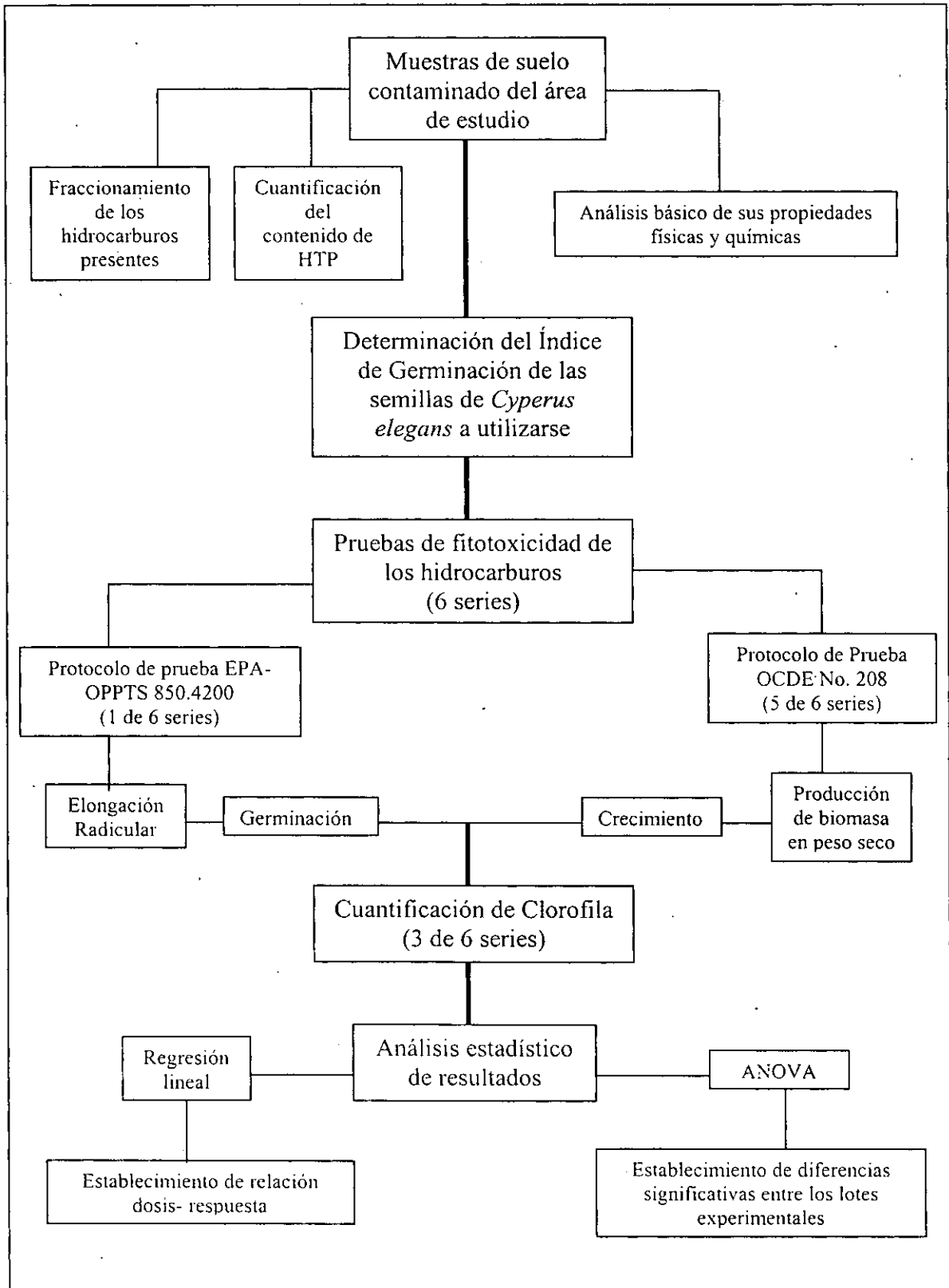
Como punto de partida se determinó el Índice de germinación (IG) de las semillas obtenidas de varios frutos de un ejemplar de *Cyperus elegans* colectado en el área de estudio, mismo que se utilizó como fuente única de semillas en el transcurso del trabajo. Se montaron (por triplicado) 6 series de prueba para comparar la fitotoxicidad de los hidrocarburos, incluyendo en cada una por lo menos cinco concentraciones diferentes adicionando un control y un testigo. Se evaluó el Índice de germinación, elongación radicular y crecimiento (este último expresado en altura de la parte aérea y biomasa en peso seco) correspondientes. El contenido de clorofila se determinó únicamente en las últimas tres series.

Las respuestas observadas y analizadas estadísticamente de la serie anterior se utilizaban como referencia y criterio para establecer las concentraciones de hidrocarburos para la siguiente serie. Los procedimientos, pautas y condiciones experimentales para realizar las pruebas mencionadas se basaron preferentemente en lo recomendado por el protocolo OCDE No. 208, propuesto por dicha agencia internacional, debido a que se consideró más adecuado y verídico en cuanto a las condiciones de exposición. Solamente se realizó una serie experimental bajo los estatutos del protocolo EPA - OPPTS 854.200.

La preparación y cálculos de las concentraciones de suelo contaminado para conformar las series experimentales implicó la extracción y cuantificación previa de los hidrocarburos totales del Petróleo (HTP) contenidos en las muestras de suelo problema y testigos.

El tratamiento estadístico de los datos de la respuesta de las plantas a los hidrocarburos comprendió el análisis de varianza (ANOVA) y regresión lineal, utilizando para ello el paquete estadístico SPSS® v. 7.5 y Microsoft® Office Excell respectivamente.

Cuadro 6. Diagrama de flujo del método propuesto y seguido para desarrollar los objetivos planteados. Véase mas información en texto.



A continuación se describirán los procedimientos técnicos y analíticos utilizados para desarrollar los objetivos que se plantearon.

6.1 Extracción de los Hidrocarburos Totales del Petróleo (HTP).

El suelo utilizado durante los experimentos se colectó directamente del pantano de Santa Alejandrina. El personal del Instituto Mexicano del Petróleo (I. M. P.) tomó muestras del horizonte superficial del suelo (25 cm. de profundidad aprox.) en áreas visiblemente contaminadas y en superficies sin contaminar. Los suelos se mantuvieron en un cuarto frío y oscuro a 4°C para reducir la actividad biológica. Se realizó la extracción (por triplicado) de los Hidrocarburos Totales del Petróleo (HTP)* en ambas muestras con la finalidad de conocer su concentración correspondiente, para lo cual se empleó la técnica de Extracción Soxhlet† para los suelos contaminados y la técnica de Agitación* para los suelos "limpios". Sin embargo esto no significa que ambas metodologías sean específicas para cada caso, pueden utilizarse indistintamente, obteniendo eficiencias de extracción similares aunque en tiempo y costo diferentes. Para una interesante discusión y análisis comparativo con respecto a la eficiencia, ventajas y desventajas de ambas técnicas véase el trabajo de Schwab, y colaboradores (1999).

6.1.1 Extracción por Soxhlet.

La extracción por soxhlet de los hidrocarburos se describe continuación:

El suelo contaminado previamente almacenado en oscuridad y a 4°C aproximadamente, se tamizó con una malla No. 10 (tamaño de apertura 2 mm.). Una muestra del suelo tamizado (≥ 5 g) se colocó en el interior del *dedal de extracción* correspondiente, añadiendo 500 mg aproximadamente de sulfato de sodio anhidro (NaSO_4 , Baker Analyzed®) e insertando una porción suficiente de fibra de vidrio a manera de tapón (figura 7). El dedal preparado de esta manera se colocó en el interior del extractor soxhlet, este último acoplándose en su extremo superior al condensador Allihn conectado a un recirculador refrigerante. En su extremo inferior se posicionó un matraz bola de 250 ml conteniendo 100 ml de tetracloruro de carbono (C-Cl_4 , Merck®). Una vez ensamblado todo el sistema (figura 7) se encendió la parrilla eléctrica y el recirculador y se ajustó el nivel de potencia a 7 (de 10). La temperatura suministrada permitía un ciclo de reflujo del

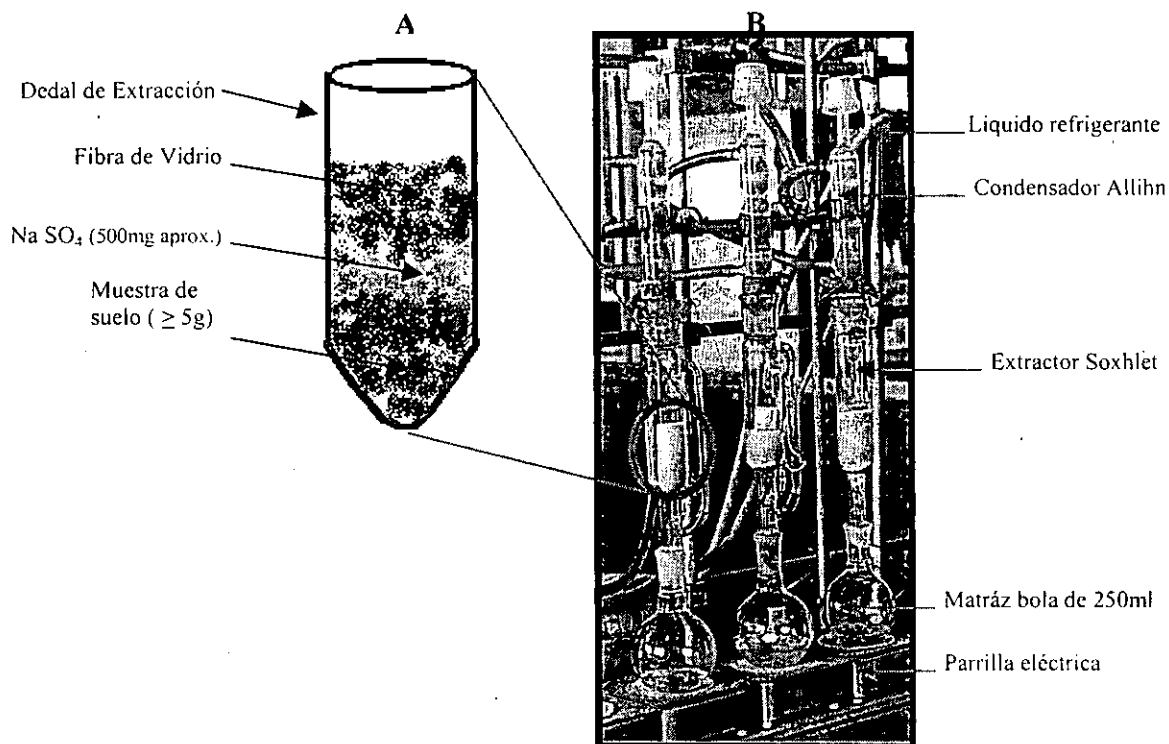
* Los HTPs se refieren a la cantidad conjunta de hidrocarburos saturados, insaturados, mono y poliaromáticos que contiene una muestra determinada. Representa una medida típica y estándar de cuantificación de hidrocarburos (Heath, et al., 1993; Chen, 1997).

† La extracción soxhlet es un protocolo aceptado para la remoción de compuestos orgánicos no volátiles y semi volátiles a partir de matrices sólidas (suelo, sedimento, residuos granulares etc.), el cual fue esbozado por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (US EPA), método 3540 A (Schwab, et al, 1999), véase también el método estándar D 5369-93 de la ASTM.

* La técnica de agitación es un procedimiento muy empleado también para la extracción hidrocarburos, sin embargo no existe un protocolo estandarizado específico. Por lo cual, es común observar en los trabajos publicados que cada autor reporta y sugiere sus condiciones, por ejemplo el tiempo e intensidad de la agitación. El IMP desarrolló un método estandarizado de uso interno a este respecto (método IMP-QA-620).

solvente ($C-Cl_4$) de aproximadamente diez veces por hora (1 ciclo por cada 6 minutos), que es lo recomendado. El tiempo de extracción consistió de 18 horas. Una vez finalizado el período de extracción, se permitió el enfriamiento del extracto (conteniendo los HTP) y se colocó en un matríz aforado de 100 ml, añadiendo $C-Cl_4$ limpio (aforando) cuando fuera necesario.

Figura 7 . Representación esquemática de la preparación de la muestra en el *dedal de extracción* (A). Sistema de Extracción Soxhlet montado completamente (B).



6.1.2 Extracción por Agitación.

La extracción por agitación de los hidrocarburos, se realizó según el método IMP-QA-620 y se describe a continuación:

Del suelo limpio tamizado (malla 10) y conservado en oscuridad a una temperatura aproximada de 4°C, se tomó una muestra de 70 g (Balanza Mettler® PE- 400) y se puso a secar en una mufla a 110 °C por 3 horas. Transcurrido este tiempo se pesaron 10 g de suelo en un matríz Erlen Meyer de 250 ml y se agregó 1 g de sulfato de sodio anhidro (Baker Analyzed®), 1 g de Silica gel (Baker Analyzed®) y 50 ml de tetracloruro de carbono (Merck®). Posteriormente se colocó en un agitador mecánico (Junior Orbit Shaker, Lab-line Instruments, Melrose Park, Illinois) a 1400 rpm, por 30 minutos. A continuación se separó la fase orgánica y se transfirió a través de papel filtro (Whatman® No. 1) a un matríz volumétrico de 100 ml. Se lavó el papel filtro con $C-Cl_4$ hasta el aforo del matríz.

6.2 Cuantificación de los HTP por espectrofotometría infrarroja.

El análisis cuantitativo de los HTP de los extractos obtenidos a partir de los suelos del pantano se realizaron por espectrofotometría infrarroja*, utilizando para ello un espectrofotómetro Buck Scientific, Inc. modelo 500 (anexo 2b) y realizando las diluciones necesarias de los extractos para obtener absorbancias entre 0.2 y 0.8 en la zona de 2930 cm^{-1} (Número de onda comúnmente empleado para cuantificar HTP, Schwab, 1999). Una vez tomadas las lecturas dadas por el equipo se interpolaban y ubicaban dentro de la curva estándar correspondiente (anexo 2a) y se calcularon las concentraciones en partes por millón (ppm) de los HTP con base en la siguiente fórmula:

$$\text{Hidrocarburos Totales (en ppm)} = \frac{C \cdot Ve \cdot F}{Gs} \quad (1)$$

donde:

C = concentración en ppm dada por el FT-IR.

Ve = volumen del extracto de tetracloruro de carbono.

F = factor de dilución.

Gs = gramos de sedimento utilizado en la extracción.

6.3 Técnicas para la Caracterización de Suelos.

Las técnicas utilizadas para la caracterización física y química de las muestras de suelo del pantano de Santa Alejandrina se describen a continuación:

6.3.1 Análisis de textura.

La textura de los suelos se determinó según la metodología desarrollada por Bouyoucos (1962). Este método es empleado comúnmente para la determinación de texturas, principalmente está fundamentado en el cálculo de la velocidad de sedimentación de las partículas de suelo basándose en el principio de la ley de Stokes la cual establece que "la densidad de una solución acuosa en reposo varía directamente con la cantidad de partículas en suspensión que se van asentando de acuerdo a su diámetro y al tiempo transcurrido".

* la cual se basa en el análisis y distinción de los modos vibracionales y rotacionales de torsión y flexión de los átomos en una molécula, permitiendo identificar y cuantificar de una manera bastante rápida el contenido de una muestra. Desde luego, el espectro de absorción de la sustancia de interés debe ubicarse dentro de la región del infrarrojo no así el espectro del solvente en el que está contenida, el solvente debe ser *transparente* en esta región. Una sustancia se considera transparente si la transmitancia es del 75% o mayor (Willard, *et al.* 1998). Este método es muy utilizado en la Industria del Petróleo para análisis y cuantificación de hidrocarburos y metales (Navarrete, *etal.* 1996).

Los reactivos utilizados fueron los siguientes:

- 100 ml de una solución de Metasilicato de Sodio anhidro ($\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) al 5%
- Solución de Oxalato de Sodio $(\text{COONa})_2$ anhidro, 100 ml.
- Solución de Peróxido de Hidrogeno (H_2O_2), 100 ml. La cual se conservó en refrigeración previo a su utilización

Una vez preparados los reactivos se procedió a tratar 100 g de suelo de cada muestra* con 30 ml de la solución de H_2O_2 permitiéndose secar durante 24 horas en una mufla a 80°C . A continuación se pesaron 50 g de suelo y se colocaron en un vaso para agitador mecánico, agregando 5 ml de la solución de $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ y 5 ml de $(\text{COONa})_2$. Una vez realizado esto se aforó con agua corriente hasta la segunda ranura del vaso y se agitó la muestra preparada durante 10 minutos en el agitador mecánico (batidora Oster®). Posteriormente la muestra se transfirió a una probeta de 1000 ml aforándose con agua. Se agitó manualmente por un minuto en la probeta, se reposó 40 segundos y se tomó la primera lectura con el hidrómetro así como la temperatura. La segunda lectura con el hidrómetro y el termómetro se realizó transcurridas 2 horas de reposo de la solución.

Con los datos obtenidos se calculó el porcentaje de limos y arcillas correspondiente, empleando para ello las fórmulas siguientes:

$$\% \text{ de limos} + \% \text{ arcillas} = \frac{\text{primera lectura dada por el hidrómetro}}{\text{g de suelo}} \times 100 \dots (2)$$

$$\% \text{ de arenas} = 100 - (\% \text{ de limos} + \% \text{ de arcillas}) \dots (3)$$

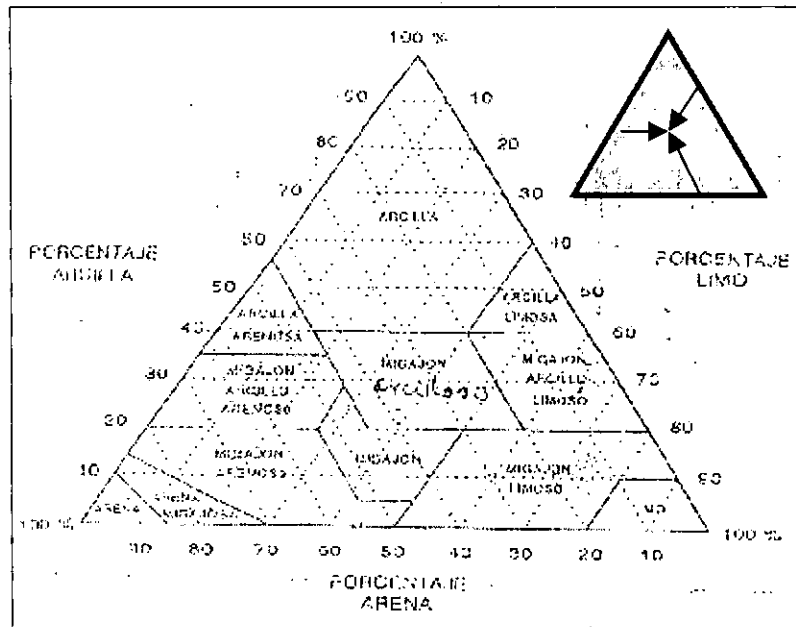
$$\% \text{ de arcillas} = \frac{\text{segunda lectura dada por el hidrómetro}}{\text{g de suelo}} \times 100 \dots (4)$$

$$\% \text{ de limos} = (\% \text{ de limos} + \% \text{ de arcillas}) - \% \text{ de arcillas} \dots (5)$$

Agregando 0.2 a las lecturas de densidad por cada grado centígrado después de 20. Con los porcentajes obtenidos se determinó la clase textural que le corresponde al suelo de acuerdo al triángulo de texturas (figura 8).

* Suelo previamente seco y cernido con un tamiz de malla 10.

Figura 8. Triangulo de texturas que contempla la clasificación de los suelos en 12 clases diferentes.



6.3.2 Análisis pH.

El método potenciométrico o electrométrico para medir el pH de suelo es el más utilizado en los laboratorios, fue desarrollado por Bates, 1954 y Willard, Merrill, Ran, 1958 (Chapman, *et al* 1979).

La determinación de pH de los suelos se realizó por triplicado, colocando 10 g de suelo en un vaso de precipitados de 150 ml, al cual se agregó 25 ml de agua destilada y posteriormente se agitó manualmente por 30 segundos. A continuación se reposó el contenido por 30 minutos y se introdujo directamente en la solución el electrodo del potenciómetro (previamente calibrado) anotándose la lectura correspondiente.

6.3.3 Análisis de Materia Orgánica.

Para la determinación de la materia orgánica se tomó como referencia el método de Walkley-Back. Se prepararon los siguientes reactivos:

- Dicromato de Potasio 1.0 N
- Ácido Sulfúrico concentrado
- Ácido Fosfórico
- Sulfato Ferroso 0.5 N
- Bariosulfato de difenil amina

Una vez preparados los reactivos se procedió a colocar 0.5 g de suelo seco y tamizado con malla 10 en un matríz erlenmeyer de 250 ml al cual se le agregó 5

ml de dicromato de potasio 1 N y 10 ml de ácido sulfúrico concentrado, este último resbalándolo cuidadosamente por las paredes. A continuación se agitó por un minuto y se reposó por 30 minutos. Transcurrido este tiempo se adicionó al matríz 100 ml de agua destilada, 5 ml de ácido fosfórico y cinco gotas de indicador de bariosulfato de difenil amina. La muestra preparada se tituló con sulfato ferroso 0.5 N. Al titular se observó un cambio de color azul turbio, a partir de ese momento se esperó el viraje con una gota a un tono verde brillante o *botella*, que indica el punto final. Con la finalidad de calcular el *factor de corrección* en el análisis, se procedió a realizar un *blanco* consistente en desarrollar los mismos procedimientos anteriores en un matríz *sin* muestra de suelo. El porcentaje de materia orgánica se calculó según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ M. O.} = \frac{5 - (ml \text{ de } FeSO_4 \times N \times Fc)}{g \text{ de muestra}} \times 69 \quad (6)$$

Donde:

5 = ml de dicromato de potasio agregado.

N = normalidad del sulfato ferroso.

Fc = factor de corrección.

69 = constante de Jackson.

$$Fc = \frac{10}{ml \text{ de } FeSO_4 \text{ gastado en el blanco}} \quad (7)$$

El análisis de materia orgánica de cada muestra se realizó por triplicado.

6.3.4 Análisis de Porosidad, Densidad Real y Aparente.

Para el análisis de la densidad real de las muestras de suelo se procedió primeramente a registrar el peso de un matríz aforado de 25 ml (vacío), al cual se agregaron 5g de suelo (seco y tamizado, malla 10) y 8ml de agua aproximadamente con una piceta, esto último con la finalidad de evitar mojar externamente el matríz. A continuación se realizó un movimiento de rotación suave para desalojar el aire contenido y se permitió reposar durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo se aforó el matríz con agua y se registró su peso correspondiente (balanza Mettler® PE-400). El matríz utilizado se enjuagó y secó, empleándose nuevamente ahora para obtener su peso aforado con agua destilada. Con los datos obtenidos se calculó la densidad real según la fórmula:

$$\text{Densidad real (g/cm}^3\text{)} = \frac{S}{(S+A) - (M)} \quad (8)$$

Donde:

S = peso de suelo (5 g), M = peso de la mezcla de suelo + agua hasta el afore.

A = peso del agua sin matríz.

La densidad aparente se determinó registrando primero el peso de una probeta de 10 ml vacía, a la cual se le agregó un volumen de 10 ml de suelo (seco y tamizado, malla 10). La probeta con el suelo se golpeó ligeramente contra un lienzo sobre la mesa de trabajo por 5 veces, con la misma intensidad. El volumen del suelo se ajustó nuevamente a 10 ml y se tomó el peso de la probeta con el suelo. Con los datos obtenidos se calculó la densidad aparente según la fórmula:

$$\text{Densidad aparente (g/cm}^3\text{)} = \frac{\text{peso neto del suelo}}{\text{volumen}} \dots\dots\dots (9)$$

Una vez obtenidos los valores de la densidad aparente y real de cada muestra se calculó la porosidad, a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{Porosidad} = [1 - (\text{densidad aparente} / \text{densidad real})] \dots\dots\dots (10)$$

6.4 Fraccionamiento de los Hidrocarburos Contenidos en las Muestras del Suelo Contaminado.

El procedimiento para el fraccionamiento de los hidrocarburos se basó principalmente en lo sugerido y recomendado en los trabajos de Later, *et al.* (1981) y Wang, *et al.* (1994). La proporción y análisis de cada fracción de hidrocarburos obtenida se calculó gravimétricamente con respecto a los HTP. La cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas resulta una herramienta excelente para el análisis cualitativo y cuantitativo de las fracciones. El análisis gravimétrico es una alternativa menos precisa aunque no por ello menos confiable, suficiente en este caso, para los fines que se pretenden.

Los procedimientos realizados se efectuaron por triplicado y se describen a continuación:

Nota: Debido a que los cálculos de las proporciones de cada fracción se determinaron gravimétricamente, todos los matraces bola y frascos utilizados para contener los extractos y las fracciones de hidrocarburos fueron lavados, secados y mantenidos a peso constante, esto último implicó rectificar su peso inicial varias veces antes de ser empleados, mantenerlos en un desecador y utilizar guantes o pinzas para su manejo.

1. A las muestras de suelo contaminado (secas y tamizadas con malla 10) se les extrajo los hidrocarburos por soxhlet. El tetracloruro de carbono del extracto se evaporó con un rotavapor (Büchi® R-124, Switzerland) a 60 rpm y 60 °C.
2. Una vez realizado esto, el matrás bola de 250 ml (conteniendo el extracto seco) se pesó y se restó su peso original inicial vacío ($P_2 - P_1$). La diferencia entre los pesos representa los HTP.
3. El matrás conteniendo los HTP se lavó y filtró (papel filtro Whatman® No. 42) su contenido con 20 ml de pentano, transfiriéndose a un frasco pequeño y permitiéndolo evaporar a temperatura ambiente por lo menos 48 horas hasta alcanzar su peso constante definitivo. Posteriormente se restó

el peso original del frasco vacío ($P_2 - P_1$). La diferencia entre los pesos representa la *fracción de asfaltenos**.

4. Al frasco conteniendo los asfaltenos se le agregó 0.2 g de Sílica Gel tratada y activada previamente[†] mas 1ml de hexano. La pasta formada se agregó a una columna cromatografía preparada con antelación* eluyendo con 11 ml de hexano. El eluato se colectó en otro frasco, permitiéndose evaporar (48 horas a temperatura ambiente). Se determinó el peso constante del frasco y se sustrajo su peso neto (vacío). La diferencia entre los pesos (o peso residual) representa la fracción de *hidrocarburos alifáticos*.
5. Una vez que el eluato anterior fue colectado, se agregó a la columna 12 ml de una solución 1:1 de hexano-benceno. El eluato se recuperó en otro frasco, evaporándose por 48 horas y realizando el mismo procedimiento señalado para los hidrocarburos alifáticos. La diferencia entre los pesos representa una primera fracción de *hidrocarburos aromáticos*.
6. A continuación se agregaron 12 ml de benceno. La diferencia entre los pesos ($P_2 - P_1$) representa la *segunda fracción* de *hidrocarburos aromáticos*.
7. Colectado el eluato anterior se adicionaron a la columna 12 ml de una solución 1:1 de acetona-metanol para eluir y coleccionar la *primera fracción* de *hidrocarburos polares*.
8. Por último se eluyó con 12 ml de tetrahidrofurano la *segunda fracción* de *hidrocarburos polares*.

Asumiendo que el peso de los HTP representa la suma de los pesos de cada fracción, se procedió a calcular la parte proporcional (en porcentaje) que aporta cada una de las diferentes fracciones en el contenido neto de los HTP de las muestras.

6.5 Protocolos de Prueba Utilizados para la Evaluación de la Germinación, Elongación Radicular y Crecimiento. Comentarios y Modificaciones para este Estudio.

Los procedimientos técnicos y analíticos para evaluar la germinación, elongación radicular y crecimiento se sustentaron principalmente de acuerdo a lo especificado en los siguientes protocolos:

* Asfaltenos, representados por la fracción policíclica de alto peso molecular de los crudos en las que se incluyen átomos de N, S y O. Por lo general constituyen entre el 10 y el 30% de los TPH. (Ramírez, 1998).

† La Sílica Gel (malla 170-200, poro de 150 Amstrongs) se lavó en una columna de 90 x 4 cm con acetona, hexano y diclorometano (250ml de cada reactivo). Posteriormente se realizó el secado de la misma a 40-50°C por 10 horas en una estufa con salida para vapores. Una vez seca, se activó a 180 °C durante 20 horas en un recipiente extendido con una cubierta holgada de papel aluminio.

* Columna cromatográfica con llave de teflón y con fibra de vidrio en el fondo se enjuagó con metanol, hexano y diclorometano, permitiéndose secar. Se agregó 15 ml de hexano para posteriormente incorporar lentamente 3g de Sílica Gel activada y 500 mg aproximadamente de Sulfato de Sodio Anhidro (Na_2SO_4) evitando en todo momento la formación de burbujas. A continuación se drenó la columna hasta milímetros antes de el área superior ocupada por el Na_2SO_4 esto último con la finalidad de mantener húmeda la columna.

- **Prueba toxicológica de germinación y elongación radicular OPPTS 850.4200 (1996)**, la cual forma parte de la *serie de guías para la prueba de efectos ecológicos*, emitidos por la Oficina de Prevención, Plaguicidas y Sustancias Tóxicas (OPPTS) de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de América (US EPA), para evaluar plaguicidas y sustancias tóxicas
- **Prueba de crecimiento en plantas terrestres No. 208 (1984)**, parte integrante de las *guías para la prueba de sustancias tóxicas* publicadas por la Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico (OCDE)

Como puede suponerse, la aplicación, objetivos, alcances y relevancia de cada prueba es diferente. A continuación se presenta un cuadro comparativo general de ambas.

Cuadro 7. Comparación de algunos aspectos característicos de las pruebas utilizadas para evaluar la fitotoxicidad de los hidrocarburos presentes en los suelos del pantano de Santa Alejandrina.

Atributos comparados	Protocolo de prueba OPPTS-US EPA (1996).	Protocolo de prueba OCDE No. 208 (1984).
Objetivos	<i>Evaluación de la Toxicidad aguda producida por la sustancia química de prueba en la germinación y elongación radicular.</i>	<i>Evaluación de la Toxicidad aguda producida por la sustancia química de prueba en la germinación y crecimiento (expresado en producción de biomasa en peso fresco o seco).</i>
Pretratamiento de las semillas.	<i>Esterilización superficial de las semillas, si resulta necesario.</i>	Ninguno
Humedad.	<i>No específica.</i>	<i>Las adecuadas para mantener el crecimiento normal de las plantas experimentales durante el periodo de prueba.</i>
Temperatura.	<i>25-1 °C</i>	
Luz.	<i>En oscuridad completa.</i>	
Recipiente de prueba.	<i>Cajas Petri de vidrio, preferentemente de 200mm de diámetro</i>	<i>Recipientes de vidrio o plástico no poroso.</i>
Sustrato.	<i>Cualquier material inerte exceptuando perlita y vermiculita. Suelo natural nativo no puede utilizarse como sustrato.</i>	<i>El suelo nativo tamizado (0.5 cm), no necesariamente estéril.</i>
Número de semillas por recipiente.	<i>Mínimo 5.</i>	<i>Mínimo 15.</i>
Réplicas.	<i>Por lo menos 3.</i>	<i>Por lo menos 4.</i>
Duración de la prueba.	<i>Hasta observar el 65% de germinación y una elongación radicular de por lo menos 20mm en las semillas control.</i>	<i>Por lo menos 14 días después de observar el 50% de germinación en las semillas control.</i>
Uso de acarreadores o surfactantes adicionales para dispersar u homogenizar la sustancia prueba en el sustrato.	<i>Permitido para sustancias insolubles en agua. El surfactante debe contribuir poco a la toxicidad del sistema y es necesario incluir un lote control para valorar sus efectos.</i>	<i>No permitido.</i>
Datos reportados esperados.	<i>Valores de la CL₅₀, CE₅₀, presentación gráfica de la relación dosis-respuesta.</i>	<i>Valores de la CL₅₀, CE₅₀, presentación gráfica de la relación dosis-respuesta.</i>

En total se realizaron (por triplicado) 6 series de prueba para comparar la fitotoxicidad de los hidrocarburos, incluyendo en cada una por lo menos 5 concentraciones diferentes adicionando lotes control y testigos. En el cuadro 8 se presentan las concentraciones de HTP (en ppm) manejadas.

Cuadro 8. Concentraciones (ppm) correspondientes a las series experimentales realizadas.

<i>Serie I a</i>	<i>Serie I b</i>	<i>Serie 2</i>	<i>Serie 3</i>	<i>Serie 4</i>	<i>Serie 5</i>
<i>US EPA- OPPTS</i>	<i>OCDE No.208</i>	<i>OCDE No.208</i>	<i>OCDE No.208</i>	<i>OCDE No.208</i>	<i>OCDE No.208</i>
100		25	300	75	250
500		50	600	150	900
1000		75	1200	300	1500
10,000		100	2400	600	2250
97,376		150	5000	1200	3000
Control		S. Pantano	S. Pantano	S. Pantano	4000
Testigo		S. Tlalpizahuac	-----	S. Tlalpizahuac	S. Pantano

Primeramente se llevaron a cabo dos series experimentales (series I a y I b) consistentes en tratar las mismas concentraciones aunque no así las condiciones. Una de ellas se efectuó según los lineamientos que establece la prueba OCDE No. 208 (I a) y otra bajo los criterios de la prueba US EPA - OPPTS 850. 4200 (I b). Las condiciones experimentales de estas series realizadas se indican en el cuadro 9.

Cuadro 9.

	<i>OCDE No. 208</i>	<i>US EPA - OPPTS 850. 4200</i>
<i>Recipiente</i>	<i>Cajas Petri de cristal</i>	
<i>Semillas por lote</i>	25 ¹	
<i>Réplicas</i>	3	
<i>Fotoperiodo*</i>	12 horas	
<i>Temperatura*</i>	35°C diurna - 25°C nocturna	
<i>Humedad relativa*</i>	65% ~ 5%	
<i>Sustrato</i>	<i>Suelo tamizado (malla 10), 15 g por caja.²</i>	<i>Papel filtro impregnado con hidrocarburos³</i>
<i>Duración de la prueba</i>	25 Días	
<i>Pretratamiento de las semillas</i>	Ninguno	

¹ Se eligieron semillas de tamaño y apariencia similar, aquellas dañadas fueron descartadas.

² Los suelos utilizados para preparar las concentraciones de prueba fueron: 1) *suelo testigo* del pantano conteniendo 336.1 ppm de HTP, 2) *Suelo contaminado* del pantano con 97, 376 ppm de HTP. Desde luego, concentraciones menores a 336.1 ppm no podían ser preparadas con dichos suelos por lo cual resultó necesario utilizar una muestra de suelo adicional conteniendo 18.1 ppm de HTP, proveniente de Tlalpizahuac, Estado de México.

³ Se utilizaron dos capas de papel filtro Watman[®] No. 1 impregnado (evaporación del solvente) con 10 ml de la solución de las concentraciones manejadas. El solvente utilizado fue C-Cl₄ (Merck[®]) por lo cual, se incluyó un lote testigo conteniendo papel filtro con C-Cl₄ evaporado. Para elaborar las diferentes concentraciones de las soluciones se utilizaron micro pipetas Pipetman-Gilson[®] de 2, 200 y 1000 microlitros.

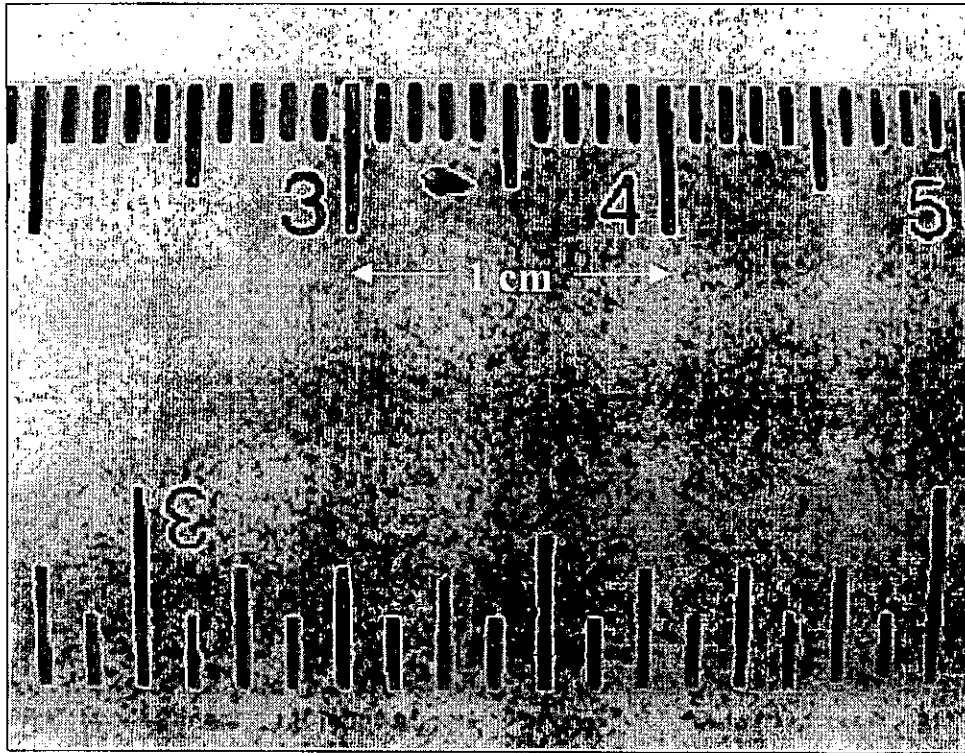
* Para mantener estas condiciones se utilizó una incubadora Hot pack (Phila., Pa. U. S. A). Se pusieron a germinar semillas certificadas de chícharo (*Pisum sativum*) obteniéndose un índice de germinación (IG) del 92% con estos parámetros. Las semillas silvestres de *Cyperus elegans* tuvieron un IG = 74%.

Como puede observarse contrastando con el cuadro 7, se hicieron mayores modificaciones en la prueba US EPA 850. 4200, las cuales principalmente radican en el fotoperiodo y la duración de la prueba. Este protocolo recomienda condiciones de oscuridad total, sin embargo existen semillas *fotoblásticas* o *fotolatentes*, es decir, que requieren luz para germinar (fotoactivación). Salisbury y Ross (1994) señalan que las semillas de este tipo por lo general son bastante pequeñas (como la semilla de lechuga, *Lactuca sativa*) debido a que no cuentan con abundante material de reserva y es muy común en muchas plantas perennes y herbáceas anuales no domesticadas (silvestres). Con respecto a las semillas de *Cyperus elegans*, se sospechó su naturaleza fotolatente puesto que comparte las características antes señaladas (figura 9), incluso se encontraron trabajos como los de Baskin (1976, 1978) y Chozin (1988) en los que se reporta este hecho en semillas producidas por *C. inflexus*, *C. iria* y *C. microiria*, especies del mismo género. No obstante, se observó germinación de semillas de *C. elegans* en oscuridad*, aunque no por ello se manejó esta condición puesto que se pretendía evaluar también el crecimiento, proceso que requiere la presencia de luz necesariamente.

La duración de las pruebas se estandarizó a 25 días debido que se observó el 50% de la germinación (como lo señala el protocolo OCDE No. 208) hasta el décimo día aproximadamente. Aunque la prueba EPA - OPPTS 850. 4200 no contempla el evaluar crecimiento (de ahí su menor duración) ambas series tuvieron el mismo intervalo de tiempo señalado con la finalidad de comparar los resultados y valorar la conveniencia de una u otra, lo cual permitiría posteriormente la elección de alguna de ellas para las series de prueba posteriores.

* Se ha observado en algunos casos que una alternancia en la temperatura puede sustituir a la luz como activador de la germinación en ciertas semillas foto latentes. Ejemplo del anterior lo demuestran la germinación de las semillas del pasto (*Poa pratensis*) en oscuridad con una fluctuación de temperatura de 15-25 °C (Salisbury *et al.*, 1994). Véase en el cuadro 9 correspondiente a las condiciones experimentales, que la fluctuación de la temperatura diurna-nocturna en la incubadora fue también de 10 °C.

Figura 9 . Semilla de *Cyperus elegans*. Obsérvese su tamaño reducido, característica común de las semillas fotolábiles debido a su escaso contenido de material de reserva (Salisbury, *et al.*, 1994).



El seguimiento de la germinación de cada lote experimental, control y testigo se realizó diariamente, registrando en la bitácora el número de semillas observadas con una radícula de longitud mayor o igual a 1 milímetro aproximadamente. La elongación radicular y el crecimiento de la parte aérea de las plántulas se cuantificó al término del período estipulado, utilizando para ello una regla de aluminio de 10 centímetros sobre la cual se colocaba a los ejemplares de manera individual y cuidadosamente humedecidos y extendidos. En esta posición, la semilla representaba el punto de partida (0 mm) para medir en ambas direcciones tanto la parte aérea foliar como la radícula (figura 10).

También se evaluó el crecimiento expresado en *biomasa en peso seco*, para lo cual se colocaron las plántulas (después de ser medidas como se mencionó) en sobres de papel absorbente identificados y cerrados ajustadamente con cinta adhesiva (Masking Tape), por ocho días (figura 11). Una vez transcurrido este tiempo, se registraba el peso de las plántulas deshidratadas con una balanza analítica Explorer OHAUS®. Los sobres contenían las plántulas correspondientes a cada réplica de cada lote.

Figura 10. Procedimiento para medir el crecimiento (altura) y elongación radicular de las plántulas expuestas a los hidrocarburos al término del periodo de prueba (25 días).

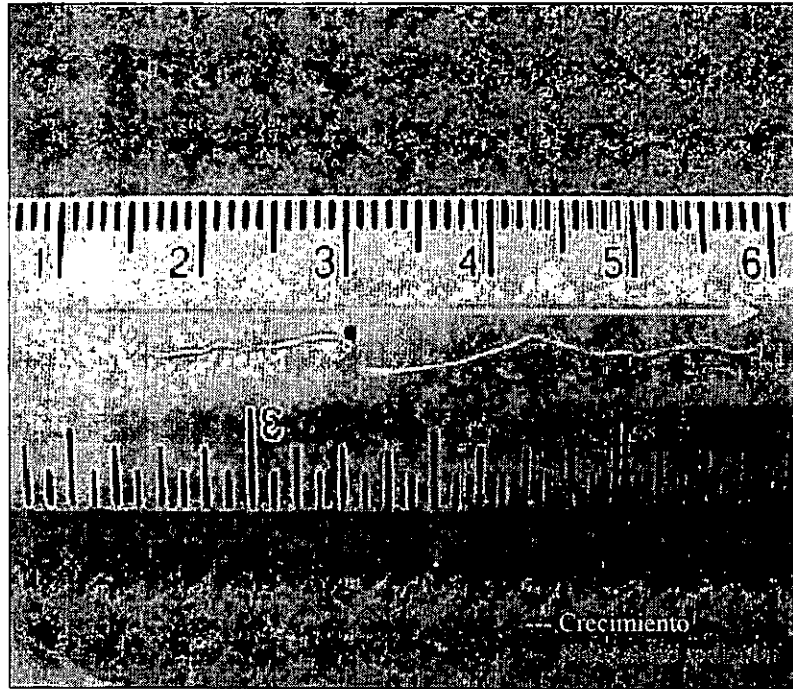
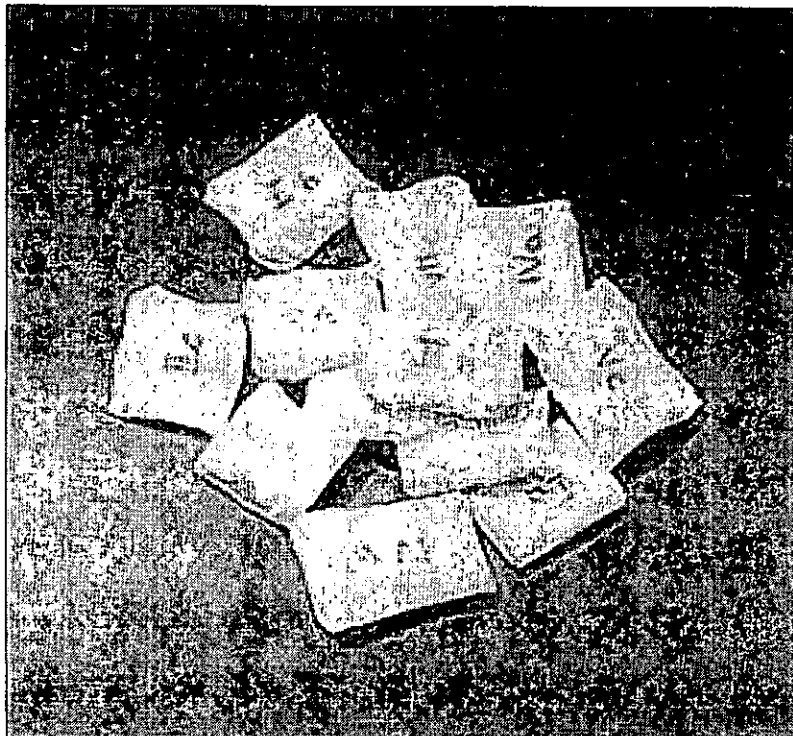


Figura 11. Sobres de papel absorbente cerrados e identificados, conteniendo las plántulas de cada tratamiento con hidrocarburos durante ocho días para determinar la producción de biomasa en peso seco.

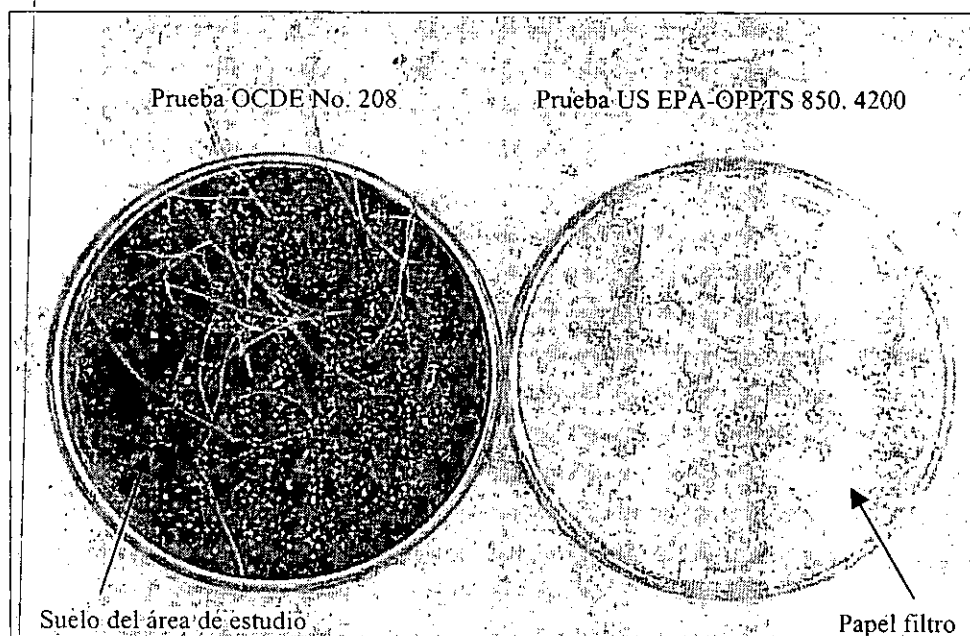


Con base en la prueba preliminar para los protocolos mencionados, las series experimentales se realizaron apoyándose preferentemente en lo estipulado por la prueba OCDE No. 208 (cuadro 8). El procedimiento US EPA 850. 4200 resultó práctico únicamente en los siguientes aspectos:

- La preparación de las concentraciones de prueba no implicó mezclas de suelos sino elaborar soluciones e impregnar papel filtro evaporando el solvente
- El papel filtro resultó más eficiente para conservar la humedad.
- La medición de la elongación radicular fue más sencilla puesto que no se necesitó enjuagar o remover las partículas de suelo alojadas en las raíces de las plántulas previamente

Se observó también que las plántulas crecidas en papel filtro no adoptaron una posición vertical (erecta) durante el periodo de la prueba (figura 12) Desde luego, se tuvo presente que ningún experimento de laboratorio refleja o simula de manera totalmente certera y fiel las condiciones naturales y sus interacciones con los organismos de prueba.

Figura 12. Plántulas control de *Cyperus elegans* de 25 días. Aquellas que crecieron sobre papel filtro como sustrato (derecha) no adoptaron una posición vertical erecta.



Sin embargo, se determinó que la prueba OCDE No. 208 era la más adecuada puesto que representa de una manera más apegada a la realidad las condiciones de exposición de las plántulas a los hidrocarburos, ya que permite por un lado, la utilización del suelo nativo como sustrato, por el otro, no interviene ni modifica la biodisponibilidad del contaminante al no utilizar surfactantes o disolventes para las sustancias con un coeficiente de partición alto como es el caso de la mayoría de los hidrocarburos que constituyen el petróleo.

Ahora bien, los datos obtenidos de germinación elongación radicular y crecimiento se analizaron estadísticamente para determinar si los efectos de los diferentes concentraciones fueron significativas (a un nivel de confianza del 95%) en dichos parámetros fisiológicos, así como su correlación existente. Se utilizó para ello el análisis de varianza unifactorial (ANOVA) del paquete estadístico SPSS® v. 7.5 y el modelo de regresión lineal de Microsoft® Office Excell.

6.6 Extracción y cuantificación de clorofila.

La extracción de clorofila se realizó según lo fundamentado por Liassen - Jessen (1971), procedimiento que se basa en la separación de los diferentes pigmentos fotosintéticos por la solubilidad característica de cada uno de ellos. De acuerdo con Bregman (1996) la polaridad de los principales pigmentos se puede ordenar en forma decreciente como sigue:

(+) ————— Polaridad —————> (-)

Clorofila b > clorofila a > Xantofilas > Carotenoides

Ahora bien, si se asume que las moléculas o sustancias *polares* son disueltas o atraídas por solventes *polares* y de igual manera ocurre con aquellas sustancias *no polares* y solventes *no polares*, entonces resulta plausible separar por solubilidad a los diferentes pigmentos utilizando solventes de polaridad diferente.

De esta manera, primero se procedió a extraer los pigmentos en frío, macerando la parte aérea de las plántulas deshidratadas en un mortero (mantenido previamente en un ultra congelador a - 80 °C (So low®, USA.) con 10 ml de una solución acetona-agua al 80% (v/v). El extracto generado se filtró y transfirió a un tubo de ensaye permitiéndose reposar por 3 minutos para asentar las partículas finas. A continuación se decantó el extracto en un embudo de separación de 50 ml, agregando secuencialmente 10 ml de metanol (Baker Analyzed®) y 10 ml de éter de petróleo (Baker Analyzed®). Debido a que se trata de un solvente polar y uno no polar respectivamente, su inmiscibilidad se manifestó por la formación de una solución de dos fases. La fase superior, correspondiente al metanol debía contener principalmente los pigmentos de mayor polaridad, es decir, la clorofila a y b (Liaaen-Jensen, 1971), la fase inferior se descartó. Una vez hecho esto, se evaporó el solvente de la fase superior colectada en una parrilla a una temperatura menor o igual a 60 °C (para evitar la degradación de los pigmentos), con la finalidad de reemplazar el solvente por 10 ml de una solución de acetona-agua al 80% (v/v). La sustitución del solvente se hizo con la intención de utilizar los coeficientes de absorción para clorofila a y b en acetona, determinados por G. MacKenney en 1940 (Bregman, 1996) para la cuantificación de los pigmentos por espectrofotometría de luz visible.

Para cuantificar los pigmentos se utilizó un espectrofotómetro Spectronic® 20 D (Milton Roy Company) y cubetas de 1 cm. Se registró la absorbancia de los

extractos en la longitud de onda de 663 y 645 nm* y se calculó su concentración según la ecuación de Lambert-Beer:

$$A = K C l \text{ ----- (11)}$$

Despejando C:

$$C = \frac{A}{K L} \text{ ----- (12)}$$

Donde:

A = absorbancia dada por el equipo.

K = Coeficiente de absorción en acetona: $K_{663} = 80.17 \text{ cm}^2/\text{mg}$ (para clorofila a); $K_{645} = 50.93 \text{ cm}^2/\text{mg}$ (clorofila b).

L = diámetro de la cubeta utilizada.

C = concentración en mg/ml del pigmento.

Una vez calculada la concentración de cada pigmento se determinó su proporción en el extracto realizando el cociente *clorofila a/ clorofila b*.

$$\text{Proporción de clorofilas en el extracto} = \text{clorofila a} / \text{clorofila b} \text{ ----- (13)}$$

Todas las actividades antes señaladas se realizaron de manera independiente para las tres réplicas de cada lote experimental, testigo y control, de las tres últimas series de prueba. Los datos obtenidos de clorofila se trataron estadísticamente de la manera como se mencionó para las otras respuestas evaluadas.

* Estas longitudes de onda representan el pico de absorción característico de la Clorofila a y b, respectivamente (Bregman, 1996)

7. Resultados y Análisis

7. RESULTADOS Y ANÁLISIS.

7.1 Presentación.

A continuación se muestran los resultados obtenidos según la metodología y técnicas mencionadas anteriormente.

Suelo

Los datos generados por el análisis básico de las propiedades físicas y químicas de las muestras de suelo utilizadas en este trabajo se muestran en el cuadro 10.

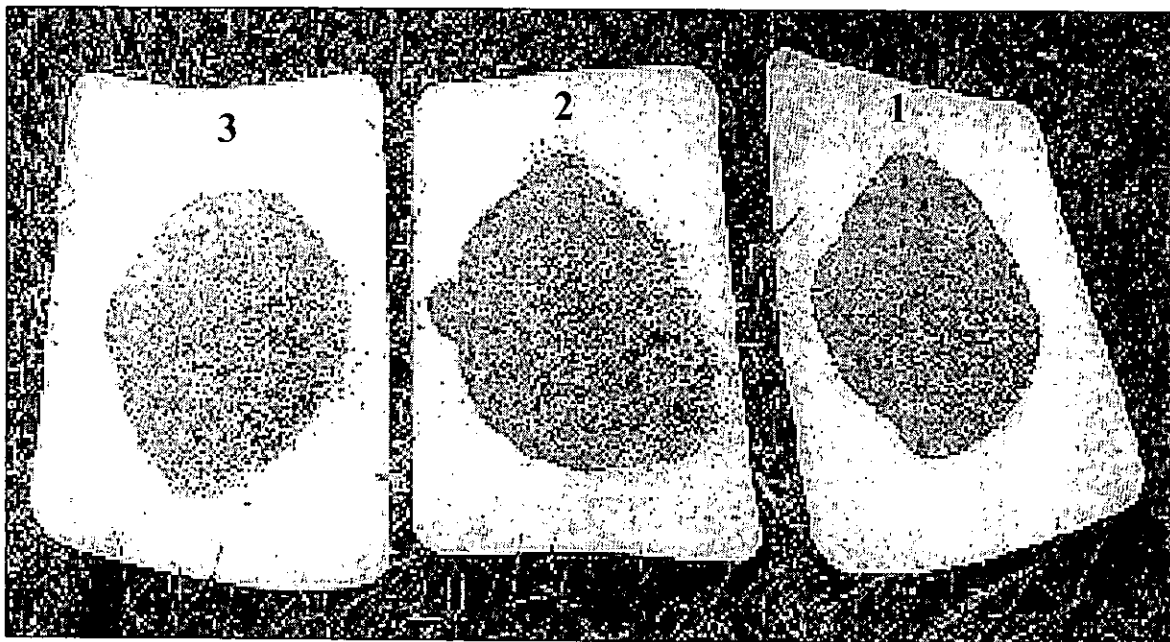
Cuadro 10. Resultados del análisis de las propiedades fisicoquímicas de las muestras de suelo utilizadas.

Suelo	1	2	3
Condición	Testigo	Contaminado	Testigo
Procedencia	Pantano Santa Alejandrina, Ver.	Pantano Santa Alejandrina, Ver	Tlalpizahuac, Edo. de Mex.
Arenas (%)	42.4	52.4	70.4
Limos (%)	42.6	25.6	86.0
Arcillas (%)	15.0	22.0	14.0
Tipo de Suelo	Migajón Franco	Migajón Arcillo-Limoso	Migajón Arcilloso
Materia Orgánica (%)	2.51	11.0	.424
pH	4.73	4.36	8.31
Densidad Aparente (g/cm ³)	1.18	.860	1.24
Densidad Real (g/cm ³)	2.23	1.19	2.10
Porosidad (%)	47.08	72.26	33.3
Contenido de HTP (ppm)	336.1	97, 376	18.1

Si se ubica el suelo del pantano testigo en el intervalo de categorías para contenido de materia orgánica propuesto por Jackson (1976), éste se consideraría un suelo *intermedio*. Siguiendo este mismo criterio, el suelo contaminado (2) es *rico* en materia orgánica mientras que la muestra de Tlalpizahuac es *extremadamente pobre*, lo cual se puede inferir previamente por su color claro comparado con los dos anteriores (figura 13). Nótese también que el 8. 49% (es decir, 11% -2. 5%) adicional de materia orgánica que contiene el suelo 2 puede

atribuirse a la contaminación por hidrocarburos, mientras que el 2. 5% se asume que es de carácter biogénico. De manera análoga puede considerarse el mismo criterio para el caso de los HTP, puesto que no todos los hidrocarburos extraídos y cuantificados necesariamente proceden de la contaminación por petróleo. Así mismo, otras propiedades químicas y físicas del suelo 2 como el pH, la densidad real y aparente así como la porosidad, están modificadas con respecto al suelo 1, lo cual indica que es el efecto de la contaminación del suelo con hidrocarburos.

Figura 13. Muestras de los suelos analizados y utilizados en este trabajo. El menor contenido de materia orgánica del suelo 3 se ve reflejado en su color claro característico, véase cuadro 10.



Suelo de Tlalpizahuac

Suelo contaminado del Pantano
Santa AlejandrinaSuelo control del Pantano Santa
Alejandrina

Ahora bien, como puede verse, el suelo del pantano de Santa Alejandrina testigo es *muy fuertemente ácido* y que al estar contaminado con hidrocarburos (suelo 2) su contenido de materia orgánica aumenta considerablemente, lo cual disminuye aún más su pH confiriéndole así un *carácter extremadamente ácido*. El suelo proveniente de Tlalpizahuac es *moderadamente alcalino*.

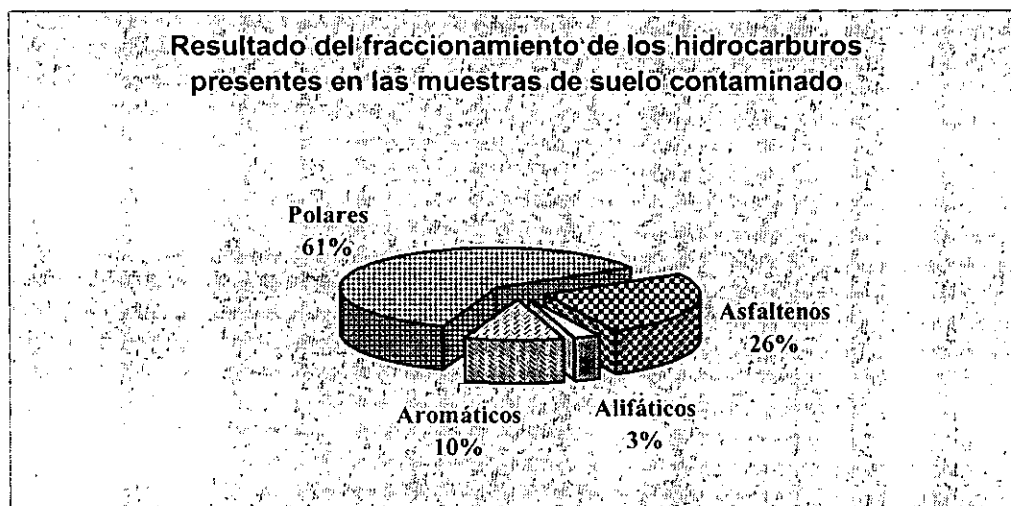
En general, la densidad real de los tres suelos es *baja*, por lo que la porosidad de cada uno de ellos es *intermedia* (suelo 1 y 3) y *muy alta* (suelo 2) en esa misma proporción.

De todo lo anterior puede comentarse entonces que el suelo testigo del pantano de santa Alejandrina por sus propiedades fisicoquímicas naturales señaladas posee mayor capacidad (comparado con el suelo de Tlalpizahuac) para adsorber xenobióticos orgánicos como los hidrocarburos. Asimismo, puede apreciarse que la contaminación del suelo por hidrocarburos modifica las características inherentes de aquel.

Fraccionamiento de los Hidrocarburos.

Los resultados del fraccionamiento de los hidrocarburos presentes en las muestras de suelo contaminado (suelo 2) son los siguientes:

Gráfica 1.



Por lo general, el ambiente circundante o cercano a las refinerías está sujeto a una contaminación crónica por hidrocarburos, derivado de frecuentes derrames y de la descarga continua de efluentes residuales (Freedman, 1995; Mol, 1999). Este hecho da como resultado que los hidrocarburos permanezcan como contaminantes en el suelo por largos períodos de tiempo permitiendo su intemperización y envejecimiento. De manera concomitante se induce una fuerte sorción de éstos con las partículas del suelo dificultando así su degradación o extracción física, química o biológica debido a su reducida disponibilidad (Kesley, *et al.*, 1997), lo cual se traduce finalmente en una prolongada persistencia de estos compuestos en el medio. El proceso por el cual los compuestos orgánicos llegan a incrementar su resistencia a la desorción en el tiempo es algo complejo y no lo suficientemente entendido todavía (Hatzinger, 1995).

De acuerdo con Medina (1999) y Ramírez (1998) los hidrocarburos presentes en suelos intemperizados por lo general pueden incluirse en la siguiente clasificación:

- Asfaltenos, la fracción de mayor peso molecular del petróleo
- Hidrocarburos alifáticos de alto peso molecular (parafinas)
- Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP)
- Hidrocarburos polares de alto peso molecular, baja solubilidad y punto de ebullición elevado

Como ya se había comentado antes, los asfaltenos constituyen la fracción más pesada y recalcitrante del petróleo compuesta por Hidrocarburos Aromáticos Poli cíclicos de alto peso molecular. Por lo general representan del 10 al 30% de los HTP (Ramírez, 1998).

Las parafinas (del gr. *parum*, pequeña y *affinis*, afinidad) están representadas por cadenas largas de hidrocarburos saturados, los cuales son bastante inertes.

Los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos están relacionados con la refinación y destilación del petróleo. Un gran número y diversidad de ellos puede encontrarse en suelos cercanos a refinerías (Díaz, *et al.*, 1993).

Los hidrocarburos polares están integrados por una extensa variedad de familias (alcoholes, fenoles, cetonas, aldehídos, ácidos carboxílicos, aminas, amidas, etc.) compartiendo todos ellos la característica de tener uno o más átomos de carbono o hidrógeno sustituidos por átomos de oxígeno, nitrógeno, azufre o halógenos.

Germinación.

Como se aprecia en las gráficas (2-7) correspondientes a las 6 series experimentales realizadas, la germinación de las semillas de *Cyperus elegans* no presentó una sensibilidad estadísticamente significativa en respuesta a las diferentes concentraciones de hidrocarburos ensayadas. Por lo cual se puede considerar que, por lo menos en el intervalo de 75 a 97,376 ppm de Hidrocarburos Totales del Petróleo (HTP) no se observaron efectos adversos en la germinación de las semillas de esta ciperácea, por lo que no fue posible evidentemente establecer una relación dosis-respuesta.

Elongación radicular.

La elongación radicular (gráficas 8-13) respondió a los tratamientos de cada serie experimental con variaciones estadísticas distinguibles, exceptuando la serie 5. Sin embargo, la tendencia de dichas respuestas no generó un coeficiente de correlación suficientemente significativo para asumir una relación dosis-respuesta aceptable en términos cuantitativos.

Crecimiento.

Los resultados del crecimiento, expresado como altura de la parte aérea de las plántulas (gráfica 14-19) indican que éste no resultó significativamente afectado por los hidrocarburos si se compara con los lotes control ($p > 0.05$). Únicamente se presentaron variaciones intergrupales en la serie I b (gráfica 15).

Biomasa.

Como se puede apreciar en las gráficas 20-25, la producción de biomasa en peso seco tampoco fue afectada significativamente por los hidrocarburos al compararse con los controles. Caso similar a lo observado en el crecimiento, la biomasa generada en la serie I b (gráfica 21) presentó variaciones estadísticamente distintas entre sus lotes experimentales, pudiendo tener también una explicación semejante a aquella. Cabe señalar que, aunque la biomasa producida y el crecimiento tuvieron un comportamiento estadístico parecido, esto no debe indicar necesariamente la existencia de una correlación estrecha entre sí puesto que la elongación radicular contribuye también a la cantidad neta de biomasa producida.

Asimismo, cabe resaltar que pese a la presencia de diferencias significativas en la elongación radicular ($p < 0.05$) entre los lotes pertenecientes a cada una de la series realizadas⁺, la producción de su biomasa respectiva no posee variaciones apreciables lo cual sugiere que la elongación radicular aporta poco a la biomasa, expresada en peso seco.

Contenido de Clorofila.

El contenido de clorofila se determinó para las últimas tres series experimentales desarrolladas (3, 4 y 5). En el cuadro 8 se indica el intervalo de concentraciones de HTP que constituyó cada una de las series experimentales. Con la finalidad de obtener información más precisa de los datos se procedió a depurarlos a través de un análisis de regresión interactiva, descartando aquellos que producían una mayor desviación de la normalidad. Mediante este ejercicio se logró vislumbrar una tendencia logarítmica ($R = 0.755$, $p > 0.05$) que evidenció que el contenido de clorofila disminuyó conforme aumentaba la concentración de HTP en el suelo. Sin embargo, dicha información no es concluyente debido al valor del coeficiente de correlación (gráfica 29).

La proporción de clorofila a y b en los controles (cuadro 11) sugiere que el contenido de clorofila b predomina sobre el tipo a en *Cyperus elegans*. Obsérvese también que dicha relación se conserva en mayor o menor medida en presencia de los HTP (excepto serie 4 ,lote 1 y serie 5, lote 3).

⁺ Exceptuando la Serie 5 (gráfica 13).

RESULTADOS DE LA GERMINACIÓN

Gráfica 2.



Lotes HTP (ppm)

- I 0 Testigo
- II 0 Control
- III 100
- IV 500
- V 1000
- VI 10,000
- VII 97,376

F (6, 4, 14, 9) = 0.441
P = 0.836*

*La diferencia entre las medias de los grupos no es significativa al nivel 0.05

Gráfica 3.



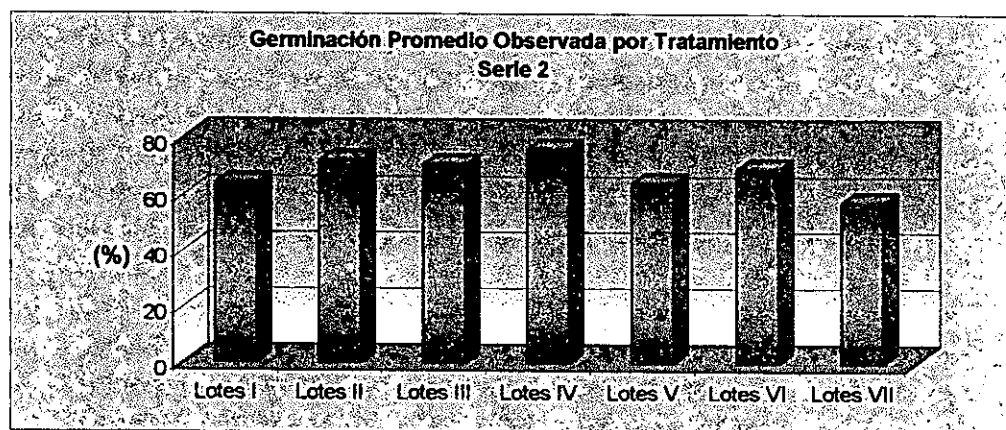
Lotes HTP (ppm)

- I S. Pantano
- II S. Tlalpizahuac
- III 100
- IV 500
- V 1000
- VI 10,000
- VII 97,376

F (6, 14) = 0.537
P = 0.771*

*La diferencia entre las medias de los grupos no es significativa al nivel 0.05

Gráfica 4.



Lotes HTP (ppm)

- I 25
- II 50
- III 75
- IV 100
- V 150
- VI S. Tlalpizahuac
- VII S. Pantano

F (6, 14) = 0.608
P = 0.719*

*La diferencia entre las medias de los grupos no es significativa al nivel 0.05

RESULTADOS DE LA GERMINACIÓN (continuación)

Gráfica 5.



*La diferencia entre las medias de los grupos no es significativa al nivel 0.05

Gráfica 6.



*La diferencia entre las medias de los grupos no es significativa al nivel 0.05

Gráfica 7.



*La diferencia entre las medias de los grupos no es significativa al nivel 0.05

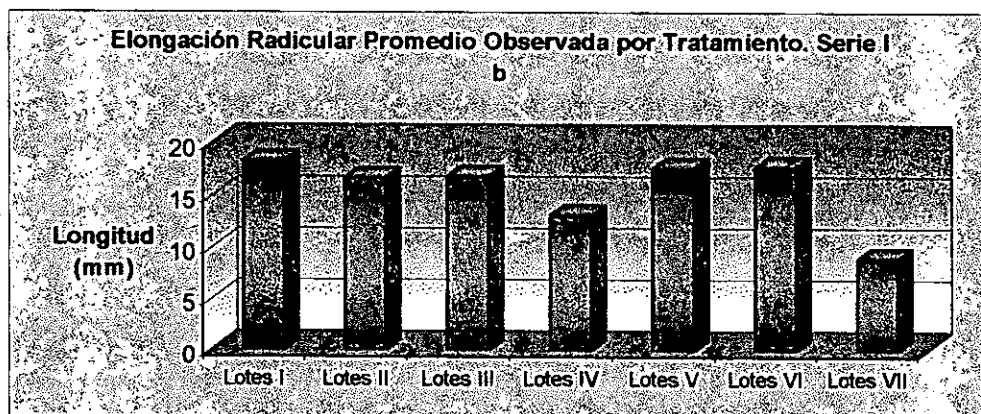
RESULTADOS DE LA ELONGACIÓN RADICULAR

Gráfica 8.



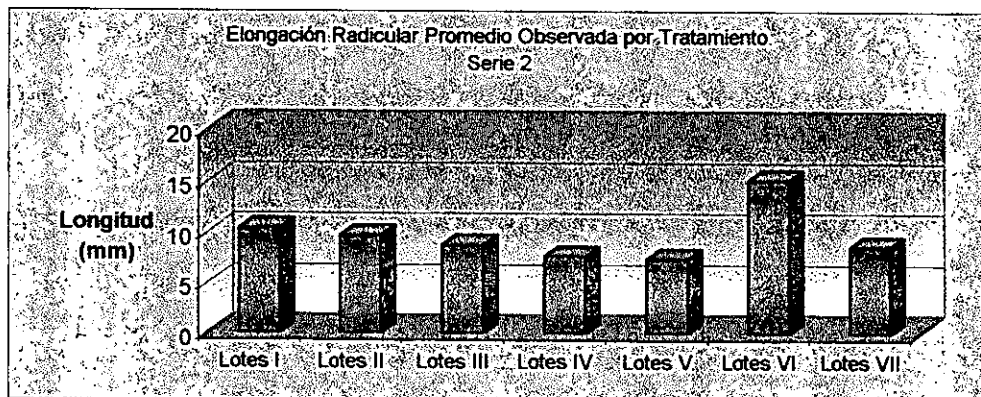
*La diferencia entre las medias de los grupos es significativa al nivel 0.05

Gráfica 9.



*La diferencia entre las medias de los grupos es significativa al nivel 0.05

Gráfica 10.



*La diferencia entre las medias de los grupos es significativa al nivel 0.05

RESULTADOS DE LA ELONGACIÓN RADICULAR (continuación)

Grafica 11.



Lotes HTP (ppm)

I	300
II	600
III	1200
IV	2400
V	5000
VI	S. Pantano

$$F(5, 306) = 2.41$$

$$P = 0.036^*$$

*La diferencia entre las medias de los grupos es significativa al nivel 0.05

Gráfica 12.



Lotes HTP (ppm)

I	75
II	150
III	300
IV	600
V	1200
VI	S. Pantano
VII	S. Tlalpizahuac

$$F(6, 328) = 26.88$$

$$P = 4.95 E^{-26}^*$$

*La diferencia entre las medias de los grupos es significativa al nivel 0.05

Gráfica 13.



Lotes HTP (ppm)

I	250
II	900
III	1500
IV	2250
V	3000
VI	4000
VII	S. Pantano

$$F(6, 293) = 0.875$$

$$P = 0.513^*$$

*La diferencia entre las medias de los grupos no es significativa al nivel 0.05

RESULTADOS DE CRECIMIENTO

Gráfica 14.



Lotes HTP (ppm)

I 0 Testigo
II 0 Control
III 100
IV 500
V 1000
VI 10,000
VII 97,376

$F(6, 348) = 1.45$
 $P = 0.195^*$

*La diferencia entre las medias de los grupos no es significativa al nivel 0.05

Gráfica 15.



Lotes HTP (ppm)

I S. Pantano
II S. Tlalpizahuac
III 100
IV 500
V 1000
VI 10,000
VII 97,376

$F(6, 347) = 18.65$
 $P = 0.000^*$

*La diferencia entre las medias de los grupos es significativa al nivel 0.05

Gráfica 16.



Lotes HTP (ppm)

I 25
II 50
III 75
IV 100
V 150
VI S. Tlalpizahuac
VII S. Pantano

$F(6, 348) = 1.90$
 $P = 0.079^*$

*La diferencia entre las medias de los grupos no es significativa al nivel 0.05

RESULTADOS DE CRECIMIENTO (continuación)

Gráfica 17.



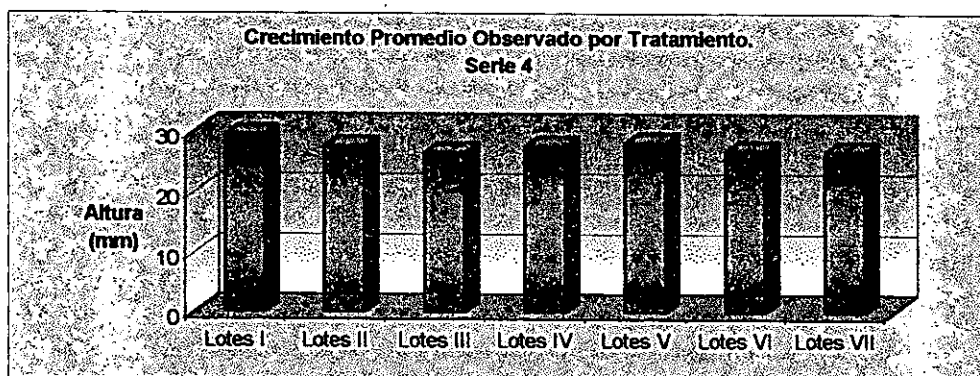
Lotes HTP (ppm)

I 300
II 600
III 1200
IV 2400
V 5000
VI S. Pantano

$F(5, 294) = 1.21$
 $P = 0.300^*$

*La diferencia entre las medias de los grupos no es significativa al nivel 0.05

Gráfica 18.



Lotes HTP (ppm)

I 75
II 150
III 300
IV 600
V 1200
VI S. Pantano
VII S. Talpizahuac

$F(6, 328) = 0.917$
 $P = 0.482^*$

*La diferencia entre las medias de los grupos no es significativa al nivel 0.05

Gráfica 19.



Lotes HTP (ppm)

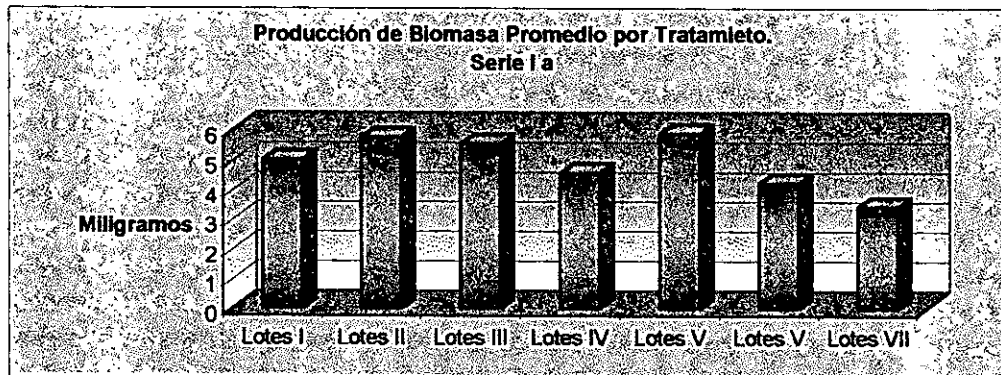
I 250
II 900
III 1500
IV 2250
V 3000
VI 4000
VII S. Pantano

$F(6, 293) = 1.29$
 $P = 0.257^*$

*La diferencia entre las medias de los grupos no es significativa al nivel 0.05

RESULTADOS DE PRODUCCIÓN DE BIOMASA

Gráfica 20.



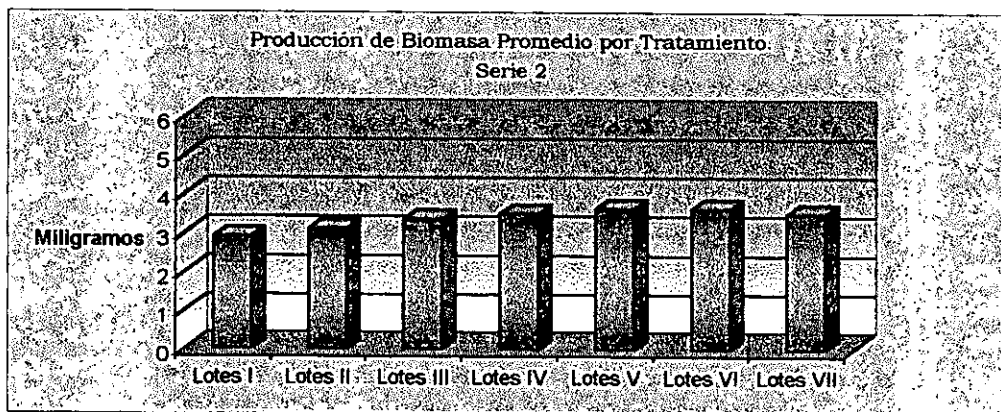
*La diferencia entre las medias de los grupos es significativa al nivel 0.05

Gráfica 21.



*La diferencia entre las medias de los grupos es significativa al nivel 0.05

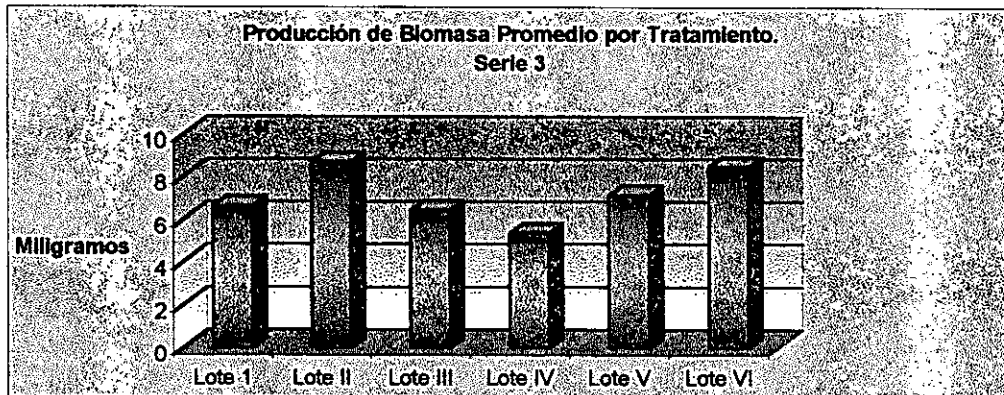
Gráfica 22.



*La diferencia entre las medias de los grupos no es significativa al nivel 0.05

RESULTADOS DE PRODUCCIÓN DE BIOMASA (continuación)

Gráfica 23.



Lotes HTP (ppm)

I 300
II 600
III 1200
IV 2400
V 5000
VI S. Pantano

$F(5, 12) = 2.91$
 $P = 0.059^*$

*La diferencia entre las medias de los grupos no es significativa al nivel 0.05

Gráfica 24.



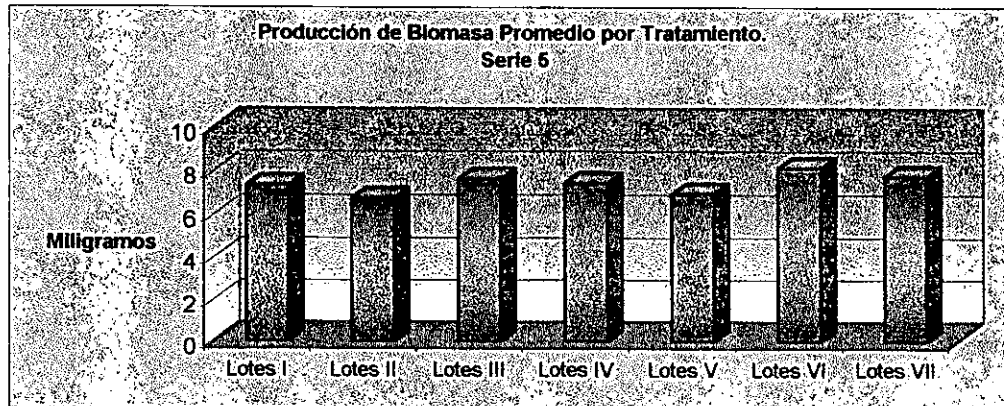
Lotes HTP (ppm)

I 75
II 150
III 300
IV 600
V 1200
VI S. Pantano
VII S. Tlalpizahuac

$F(6, 14) = 0.248$
 $P = 0.952^*$

*La diferencia entre las medias de los grupos no es significativa al nivel 0.05

Gráfica 25.



Lotes HTP (ppm)

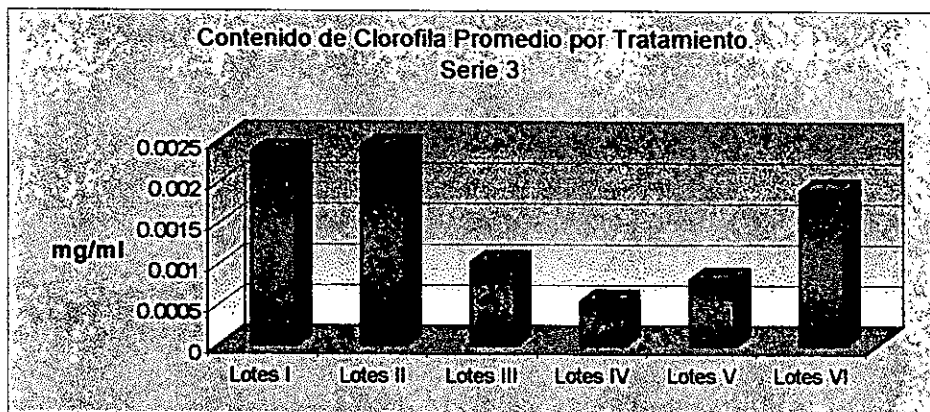
I 250
II 900
III 1500
IV 2250
V 3000
VI 4000
VII S. Pantano

$F(6, 14) = 0.629$
 $P = 0.704^*$

*La diferencia entre las medias de los grupos no es significativa al nivel 0.05

RESULTADOS DEL CONTENIDO DE CLOROFILA

Gráfica 26.



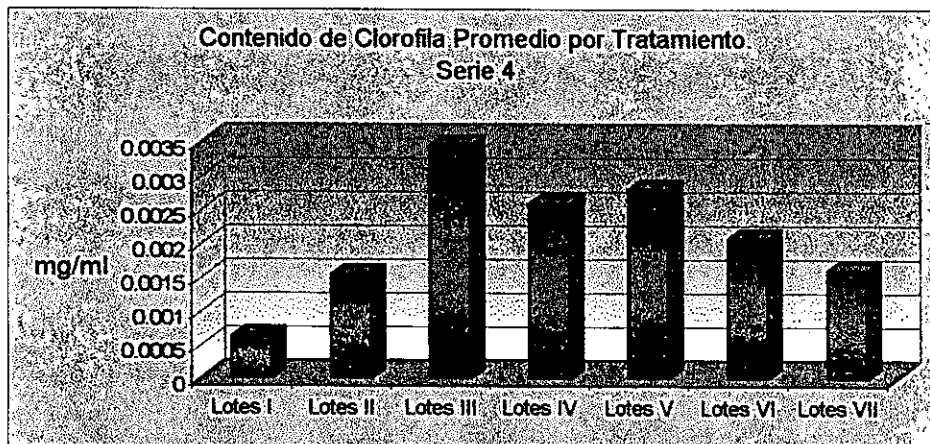
Lotes HTP (ppm)

I 300
II 600
III 1200
IV 2400
V 5000
VI S. Pantano

Probabilidad :
Íter grupos = 2.116 E -05

*La diferencia entre las medias de los grupos es significativa al nivel 0.05

Gráfica 27.



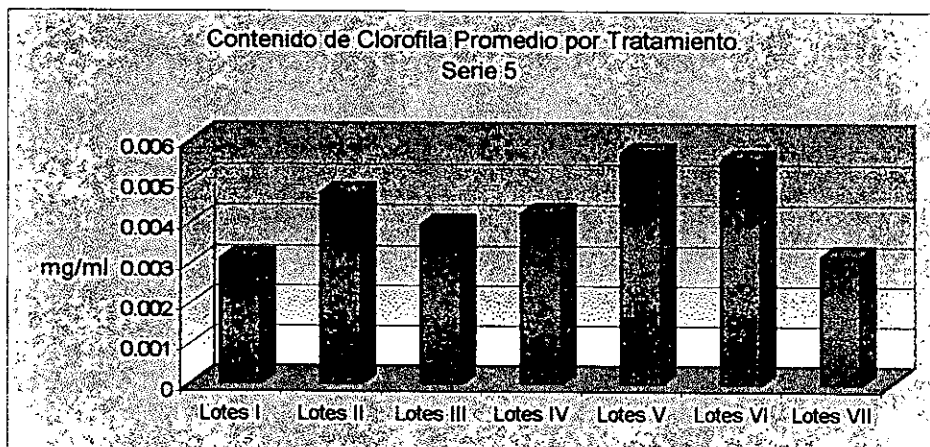
Lotes HTP (ppm)

I 75
II 150
III 300
IV 600
V 1200
VI S. Pantano
VII S. Tlalpizahuac

Probabilidad :
Íter grupos = 0.002

*La diferencia entre las medias de los grupos es significativa al nivel 0.05

Gráfica 28.



Lotes HTP (ppm)

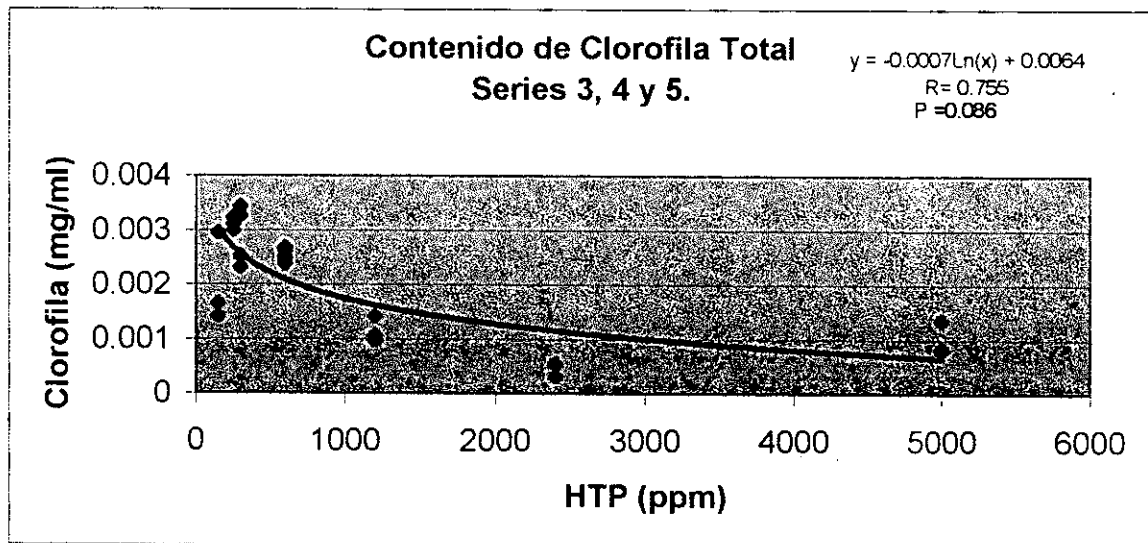
I 250
II 900
III 1500
IV 2250
V 3000
VI 4000
VII S. Pantano

Probabilidad :
Íter grupos = 0.018

*La diferencia entre las medias de los grupos es significativa al nivel 0.05

CONTENIDO DE CLOROFILA INTEGRAL DE LAS SERIES 3, 4 Y 5.

Gráfica 29.



Cuadro 11. Proporción promedio Clorofila a / Clorofila b determinada para los diferentes tratamientos correspondientes a las series experimentales desarrolladas.

	Lotes	HTP (ppm)	Clorofila a / clorofila b
SERIE 3	<i>I</i>	300	0.362
	<i>II</i>	600	0.626
	<i>III</i>	1200	0.672
	<i>IV</i>	2400	0.459
	<i>V</i>	5000	0.811
	<i>VI</i>	<i>S. Pantano (control)</i>	0.696

SERIE 4	<i>I</i>	75	1.52
	<i>II</i>	150	0.772
	<i>III</i>	300	0.604
	<i>IV</i>	600	0.234
	<i>V</i>	1200	0.572
	<i>VI</i>	<i>S. Pantano (control)</i>	0.740
	<i>VII</i>	<i>S. Tlalpizahuac (control)</i>	0.691

SERIE 5	<i>I</i>	250	0.675
	<i>II</i>	900	0.583
	<i>III</i>	1500	1.35
	<i>IV</i>	2250	0.544
	<i>V</i>	3000	0.596
	<i>VI</i>	4000	0.675
	<i>VII</i>	<i>S. Pantano(control)</i>	0.647

7.2 DISCUSIÓN.

Sin duda, por lo general la interpretación de los datos generados a partir de pruebas toxicológicas requiere adoptar una actitud prudente y cautelosa a fin de minimizar posibles estimaciones sesgadas de los efectos reales de la sustancia de prueba. Lo anterior obedece al hecho de que, por un lado, las evidencias obtenidas están determinadas y son el producto de un conjunto de condiciones experimentales controladas y definidas, las cuales pueden ser reduccionistas o diferir considerablemente de aquellas prevalecientes en el ambiente natural. Por el otro, factores intrínsecos de la población de individuos como la variabilidad genética y el vigor o salud de ellos comúnmente son de difícil control y que imposibilitan por tanto la reproducibilidad fiel de los resultados.

Ahora bien, como se mencionó en la presentación de resultados, la germinación no resultó afectada significativamente ($p > 0.05$) en los tratamientos de HTP ensayados (25 - 97,376 ppm), indicando con ello que, dicho contaminante probablemente no desempeñó un papel circunstancial que impidiera la imbibición y oxigenación* adecuada de las semillas, sugiriendo también que la viabilidad del embrión no fue alterada, hechos que en cierta forma se plantearon en la hipótesis de trabajo.

En los estudios encontrados en la literatura que abordan la fitotoxicidad de los hidrocarburos, se reportan casos en donde la germinación de las semillas de diferentes plantas se inhibe significativamente o no exhibe variación alguna. En el cuadro 12 se mencionan algunos de estos trabajos, donde puede observarse también que el tipo de hidrocarburos utilizados en ocasiones varía sustancialmente entre ellos así como las condiciones experimentales adoptadas (datos no mostrados) como lo es el tipo de suelo, fotoperiodo, temperatura, exposición, etc. Este hecho da como resultado la generación de una mayor complejidad e incertidumbre al intentar hacer comparaciones, sin embargo se aprecia la existencia de especies cuya semillas exhiben una tolerancia mayor a los hidrocarburos*, es decir, de alguna manera su morfofisiología inherente les confiere adicional e indirectamente† cierta ventaja adaptativa selectiva que se traduce finalmente en la capacidad de germinar en ambientes contaminados, con hidrocarburos en este caso.

Kulakow (1998) fundamentado en sus observaciones, generaliza mencionando que la germinación y el crecimiento de las plantas comúnmente puede presentar variaciones desfavorables en concentraciones "altas" de HTP, entendiéndose cantidades superiores o iguales a 40,000 ppm, indicando también que niveles de HTP inferiores a 5000 ppm normalmente no causan un efecto muy notable, y no descarta desde luego la existencia de especies con mayor o menor tolerancia.

* factores importantes implicados en la germinación además de la temperatura y luz (Salisbury, 1994).

† como es el caso de *Cyperus elegans* también.

‡ puesto que, desde el punto de vista evolutivo dichas adaptaciones no estuvieron originalmente orientadas para colonizar ambientes artificialmente alterados.

Cuadro 12. Algunos estudios de fitotoxicidad en donde se reporta el efecto de los hidrocarburos en la germinación de semillas de diversas plantas.

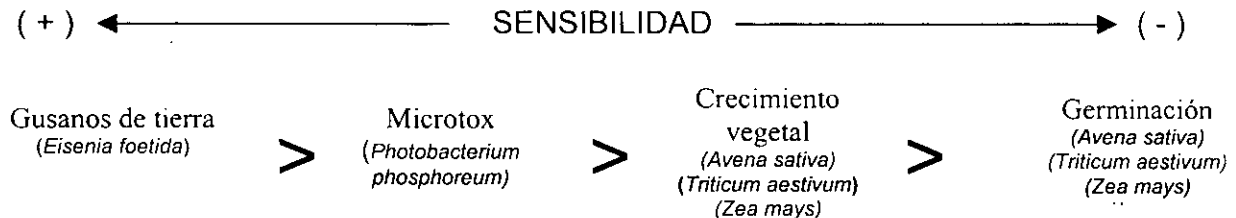
Plantas Utilizadas	Tipo de Hidrocarburos	Concentración	Efecto en la germinación	Autores
Avena sativa (avena) Lactuca sativa (lechuga) Panicum miliaceum (Mijo)	Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP)	5,878 ppm	Inhibición	Baud-Grasset, et al., 1999.
Trigonella foenum (alhova) Zea mays (maíz)	Diesel	15,000 – 20,000 ppm	Inhibición No efecto*	Damián, 1999.
Avena Sativa Lactuca sativa Lolium perennne (ballico) Triticum aestivum (Trigo) Zea mays	Crudo ligero, intermedio y pesado.	1.5-19.0% en peso.	No efecto	Dorn, et al., 1998.
Avena sativa Triticum aestivum Zea mays	Crudo ligero, intermedio y pesado.	37,700 – 122,200 ppm	No efecto No efecto Inhibición	Dorn, et al., 2000
Chromolaena odorata	Petróleo	75cm ³ **	Inhibición	Gil, et al., 1992.
Oryza sativa (arroz)	Productos refinados	***	No efecto	Ramanathan, et al., 1996.
Brassica napus (canola)	HAP intactos y fotomodificados	0.1 – 10 mg/l	No efecto	Ren, et al., 1996.
Lolium multiforum (ballico) Festuca rubra (fescue)	Pireno	2000ppm	No efecto	Reynolds, et al., 1997.
Avena sativa Triticum aestivum Zea mays	Crudo ligero Crudo intermedio	25000 – 26000 4200 – 9600 ppm	Inhibición	Salanitro, et al., 1997.
Avena sativa Lactuca sativa	HAP	2800 ppm	No inhibición Inhibición	Sayles, et al., 1999.
Secate cereate (ballico) Glycine max (soya)	Carburante para avion, aceite de caldeo y diesel	50,000 – 70,000 ppm	Inhibición	Wang, et al., 1990.
Cassava Okro Zea mays	Petróleo	2 – 8 l/m ² **	No efecto Inhibición Inhibición	Zuofa, et al., 1988.

* No efecto significa, no inhibe ni induce.

** dicha expresión no está referida adecuadamente, por lo cual, la concentración real manejada resulta ambigua.

*** se tomaron distintas muestras de suelo en áreas circundantes a una refinería abandonada localizada en Oklahoma. No se precisa la concentración de hidrocarburos de las mismas.

Todo lo anterior permite vislumbrar que la germinación es un parámetro poco sensible para evaluar la toxicidad de los hidrocarburos en suelos contaminados. De hecho, Dorn y colaboradores (1998 y 2000) comparan la sensibilidad de otros bioensayos para evaluar los efectos tóxicos a concentraciones iguales de hidrocarburos concluyendo que:



La reducida sensibilidad de los bioensayos de germinación también la han manifestado otros autores como señala Sayles (1999) y Ramanathan (1996). Bierkens y col. (1998) realizaron un trabajo interesante donde se compara la sensibilidad de 20 bioensayos (en fase sólida y líquida) para determinar la calidad de los suelos* manifestando que la germinación presenta un grado de respuesta bajo, es decir, poco susceptible. Resulta paradójico observar en la literatura que la utilización de bioensayos de germinación para evaluar efectos fitotóxicos de una amplia variedad xenobióticos sea una práctica muy común.

Ahora bien, es importante no perder de vista que, el hecho de observar una germinación escasamente sensible no es sinónimo directo de éxito en la conclusión plena del ciclo de vida de la planta. Planteado en otros términos significa que, aunque no se perciban efectos aparentes en este estadio cabe la posibilidad de que la sustancia o el contaminante interfiera posteriormente en el crecimiento y/o desarrollo, o bien en la disponibilidad de nutrientes y/o susceptibilidad a enfermedades de las plantas expuestas, pudiendo tener consecuencias que se traduzcan en una reducción de la viabilidad individual o poblacional (Sayles, 1999). Asimismo, es necesario tomar en cuenta y valorar el significado real que tiene la germinación para las diferentes especies vegetales. A este respecto, por ejemplo, *Cyperus elegans* posee dos estrategias de propagación y reproducción: por semillas⁺ y por tubérculos, siendo la principal está última. Por lo cual parece evidente entonces que el impacto que tuviera un efecto inhibitorio en la germinación de las semillas de esta planta, sería menor si se comparara con una planta que presentara únicamente un tipo de órgano de reproducción y propagación. De ahí también que el significado ecológico de la

* en este estudio se probaron 4 sustancias (cadmio, fenol, pentaclorofenol y trifluralina), cada una representativa de una toxicología o modo de acción diferente las cuales fueron aplicados en series de concentraciones en el intervalo de 1 a 1000 ppm, en un suelo estándar.

⁺ El índice de germinación observado en las semillas control de *Cyperus elegans* fue del 74% como se comentó anteriormente. Sin embargo, para otras especies del género se reportan porcentajes inferiores al 50%. Baskin, (1985) señala que por lo general las plantas anuales silvestres (no domesticadas) típicamente presentan una viabilidad reducida en sus semillas.

germinación puede ser variable dependiendo de la especie a considerar (Kapuska, 1994).

Con respecto a la elongación radicular, como se planteó anteriormente, existieron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los lotes experimentales que conformaron cada serie, exceptuando la última de ellas (serie 5). Esto indica presumiblemente la existencia de una interacción y efecto de los hidrocarburos con la radícula de las plántulas, lo cual es plausible debido a que las estructuras radiculares representan órganos expuestos que necesariamente están en contacto directo con el suelo contaminado. Al respecto, Baud-Grasset (1993) menciona que la reducción en la longitud de las raíces puede interpretarse como un indicador de estrés de una planta expuesta a sustancias químicas. Al correlacionar estadísticamente los efectos observados con la concentración de hidrocarburos presentes con el objeto de construir una curva dosis-respuesta, se encontraron coeficientes de correlación bajos ($p > 0.05$).

La comparación de la respuesta del sistema radicular de *Cyperus elegans* con otras especies de plantas reportadas en la literatura debe hacerse con las reservas y consideraciones del caso debido a las variaciones existentes en las condiciones experimentales entre los trabajos. No obstante, se puede referir que en los estudios* de Baud-Grasset (1993), Damián (1999), Ramanathan (1996), Ren (1996), Reynolds (1997) y Sayles (1999), se reportan diferencias significativas en la longitud de las raíces de las plantas expuestas, sugiriendo que este parámetro resulta más sensible para evaluar la toxicidad de suelos contaminados con hidrocarburos, lo cual también se ha observado para otras sustancias (Bierkens, 1998; Mishra, 1999).

Cabe señalar que únicamente Baud-Grasset (1993) presenta curvas de relación dosis-respuesta, donde se aprecia una relación inversa entre la concentración de hidrocarburos y la longitud radicular en el tiempo, en un suelo contaminado sujeto a biorremediación. Por otro lado, Damián (1999) no observó diferencias estadísticas en las raíces de plantas expuestas a 5000 ppm de diesel con respecto al control, esto se aprecia también en *Cyperus elegans* en la serie 5, constituida por tratamientos con hidrocarburos inferiores a 4000 ppm.

Ahora bien, el efecto generalizado que reportan los estudios mencionados es una *reducción* en la longitud de las raíces, aunque adicionalmente algunos autores reportaron otras anomalías como:

- Engrosamiento radicular (Ramanathan, 1996)
- Pérdida del geotropismo positivo (Bossert, 1985; Wang, 1990)

Todas estas manifestaciones de las raíces a la exposición de hidrocarburos denotan presumiblemente interferencias o alteraciones tanto en la división como

* en el cuadro 12 se hizo referencia al tipo de hidrocarburos, su concentración así como las especies utilizadas en los estudios de estos autores.

en la elongación celular en el área del meristemo radicular, lo cual es explicable a la luz de varios factores entre los que se encuentran:

1) La carencia o escasez considerable de oxígeno, rasgo característico de los suelos contaminados con hidrocarburos debido a la demanda y competencia de este gas por parte de las bacterias y hongos degradadores que proliferan de manera sustancial, independientemente del efecto aglutinante (que modifica la porosidad y permeabilidad del suelo) provocado por la presencia de dichos compuestos orgánicos. Potterfield (1998) y col. realizaron un trabajo interesante en donde se aprecia que la elongación de las raíces de plantas de chícharo (*Pisum sativum*) disminuye significativamente en condiciones graduales de hipooxigenación. Este mismo autor evidencia también que las raíces en general presentan un tropismo positivo al oxígeno (oxitropismo).

2) La disminución del contenido de agua en el sustrato causado por la presencia y naturaleza predominantemente hidrófoba de los hidrocarburos (ya que se abate de manera considerable la capacidad de retención de agua del suelo).

3) Se ha visto que ciertos hidrocarburos o sus productos de degradación pueden inducir efectos análogos a auxinas (del gr. *aúxein*, crecer) hormonas vegetales del crecimiento (Bossert, 1985; Salanitro, 1997). El alargamiento celular está regulado por auxinas*. Como se sabe, estas hormonas estimulan y coordinan muchos procesos fisiológicos de las plantas en concentraciones tan pequeñas como 10 mg/l, altos niveles de ellas pueden originar efectos inhibitorios en esos mismos procesos. Asimismo, cada tejido responde a concentraciones muy diferentes: las raíces son estimuladas con cantidades inferiores a las que se estimulan los tallos, en varios órdenes de magnitud (Salisbury, 1994). Por lo tanto, al encontrarse hidrocarburos en el suelo, cabe la posibilidad de que algunos de estos exhiban propiedades moleculares semejantes y se encuentren en cantidades que permitan inducir un efecto inhibitorio análogo a este tipo de hormonas. Las auxinas también pueden inducir la producción de etileno el cual también participa como regulador de la elongación celular.

Cabe señalar con respecto al caso de *Cyperus elegans* que, el posible origen de las variaciones observadas en la elongación radicular quizá no responda a un estrés por hipooxigenación debido a que se trata de una planta habitante de zonas pantanosas, cuyas raíces necesariamente deben de estar adaptadas a condiciones precarias de oxígeno. Los suelos inundados generalmente son hipóxicos puesto que el agua llena los espacios de aire y se reduce la renovación de O₂ alrededor de las raíces por el movimiento reducido de este gas en el agua.

Por otro lado, es poco probable que las raíces sufrieran estrés hídrico puesto que el suelo se homogeneizó con agua para alcanzar una humedad relativa uniforme (del 65% aproximadamente) además de que en ningún momento se apreciaron

* Para un explicación amplia de este proceso, estudiado concretamente en células radicales, se sugiere el trabajo de Büntemeyer (1998) con la especie *Zea mays* (maíz).

síntomas o evidencias de deshidratación en las plántulas.

De lo anterior se desprende que, el efecto hormonal de algunos de los hidrocarburos podría ser la posible explicación a los resultados, lo cual daría pauta para investigaciones futuras. Sin embargo, se encontraron coeficientes de correlación reducidos ($p > 0.05$) entre los efectos y la concentración de hidrocarburos, situación que alude a contemplar a la biodisponibilidad como un cuarto elemento en el escenario de discusión, intentando con ello plantear que, aunque en las muestras del suelo se hayan manejado hasta 97,376 ppm de HTP esto no significa necesariamente que dichos contaminantes sean susceptibles de interactuar en esa misma proporción con las plantas experimentales, más aún si se trata de un suelo intemperizado como en este caso. El fenómeno de la biodisponibilidad se discutirá más adelante.

Ahora bien, como se planteó en la presentación de resultados, el crecimiento y la producción de biomasa en peso seco no resultaron significativamente afectados por los hidrocarburos al no existir diferencias estadísticas entre los tratamientos y los controles exceptuando la serie I b (la serie I a consistente en manejar el mismo intervalo de concentraciones que aquella no presentó variaciones estadísticamente distinguibles). El hecho de que ambos parámetros (crecimiento y biomasa) de manera coincidente no exhibieran variaciones estadísticas, hace suponer que la elongación radicular contribuyó poco a la biomasa total producida si se considera que las raíces presentaron diferencias significativas en 5 de 6 series (aunque con una correlación dosis-respuesta reducida como ya se señaló).

El crecimiento (altura) de las plantas y la producción de biomasa también son susceptibles a los efectos físicos y químicos de los hidrocarburos al estar presentes como contaminantes en el suelo y que pueden reflejarse en un aumento o disminución de los mismos dependiendo de la concentración y tipo de hidrocarburos, el sustrato, las especies de plantas utilizadas y las condiciones generales de experimentación.

En la literatura se encuentran casos en los cuales el crecimiento y la producción de biomasa de plantas expuestas se inhibe sustancialmente (Gill,1992; Huang,1995; Ramanathan,1996; Reynolds,1997; Wang,1990; Zuofa,1988) y en otros donde se apreció un aumento (Boosert,1985; Dorn,1998, 2000; Hund,1994; Salanitro,1997). Asimismo, existen trabajos en los que no se reporta ningún efecto (Damián, 1999; Ren, 1996). Dichos resultados tienen explicación posible si se considera que ciertos hidrocarburos o sus productos de degradación potencialmente tienen la capacidad de simular auxinas naturales (Bossert, 1985; Salanitro, 1997), por tanto su modo de acción sería análogo también a aquellas: en altas concentraciones se provocarían efectos inhibitorios y la situación contraria si se encontraran en cantidades reducidas. Bossert (1985) señala que en campo se ha visto un aumento en el crecimiento y la producción agrícola cuando los niveles de contaminación por hidrocarburos (con petróleo) se presentan por

debajo del 1% (equivalente a decir 10,000 ppm)[†]. Considerando que las hormonas naturales del crecimiento ejercen sus efectos en concentraciones tan reducidas como 10 mg/l (Salisbury, 1994), la estimación de Bossert parecería bastante congruente teniendo en cuenta que no todos los hidrocarburos presentes como mezcla poseen estructuras similares a estos fitoreguladores.

Ren y colaboradores (1996) comentan que el precario efecto observado en el crecimiento de sus plantas experimentales (*Brassica napus*, véase cuadro 12) es el resultado de la aplicación hidropónica de los hidrocarburos aromáticos policíclicos y del reducido transporte o translocación de ellos a través del sistema vascular, este último hecho lo señala también Anderson (1997), Edwards (1983) y Swarts (1997)^{*}. Por su parte, Damián (1999) tampoco observó diferencias en el crecimiento de las plantas expuestas (*Zea mays* y *Trigonella foenum graecum*) a diesel lo cual puede tener la misma explicación anterior, además de que dicho carburante representa una mezcla constituida principalmente por hidrocarburos de alto peso molecular, reducida solubilidad y volatilidad así como una alta capacidad de sorción con las partículas del suelo, características que en conjunto le confieren una alta persistencia y poca movilidad.

En referencia al caso concreto de *Cyperus elegans*, el no haber observado efectos significativos en el crecimiento y la producción de biomasa (figura 14) puede obedecer a los factores comentados y también a la *baja biodisponibilidad* de los hidrocarburos presentes puesto que se trata de un suelo intemperizado (véase página 71). En este sentido, se ha visto que no existe necesariamente una correlación directa entre la concentración de los hidrocarburos extraídos de una muestra de suelo con la biodisponibilidad real de ellos en los sistemas biológicos (Harkey, 1998). El factor tiempo es un elemento que también está implicado en este fenómeno al observarse que la biodisponibilidad de los hidrocarburos puede ir disminuyendo gradualmente conforme aumenta su longevidad o tiempo de residencia en el suelo, lo cual se traduce en una menor tasa de biodegradación, reducida desorción y menor interacción con los organismos (Harkey, 1998; Hatzinger, 1995; Kesley, 1997; Kotteman, 1998; Maliszewska, 1998). Los mecanismos y fenómenos relacionados con estos hechos aún no han sido comprendidos ni estudiados suficientemente (Hatzinger, 1995), sin embargo se ha planteado que la reducción de la biodisponibilidad en función del tiempo obedece principalmente a que (Hatzinger, 1995; Kesley, 1997; Kotteman, 1998):

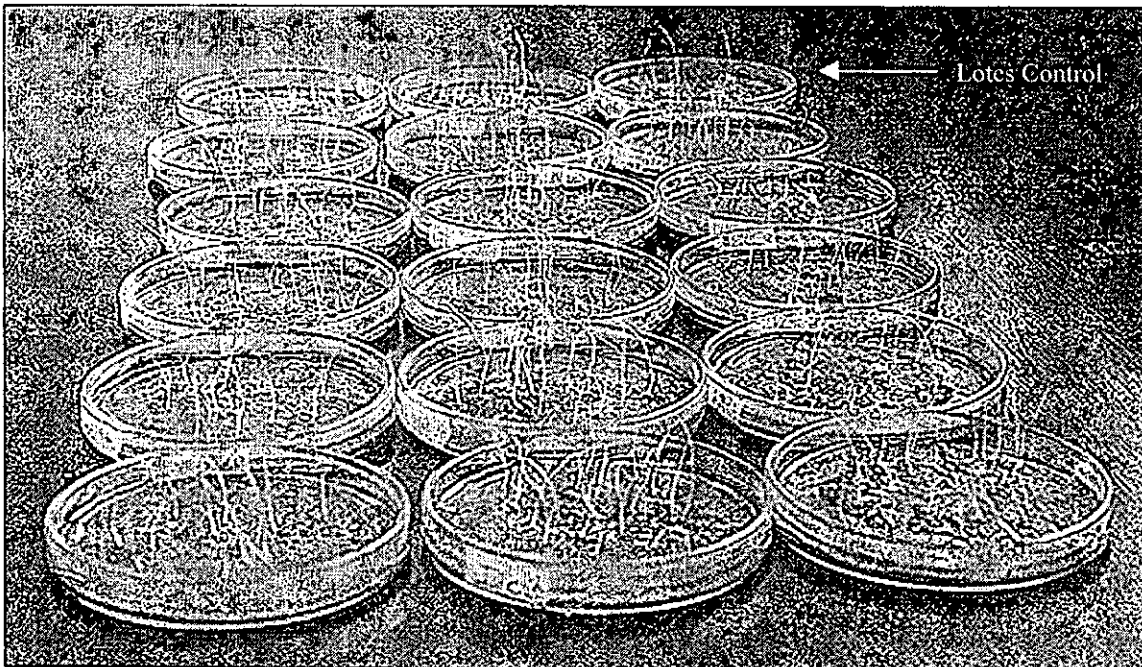
[†] Algunos autores como Freedman (1995) paralelamente atribuyen también como posible causa de la estimulación del crecimiento observado en algunos pastos (como *Arctagrostis latifolia* y *Carex aquatilis*) el microclima cálido asociado con la superficie oscurecida generada por la contaminación con petróleo.

^{*} Existen en la literatura pocos estudios documentados referentes al estudio preciso de la incorporación y translocación potencial de los hidrocarburos así como la identificación de los posibles metabolitos de degradación. Pese a ello se ha visto que la factibilidad de estos procesos está vinculada estrechamente con el tipo de suelo, la concentración y algunas propiedades fisicoquímicas (como el coeficiente de partición y el peso molecular) de los hidrocarburos implicados así como la especie y edad de la planta expuesta. En los trabajos de Briggs (1982), Clothier (1997), Schroll (1991), Shwab (1998) y Topp (1986) se analiza a detalle la relación entre los factores mencionados.

- Los hidrocarburos, como compuestos orgánicos, establecen una fuerte sorción con la materia orgánica y las partículas minerales del suelo, a través de enlaces covalentes, puentes de hidrógeno, y fuerzas de Van der Waals.
- La difusión e introducción lenta de los mismos en los microporos de las partículas del sustrato origina que finalmente queden inaccesibles a la biodegradación o al contacto con solventes.

Todo lo anterior permite vislumbrar que, la *concentración* de los contaminantes totales contenidos en una muestra, determinada por los métodos de extracción convencionales, no representa la *dosis* real disponible, únicamente se trata de una medida directa de la *concentración ambiental* o una aproximación de la *concentración de exposición*.

Figura 14. Serie experimental 3. El crecimiento de las plántulas no se observa afectado por los diferentes tratamientos con HTP. Las series complementarias exhibieron un comportamiento estadístico y apariencia similar.



Ahora bien, como se indicó previamente, el contenido de clorofila de las plántulas experimentales se determinó para las últimas tres series manejadas (3, 4 y 5)*. El tratamiento estadístico de los resultados obtenidos correspondientes a las tres series se realizó de manera integral. La alta dispersión de los datos no permitió observar una tendencia suficientemente definida para poder establecer una correlación aceptable entre ambas variables. Con la finalidad de obtener información más precisa a partir de dichos datos se procedió a depurarlos a través

* En el cuadro 8 se indica el intervalo de concentraciones de HTP que constituyó cada una de estas series experimentales.

de un análisis de correlación interactiva, descartando aquellos que producían una mayor desviación en la normalidad. Mediante este ejercicio se logró vislumbrar una tendencia logarítmica con un coeficiente de correlación mayor ($R= 0.7558$, $p>0.086$) que evidenció que el contenido de clorofila disminuyó conforme aumentaba el contenido de HTP en el suelo.

Como se muestra en el cuadro 11, la proporción de clorofila a y b en los lotes control sugiere que el contenido de clorofila b predomina sobre el tipo a en *Cyperus elegans*.* Asimismo, se aprecia que dicha relación se conserva en mayor o menor medida aún en la presencia de los HTP (a excepción de los tratamientos de 75 y 1500 ppm), sugiriendo con ello que la disminución observada en el contenido total de clorofila no necesariamente es producto de la inhibición selectiva de la síntesis de alguno de los dos tipos de pigmento analizados.

Se encontraron en la literatura escasos trabajos que refieren el efecto de los hidrocarburos en el contenido de clorofila (cuadro 13). Dentro de este reducido acervo de información se pueden mencionar los trabajos de Huang (1996), Ralph (1998) y Ren (1996) cuyos resultados se exponen y comentan brevemente a continuación.

Cuadro 13. Algunos estudios que refieren el efecto de los hidrocarburos en el contenido de clorofila.

Especie Experimental	Tipo de Hidrocarburos Utilizados	Concentración	Efecto en el Contenido de Clorofila	Autor
<i>Brassica napus</i> <i>Cucumis sativus</i>	6 especies de HAP (intactos y fotomodificados) ¹ .	2, 4 y 8 mg/l	Reducción, en proporción a la concentración.	Huang, et al., 1996.
<i>Halophila ovalis</i>	Crudo ligero	100%, 50% y 25% de una solución stock al 1%.	No efecto significativo.	Ralph, et al., 1998.
<i>Brassica napus</i>	3 especies de HAP (ntactos y fotomodificados) ²	0.1-10 mg/l	No efecto significativo.	Ren, et al., 1996.

¹Antraceno, benzo (a) antraceno, benzo (a) pireno, fenantreno, fluoranteno, pireno.

²Antraceno, benzo (a) pireno, fluoranteno.

Desde luego, la comparación de los resultados entre los trabajos debe hacerse con cierta parsimonia debido a la variación en la calidad y cantidad de los hidrocarburos así como en las condiciones generales de experimentación. Sin embargo, con el estudio de Huang (1996) y Ren (1996) se resalta la importancia ya reconocida que posee la ruta o vía de exposición de los contaminantes como un factor que determina sustancialmente la toxicidad de ellos. En este sentido, la comparación de estos dos estudios resulta elocuente de esta idea puesto que el tipo de hidrocarburos de prueba así como las concentraciones manejadas poseen estrecha similitud, además de que una de las especies experimentales (*Brassica*

* La proporción de cada tipo de pigmento es variable y característico de cada especie de planta (Bregman, 1996; Wellburn, 1994).

napus) es común en ambas. No obstante, la vía de exposición o administración de los HAP fue muy distinta: por hidroponía (Huang, 1996) y por aspersión directa del área foliar (Ren, 1996), originando respuestas diferentes también.

Por otra parte, Ralph (1998) utilizó hidroponia, obteniendo resultados semejantes a Huang (es decir, ningún efecto estadísticamente apreciable con respecto a los lotes control), lo cual sugiere, como se planteó anteriormente, que los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos, tanto en su forma intacta como fotomodificada, no son translocados significativamente por las plantas. Por su parte, Ralph (1998) no reporta variación notable en la relación clorofila a/clorofila b de *Halophila ovalis* con los tratamientos, caso semejante al observado en *Cyperus elegans*.

La disminución en el contenido de clorofila de las plántulas de *Cyperus elegans* en el intervalo de 150 a 5000 ppm pudiera tener explicación si se toma en cuenta que, entre otros aspectos:

- Algunos hidrocarburos pueden ejercer o inducir efectos análogos a las auxinas, por lo tanto en concentraciones mayores de HTP cabe la posibilidad de que exista un incremento en la proporción de constituyentes con estructura semejante a aquellas, induciendo así la síntesis de etileno por parte de las plántulas. Este gas degrada a la clorofila (Ascon-Bieto, 1996)
- La presencia de hidrocarburos en el suelo disminuye la capacidad de retención de agua del mismo por lo cual las plantas pueden exhibir síntomas de deshidratación, como lo es la clorosis foliar (que se traduce en un menor contenido de clorofila)

Sin embargo, resulta poco probable que dichos factores hubieran jugado un papel preponderante en los resultados observados si se considera que en los suelos intemperizados como es el caso, los hidrocarburos presentes, por lo general de alto peso molecular (véase página 71 y 72) poseen una reducida biodisponibilidad. Como se indicó en párrafos anteriores tampoco fueron evidentes síntomas por deficiencia de agua.

Por lo anterior, es necesario tener presente que el comportamiento negativo observado en el contenido de clorofila en función de la concentración de HTP es el resultado de la depuración selectiva de los datos, por lo cual, la información derivada de ellos no es lo suficientemente concluyente en cuanto al efecto atribuible a los Hidrocarburos.

No obstante, de manera general, los demás parámetros evaluados (germinación, elongación radicular, crecimiento, producción de biomasa en peso seco) en plántulas de *Cyperus elegans* denotan un efecto reducido de los hidrocarburos presentes en el pantano en esta especie, hecho experimental que se confirma tangiblemente en campo puesto que esta ciperácea se encuentra habitando de manera natural este ambiente alterado (figura 4).

Como se indicó, *Cyperus elegans* como planta ruderal, tiene la capacidad de sobrevivir en este medio porque está adaptada para solventar condiciones naturales de perturbación. En este sentido, cabe señalar también que el uso del nitrógeno es muy eficiente en las plantas de este género (Li, 1999), factor de crucial importancia si se considera que por lo general en los suelos contaminados con petróleo existe una disminución importante de macronutrientes o macroelementos para las plantas como lo es el fósforo y el nitrógeno (particularmente este último) debido, por un lado, a que se encuentran presentes en bajas concentraciones en el petróleo y sus productos refinados y residuales (Freedman, 1995), por el otro, como consecuencia de la elevación de la demanda de aquellos por parte de los microorganismos que proliferan de manera sustancial (Bossert, 1984). A este respecto, este último autor comenta adicionalmente que durante la reforestación natural de los suelos contaminados la limitación por nitrógeno impone una alta presión selectiva hacia plantas con requerimientos bajos de este elemento*.

Bajo esta perspectiva, el limitado efecto manifestado por las plántulas de *Cyperus elegans* frente a la exposición de los HTP limita considerablemente su potencialidad para ser utilizada como bioindicador sensible de contaminación para este tipo de xenobióticos, puesto que no permite valorar o interpretar adecuadamente los efectos relacionados a la existencia de concentraciones o niveles de contaminación particulares. Es necesario considerar que la vulnerabilidad de las especies con respecto a un mismo factor de estrés puede variar considerablemente y por añadidura, resulta evidente que ninguna especie puede ser la más sensible en todos los casos.

Desde un punto de vista fitotoxicológico, la escasez de respuestas adversas de *Cyperus elegans* a los hidrocarburos le confiere una ventaja que le permitiría ser utilizada en la fitorremediación del pantano de Santa Alejandrina. Adicionalmente, esta especie posee un sistema radicular fibroso y profuso que puede proveer una amplia superficie de rizosfera que potencialmente promueva o estimule los procesos químicos y biológicos implicados en la biodegradación de los hidrocarburos (Aprill, 1990), independientemente de que se trata de una planta nativa que, por lo mismo, no necesitaría aclimatación previa.

En conjunto, todas estas características le conceden a esta planta un papel promisorio en el proceso de fitorremediación lo cual, desde luego es pauta para

* De ahí que las leguminosas, por su potencialidad de fijar nitrógeno atmosférico (a través de la formación de nódulos radiculares por el establecimiento de una relación simbiótica con bacterias del género *Rhizobium*), sean también buenos candidatos.

otras investigaciones relacionadas en torno a comparar su eficiencia para estimular las poblaciones microbianas implicadas en la biodegradación de dichos compuestos orgánicos, su potencialidad para bioacumularlos así como el tiempo y cantidad de remoción de los mismos. Algunos de estos estudios ya se han estado realizando.

8. Conclusiones y Recomendaciones

8. Conclusiones y Recomendaciones.

De la información generada en este trabajo se puede comentar lo siguiente:

- 1.- Las propiedades físicas y químicas de un suelo pueden modificarse debido a la contaminación por hidrocarburos.
- 2.- Los Hidrocarburos Totales del Petróleo (HTP) contenidos en las muestras del suelo del pantano de Santa Alejandrina no tuvieron efecto significativo en la germinación, crecimiento y producción de biomasa de *Cyperus elegans*, en el intervalo de 25 a 97,376 ppm.
- 3.- En la elongación radicular de *Cyperus elegans* se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en 5 de las 6 series experimentales realizadas, lo que sugiere de alguna manera la existencia de efectos derivados de la exposición a los HTP, aunque los coeficientes de correlación correspondientes no presentaron valores elevados ($p > 0.05$).
- 4.- El contenido de clorofila mostró diferencias estadísticas ($p < 0.05$) en los tratamientos con HTP, apreciándose una reducción, aunque no es concluyente con respecto al grado de efecto atribuible a los mismos.
- 5.- La reducción de la biodisponibilidad de los hidrocarburos en función del tiempo es un factor que puede influir notablemente en la toxicidad de un suelo contaminado, y que explica de alguna manera el limitado efecto manifestado en las plántulas de *Cyperus elegans* frente a la exposición a los HTP contenidos en muestras de suelo del área de estudio.
- 6.- La reducida respuesta de *Cyperus elegans* frente a los HTP, además de su gran adaptabilidad natural a condiciones de perturbación, disminuye considerablemente su potencialidad para ser utilizada como bioindicador sensible para este tipo de xenobióticos.
- 7.- Desde un punto de vista fitotoxicológico, la aparente tolerancia de *Cyperus elegans* a los HTP le confieren cierta ventaja para ser empleada en la fitorremediación del pantano de Santa Alejandrina.
- 8.- La información generada a través de los bioensayos de toxicidad con plantas quizá no sea decisiva o contundente con relación a los efectos de los xenobióticos en todos los casos, debido a que algunos parámetros fisiológicos (germinación, crecimiento, entre otros) pueden diferir en su sensibilidad inherente, sin embargo, no por ello las pruebas de fitotoxicidad deben ser subestimadas o excluidas, debido al papel clave que representan las plantas como productores primarios.
- 9.- La Prueba de Fitotoxicidad OCDE No. 208 refleja o simula con mayor aproximación las condiciones e interacciones reales de los xenobióticos con las plantas experimentales dado que sugiere el empleo del suelo nativo como sustrato y no permite la utilización de solventes para sustancias no polares que modifiquen su biodisponibilidad, por lo cual se recomienda su utilización para realizar bioensayos orientados a integrar estudios a nivel ecotoxicológico.

10.-Los bioensayos de toxicidad constituyen una parte integrante de los estudios analíticos dirigidos a la evaluación del riesgo o impacto ambiental para un contaminante dado. En este sentido, una estimación del impacto ecológico de los hidrocarburos en el Pantano de Santa Alejandrina implicaría la realización de pruebas con múltiples especies, representando cada una de ellas un nivel trófico o nicho diferente.

REFERENCIAS

- Adams, C. (1994). *5.-Cyperaceae*. En: Davidse, G., M. Sousa, A. Chater. Flora Mesoamericana **Vol. 6.**, UNAM, Missouri Botanical Garden, The Natural History Museum (London), pp. 423-440.
- Anderson, T., A. Hoylman, N. Edwards, B. Walton (1997). *15.-Uptake of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Vegetation: a Review of Experimental Methods*. In: Wang, W., J. Gorsuch, J. Hughes. Plants for Environmental Studies, Lewis Publishers, U. S. A., pp.452-480.
- Arcos, M. A., J. Becerril, M. Espíndola, G. Fernández, M. E. Navarrete. (1994). *Transporte, Destino y Toxicidad de Constituyentes que Hacen Peligroso a un Residuo*. CENAPRED, Cuaderno de Investigación 2, México, pp. 1-5.
- Ascon-Bieto, J. M., Talon. (1993). *Fisiología y Bioquímica Vegetal*, Interamericana-Mc Graw Hill., México, pp. 112-128.
- ASTM (1993). *Standard Practice for Extraction of Solid Waste Samples for Chemical Analysis Using Soxhlet Extraction*, Annual Book of ASTM Standards Vol. **05. 05**.
- Barnes, R. (1989). *Zoología de los Invertebrados*. Interamericana- Mc Graw Hill, México, 5ª edición.
- Baskin, J., C. Baskin. (1976). Effect of Photoperiod on Germination of *Cyperus inflexus* seeds. *Bot. Gaz.* **137** (3): 269-273. Located in: *Biol Abstr.* **63**: 111-120 (1977).
- Baskin, J., C. Baskin. (1978). Seasonal Changes in the Germination Response of *Cyperus inflexus* Seeds to Temperature and Ecological Significance. *Bot. Gaz.* **139** (2):231-235. Located in: *Seed Abstr.* **2**: 241-125 (1979).
- Baskin J., C. Baskin (1985). The Annual Dormancy Cycle in Buried weed seeds: a continuum. *Bioscience* **35**: 492-498.
- Baud-Grasset, F., S. Baud-Grasset, S.,Safferman. (1993). Evaluation of the Bioremediation of a Contaminated Soil with Phytotoxicity Tests. *Chemosphere* **26** (7): 1365-1374.
- Bierkens, J., G. Klein, P. Corbisier, R. Van Den Heuvel, L. Verschaeve, R. Weltens, G. Schoeters. (1998). Comparative Sensitivity of 20 Bioassays for Soil Quality. *Chemosphere* **37** (14-15): 2935-2947.
- Bossert, I. R. Bartha. (1984). *10.-The fate of Petroleum in Soil Ecosystems*. In: Atlas R. (ed.) Petroleum Microbiology, Mac Millan Publishing, Co., U. S. A., pp.435-473
- Bossert I., R. Bartha. (1985). Plant Growth in Soils with a History of Oily Sludge Disposal. *Soil Sci.* **140** (1): 75-77.
- Bossert, I., R. Bartha. (1986). Structure Biodegradability Relationships of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Soil. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **37**: 490-495.
- Bouyoucos, G. J. (1962). Directions for Making Mechanical Analysis of soils by the Hydrometer Method, *Soil Sci.* **42**: 225-230.
- Bregman, A. (1996).Chromatography of Photosyntetic Pigments- Project 12. In: *Laboratory Investigations in Cell and Molecular Biology*, John Wiley & Sons, U. S. A., 3ª edición, pp. 147-163.

- Briggs, G., R. Bromilow, A. Evans. (1982). Relationships Between Lipophilicity and Root Uptake and Translocation of Non-ionized Chemicals by Barley. *Pestic. Sci.* **13**: 495-504.
- Büntemeyer, K., H. Lüthen, M. Böttger. (1998). Auxin-Induced Changes in Cell Wall Extensibility of Maize Roots. *Planta* **204**: 515-519.
- Calow, P. (1998). *Handbook of Ecotoxicology*, Blackwell Science, Great Britain, pp. 871.
- Cairns, Jh., P. Mc Cormick, S. Belanger. (1992). Ecotoxicological Testing: Small is Reliable, *JEPTO* **11** (5,6): 247-263
- Calabrese, E. , P. Kostecki. (1992). *Hydrocarbon Contaminated Soil and Groundwater*, Lewis Publishers, U. S. A., pp. 408-413.
- Clothier B., S. Green. (1997). Roots: The Big Movers of Water and Chemical in Soil. *Soil Sci.* **162** (8): 534- 543.
- Chapman, H., P. Pratt. (1979). *Métodos de Análisis para Suelos, Plantas y Aguas*. Trillas, México, pp. 13-39.
- Chen , Z. (1997). *Phytoremediation of Petroleum Contaminated Soil*. Ph. D Thesis, Kansas State University.
- Chow, S. (1998). *Petroquímica y Sociedad*, La ciencia para todos 39, Fondo de Cultura Económica, México, pp. 21-45.
- Chozin, M., K. Nakagawa .(1988). Autoecological Studies on Cyperus iria and C. microiria Steud., Annual Cyperaceous Weeds. Seed Dormancy, Germination and Seedling Emergence. *Weed res. (Japan)* **33** (1); 23-30.
- Damián, F. (1999). *Estudios de Ecotoxicidad, Biorremediación y Fito-biorremediación en Suelos Contaminados con Hidrocarburos (Diesel)*, Tesis de Licenciatura Biología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Facultad de Ciencias , México, pp. 2-49.
- Díaz, G. (1993). *Hidrocarburos Poliaromáticos en Áreas Costeras del Golfo de México*. Revista Interna de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa (UAM-I) **3**, pp. 1-15.
- Diego-Pérez, N., R. M. Fonseca. (1997). *Flora de Guerrero No. 5 Cyperaceae*. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México: 50-54.
- Dorn, Ph., T. Vipond, J. Salanitro, H. Wisniewsky. (1998). Assesment of the Acute Toxicity of Crude Oils in Soils Using Earthworms, Microtox[®] and Plants. *Chemosphere* **37** (5): 845-860.
- Dorn, Ph., J. Salanitro. (2000). Temporal Ecological Assesment of Oil Contaminated Soils Before and After Biorremediación. *Chemosphere* **40**: 419-426.
- Duffus, J. (1983). *Toxicología Ambiental*. Omega Ediciones, España, pp. 114 –125.
- Edwards, N. (1983). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in the Terrestrial Environment-A Review. *J. Environ. Qual.* **12** (4):427- 441.
- Espindola, M., G. Fernandez. (1994) Procesos Fisicoquimicos para la Estabilización de Residuos Peligrosos, Cuaderno de Investigación 3, CENAPRED, México.
- Fernández, G. , Ma. Arcos, C. Izcapa, L.Meza, L. Soria, R. Rivera, C. Tello. (1998). *Residuos Peligrosos*, Fascículo 9, CENAPRED, México, pp. 1- 20.

- Fernández, G., Ma. Arcos, Y. Espindola, Ma. Navarrete, C. Tello, C. Izcapa. (1998). *Riesgos Químicos*, Fascículo 6, CENAPRED, México, pp. 3-16.
- Fletcher, J., R. Hedge. (1995) Release of Phenols by Perennial Plant Roots and their Potential Importance in Bioremediation. *Chemosphere* 31: 3009-3016.
- Freedman, B. (1995). *Environmental Ecology. The Ecological Effects of Pollution, Disturbance and other Stresses*, Academic Press Inc. pp. 159-180.
- Fuad, A., D. Gidi. (1995). *Saneamiento de Sitios Contaminados*. Gaceta Ecológica INE 36, México, pp. 8- 14.
- Gill, L., H. Nyawuame. (1992). *Effect of Crude Oil on Growth and Anatomical Features of Chromolaena odorata (L.) K. & R.* (1992). In: Four International Workshop on Biological Control and Management of Chromolaena odorata, Bangalore, India.
- Grime, Jh. (1982). *Estrategias de Adaptación de las Plantas y Procesos que Controlan la Vegetación*, LIMUSA, México, pp. 19-77.
- Günter Th., U. Dornberger, W. Fritsche. (1996). Effects of Ryegrass on Biodegradation of Hydrocarbons in Soil.. *Chemosphere* 11 (2): 203-215.
- Harkey, G., A. Cepuritis, J. Paterek. (1998). Effect of Soil Contaminant Extraction Method in Determining Bioavailability and Toxicity Associated with PAHs in Tar-Contaminated Soils, Inst. Gas Technol., Environ. Biotechnol & appl. International Symposium, Orlando, U. S. A., pp. 1-14.
- Hatzinger, P., M. Alexander. (1995). Effect of Aging of Chemicals in Soil on Their Biodegradability and Extractability. *Environ. Sci. Technol.* 29: 537-545.
- Heath, J. K. Koblis, Sh. Sager. (1993). Review of Chemical, Physical and Toxicologic Properties of Components of Total Petroleum Hydrocarbons. *J. Soil contam.* 2 (1): 1-25.
- Hedge, R. , J. Fletcher. (1996) Influence of Plant Growth Stage and Season on the Release of Root Phenolics by Mullberry as Related to Development of Phytoremediation Technology, *Chemosphere* 32: 2471-2479.
- Huang, X., G. Dixon, B. Greenberg. (1995). Increased Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Toxicity Following their Photomodification in Natural Sunlight: Impacts on the Duckweed Lemna gibba L. G-3. *Ecotox. Environ. Saf.* 32: 194-200.
- Huang, X., L. Zeiler, G. Dixon, B. Greenberg. (1996). Photoinduced Toxicity of PAHs to the Foliar Regions of Brassica napus (Canola) and Cucumis sativus (Cucumber) in Simulated Solar Radiation. *Ecotox. Environ. Saf.* 35: 190-197.
- Hund, K., W. Traunspurger. (1994). Ecotox-Evaluation Strategy for Soil Bioremediation Exemplified for a PAH- Contaminated Site. *Chemosphere* 29 (2): 371-390.
- Ibarrarán C., M. Arcos, C. Izcapa, G. Fernández. (1996). *Tecnologías para la Descontaminación de Suelos*. Cuaderno de Investigación 29, CENAPRED, México, pp. 13-15, 40-54.
- Instituto Mexicano del Petróleo (1994). *Determinación de Hidrocarburos Totales del Petróleo en Suelo y Sedimento por FT-IR, Método IMP-QA-620*, México.
- INE / SEMARNAP. (1996). *Las Decisiones y los Días. El programa para el Manejo Integral de los Residuos Industriales y Peligrosos en México 1996- 2000*. Gaceta Ecológica 39, México, pp. 24- 28.

- INE / SEMARNAP. (1996). *Programa para la Minimización de Residuos Peligrosos en México 1996 – 2000*, México, pp. 18- 27.
- Jackson, M. L. (1976). *Análisis Químico de Suelos*, Prentice Hall, México, pp. 65-87.
- Jansen, L. (1971). Morphology and Photoperiodic Responses of Yellow Nutsedge. *Weed Sci.* 19: 210-219.
- Kalf, D., T. Crommentuijn, E. Van De Plassche. (1997) Environmental Quality Objectives for 10 Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs). *Ectox. Environ Saf.* 36: 89-97.
- Kapustka, L., M. Reporter. (1998). *Terrestrial Primary Producers*. In: Calow, P. Handbook of Ecotoxicology, Blackwell Science, Great Britain: 280-294.
- Kesley, J., B. Kottler, M. Alexander. (1997). Selective Chemical Extractants to Predict Bioavailability of Soil-Aged Organic Chemicals. *Environ. Sci. Technol.* 31 (1): 214- 217.
- Kotteman, M.(1998). Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Degradation by the White Rot Fungus *Bjerkandera sp* Strain BOS 55. Thesis Wagenigen Agricultural University, pp. 11-26.
- Krebs, Ch. (1985). *Ecología. Estudio de la Distribución y la Abundancia*. Harla, México: 116-126.
- Kristen, U. (1997). Use of Higher Plants as Screens for Toxicity Assesment. *Toxicol. in vitro.* 11: 181-191.
- Kulakow, P. (1998). Seed Mix and Plant Density. In: *Summary of the Remediation Technologies Forum*. Phytoremediation of Organics Action Team, Total Petroleum Hydrocarbon in Soil Subgroup, Conference Call, U. S. A. pp. 1-7.
- Later, D., M. Lee, K. Bartle. R. Kong, D. Vassllaroa. (1981). Chemical Class Separation and Characterization of Organic Compounds in Synthetic Fuels, *Annal Chem.* 53: 1612-1620.
- Lee, E., M. Banks (1993). Bioremediation of Petroleum Contaminated Soil Using Vegetation: a Microbial Study. *J. environ.Sci. Health A* 28 (10) 11: 2187-2198.
- Lett, L.; S. Judson. (1993). *Fundamentos de Geología Física*, LIMUSA, México, pp.181-185.
- Li, M., D. Wedin, L. Tieszen. (1999). C₃ and C₄ Photosynthesis in Cyperus (Cyperaceae) in Temperate Eastern North America. *Can J. Bot.* 77: 209- 218.
- Liassen- Jessen, B., A. Jessen. (1971). Quantitative Determination of Carotenoids in Photosynthetic Tissues. In: Collowick, C., N. Kaplan (Eds.). *Methods of Enzimology*, Academic Press, London, pp. 668-677.
- Liste, H., M. Alexander. (2000). Plant-Promoted Pyrene Degradation in Soil.. *Chemosphere* 40: 7-10.
- Maliszewska-Kordybach, B. (1998). The Relationship Between the Properties of PAHs and the Rate of their Disappearance from Soils. *Toxicol. Environ. Chem.* 66: 47-52.
- Mallakin, A., B. McConey, G. Miao, B. McKibben, V. Snieckus, G. Dixon, B. Greenberg. (1999). Impacts of Structural Photomodification on the Toxicity of Environmental Contaminants: Anthracene Photooxidation Products. *Ecotox. Environ. Saf.* 43: 204-212.

- Mallalah, G., M. Azfal, S. Gulshan, D. Abraham, M. Kurian, M. Dhami. (1996). Vicia faba as a Bioindicator of Oil Pollution. *Environ. Pollut.* 92 (2) pp. 213-217.
- Mazet, J., I. Gardner, D. Jessup, J. Rittenburg. (1997). Field Assay for the Detection of Petroleum Products on Wildlife. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 59: 513-519.
- Medina, E., T. De Bifano, M. Delgado. (1976). Diferenciación Fotosintética en Plantas Superiores. *Interciencia* 1 (2): 96-103.
- Medina, S. A. (1999). *Lavado, Composteo ex – situ de un Suelo Intemperizado con Hidrocarburos*, Tesis de Maestría Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa (UAM-I), México.
- Mishra, A., M.A. Choudhuri (1999). Monitoring of Phytotoxicity of Lead and Mercury from Germination and Early Seedling growth Indices in Two Rice Cultivars. *Water, Air, Soil Pollut.* 114 : 339-336.
- Mol, J. (1999). An Analysis of the Remediation of Soil Contaminated Refinery Sites. *Environ. Manag. Health.* 10 (1): 37- 40.
- Morrison, R., R. Boyd. (1990). *Química Orgánica*, Addison-Wesley Iberoamericana, U. S. A., 5ª edición.
- Navarrete, M., J. Becerril. (1996). *Muestreo y Caracterización de Residuos Peligrosos*. Cuaderno de Investigación 27, CENAPRED, México, pp. 51-53.
- Neilson, p. (1998). *PAHs and Related Compounds, Biology*. The Handbook of Environmental Chemistry, Vol. 3, Anthropogenic Compounds, Part J. Springer-Verlag, Germany, pp. 386.
- NTE-CRP-001/88 *Acuerdo por el que se expide la Norma Técnica Ecológica, que establece los criterios para la determinación de los Residuos Peligrosos y el listado de los mismos*, Gaceta Ecológica 11 (11), México, pp. 2-7.
- Odum, E.(1978). *Ecología*. CECOSA, México, pp. 257-265.
- Olson, R., R. Ellis, Jr. Krunze, J. Dixon (1982). In: *Methods of Soil Analysis Part 2. Chemical and Microbiological Properties* 2nd ed. American Society of Agronomy Inc. Madison Wisconsin, U. S. A., pp. 149-157, 167-178, 534-577.
- Organization for Economic Cooperation and Development (1984). Terrestrial Plants, Growth Test No. 208. *OECD Guidelines for Testing Chemicals*, France, pp. 1-5.
- Phillips, D. (1998). *Bioaccumulation*. In: Calow, P (ed.), Handbook of Ecotoxicology, Blackwell Science, U. S. A., pp. 378- 390.
- Poterfield, D., M. Musgrave. (1998). The Tropic Response of Plants Roots to Oxigen: Oxitropism in *Pisum sativum* L. *Planta* 206 (1): 1-6.
- Powell R.(1997) *The Use of Plants as a "Field" Biomonitors*. In: Wang, W., J. Gorsuch, J. Hughes. *Plants for Environmental Studies*, Lewis Publishers, U. S. A.
- Ralph, P. J., M. D. Burchett (1998). Impact of Petrochemicals on the Photosynthesis of *Halophila ovalis* Using Chlorophyll Fluorescence. *Mar. Pollut. Bull.* 36 (6): 429-436.
- Ramanathan, A., S. Burks. (1996). Hazard Evaluation of Soil Contaminants with Acuatic and Plant Toxicity Tests. *Bull. Envirôn. Contam. Toxicol.* 56: 956-963.
- Ramírez, M. E. (1998). Biodisponibilidad y biodegradación del Naftaleno en Suelo. Tesis de Maestría, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa (UAM-I), México.

- Ren, L., X. D. Huang, B. McConey, G. Dixon, B. Greenberg. (1994). Photoinduced Toxicity of Three Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (Fluoranthene, Pyrene and Naphthalene) to the Duckweed *Lemna gibba* L. G-3. *Ecotox. Environ. Saf.* **28**: 160-171.
- Ren, L., L. Zeiler, G. Dixon, B. Greenberg. (1996). Photoinduced Effects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on *Brassica napus* (Canola) During Germination and Early Seedling Development. *Ecotox. Environ. Saf.* **33**: 73-80.
- Rodríguez, R. (1998). *Las Toxinas Ambientales y sus Efectos Genéticos*. Fondo de Cultura Económica, México, pp. 72-79.
- Rogers, J., D. Tedaldi, M. Kavanaugh. (1993). A screening Protocol for Bioremediation of Contaminated Soil. *Environ Prog.* **12** (2): 146-156.
- Salanitro J., P. Dorn, M. Huesemann, K. Moore, I. Rhodes, L. Rice Jackson, T. Vipond, M. Western, H. Wisniewsky. (1997). Crude Oil Hydrocarbon Bioremediation and Soil Ecotoxicity Assessment. *Environ. Sci. Technol.* **31**: 1769-1776.
- Salisbury, F. (1994). *Fisiología Vegetal*, Iberoamericana, España, pp. 87- 99.
- Salvétat, R., Ph. Juneau, R. Popovic. (1998). Measurement of Chlorophyll Fluorescence by Synchronous Detection in Integrating Sphere: A Modified Analytical Approach for the Accurate Determination of Photosynthesis Parameters for Whole Plants. *Environ. Sci. Technol.* **32** (17): 2640-2645.
- Sayles, G., C. Acheson, M. Kupferle, Y. Shan, Q. Zhou, J. Meier, I. Chang, R. Brenner. (1999). Land Treatment of PAH-Contaminated Soil: Performance Measured by Chemical and Toxicity Assays. *Environ. Sci. Technol.* **33**: 4310-4317.
- Schroll, R., I. Scheunert. (1992). A Laboratory System to Determine Separately the Uptake of Organic Chemicals from Soil by Plants Roots and by Leaves after Vaporization. *Chemosphere* **24**: 97- 108.
- Schwab, A., A. Al-Assi, M. Banks. (1998). Plant and Environment Interactions. Adsorption of Naphthalene onto Plants Roots. *J. Environ. Qual.* **27**: 220- 224.
- Schwab, A., J. Su, S. Wetzel, S. Pekarek, M. Banks. (1999). Extraction of Petroleum Hydrocarbons from Soil by Mechanical Shaking. *Environ. Sci. Technol.* **33**: 1940-1945.
- Stanley, M. (1992). 13.-*Toxic Organic Compounds and Hydrocarbons*. In: Toxicological Chemistry, Lewis Publishers, U. S. A., 2th edition, pp. 309-327.
- Swarts, O., L. Jones. (1997). *Bioaccumulation of Xenobiotic Organic Chemicals by Terrestrial Plants*. In: Wang, W., J. Gorsuch, J. Huges. Plants for Environmental Studies, Lewis Publishers, U. S. A.: 416- 449.
- Topp, E., I. Scheunert, A. Attar, F. Korte. (1986). Factors Affecting the Uptake of ¹⁴C-Labeled Organic Chemicals by Plants from soil. *Ecotox. Environ. Saf.* **11**: 219-228.
- Tuominen, J., H. Pyysalo, M. Sauri. (1988). Cereal Products as a Source of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *J. Agric. Food. Chem.* **36**: 118-120.
- US EPA – OPPTS. (1996). Seed Germination/ Root Elongation Toxicity Test OPPTS 850. 4200, *Ecological Effects Test Guidelines*, U. S. A., pp. 1-7.
- Van Straalen, N., C. Van Gestel. (1998). *Soil Invertebrates and Micro-organisms*. In: Calow, P. (ed.), *Handbook of Ecotoxicology*, Blackwell Science, U. S. A., pp. 251- 264.

- Wagrowsky, D., R. Hites. (1996). Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Accumulation in Urban, Suburban and Rural Vegetation. *Environ. Sci. Technol.* **31** (1): 279-282.
- Walker, C., S. Hopkin, R. Sibly, D. Peakall .(1996). *Principles of Ecotoxicology*, Taylor & Francis, Great Britain, pp. 27-39
- Wang, W., K. Freemark. (1995). The Use of Plants for Environmental Monitoring and Assesment. *Ecotox. Environ. Saf.* **30**: 289-301.
- Wang, W., J. Gorsuch, J. Hughes. (1997). *Plants for Environmental Studies*, Lewis Publishers, U. S. A. pp. 152- 287
- Wang, X., R. Bartha. (1990). Effects of Bioremediation on Residues, Activity and Toxicity in Soil Contaminated by Fuel Spills. *Soil Biol. Biochem.* **22** (4): 501-505.
- Wang, Z., M. Fingas, K. Li. (1994). Fractionation of a Light Crude Oil and Identification and Quantitation of Aliphatic, Aromatic and Biomarker Compounds by GC-FID and GC-MS, Part I. *J. Chromat. Sci.* **32** : 361-366.
- Wellburn, A. (1994). The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution. *J. Plant. Physiol.* **144**: 307-313.
- Willard, H., L. Merrit, Jh. Dean, F. Settle. (1988). *Métodos Instrumentales de Análisis.*, Iberoamericana, México.
- Williamson, D., R. Loher, Y. Kimura. (1998). Release of Chemicals from Contaminated Soils. *J. Soil. Contam.* **7** (5): 543-558.
- Wills, G.(1975). Effect of Light and Temperature on Growth of Purple Nutsedge. *Weed Sci.* **23**: 93-96.
- Zuofa, K.,P. Loganathan, P. Isirmah (1988).Effects of Crude Oil Applications to Soil on the Growth and Yield of Maize, Okro and Cassava. *Oil Chem. Pollut.* **4** (4):249-259.

INDICE DE CUADROS, FIGURAS Y GRÁFICAS.

Cuadros.	Página
1. Principales contaminantes localizados en 1035 suelos en Estados Unidos.	8
2. Constituyentes principales del Petróleo.	30
3. Algunas especies vegetales utilizadas en pruebas de toxicidad con hidrocarburos.	32
4. Características principales de las plantas ruderales.	38
5. Datos climáticos correspondientes al municipio de Minatitlán, Veracruz.	41
6. Diagrama de flujo del método propuesto para desarrollar los objetivos planteados.	51
7. Comparación de las condiciones experimentales estipuladas por las pruebas OPPTS/US EPA y OCDE.	60
8. Relación de las concentraciones correspondientes a las series experimentales realizadas.	61
9. Condiciones experimentales de las series experimentales desarrolladas.	61
10. Resultados del análisis de las propiedades fisicoquímicas de las muestras de suelo utilizadas.	69
11. Proporción promedio de Clorofila a/ Clorofila b en los diferentes tratamientos de las series desarrolladas.	84
12. Algunos estudios de fitotoxicidad en donde se reporta el efecto de los hidrocarburos en la germinación.	86
13. Algunos estudios que refieren el efecto de los hidrocarburos en el contenido de Clorofila.	93

Figuras.

1. Esquema del Proceso Crow para la descontaminación de suelos.	17
2. Planteamiento para realizar una técnica de limpieza de suelos por <i>Extracción</i> .	18
3. Ejemplos de Hidrocarburos Alifáticos y Aromáticos.	28
4. Ciperáceas y Gramíneas en el pantano de Santa Alejandrina.	36
5. Pantano de Santa Alejandrina.	40
6. Ejemplar de <i>Cyperus elegans</i> de 90 días aproximadamente.	40
7. Sistema de Extracción Soxhlet.	53
8. Triángulo de Texturas utilizado para la clasificación de los suelos.	56
9. Semilla de <i>Cyperus elegans</i> .	63
10. Procedimiento para medir el crecimiento y elongación radicular de las plántulas expuestas a los hidrocarburos.	64
11. Sobres de papel absorbente conteniendo las plántulas de cada tratamiento con hidrocarburos.	64
12. Plántulas control de <i>Cyperus elegans</i> de 25 días.	65
13. Muestras de los suelos analizados y utilizados en este trabajo.	70
14. Serie Experimental 3.	92

INDICE DE CUADROS, FIGURAS Y GRÁFICAS (continuación).

Gráficas.	Página.
1. Resultados del fraccionamiento de los hidrocarburos presentes en las muestras de suelo contaminado.	71
Germinación promedio observada por tratamiento:	
2. serie la.	74
3. serie lb.	74
4. serie 2.	74
5. serie 3.	75
6. serie 4.	75
7. serie 5.	75
Elongación Radicular promedio observada por tratamiento:	
8. serie la.	76
9. serie lb.	76
10. serie 2.	76
11. serie 3.	77
12. serie 4.	77
13. serie 5.	77
Crecimiento promedio observado por tratamiento:	
14. serie la.	78
15. serie lb.	78
16. serie 2.	78
17. serie 3.	79
18. serie 4.	79
19. serie 5.	79
Producción promedio de Biomasa en Peso Seco:	
20. serie la.	80
21. serie lb.	80
22. serie 2.	80
23. serie 3.	81
24. serie 4.	81
25. serie 5.	81
Contenido Promedio de Clorofila por tratamiento:	
26. serie 3.	82
27. serie 4.	82
28. serie 5.	82
29. Correlación Contenido Clorofila vs Concentración Hidrocarburos Integral.	83

ANEXO 1

Datos de la estación Meteorológica localizada en el Municipio de Minatitlán, Veracruz.

Numero	Estación	Coordenadas	Años	Ene.	Feb.	Mar.	Abr.	May.	Jun.	Jul.	Ago.	Sept.	Oct.	Nov.	Dic.	Anual	P/T	% P. INV.	OSC.	Tipo de Clima
30-066	Minatitlán (64m)	17°59'	T 40	22.7	23.3	25.5	27.4	28.6	28.2	27.7	27.6	27.5	26.2	24.5	23.2	26.0	88.8	9.1	5.8	Am(i')g
		94°32'	P 39	108.0	69.3	34.1	26.4	63.4	249.0	271.1	310.8	449.9	366.6	231.3	134.0	2313.9				

Fuente: García E. (1988). Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Köppen, UNAM, México, pp. 75, 192.

Número : Se refiere al número de la estación como aparece en la carta de climas de la Comisión de Estudios de Territorio Nacional (CETENAL) y en las del INEGI.

Estación : Nombre de la Estación Meteorológica.

Coordenadas: Coordenadas geográficas de la Estación.

T40 : Número de años que se consideraron para el promedio en el lapso 1921- 1980, la temperatura media de todos los meses del año y el promedio anual expresados en grados centígrados (°C).

P39: Número de años de servicio, las precipitaciones medias mensuales y la suma total anual, expresadas en milímetros (mm).

P/T: Índice de Humedad de Lang. Representa el cociente que resulta de la división entre la Precipitación total anual expresada en milímetros y la temperatura media anual, en grados centígrados.

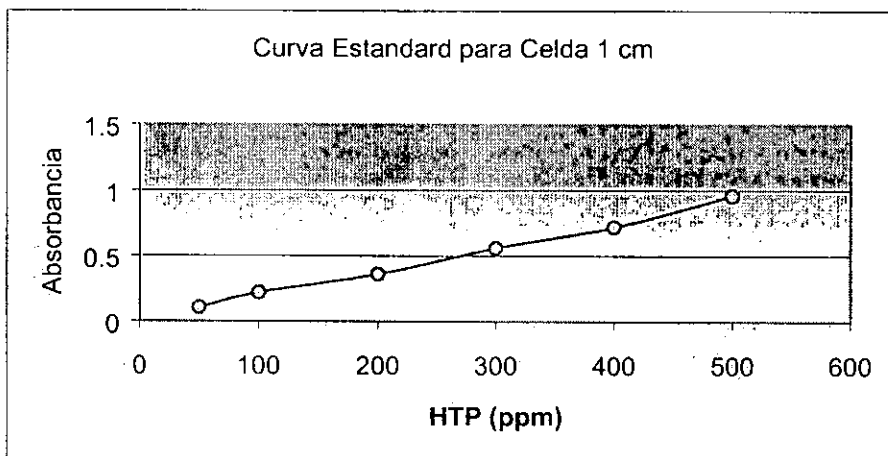
% P. INV.: Lluvia invernal. Es el porcentaje de la precipitación recibida en los tres meses invernales: enero, febrero y marzo, respecto de la total anual.

OSC. : Hace referencia a la diferencia entre el mes mas frío y el mas caliente, es decir, la oscilación anual de las temperaturas medias mensuales.

Tipo de clima : Se refiere a la categoría del clima según el sistema de clasificación climática de Köppen modificado por García (1987), para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana.

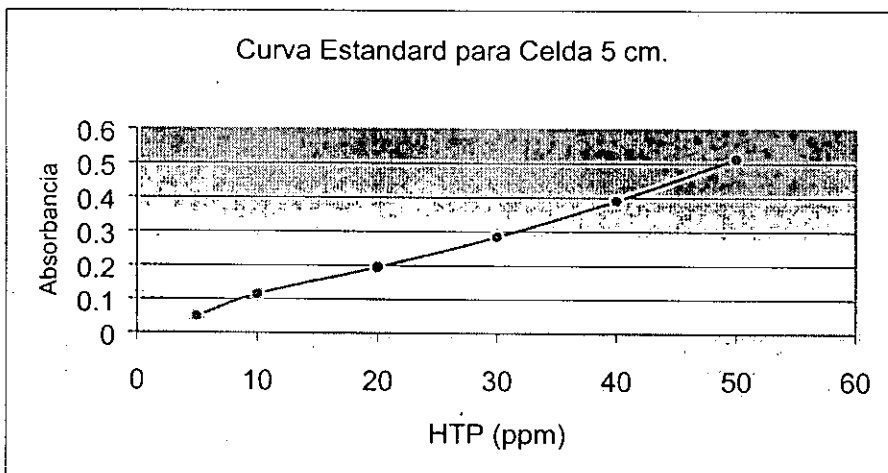
ANEXO 2a

Curvas de 6 puntos utilizadas para establecer la relación entre la absorbancia y la concentración de HTP.



Concentración	Absorbancia
50	0.105
100	0.218
200	0.360
300	0.561
400	0.719
500	0.959

Coefficiente de Correlación: 0.9976
 Pendiente: 0.0018
 Intersección: 0.0121



Concentración	Absorbancia
5	0.048
10	0.115
20	0.195
30	0.284
40	0.391
50	0.514

Coefficiente de Correlación: 0.9974
 Pendiente: 0.0100
 Intersección: -0.0001

Ejemplo de cálculo de HTP de una muestra:

Lectura dada por el equipo: .351
 Interpolación en la curva estándar:

$$Y = mx + b$$

$$Y - b$$

$$X = \frac{\dots}{m}$$

$$X = \frac{.351 - .0121}{.0018}$$

$$X = \dots$$

$$X = 188.27$$

Calculando según Formula (1) véase pag 54 :

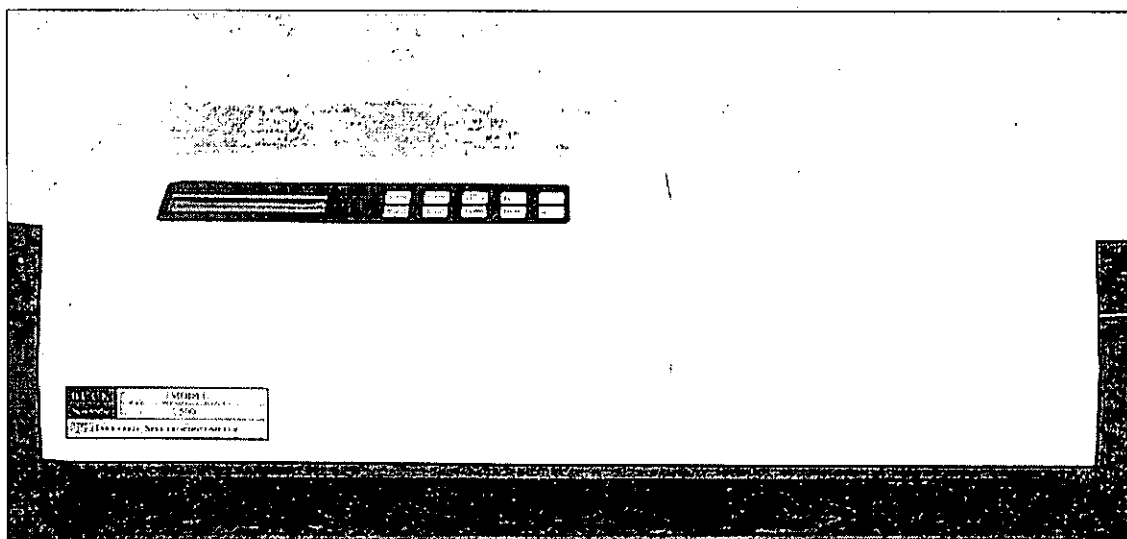
$$HTP (ppm) = \frac{C \cdot Ve \cdot F}{G s}$$

$$ppm = \frac{188.27 (100) (100)}{20}$$

$$ppm = 94,135$$

ANEXO 2 b

Espectrofotómetro Infrarrojo de Transformada de Fourier (FT-IR) utilizado para la cuantificación de los Hidrocarburos Totales del Petróleo (HTP) contenidos en las muestras de suelo del pantano de Santa Alejandrina.



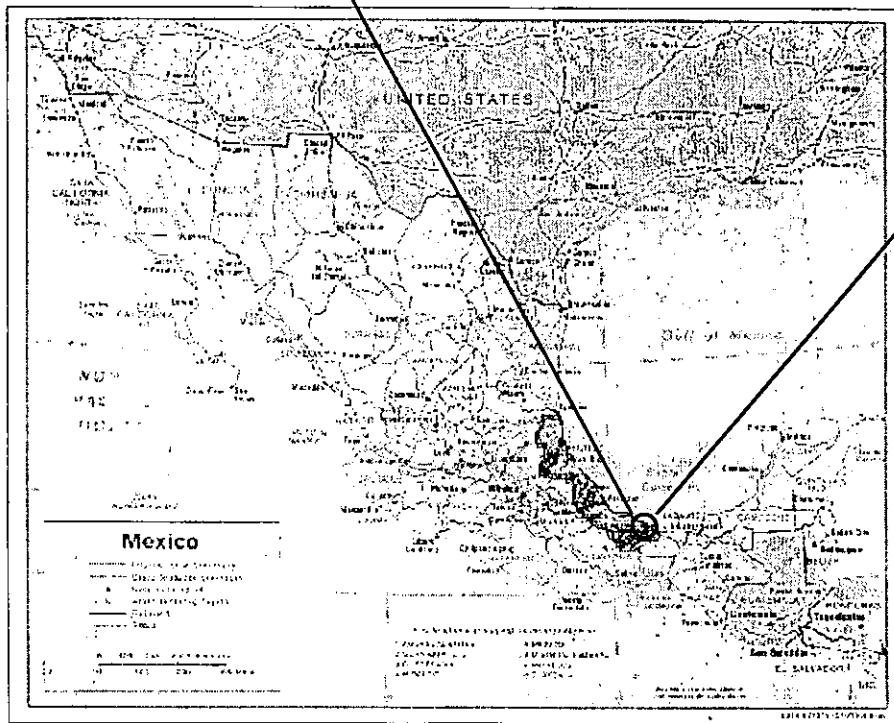
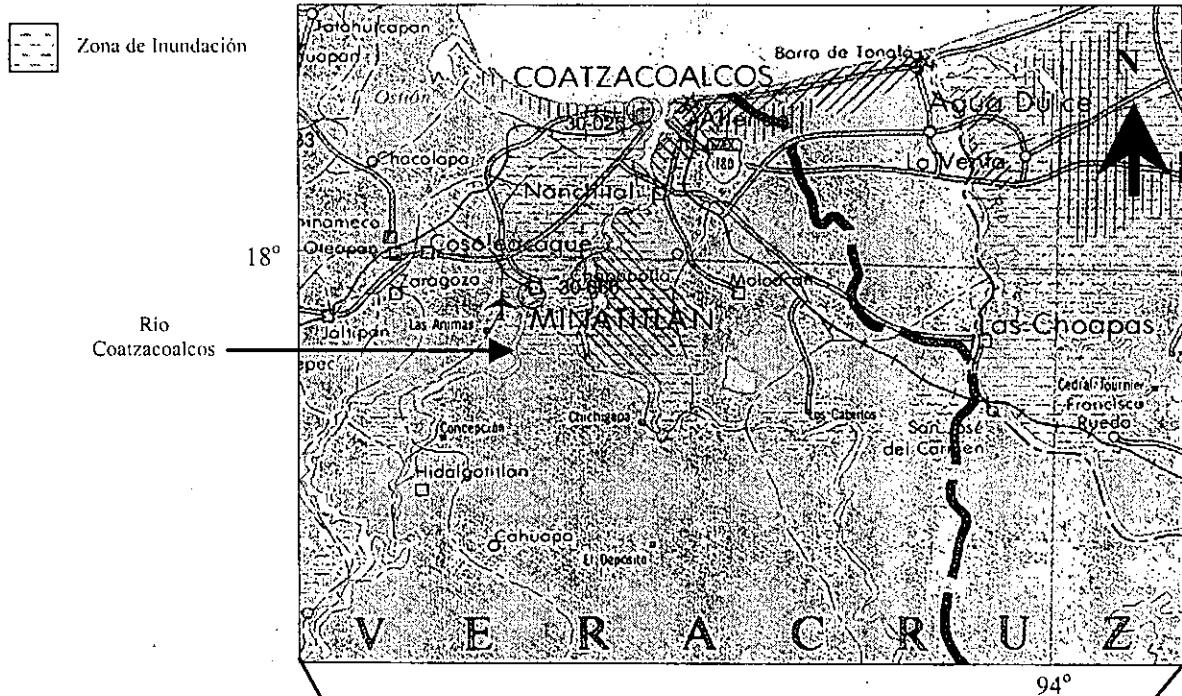
De acuerdo con Navarrete y Becerril (1996), los espectrofotómetros infrarrojos modernos son instrumentos automáticos, fáciles de operar y requieren un mantenimiento mínimo, existiendo principalmente dos tipos:

- 1) Espectrofotómetros de dispersión tradicional.
- 2) Espectrofotómetros de Transformada de Fourier (FT-IR).

Los instrumentos de dispersión tradicional emplean un enrejado de hierro para dispersar la radiación infrarroja proveniente de la fuente. La dispersión de la radiación se dirige hacia la muestra y después al detector. En contraste, el espectrofotómetro de Fourier dirige la radiación directamente de la fuente a la muestra.

ANEXO 3

Ubicación del área de estudio.



El pantano de Santa Alejandrina representa un área de 76 Kms² aprox., localizada en el municipio de Minatitlán.

Se ubica en el margen derecho del río Coatzacoalcos, con una elevación aproximada de 5 msnm.

Sus coordenadas geográficas son:

17° 59' 50" latitud N
94° 30' 00" latitud W