

10



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Estudio comparativo de la fitotoxicidad del Naftaleno
en dos especies de plantas superiores
Cyperus elegans y *Glycine max* (soya),
obtenidas bajo cultivos hidropónicos.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

BIOLOGA

P R E S E N T A

IVONNE ALONSO VALLE



DIRECTOR: M. en C. PAUL URIBE HERNÁNDEZ



**FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR**





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.



VNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito: "Estudio comparativo de la fito-
toxicidad del Naftaleno en dos especies de plantas superiores Cyperus elegans y -
Glycine max (Soya), obtenidas bajo cultivos hidropónicos".

realizado por Ivonne Alonso Valle

con número de cuenta 9204415-7 , quién cubrió los créditos de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

- ✓ Propietario M. en C. Raúl Uribe Hernández
- × Propietario M. en C. Juan Antonio Zermeño Eguía Lis
- × Propietario Biol. Lucía Salazar Coria
- ✓ Suplente M. en C. María Guadalupe Barajas Guzmán
- ✓ Suplente M. en C. Rosenda Margarita Ponce Salazar

[Handwritten signatures and initials]
 M. en C. María Guadalupe Barajas Guzmán
 Rosenda Margarita Ponce Salazar

FACULTAD DE CIENCIAS

Consejo Departamental de Biología

DRA. PATRICIA RAMOS MORALES



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

A mis Padres, por la valiosa oportunidad de vivir y de existir...

A Mamá

Por enseñarme a caminar y permitir que cada día mis pasos sean mas largos y firmes para llegar a la cima en la que ahora estoy parada contemplando el horizonte y soñando alcanzar una mas alta.

Gracias por tu vida, tu tiempo, tu dedicación y buenos consejos.

T. Z. M.

A mis hermanos

Julio César, por darme la oportunidad de conocer y compartir un mundo propio que mucha gente no puede comprender.

Wendy, por el tiempo que compartimos, los consejos, el apoyo, el cariño que nos une y por darme la alegría de ser tía por primera vez.

Por que siempre estamos juntos en las buenas y en las malas, los amo:

Tuonne

Agradecimientos

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

A la Productora Nacional de Semillas, por la generosa donación de semillas certificadas de Soya.

A mis asesores y sinodales....

Juan Zermeño, Raúl Uribe, Lucia Salazar, Benjamín Chávez, Margarita Ponce y Guadalupe Barajas por su asesoría, aportaciones y buenos consejos.

A mis amigos....

Lalo, Alfonso, Polo, José Luis y Mauricio, por su valiosa amistad, por estar conmigo en momentos importantes de mi vida y formar parte de mi mundo.

Resumen

Se evaluó y comparo el efecto del Naftaleno expuesto en forma de solución a concentraciones de 5,10,15,20,25 y 30 mg/L., en la germinación, producción de biomasa y contenido de clorofila en plantas de *Cyperus elegans* y *Glycine max*. Se utilizo el cultivo hidropónico como un método de obtención de plantas experimentales y una vía de exposición al naftaleno de las mismas, controlando las condiciones de luz, temperatura, humedad, y fotoperiodo, al que fueron sometidas. Además debido a las características propias del naftaleno, la solución fue recambiada periódicamente para mantener una misma concentración durante el periodo de prueba. De acuerdo al análisis estadístico aplicado en cada uno de los bio-ensayos estudiados en este trabajo, en ambas especies de plantas, no hubo respuesta tóxica al naftaleno, en las determinaciones de índice de germinación y en biomasa. Sin embargo en el parámetro del contenido de clorofila se observo una disminución del 50 % a concentraciones de naftaleno de 25 y 30 mg/L en las plantas expuestas de *Glycine max*, mientras que *Cyperus elegans* resultó ser una especie tolerante al naftaleno a concentraciones de 5 a 30 mg/L en este parámetro.

Índice

Agradecimientos

Resumen

	Página
1. Introducción.....	6
2. Antecedentes.....	9
2.1 Contaminación y Toxicidad.....	9
2.1.1 Bio-ensayos de toxicidad.....	10
2.1.2 Fitotoxicidad.....	11
2.2 Los Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP).....	12
2.2.1 Origen y Destino en el ambiente de los HAP.....	13
2.2.2 El Naftaleno.....	14
2.2.3 Mecanismos de toxicidad de los HAP en especies biológicas.....	16
2.3 Plantas superiores en suelos contaminados.....	17
2.3.1 Metabolismo de xenobióticos en plantas superiores.....	18
2.3.2 Parámetros fisiológicos utilizados en la evaluación de efectos fitotóxicos.....	20
- Germinación.....	20
- Producción de biomasa.....	20
- Pigmentos fotosintéticos y Síntesis de clorofila.....	21
2.4 Hidropónia.....	22
2.4.1 Asimilación y Transporte de agua y solutos en Plantas Superiores...	23
2.5 <i>Cyperus elegans</i>	24
- Clasificación taxonómica.....	24
- Descripción morfológica.....	24
- Distribución y hábitat.....	25
- Ciclo de vida y reproducción.....	25
- Características adaptativas.....	26
2.6 <i>Glycine max</i>	26

- Clasificación taxonómica.....	27
- Descripción morfológica.....	27
- Distribución y hábitat.....	27
2.7 Uso de plantas superiores en estudios ambientales.....	29
2.7.1 Fitorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos.....	29
- La biodegradación realizada por la rizósfera de las plantas.....	30
- La fitoacumulación.....	30
- La fitodegradación.....	30
- La fitoestabilización.....	30
2.7.2 Uso de Plantas superiores como biomonitores o bioindicadores de toxicidad.....	30
2.7.3 <i>Cyperus elegans</i> en estudios ambientales.....	31
2.7.4 Especies de plantas superiores utilizadas en estudios de fitotoxicidad con hidrocarburos.....	32
2.7.4.1 Efectos de los hidrocarburos sobre el desarrollo de las plantas.....	33
2.7.4.2 Asimilación de HAP por las plantas.....	36
Objetivos	37
Hipótesis.....	38
2 Material y Método.....	39
3.1 Obtención y tratamiento del material biológico.....	39
3.1.1 Prueba de viabilidad de achenios y semillas.....	39
3.1.2 Cultivos hidropónicos.....	41
3.2 Efectos del Naftaleno en plantas de <i>Cyperus elegans</i> Y <i>Glycine max</i>	42
3.2.1 Prueba de Toxicidad con plantas terrestres OPPTS-US EPA 850.4200 (1996).....	42
3.2.2 Determinación del efecto del Naftaleno en plantas de <i>Cyperus elegans</i> y <i>Glycine max</i>	43
3.2.3 Extracción y cuantificación de clorofila como un posible biomarcador de daño tóxico.....	44
3.3 Espectrofotometría.....	46
3.3.1 Espectrofotometría de luz visible.....	46

3.3.2 Espectrofotometría de luz ultravioleta.....	47
3.3.1.1 Barrido espectroscópico del naftaleno soluble en agua.....	48
3.3.1.2 Curva de calibración obtenida a partir de una solución saturada de naftaleno.....	49
3.3.1.3 Monitoreo del naftaleno residual.....	50
3.4 Análisis de datos.....	50
4. Resultados y análisis.....	56
4.1 Prueba de viabilidad de aquenios y semillas.....	56
4.2 Desarrollo de plantas en cultivos hidropónicos en solución.....	57
4.2.1 <i>Cyperus elegans</i>	57
4.2.2 <i>Glycine max</i>	57
4.3 Prueba de toxicidad con plantas terrestres OPPTS-US EPA 850.4200 (1996).....	60
4.4 Efecto en biomasa.....	62
4.5 Prueba de fitotoxicidad utilizando la cuantificación de clorofila como un biomarcador de daño metabólico.....	64
4.6 Monitoreo del naftaleno residual.....	67
Discusión.....	69
Conclusiones.....	76
Recomendaciones.....	78
Bibliografía.....	79
Índice de Tablas, Figuras , Gráficas y Fotos.....	85

Estudio comparativo de la fitotoxicidad del Naftaleno en dos especies de plantas superiores *Cyperus elegans* y *Glycine max*, obtenidas bajo cultivos hidropónicos.

1. Introducción

Sin duda la industria petrolera constituye una parte muy importante dentro de la economía de nuestro país, sin embargo, el manejo inadecuado de los residuos y desechos industriales, ha provocado una gran cantidad de problemas de contaminación e impacto ambiental. En donde la biosfera, ha quedado expuesta a muchos contaminantes y sustancias peligrosas causando diversos efectos en el ecosistema.

Un ejemplo de esto son los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP), grupo de compuestos derivados del petróleo al que pertenece el Naftaleno, que desde el punto de vista biológico reciben gran atención debido al potencial tóxico de varios de ellos al llegar a ser incluso cancerígenos y mutagénicos en organismos expuestos (Cerniglia,1992). Por lo que, varios estudios de impacto y contaminación ambiental se han enfocado al estudio y tratamiento de este tipo de contaminantes.

En este trabajo, se pretende evaluar y comparar la respuesta fitotóxica, por exposición a Naftaleno en condiciones hidropónicas en dos especies de plantas *Cyperus elegans* y *Glycine max*. Considerando que la valoración de efectos tóxicos provocados por contaminantes presentes en el ambiente en plantas superiores, permite proponer especies útiles para la evaluación, remediación y protección de sitios contaminados.

Cyperus elegans, es una planta silvestre que presenta la capacidad de adaptación y resistencia a condiciones desfavorables, tolerante a crecer en sitios altamente contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo (Zermeño *et al.*

2000) y *Glycine max*, una especie de planta domesticada, sensible a efectos tóxicos y a alteraciones de su entorno, recomendada por EPA (2000), para realizar pruebas de toxicidad y evaluar los efectos ecológicos de fuerzas antropogénicas que puedan tener impacto en el ambiente.

Tomando en cuenta que el Naftaleno, se encuentra en medios contaminados normal y en forma de muchos precursores y aunque algunas veces este compuesto en el ambiente, no llega a ser potencialmente dañino hacia los organismos expuestos, debido a su susceptibilidad a ser degradado por microorganismos y factores ambientales como luz y volatilidad (Neilson, 1998), es importante indagar si bajo ciertas condiciones de exposición puede ser tóxico el o alguno de sus derivados una vez que ha sido metabolizado o transformado por procesos ambientales y/o biológicos. Esto debido a que muchos compuestos xenobióticos no siendo tóxicos en el ambiente, al ser metabolizados por los diferentes organismos llegan a ser potencialmente dañinos, cuando los metabolitos de degradación llegan a ser más peligrosos dentro de los organismos vivos (Albert, 1990).

Por otro lado, según Halliwell (1987) y Matringe *et al.* (1989) una gran variedad herbicidas, heterocompuestos que presentan estructuras químicas similares a anillos aromáticos que constituyen al naftaleno, son capaces de tener efectos en la ruta de síntesis de clorofila como por ejemplo al inhibir el transporte de la cadena de electrones para la generación de ATP y NADPH. Tomando en cuenta que dentro de la ruta de biosíntesis de clorofila se llevan a cabo un sin número de reacciones químicas, Matringe (1989), propone moléculas como protoporfirinogen axidasa como un blanco molecular de compuestos xenobióticos como herbicidas difenil éter, citando que estos compuestos inducen una acumulación de protoporfirina IX en tejidos de plantas. Observándose efectos tóxicos como disminución o acumulación de pigmentos fotosintéticos, como la clorofila.

Conocer los efectos fitotóxicos, que puede producir el naftaleno bajo ciertas condiciones de exposición, en especies de plantas superiores con características

diferentes, para valorar y determinar los factores de riesgo asociados a su exposición así como el grado de tolerancia o sensibilidad de las plantas examinadas, en conjunto, puede aportar elementos para un estudio de control o prevención de daños ambientales mayores.

2. Antecedentes

El uso del petróleo y muchos de sus derivados en actividades industriales y domésticas, genera diversos contaminantes que al ser vertidos al ambiente y/o depositados de manera clandestina en lugares alejados, tiraderos, drenajes municipales, barrancas, ríos y lagunas entre otros, constituyen graves problemas de contaminación ambiental que pueden causar efectos tóxicos en el ecosistema. Un ejemplo de estos compuestos son los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP), grupo al que pertenece el Naftaleno, los cuales son considerados residuos peligrosos debido a sus características fisicoquímicas que provocan grandes niveles de contaminación residual en suelos y aguas (Cerniglia, 1992; Bouchez, *et al.* 1996).

En la búsqueda de soluciones adecuadas para el manejo de residuos como los HAP, muchos estudios científicos se han enfocado a su investigación con el fin de proponer e innovar tecnologías limpias cuyos avances puedan ayudar en los procesos de corregir y prevenir los problemas de contaminación, riesgo e impacto ambiental provocados por este tipo de compuestos.

En este sentido, se han desarrollado un conjunto de herramientas encaminadas a la producción de bienes y servicios mediante la utilización de sistemas biológicos (microorganismos, plantas superiores silvestres y domesticadas, o animales), con el objeto de disminuir la contaminación en el país, prevenir posibles daños irreversibles al ambiente o bien evaluar el grado de afectación de los contaminantes en los ecosistemas empleándolos como biomarcadores o bioindicadores de toxicidad.

2.1 Contaminación y Toxicidad

La contaminación se define como la presencia en el ambiente de uno o más contaminantes o cualquier combinación de ellos, que causan un desequilibrio

ecológico; entendiéndose por contaminante a toda materia o energía en cualquiera de sus estados físicos y formas, que al incorporarse o actuar en la atmósfera, agua, suelo, flora, fauna o cualquier elemento natural, altera o modifica su composición y condición natural (LGEPA, 2000).

Por otro lado, la toxicidad de una sustancia es su capacidad para causar daño en un organismo vivo y se determina según los efectos letales, crónicos o subcrónicos que pueden presentarse en diferentes organismos.

Todas las sustancias químicas son tóxicas en ciertas condiciones de exposición (Albert, 1990).

La respuesta de los seres vivos a los efectos provocados por un compuesto xenobiótico, varía considerablemente de un organismo a otro, ya que además de depender de la concentración y de las propiedades toxicológicas de cada contaminante, depende también de las características fenotípicas, genotípicas, morfológicas y fisiológicas propias de cada especie biológica. (Wang y Freemark 1995).

2.1.1 Bio-ensayos de toxicidad

Los bio-ensayos de toxicidad son experimentos de laboratorio utilizados para evaluar los efectos tóxicos potenciales de contaminantes, sustancias químicas, muestras de agua-sedimento o suelos de un cuerpo receptor o efluentes industriales sobre los organismos vivos. Son empleados, para tratar de indagar la naturaleza y los mecanismos de las lesiones tóxicas en los organismos expuestos, los efectos se evalúan a partir de las respuestas de los organismos expuestos a las sustancias químicas probadas.

Entre los indicadores de toxicidad comúnmente evaluados se destacan los siguientes (Albert, 1990):

- ✓ Letalidad aguda
- ✓ Efectos subletales en organismos, plantas, mamíferos e invertebrados a nivel bioquímico, fisiológico, etológico etc.
- ✓ Teratogenicidad: cuando un compuesto causa defectos estructurales que afectan el desarrollo de un organismo
- ✓ Genotoxicidad-mutagenicidad: son los cambios que se producen en el material genético de la célula, pueden producir defectos de nacimiento o aborto.
- ✓ Carcinogenicidad: cuando una sustancia es capaz de producir cáncer.

2.1.2 Fitotoxicidad

La fitotoxicidad es la valoración en las plantas de los efectos causados por la exposición de estas a sustancias xenobioticas. Se evalúa mediante el análisis cualitativo y cuantitativo del efecto provocado en uno o más parámetros fisiológicos que se consideran relevantes o representativos a lo largo del desarrollo de una planta.

Los protocolos de pruebas de fitotoxicidad, son desarrollados para la aplicación en laboratorio de bioensayos enfocados hacia la valoración de la respuesta de plantas superiores tratadas con sustancias químicas probadas.

Los efectos de miden en:

- ✓ Parámetros morfológicos como son, la germinación de las semillas, la emergencia y alargamiento de las raíces, la producción de biomasa, el crecimiento y vigor vegetativo (Freemark *et al.* 1990).
- ✓ Parámetros bioquímicos, como cuantificación y cualificación de enzimas.
- ✓ Parámetros genéticos; prueba de macro y micro núcleos.
- ✓ Asimilación y translocación de xenobióticos.
- ✓ Bioconcentración y bioacumulación de xenobióticos en las plantas.
- ✓ Tolerancia y asimilación de contaminantes (Freemark *et al.* 1990).

2.2 Los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP)

Los HAP están constituidos por la unión de dos y hasta 7 anillos bencénicos fusionados, el número y arreglo de estos determina sus características físicas y químicas (Tabla 1), presentando en general bajos valores de solubilidad en agua, ya que son compuestos no polares, hidrofóbicos y lipofílicos (Mueller *et al.* 1998).

Tabla 1. Propiedades físicas, químicas y biológicas de 16 HAP de interés ambiental EPA (Environmental Protection Agency U.S.A), y 10 HAP seleccionados por VROM (Dutch Ministry of Housing and Environment) como indicadores de contaminación por HAP, indicados con * (Kotterman, 1998).

Compuesto HAP	Peso molecular	Formula molecular	Numero de anillos	Potencial carcinogénico	Log Kpa	Solubilidad en agua (mg L-1)	Enlistado como contaminante
Naftaleno*	128	C10H8	2		3.37	30	E
Acenaftileno	152	C12H8	3		4.07	3.9	E
Acenafteno	154	C12H10	3		4.33	3.5	E
Fluoreno	166	C13H10	3	--	4.18	2.0	E
Antraceno *	178	C14H10	3	--	4.45	7.3*10-2	E
Fenantreno*	178	C13H10	3	--	4.46	1.3	E
Fluoranteno*	202	C16H10	4	--	5.33	2.6*10-1	E
Pireno	202	C16H10	4	--	5.32	1.4*10-1	E
Benzo (a)	228	C18H12	4	+	5.61	1.4*10-2	E
Antraceno*							
Críseno*	228	C18H12	4	+/-	5.61	2.0*10-3	E
Benzo (b)	252	C20H12	5	++	6.57	1.2*10-3	
Fluoranteno							
Benzo (k)	252	C20H12	5	-	6.84	5.5*10-4	
Fluoranteno*							
Benzo (a)	252	C20H12	5	+++	6.04	3.8*10-3	E,W
Pireno*							
Dibenzo (a,h)	278	C22H14	5	+	5.97	5.0*10-4	E
Antraceno							
Benzo (g,h,i)	276	C22H12	6		7.23	2.6*10-4	E,W
Perileno*							
Indeno (1,2,3-cd)	276	C22H12	6	+	7.66	6.2*10-2	E,W
Pireno*							

-No carcinogénico, +/- incierto, + carcinogénico, ++ y +++ fuertemente carcinogénicos. Lista de contaminantes propuestos por Environmental Protection Agency (E) y World Health Organization (W).

Algunos de los HAP de bajo peso molecular (de 2 a 3 anillos) provocan graves efectos tóxicos, mientras que la biotransformación de moléculas de HAP de alto peso molecular (mas de 3 anillos), puede dar como resultado la generación de metabolitos intermediarios con alta actividad carcinogénica para el hombre y mutagenicidad en microorganismos (Sims y Overcash, 1983).

2.2.1 Origen y Destino de los HAP en el ambiente

Los HAP son el resultado de la combustión incompleta del petróleo y muchos de sus derivados, productos de procesos industriales, pirólisis y piro síntesis de materiales orgánicos, síntesis biológica y algunas veces en la cocción de alimentos (Lijinsky, 1991). Estos compuestos ingresan al ambiente por fuentes naturales como derrames de petróleo y procesos industriales, emisiones directas a la atmósfera por incineraciones, derrames crónicos de efluentes residuales o industriales, descargas accidentales durante el transporte, uso y disposición de productos del petróleo de los que se liberan altas cantidades de HAP al ambiente (Cerniglia, 1992).

Los HAP tienden a ser compuestos altamente recalcitrantes debido a la fuerte adsorción de las moléculas de alto peso molecular a la materia orgánica, esto se atribuye a su baja solubilidad, lo que provoca poca biodisponibilidad o asimilación por organismos vivos y como resultado generalmente persisten en suelos, sedimentos y están asociados con partículas suspendidas en el ambiente bajo diversas condiciones naturales (Cerniglia, 1992).

La biodegradación de los HAP está basada en su solubilidad y en sus características físicas y químicas, siendo en general lentamente degradados por diferentes microorganismos como hongos, bacterias y algas, especialmente los de bajo peso molecular como el Naftaleno, Fenantreno y Antraceno (Neilson, 1998).

Aunque muchas veces los HAP se encuentran en concentraciones traza en el ambiente, estos compuestos pueden ser transformados por mecanismos entre los

cuales se encuentran la biotransformación, la ozono-inducción, con la oxidación e hidroxilación y la foto-oxidación, volatilización o bien pueden ser bioacumulados por organismos vivos, (Fig. 1) (Cerniglia, 1992).

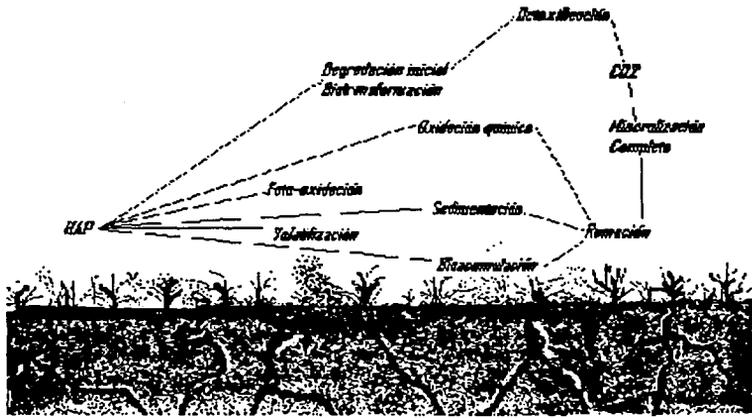


Fig. 1 Representación esquemática del destino ambiental de los HAP (Cerniglia, 1992).

Muchas veces la concentración de HAP disponible en el ambiente, depende de su destino (reacción y comportamiento) que influye en su distribución en los ecosistemas.

2.2.2 El Naftaleno

El Naftaleno es el mas pequeño en peso molecular de la familia de los HAP, su estructura molecular consta de la unión de dos anillos bencénicos fusionados, cuya formula química es $C_{10}H_8$ (Fig. 2). Se caracteriza por ser el más soluble de los HAP, lo que resulta en una mayor biodisponibilidad en el ambiente, siendo además el mas degradable de ellos, por medio de la actividad microbiana que depende de ciertos factores como son: la temperatura, tipo de suelo y la presencia de organismos capaces de degradarlo, como son algunas especies de bacterias,

hongos y algas (Liu *et al.* 1995; Volkering *et al.* 1993; Efrogmson y Alexander, 1991). Este compuesto también tiende a adsorberse a la materia particulada presente en el medio y debido a su bajo peso molecular puede ser afectado por procesos de volatilización y fotomodificación (Semple, 1997). En la Tabla 2 se presentan algunas de sus características físicas y químicas.

Tabla 2. Propiedades físicas y químicas del Naftaleno* (Semple, 1997)

Peso molecular (g/mol)	128.16
Punto de fusión (°C)	80.28
Punto de ebullición (°C)	217.95
Solubilidad (acuosa, mg/l)	30
Presión de vapor (Torr)	0.082
Constante de Henry (atm·m ³ /mol)	4.27E-04
Volumen Molar (Cm ³ /mol)	148
Calor de vaporización (KJ/mol)	43.2
Volumen Molecular (Angstroms ³)	126.9
Área superficie molecular (Angstroms ²)	155.8

* Datos obtenidos de la Fuente <http://www.eng.clemson.edu/ees/lee/pahs.html>

El Naftaleno es un compuesto químico industrial importante, su apariencia física es la de un sólido cristalino de color blanco, muy volátil y con un olor característico. El carbón alquitranado y el petróleo son sus principales rutas de origen, y numerosos compuestos químicos industriales derivados son manufacturados a partir de él (Stanley, 1992).

El Naftaleno es un compuesto que por sus características físicas y químicas es uno de los HAP mas biodisponibles para muchas especies de microorganismos como hongos, bacterias y algas los cuales tienen la capacidad de degradar, transformar e incluso metabolizar a este compuesto (Cerniglia, 1992; Kotterman, 1998), por lo cual se han realizado un sin numero de trabajos al respecto.

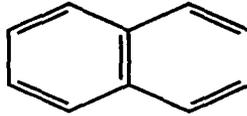


Fig. 2 Naftaleno HAP

2.2.3 Mecanismos de toxicidad de los HAP en especies biológicas.

Los mecanismos de toxicidad de HAP mas comunes en organismos vivos, se enlistan a continuación:

- a) **Narcosis no polar;** Es un modo específico de toxicidad causada por la alteración física de la membrana biológica ocasionada por los HAP. La narcosis puede desarrollarse relativamente rapido durante un tiempo de exposición corto y es un fenómeno típicamente observado en experimentos de toxicidad aguda (Neilson, 1998).

- b) **Fototoxicidad;** Es el fenómeno que incrementa la toxicidad de ciertos HAP en presencia de luz U.V. La luz induce la formación de radicales libres y subsecuentemente el daño a una variedad de macromoléculas sensibles a este mecanismo de toxicidad, pudiendo desarrollarse relativamente rápido y ser observado en experimentos de toxicidad aguda y crónica (Neilson, 1998).

- c) **Activación bioquímica y formación subsecuente de aductos;** Durante la transformación enzimática, ciertos HAP son transformados en compuestos altamente reactivos que pueden formar enlaces covalentes con macromoléculas semejante a las proteínas y aductos en el ADN. Los aductos de ADN pueden originar mutaciones que pueden resultar en carcinogénesis y teratogénesis que son los resultados típicos de

experimentos de toxicidad crónica, que se desarrollan en largos periodos de tiempo (Neilson, 1998).

- d) Alteración de la regulación hormonal; Esta es solo una evidencia circunstancial para este mecanismo de toxicidad, que se piensa ocurre por interacción directa de metabolitos de HAP con receptores hormonales, mimetismo de hormonas o indirectamente por interferencia con el metabolismo hormonal. Este tipo de toxicidad toma algún tiempo de desarrollo y requiere una exposición crónica (Neilson, 1998).

2.3 Plantas superiores en suelos contaminados

Dentro del grupo de las plantas superiores se encuentran especies con características genotípicas y fenotípicas que en ocasiones resultan favorables para su desarrollo en sitios inadecuados, siendo resistentes a diferentes tipos de estrés y variaciones ambientales extremas (Salisbury, 1994).

La presencia de contaminantes en el suelo se puede reflejar de forma directa sobre la vegetación, por la reducción del número de especies presentes en el, o bien hay acumulación de algunos compuestos contaminantes sin generar daños notables en las plantas debido a su alta capacidad para bioconcentrar y metabolizar (Gunter *et al.* 1996), lo que significa un peligro potencial para los organismos de eslabones superiores que participan en la cadena alimenticia.

Las plantas superiores son componentes esenciales de los ecosistemas al ser fuente de alimentación, proporcionar refugios y albergues de anidación para otros organismos, incluyendo insectos, invertebrados, peces, anfibios, aves y mamíferos, además de participar en los procesos de los ciclos de nutrientes, suelos y estabilización de sedimentos (Powell, 1997).



Fig. 3 Planta superior en suelo

Muchas especies de plantas superiores, pueden ayudar directamente a la transformación de los contaminantes, por procesos como bioacumulación, biodegradación o volatilización de los contaminantes presentes en el suelo. En ocasiones pueden convertirlos a metabolitos menos tóxicos o bien, estimular su degradación mediante la acción de la microflora de la rizosfera (Fig. 3), por medio de la excreción de exudados que son liberados por la raíz, tales como carbohidratos, aminoácidos y enzimas, contribuyendo así a la depositación de carbono orgánico en el suelo (Wang *et al.* 1997).

2.3.1 Metabolismo de xenobióticos en plantas superiores

Muchos contaminantes químicos en el ambiente, pueden ser metabolizados o integrados en algunas etapas que forman parte del desarrollo de los seres vivos, (Shimabukuro y Walsh, 1979).

Los procesos biológicos que modifican la estructura de los compuestos químicos dentro de las células o en los ecosistemas, pueden ser o no mediados por procesos enzimáticos que pueden ocurrir dentro y fuera de los organismos esto es, en el suelo por la actividad microbiana, o en la superficie de las hojas o dentro de la planta (Anderson *et al.*, 1997).

La naturaleza química, la cantidad de metabolitos intermedios y los residuos insolubles en las plantas están influidos por los sitios de absorción, transporte, distribución y tiempo de residencia del contaminante en la planta. Las raíces y la superficie de las hojas son los principales sitios de absorción, mientras que el transporte y distribución se llevan a cabo por el sistema vascular (xilema y floema) donde se encuentra la mayoría de los centros de actividad metabólica. Los mecanismos de biotransformación están basados en los sistemas enzimáticos de las plantas y las reacciones más importantes son las de oxidación, hidroxilación y en menor medida las de reducción (Wain y Carter, 1967).

La mayoría de los sistemas enzimáticos en los seres vivos participan en oxidaciones, hidroxilaciones y conjugaciones y están asociadas al sistema de las monooxigenasas de función mixta (MFO) del cual forman parte los citocromos P-450.

El citocromo P450 es un grupo de moléculas que participan en la detoxificación de los organismos vivos, las enzimas dependientes de citocromo p450 son importantes en la biosíntesis de muchas sustancias y en la desintoxicación de xenobióticos. En plantas, están implicadas en la biosíntesis de los productos secundarios (flavonoides, alcaloides) y de las hormonas pero también en la desintoxicación de los herbicidas y de otros xenobióticos (Stanley, 1992) catalizando la transformación de distintos pesticidas, mediante reacciones de oxidación.

2.3.2 Parámetros fisiológicos utilizados en la evaluación de efectos fitotóxicos

- **Germinación**

Una de las etapas mas importantes dentro del desarrollo de una planta es la germinación de la semillas y la emergencia del primer cotiledón. La mayoría de las semillas tienen algún tejido de almacenamiento de reservas del cual son tomadas las sustancias necesarias para el crecimiento subterráneo de la planta, hasta cuando pueda efectuar fotosíntesis y proveerse por si misma los nutrimentos necesarios para su crecimiento y desarrollo. En las gramíneas este tejido de reserva es el endospermo y en la mayoría de las dicotiledóneas son los cotiledones (Salisbury, 1994).

En términos generales, la germinación tiene cuatro grupos de procesos: a) la imbibición o toma física de agua. El proceso físico más que el metabólico tiene lugar en esta primera etapa, b) La formación de los sistemas enzimáticos. La semilla desarrolla los sistemas metabólicos necesarios para crecer y las enzimas de los mismos. Se inicia la síntesis de proteínas y ARN, c) la iniciación del crecimiento y emergencia de la radícula y d) el crecimiento de la plántula (ICA, 1985).

- **Producción de biomasa.**

Una de las expresiones del fenotipo de una planta es el rendimiento y una de las formas en las que se expresa es la cuantificación de biomasa en peso seco. El término biomasa se refiere a toda la materia que puede obtenerse mediante la fotosíntesis. (Salisbury, 1994).

- Pigmentos fotosintéticos y Síntesis de clorofila

La clorofila es un pigmento importante en las plantas y su cantidad está relacionada con su capacidad fotosintética.

Las plantas superiores contienen dos formas de clorofila designadas como clorofila-a y clorofila-b (Fig. 4). Ambas clorofilas difieren una de otra en sus estructuras moleculares y en sus propiedades específicas de absorción.

La energía absorbida es transferida a una molécula de clorofila-a, la cual es transformada a energía química durante el curso de la fotosíntesis en las hojas de las plantas verdes. La clorofila b es un pigmento accesorio que sirve para aumentar el rango de iluminación, y generalmente constituye alrededor de un cuarto del total del contenido de clorofila, aunque en algunas especies de plantas superiores esta proporción cambia (Salisbury, 1994).

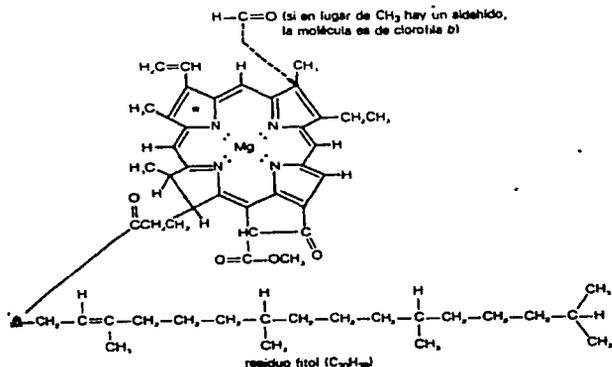


Fig. 4 Estructura molecular de la clorofila a y b (Salisbury, 1994)

La síntesis de clorofila es modulada por ciertos factores externos, siendo dos los más importantes; la luz y la nutrición mineral. El desarrollo de cloroplastos

depende en gran medida de la formación de clorofila y, por lo tanto, de estos dos factores. Todas estas respuestas conducen, en cuestión de pocas horas, a la fotosíntesis en las hojas de pasto cuando estas surgen del coleóptilo, y en cotiledones u hojas jóvenes de dicotiledóneas cuando éstas emergen del suelo. En la oscuridad no se forma clorofila y se bloquea el desarrollo de los cloroplastos (Lehninger, 1985).

La clorofila ha sido utilizada en estudios de los efectos de estrés ambiental en plantas, desde la reducción de fotosíntesis en plantas expuestas a condiciones adversas, como deficiencia de agua, temperatura, deficiencia de nutrientes, agentes de contaminación y ataque por patógenos (Matringe *et al.* 1989; Ralph y Burchett 1998).

2.4 Hidroponía

La hidroponía es un método de cultivo de plantas en el que se utiliza como sustrato agua o un medio sólido inerte que cumple 2 funciones esenciales: Dar soporte a las raíces protegiéndolas de la luz y permitiéndoles respirar y por otro lado, contener el agua y los nutrientes que las plantas necesitan (Sánchez y Escalante, 1981).

Para asegurar un buen crecimiento todas las plantas requieren agua, luz, aire, sales minerales y un soporte para las raíces. En los cultivos hidropónicos, las plantas se desarrollan porque reciben una nutrición óptima y condiciones ideales.

Para desarrollarse necesitan absorber dióxido de carbono de los gases atmosféricos así como de elementos nutritivos y sales inorgánicas disueltas en el agua. Estas sustancias químicas son transformadas con ayuda de la energía luminosa en el proceso de fotosíntesis.

Los elementos considerados esenciales para el crecimiento de la mayoría de las plantas son: Carbono, Hidrógeno, Oxígeno, Nitrógeno, Fósforo, Potasio, Calcio,

Azufre, Magnesio (macronutrientes) y Hierro, Manganeso, Boro, Zinc, Cobre, Molibdeno, Cobalto y Cloro (micronutrientes).

Existen varios métodos de cultivo hidropónico, todos ellos basados en los mismos principios; la utilización de agua y fertilizantes químicos para nutrir a las plantas. Una de las principales ventajas que se obtienen de este tipo de cultivo, es la rápida obtención de plantas debido a un acelerado e inducido desarrollo. (Sánchez y Escalante, 1981).

2.4.1 Asimilación y Transporte de agua y solutos en plantas superiores.

El agua y los materiales disueltos en ella se desplazan por vías de transporte especiales siendo un recurso vital para los ecosistemas: el agua pasa del suelo a través de las raíces, tallos y hojas hasta la atmósfera.

Las sales inorgánicas y moléculas orgánicas circulan en muchas direcciones en el interior de una planta, estableciéndose un movimiento de agua y solutos diluidos a través del xilema en raíces y tallos.

Además de esto, el desarrollo de las plantas es influido por factores ambientales como temperatura, luz, gravedad, viento y humedad (Salisbury, 1994).

El movimiento en las plantas de los materiales disueltos en el agua se realiza por difusión, flujo masivo y osmosis.

Dado que todas las células pueden absorber ciertos solutos esenciales rápidamente por periodos prolongados, y muchas veces las concentraciones de estos se vuelven mucho mayores dentro de las células que en la solución del exterior. A este proceso de absorción se le conoce con el nombre de acumulación. En los seres vivos este proceso se define como bioacumulación y se define como "la

toma y retención de contaminantes del ambiente por organismos vía muchos mecanismos de ruta" (Connell y Miller 1984).

Las complejas estructuras de la raíz y partes aéreas de las plantas satisfacen la necesidad de estas de agua, aire y nutrientes por medio de una transferencia ordenada e integrada de materiales en el interior del vegetal, que se le conoce como translocación.

2.5 *Cyperus elegans* (Lineo) (Cyperaceae) Foto 1.

-Clasificación taxonómica (Tabla 3).

-Descripción morfológica

Las plantas de *Cyperus elegans* se caracterizan por ser hierbas perennes, cespitosas, verde glauco, de 20 a 75 cm de alto, viscosas. Tallos trígono o subcilíndricos, de 1.5 a 3.5 mm de ancho en la base, estriados, glabros. Hojas 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, carinadas, 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, cubiertos por una capa translúcida, anchamente obovoides, trígono, 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. (Adams, 1994).

-Distribución y hábitat

Estas plantas se encuentran en: el 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 m. Se desarrollan generalmente en pantanos salobres abiertos, potreros estacionalmente inundables, en su mayor parte cerca del mar. Florece y fructifica de febrero a noviembre (Diego y Fonseca, 1997).

-Ciclo de vida y reproducción

Las plantas de esta especie son perennes, pueden propagarse de dos maneras: reproducción sexual por dispersión de semillas (frutos o aquenios) o bien por reproducción vegetativa utilizando partes de la planta provista de yemas capaces de desarrollar tallos y raíces para dar origen a nuevas plantas (Diego y Fonseca, 1997).

Una de las características de la reproducción por semilla es la variación genética que puede darse dentro de un grupo de plantas. La variación dentro de las semillas es muy importante, ya que proporciona el material genético que permite la adaptación continua de una especie determinada al medio ambiente. Dentro de cada generación las plantas que estén mejor adaptadas a ese ambiente tienden a sobrevivir y a producir la generación siguiente.

Los descendientes formados de manera vegetativa difieren radicalmente de los producidos por semilla en características tales como tamaño, tiempos de producción, eficiencia de dispersión y ritmos de mortalidad, por lo que se puede esperar que añadan dimensiones completamente diferentes a la ecología de la especie o de la población.

Estas plantas presentan una alta producción de semillas y/o estructuras reproductoras vegetativas; llegando algunas a producir 200 000 o más semillas por planta (Adams, 1994).

-Características adaptativas

Las plantas de la familia Cyperaceae tienen características especiales que les permiten adaptarse a diferentes medios. Esta adaptación depende de factores como:

- ✓ *Su ciclo de vida* que les permite una mejor competencia para su adaptación al medio.
- ✓ *Velocidad de crecimiento*. un rápido desarrollo de las raíces y partes aéreas, les da mayor capacidad de absorción de agua y nutrientes, y mayor área fotosintética.
- ✓ *Plasticidad de las poblaciones*, es decir que al establecerse una población de invasoras el número inicial de plántulas es elevado, tal que le permite llegar a la madurez con un número reducido de individuos vigorosos.
- ✓ *Prolificidad*. Tanto de una alta producción de semillas y/o estructuras reproductoras vegetativas.
- ✓ *Versatilidad de Germinación de las semillas*: Las semillas germinan en diferentes épocas del año o bien pueden conservar su viabilidad por largo tiempo, pudiendo permanecer en latencia por largo tiempo.
- ✓ *Adaptación*. Las plantas de este género son bastante flexibles a variaciones de las condiciones ambientales, adaptándose a sequías o inundaciones, falta de luz o espacio.

2.6 *Glycine max* (Merr) (Fabaceae) Foto 2

-Clasificación taxonómica (Tabla 3).

-Descripción morfológica

La soya es una planta erguida, anual grande, pubescente, de 0.5 a 1.5 m de altura con hojas trifoliadas (tréboles), con folíolos ovales y pubescentes. Flores pequeñas de color blanco o púrpura y vainas cortas que encierran entre una y cuatro semillas. Cuando la planta alcanza la madurez, entre 100 y 150 días después de la plantación, según la variedad, el lugar y el clima, las hojas viran al amarillo y caen, mientras que las vainas adquieren en poco tiempo color tostado y se secan. Las semillas, casi esféricas, suelen ser de color amarillo claro, y también negro, castaño o verde en ciertas variedades raras. El hilo o cicatriz es negro, castaño o amarillo. Las semillas contienen alrededor de un 20% de aceite y un 40% de proteínas (PRONASE, 2000).

-Distribución y hábitat

La variedad Huasteca 2000 tiene su mejor adaptación en regiones con clima cálido húmedo y subhúmedo con precipitaciones anuales de 800 a 1000 mm. Temperaturas medias de 25 a 27 °C, fotoperíodos de 13 horas luz y prosperan satisfactoriamente en suelos vertisoles (<http://ns.minae.go.cr/estrategia/estudio/sp-cultivadas.html>).

La mejor zona de adaptación, son las áreas soyeras del sur de Tamaulipas, las cuales se ubican principalmente en los municipios de Aldana, Altamira, Gómez Farias, González y Mante. Lo mismo pueden sembrarse en el Oriente de San Luis Potosí y el Norte de Veracruz ya que las condiciones de clima y suelo son similares a las del sur de Tamaulipas (PRONASE, 2000). Las plantas de *Glycine max* presentan un ciclo de vida anual.

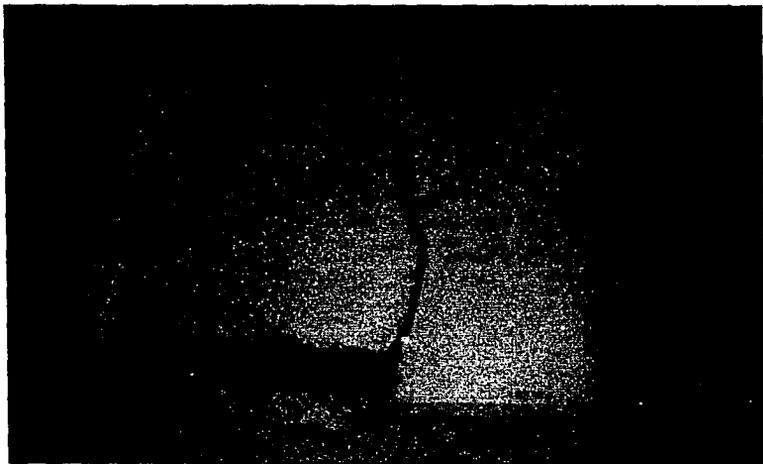
Reino	Filum	Clase	Orden	Familia	Genero	Especie
Plantae	Magnoliophyta	Liliopsida (monocotiledónea)	Cyperales	Cyperaceae	<i>Cyperus</i>	<i>Cyperus elegans</i>
		Magnoliopsida (dicotiledónea)	Rosidae Fabales	Fabaceae (leguminosae)	<i>Glycine</i>	<i>Glycine max</i>

Tabla 3. Clasificación taxonómica de las plantas utilizadas en este trabajo.

Foto 1. *Cyperus elegans* L., Herbario Nacional UNAM.



Foto 2. *Glycine max* M., Herbario Nacional UNAM.



2.7 Uso de plantas superiores en estudios ambientales

Debido a la importancia de las plantas en los ecosistemas y su respuesta al interaccionar con ciertos compuestos xenobióticos que forman parte del grupo de contaminantes ambientales, se ha considerado que algunas especies de plantas vasculares son útiles en procesos de remediación, estudios de contaminación ambiental, seguimientos, valoraciones toxicológicas y ambientales por lo cual, recientemente ha aumentado el uso de plantas superiores acuáticas y terrestres para remediar, evaluar y prevenir problemas de contaminación ambiental.

Esto a partir de la cualificación y la cuantificación de efectos morfológicos y fisiológicos así como de la utilización de biomarcadores de toxicidad que implican la medición de respuestas de las plantas utilizadas, en diversos niveles de organización biológica, fisiológica, histológica, bioquímica y molecular.

2.7.1 Fitoremediación de suelos contaminados con Hidrocarburos

La fitoremediación de suelos contaminados, es una forma de tratamiento biológico de bajo costo en la que se utilizan las plantas superiores para transformar, transferir, estabilizar y/o para eliminar contaminantes del suelo y del sedimento, este método es aplicable para la remediación de suelos o aguas contaminadas con compuestos inorgánicos como metales o bien orgánicos como pesticidas, solventes, y compuestos derivados del petróleo, entre los que se encuentran los HAP (Schwab y Hsu, 1996).

Esta tecnología es relativamente nueva y aún se encuentra en proceso de perfeccionamiento, sin embargo se trata de un proceso lento de bajo costo que no daña al medio ambiente. Por lo pronto los suelos contaminados y tratados con esta técnica, frecuentemente han presentado concentraciones finales más bajas en comparación con sitios igualmente dañados y con ausencia de plantas (Cunningham, 1996).

Los posibles procesos en los cuales las plantas participan en la atenuación de los niveles de contaminación de suelos y aguas en esta forma de tratamiento biológico son:

- ✓ **La biodegradación realizada por la rizosfera de las plantas utilizadas**
Ocurre en el suelo circundante a las raíces de la planta (suelo rizosférico). Una de las funciones principales de las raíces de las plantas, es absorber las sustancias nutritivas, sales minerales que le sirven como alimento, pero además alberga muchos microorganismos que realizan actividades biológicas específicas en beneficio de la planta. Las raíces también aflojan al suelo y después mueren, dejando los caminos para el transporte de agua y de la aireación.
- ✓ **La fito-acumulación** es la toma o asimilación de contaminantes a través de las raíces de la planta y su acumulación en los tejidos de la planta, tal y como sucede con los metales pesados y el lirio acuático.
- ✓ **La fitodegradación** es el metabolismo de contaminantes dentro de tejidos o células vegetales. Las plantas producen las enzimas tales como peroxidasas y lacasas, que ayudan a catalizar la degradación de estos compuestos.
- ✓ **La fitoestabilización** es el fenómeno de la producción de compuestos químicos por las plantas, para inmovilizar contaminantes en la interfase de raíces y del suelo (Wang *et al.*, 1997)

2.7.2 Uso de plantas superiores como biomonitores o bioindicadores de toxicidad

Muchas especies de plantas superiores han sido empleadas como biomonitores o bioindicadores de toxicidad al ser expuestas a estrés por el aumento de la concentración del contaminante en estudio (Wang *et al.* 1997).

Es importante considerar la bio-disposición del compuesto y la duración en tiempo del contacto que tiene el organismo en él o los contaminantes.

Estudios de laboratorio y de campo han demostrado que el uso de especies vegetales es útil para el seguimiento y la valoración de la toxicidad debido a la contaminación por herbicidas, efluentes y químicos industriales. Por medio de estos se evalúa la toxicidad de los compuestos, que se refleja en los efectos producidos en las plantas expuestas, para lo cual se consideran los parámetros morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y genéticos aplicados en estudios para determinar la tasa relativa de degradación y toxicidad.

Las plantas responden a diferentes tipos de estrés, como variaciones de temperatura, luz, humedad, deficiencia o exceso de nutrientes entre otros.

La EPA (2000), recientemente ha publicado un libro en el que recomienda el uso de plantas vasculares acuáticas y terrestres para evaluar los efectos ecológicos de fuerzas antropogénicas que puedan tener impacto en el ambiente.

2.7.3 *Cyperus elegans* en estudios ambientales

Cyperus elegans es una especie de plantas silvestres con la capacidad de ser muy resistentes y tolerantes a perturbaciones ambientales, crecen en una zona pantanosa al sur del estado de Veracruz cuyo suelo se encuentra altamente contaminado con hidrocarburos derivados del petróleo. A partir de varios estudios se ha determinado que estas plantas favorecen la degradación de algunos contaminantes presentes en el suelo por lo cual han sido propuestas como una especie participante en el proceso de fitoremediación (Foto 3) (Zermeño *et al.*, 2000).

Foto 3. Planta adulta de *Cyperus elegans* en su hábitat natural.

Nombre científico;	<i>Cyperus elegans L.</i>
Familia;	Cyperaceae
Localidad;	Zona pantanosa, Santa Alejandrina Veracruz.
Tipo de vegetación;	Agrupación en macollos, plantas herbáceas
Información ambiental;	Muy perturbado
Suelo;	Arenoso, inundable
Asociada;	Gramínea
Abundancia;	Muy abundante
Forma biológica;	Hierba
Ciclo de vida;	Perenne
Fruto	aquenio

2.7.4 Especies de plantas superiores utilizadas en estudios de fitotoxicidad con hidrocarburos.

Las plantas superiores están siendo usadas para mejorar la remediación de suelos contaminados con compuestos orgánicos recalcitrantes como los hidrocarburos, muchas especies han sido probadas y evaluadas en estudios de fitotoxicidad de laboratorio y campo. (Anderson *et al.* 1997; Gunter *et al.*, 1996; Huang *et al.* 1996;

Liste y Alexander, 2000; Powell, 1997; Ralph y Burchett, 1998; Ren *et al.*, 1996; Schwab y Hsu, 1996; Swarts y Jones, 1997). De esta forma se han determinado una serie de factores que favorecen a ciertas especies de plantas vasculares como posibles candidatos para ser utilizadas en estudios ambientales de valoración, prevención, y atenuación de riesgos ambientales. A continuación se presenta una lista de nombres científicos de algunas de las especies de plantas vasculares que han sido utilizadas en diversos estudios en donde interaccionan con substratos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo.

Especies de plantas superiores utilizadas en estudios con hidrocarburos.

Nombre científico	Especie	Referencia
<i>Avena sativa</i> L.	Gramínea	Schwab <i>et al.</i> , 1998
<i>Brassica napus</i>	Cruciferae	Ren <i>et al.</i> 1996
<i>Buchloe dactiloides</i>	Gramínea	Qiu X <i>et al.</i> 1997
<i>Cucumis sativus</i> L.	Cucurbitaceae	Schwab <i>et al.</i> , 1998
<i>Daucus carota</i> .	Apiaceae	Schwab <i>et al.</i> , 1998
<i>Glycine max</i>	Leguminosae	Sandermann, 1984; Schwab <i>et al.</i> 1998
<i>Halophila ovalis</i>		Ralph y Burchett 1998
<i>Hordeum vulgare</i> L.	Poaceae	Schwab <i>et al.</i> , 1998
<i>Ipomoea alpina</i>	Convolvulaceae	Cunningham <i>et al.</i> , 1996
<i>Lolium perenne</i> L.	Poaceae	Gunther <i>et al.</i> , 1996
<i>Medicago sativa</i>	Alfalfa	Euisang, 1993
<i>Petroselinum hortense</i> .	Apiaceae	Sandermann, 1984; Schwab <i>et al.</i> 1998
<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Fabaceae	Edwards, 1983; Schwab <i>et al.</i> , 1998
<i>Pisum sativum</i> L.	Fabaceae	Schwab <i>et al.</i> , 1998
<i>Rhaphanus sativus</i> L.	Brassicaceae	Schwab <i>et al.</i> , 1998
<i>Thlaspi caurulescens</i>	Cruciferae	Cunningham <i>et al.</i> 1996
<i>Thlaspi rotundifolium</i>	Cruciferae	Cunningham <i>et al.</i> 1996

2.7.4.1 Efectos de los hidrocarburos sobre el desarrollo de las plantas

Los hidrocarburos que se encuentran contaminando el suelo, generalmente tienen un efecto negativo en las comunidades vegetales. El modo en que los hidrocarburos actúan sobre las plantas es complejo e incluye el contacto tóxico directo y efectos

deletéreos indirectos mediados por las interacciones de los hidrocarburos con los componentes abióticos y microbianos del suelo (Bossert y Bartha, 1984). El contacto tóxico ocurre primeramente por el efecto del solvente de los hidrocarburos de bajo punto de ebullición, sobre la estructura de las membranas lipídicas de las células.

Dentro de cada clase de hidrocarburos la toxicidad esta correlacionada con el incremento del peso molecular e inversamente correlacionada con el incremento de la polaridad. El efecto indirecto de los hidrocarburos en el suelo, incluye una disminución en la cantidad de oxígeno disponible para las raíces de las plantas, debido al exhaustivo uso del oxígeno del suelo por los microorganismos para la degradación de los hidrocarburos. Tales condiciones anóxicas favorecen la producción microbiana de compuestos fitotóxicos como el H_2S . Los microorganismos degradadores de hidrocarburos, también compiten con las plantas por los nutrimentos minerales. Además de que el petróleo también afecta la estructura física del suelo, disminuyendo su capacidad para almacenar agua y aire (Wang *et al.*, 1997).

Las Plantas que crecen en suelos contaminados por hidrocarburos pueden presentar síntomas similares al efecto de la sequía, debido a que alrededor de la raíz se forma una película grasosa que impide la entrada de agua, esto no sucede con todas las especies de plantas, ya que se sabe que las gramíneas pueden adaptarse mejor a las condiciones mencionadas anteriormente y crecer sin muchos problemas (Anderson *et al.*, 1997). El agua representa un papel esencial en los procesos metabólicos y fisiológicos de las plantas, así como el transporte de sustancias y en el mantenimiento de la turgencia; una deficiencia de este elemento limita el crecimiento y desarrollo de la planta llegando al grado de aniquilarla en condiciones muy drásticas (Salisbury, 1994).

El estrés hídrico afecta diversos procesos anatómicos, morfológicos, fisiológicos y bioquímicos en algunas etapas de crecimiento de las plantas. Los efectos pueden ser disminución en el crecimiento de las hojas, en el rendimiento de

la materia seca, en la fotosíntesis, en la transpiración, cierre estomático, decremento de la concentración interna de CO_2 , reducción del área foliar, reducción de síntesis de ATP. El estrés hídrico también es usualmente acompañado por una disminución de citocininas en los exudados de la raíz lo que aparentemente se manifiesta en una interferencia en la síntesis de proteínas y RNA.

La translocación de los carbohidratos a través del floema disminuye también como respuesta a la sequía, el crecimiento celular es probablemente el proceso más sensible debido al déficit hídrico causado por la disminución de turgencia, la cual es indispensable para el alargamiento celular. El efecto anterior se refleja en la reducción del área foliar. La disminución en la humedad del suelo produce un cambio estomático y de transpiración, así como un efecto en la conductancia estomática de la hoja y en el aparato fotosintético.

La actividad fotosintética disminuye cuando el potencial de agua es restringido debido en parte al cierre estomático y en algunos casos al efecto directo en los cloroplastos. La reducción en el potencial de agua reduce la acumulación de clorofila en hojas etioladas debido a la inhibición en la formación de protoclorofila.

La raíz de las plantas absorbe los contaminantes orgánicos, los cuales pueden ser confinados en los tejidos de la planta en formas biológicamente menos disponibles. Otro proceso diferente que se ha observado además de la extracción de un contaminante orgánico presente en el suelo por plantas, es la acumulación en la raíz, la translocación al xilema y subsecuentemente su volatilización en la superficie de las hojas. Un contaminante orgánico presente en el suelo, puede ser degradado mineralizado por las plantas o por los microorganismos asociados a ella.

2.7.4.2 Asimilación de HAP por las plantas

La asimilación de HAP, ha sido estudiada en una amplia variedad de especies vegetales. A continuación se enlistan algunos ejemplos de estudios previos de plantas y HAP:

- Schwab *et al.*, (1998) estudió cultivos de zanahorias que fueron regadas con aguas residuales que contenían HAP, registrando la acumulación de HAP de bajo peso molecular en las capas mas externas de las raíces, las cuales se movieron al centro de la raíz probablemente debido a su moderada lipofilidad.
- Se evaluó la asimilación, translocación y metabolismo del antraceno al ser cuantificado en raíces de frijol que crecieron en una solución nutritiva con C¹⁴ antraceno, (Edwards, 1986). Se reportó que cerca del 60 % del total del C¹⁴ antraceno se encontró en las raíces durante la floración y la producción de semillas.
- (Kirchmann *et al.*, 1991) analizaron HAP, en *Hordeum vulgare L.*, crecidas en suelo regado con aguas residuales contaminadas con HAP, utilizando fertilizantes. Los hidrocarburos se acumularon en el grano en concentraciones traza, independientemente del tipo de tratamiento usado.
- El metabolismo del benzo (a) pireno fue estudiado en suspensiones de cultivos celulares en perejil *Petroselinum hortense* y *Glycine max*, (Sandermann, 1984). De 1.0 a 2.2 % de benzo (a) pireno fue absorbido por las células de perejil y 19 a 28 % por células de soya, indicando que la afinidad depende de la especie de planta.
- Un estudio comparativo de la absorción de naftaleno en raíces de dos diferentes plantas demostró que el contenido lipídico es un factor controlador en la adsorción de naftaleno en las raíces de plantas(Schwab *et al.*, 1998).

Objetivo General

Evaluar y comparar el efecto fitotóxico del naftaleno en plantas de *Cyperus elegans* y *Glycine max*, a través de la aplicación de bioensayos de toxicidad en plantas cultivadas bajo la técnica de hidroponía.

Objetivos Particulares

Determinar el efecto del naftaleno, aplicado a distintas concentraciones sobre la germinación de los achenios (frutos) y semillas de las plantas tratadas.

Evaluar el efecto tóxico del naftaleno a distintas concentraciones, en plantas de un mes de crecidas bajo cultivos hidropónicos, por medio de la cuantificación del contenido de clorofila y la determinación de parámetros morfológicos como talla y biomasa en peso seco.

Valorar el naftaleno residual aplicado a los diferentes tratamientos utilizando técnicas de espectrofotometría de luz U. V.

Conocer la respuesta de las especies de plantas experimentales bajo cultivo hidropónico.

Hipótesis

A partir de la evaluación de respuestas fitotóxicas como la inhibición de la germinación, producción de biomasa, crecimiento y contenido de clorofila, se espera un efecto fitotóxico diferencial entre *Glycine max* (planta domesticada de sensibilidad comprobada) y *Cyperus elegans* (planta silvestre con alta capacidad de adaptación y resistencia a condiciones desfavorables), considerando al cultivo hidropónico como una vía de exposición al naftaleno directa y adecuada, debido al control de las condiciones ambientales y de la biodisponibilidad. Debido a que la fitotoxicidad depende de la forma de exposición de las plantas al químico, del tipo de tóxico expuesto y de la biodisponibilidad del compuesto químico utilizado.

Por otro lado Halliwell (1987) y Matringe *et al.* (1989), observaron que una gran variedad herbicidas, heterocompuestos que presentan estructuras químicas similares a anillos aromáticos que constituyen al naftaleno, son capaces de tener efectos en la ruta de síntesis de clorofila como por ejemplo al inhibir el transporte de la cadena de electrones para la generación de ATP y NADPH. Además de que Matringe *et al.* (1989), propone moléculas como protoporfirinogen oxidasa como un blanco molecular de compuestos xenobióticos como herbicidas difenil éter, citando que estos compuestos inducen una acumulación de protoporfirina IX en tejidos de plantas. Observando efectos tóxicos como disminución o acumulación de pigmentos fotosintéticos, como la clorofila.

3. Material y Método

3.1 Obtención y tratamiento del material biológico

A partir de un espécimen adulto (planta madre), de *Cyperus elegans* (Foto 1), sustraído de un suelo contaminado con hidrocarburos, aledaño a una zona petrolera ubicada en la parte sur del Estado de Veracruz, fueron separados manualmente los aquenios o frutos (Foto 4) los cuales en la familia de las Cyperáceas, fungen como semillas para dar lugar a nuevas plántulas una vez emergido el cotiledón.

Por otro lado, se obtuvieron semillas certificadas de *Glycine max* Variedad Huasteca 2000 (Foto 5), a través de una donación de semillas certificadas por PRONASE, (Productora Nacional de Semillas).



Foto 4 Aquenios de *Cyperus elegans*.



Foto 5 Semillas certificadas de Soya, *Glycine Max*, Var. Huasteca 2000

Una vez obtenidos los aquenios y semillas de las especies experimentales, se sometieron a las pruebas que a continuación se detallan:

3.1.1 Prueba de viabilidad de aquenios y semillas.

Se determinó la viabilidad de los aquenios y semillas de las especies tratadas, asegurando una capacidad mínima del 85% para germinar bajo las condiciones de exposición descritas en la Tabla 4.

Tabla 4. Condiciones de exposición y ambientales para cada una de las pruebas realizadas con aquenios, semillas y plantas de *Cyperus elegans* y *Glycine max*.

Nombre de la Prueba o etapa experimental	Prueba de viabilidad y germinación de aquenios y semillas	Prueba de toxicidad y OPPTS-US EPA (germinación de las semillas y alargamiento radicular) 850-4200	Cultivos Hidropónicos (Obtención de plantas de 1 mes de desarrollo después de la germinación de las semillas para corridas experimentales).	Bioensayos de toxicidad aplicados a las plantas, evaluación en la producción de biomasa, efectos morfológicos y efectos fisiológicos como la cuantificación del contenido de clorofila
Condiciones experimentales				
Tipos de recipientes empleados y adaptaciones	Cajas petri de vidrio	Cajas petri de vidrio	Frascos de vidrio estériles cubiertos con plástico negro o papel aluminio	Frascos de vidrio estériles cubiertos con plástico negro y tapados con papel de teflón
# de Aquenios y Semillas o plantas por muestra	20	20	15 Plantas	5 Plantas
Sustrato empleado	Papel filtro de celulosa	Papel filtro en micro fibra de vidrio	Agua + solución nutritiva	Agua + solución de Naftaleno a diferentes concentraciones
Replicas por muestra	3	3	3	3
Duración de la prueba o etapa experimental	20 días	20 días	1 mes	20 días
Condiciones ambientales*				
Fotoperiodo	12-L/12-O horas			
Temperatura	5-30 °C	5-30 °C	5-30 °C	5-30 °C
Humedad relativa	60%	60%	60%	60%

*Para mantener estas condiciones se utilizó una incubadora Marca Hot Pack Phila, Pa.

- Antes de sujetarlas a cualquier prueba los frutos y semillas se desinfectaron con una solución de hipoclorito-agua 9-1 siguiendo el método descrito por Márquez (1986), para evitar la contaminación por microorganismos como hongos y bacterias.

3.1.2 Cultivos hidropónicos.

Para la obtención de plantas con la técnica de hidroponía, se utilizó el cultivo en solución (Sánchez y Escalante, 1981), el cual favoreció el desarrollo de las plantas experimentales con las raíces libres e inmersas en el medio acuoso.

Las plantas de *Cyperus elegans* y *Glycine max*, se mantuvieron hasta un mes en crecimiento después de la germinación de los achenios y semillas, en lotes de 75 plántulas cada uno. Los cuales se regaron con una solución nutritiva obtenida a partir de la fórmula recomendada por Salisbury (1994). Los nombres y las proporciones de sales minerales utilizadas se presentan en la Tabla 5. La solución nutritiva y los recipientes utilizados fueron cubiertos de alrededor para disminuir la luz hacia las raíces y evitar el desarrollo de microorganismos (Foto 6 y 7). Por otro lado se cultivaron lotes de plantas mantenidas únicamente con agua (testigos).

Los lotes experimentales se mantuvieron bajo las condiciones experimentales descritas en la Tabla 4. Después de un mes de crecimiento las plantas de los lotes cultivados en hidroponía para ambas especies experimentales, se compararon con los lotes de plantas mantenidas solo con agua.

Macronutrientes g/L	Micronutrientes g/L
0.15 g Sulfato de amonio	Sulfato de hierro 0.0003 g
0.75 g Nitrato de potasio	Sulfato de manganeso 0.0002 g
.37 g Fosfato de potasio	Acido bórico en polvo 0.0002 g
0.52 g Sulfato de Magnesio	Sulfato de Zinc 0.0001 g
0.56 g Sulfato de calcio	Sulfato de cobre 0.0001 g

Tabla 5 Lista de sales minerales para solución nutritiva de cultivos hidropónicos (Salisbury, 1994).

3.2 Preparación del Naftaleno expuesto a las plantas de *Cyperus elegans* y *Glycine max*.

Se preparó una solución saturada de Naftaleno, ($C_{10}H_8$) Grado Analítico 28002. *Kanto Chemical Co. Inc*), para obtener una concentración de 30 mg/L, utilizando como solvente agua desionizada estéril; la concentración se fijó con base a la máxima solubilidad del compuesto en agua. Dicha solución se mantuvo en agitación constante durante 24 h hasta alcanzar la saturación y fué almacenada en un frasco de color ámbar, herméticamente cerrado.

Se efectuó un barrido espectroscópico de muestras para determinar el pico de absorción más alto del Naftaleno soluble en agua. Por otro lado, se tomaron muestras de la solución y se cuantificaron por espectrofotometría de luz U.V., a una longitud de onda de 276 nm, obteniéndose una curva patrón de 1-30 mg/L para determinar la concentración real de las soluciones utilizadas en las diferentes pruebas, obtenidas a partir de diluciones de una solución madre de naftaleno en agua a 30 mg/L, así como también para determinar la concentración real de cada muestra. (*Ver espectrofotometria de luz U.V.-Vis*).

3.2.1 Prueba de Toxicidad con plantas terrestres OPPTS-US EPA 850.4200 (1996).

Este protocolo forma parte de una serie de guías para la prueba de efectos ecológicos, emitidas por la Oficina de Prevención, Plaguicidas y Sustancias Tóxicas(OPPTS) de la Agencia de Protección Ambiental de USA. (US-EPA 1996), para evaluar plaguicidas y sustancias tóxicas. La prueba se aplica para determinar los posibles efectos tóxicos de sustancias químicas sólidas o líquidas, incorporadas al sustrato, en la germinación de semillas y en estadios tempranos del desarrollo de algunas plantas terrestres.

Se evaluó la toxicidad aguda producida por el Naftaleno en la germinación de los achenios y semillas de las especies experimentales. Para ello se utilizaron

cajas petri de vidrio estériles, a cada una se le colocaron 2 capas de papel filtro de micro fibra de vidrio *Whatman*[®] GF/F 90 mm de diámetro, en el fondo y 20 aquenios o semillas, previamente desinfectadas (Tabla 4).

En total se realizaron 4 corridas experimentales por lote. Cada lote estuvo constituido por 7 grupos de 3 cajas petri cada uno, y cada grupo fue tratado con una solución de concentración de naftaleno diferente, (5 mg/L, 10 mg/L, 15 mg/L, 20 mg/L, 25 mg/L y 30 mg/L) además de un grupo testigo tratado únicamente con agua (Foto 8 y 9).

Las cajas petri se pesaron antes y después de la siembra, y cada 48 horas se recambio la solución, para mantener constante el volumen y la concentración de las soluciones. El registro de la germinación de los aquenios y semillas sembrados se tomo cada dos días durante un periodo de 20 días para cada corrida experimental.

3.2.2 Determinación del efecto del Naftaleno en plantas de *Cyperus elegans* y *Glycine max*.

Se utilizaron plantas de un mes de crecidas después de la germinación de los aquenios y semillas, cultivadas bajo la técnica hidropónica del cultivo en solución. En total se realizaron 4 corridas experimentales cada una de ellas formada por 7 lotes de 15 plantas con tres repeticiones, mantenidas en frascos de vidrio. Cada grupo de plantas experimentales se sometió a un medio líquido a concentraciones diferentes de naftaleno 5, 10, 15, 20, 25 y 30 mg/L respectivamente, además de un grupo testigo mantenido únicamente con agua. Las soluciones fueron recambiadas cada 48 horas para mantener las concentraciones constantes.

Los frascos utilizados se cubrieron alrededor con plástico negro, evitando la exposición de las raíces de las plantas y de la solución de naftaleno a la luz, para evitar la rápida foto degradación del compuesto y la contaminación por

microorganismos. Por otro lado, para disminuir la pérdida del compuesto por volatilización, los frascos se taparon de la boca con cinta de teflón (Foto 9 y 10).

La prueba se realizó manteniendo a las plantas bajo las condiciones ambientales descritas en la tabla 4., la prueba se dió por terminada después de un período de 20 días de exposición continua. Posteriormente se valoró el efecto tóxico del naftaleno aplicado a las plantas cuantificando la respuesta del daño tóxico.

- ♦ *Producción de biomasa.* Se valoró la producción de biomasa, cuantificada en el peso seco de cada una de las plantas experimentales. Para lo cual, en una balanza analítica, se tomó el peso inicial de las plantas. Posteriormente se mantuvieron cubiertas con papel absorbente durante 40 h. a temperatura ambiente y una vez secas, se pesaron para obtener el peso final.

3.2.3 Extracción y cuantificación de clorofila como un posible biomarcador de daño tóxico.

En esta etapa experimental, se siguió la técnica modificada propuesta por Liaaen-Jensen (1971), en la cual se plantea la separación de pigmentos basada en la polaridad que presenta cada uno de ellos a partir de pequeñas muestras de tejido vegetal. Salisbury (1992)., considera que los pigmentos presentes en las membranas tilacoidales se agrupan básicamente en dos grupos; dos tipos de clorofilas (verdes) clorofila-a y clorofila-b, y pigmentos amarillo-naranja que se clasifican como carotenoides, los carotenos (no polares) que son hidrocarbonados puros, y las xantofilas (polares), que contienen oxígeno.

Con base a la polaridad característica de cada uno de los diferentes pigmentos presentes en las hojas de las plantas de 1 mes de crecimiento, se realizó la extracción de estos a partir de muestras de tejido vegetal de ambas especies mantenidas en soluciones de naftaleno a diferentes concentraciones.

La extracción de los pigmentos se realizó mediante un macerado de muestras de hojas de cada tratamiento en un mortero con 10 ml de Acetona mantenido previamente bajo refrigeración. Una vez macerada la muestra durante un periodo de 3 minutos, se recuperó el extracto líquido y fue decantado lentamente en un embudo de separación con 5 ml de éter de petróleo (solvente no polar) y 5 ml de metanol-agua, 9-1(solvente polar), logrando la separación de los pigmentos debido a la disolución del extracto en ambos solventes.

La polaridad de las moléculas y sustancias orgánicas es un factor importante para la solubilidad de los mismos en solventes polares y no polares, de manera que las moléculas polares son disueltas y atraídas por solventes polares así como también las sustancias no polares son absorbidas por solventes no polares. Carotenos y carotenoides junto con clorofila-a y b se extraen en la fase superior o epifase, y las xantofilas en la fase inferior o hipofase junto con clorofilas-c. (Liaaen-Jensen, 1971).

La fase superior se colectó y se puso a baño maría a una temperatura máxima de 60 °C, hasta lograr un volumen aproximado de 2 ml. Posteriormente al extracto se le adicionaron 10 ml de acetona y las muestras se leyeron en un espectrofotómetro de luz visible Modelo Spectronic® 20 D (Milton Roy Company). Según Bregman (1996), los coeficientes de absorción (α) para clorofila-a y clorofila-b en acetona se determinaron por Mackinney (1940), quien estableció un valor de $\alpha_{663} = 80.17 \text{ cm}^2/\text{mg}$, para clorofila-a, y para clorofila-b, $\alpha_{645} = 50.93 \text{ cm}^2/\text{mg}$ en donde las longitudes de onda de 663 nm y 645 nm fueron obtenidos a partir de los picos de absorción para clorofila a y clorofila b, respectivamente. Usando la ecuación de Lambert-Beer $A = K C l$ se calculo la concentración (mg/ml) de cada tipo de clorofila en las muestras analizadas.

Despejando C:

$$C = A / K L$$

Donde:

C = Concentración en mg/ml del pigmento

A = Absorbancia dada por el espectro

K = Coeficiente de absorción en acetona:

Para 663 nm (clorofila a)=80.17cm² / mg

Para 645 nm (clorofila b)=50.93 cm² / mg

l = longitud de la celda utilizada= 1

$$[\text{clorofila mg/ml}] = A/K l$$

3.3 Espectrofotometría

Se utilizaron las técnicas de espectrofotometría de luz visible y ultravioleta para cuantificar y cualificar moléculas orgánicas como las clorofilas y el Naftaleno. En donde los espectros se representan en forma de gráficas de la cantidad de energía absorbida o emitida por las muestras, frente a las distintas longitudes de onda (λ).

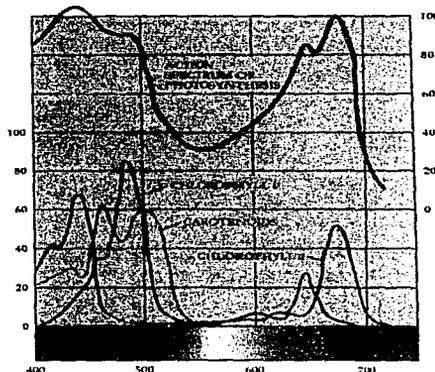
En las regiones visible y ultravioleta se presentan espectros electrónicos que se producen, debido a los electrones más externos de los átomos, que cambian de posición entre los niveles energéticos principales que generalmente van acompañados de cambios en los niveles energéticos rotatorios y vibratorios. Las distintas cantidades de energía (longitudes de onda de luz) absorbidas por una molécula dada, son usadas para detectarla cuantitativa y cualitativamente. (Cooper, 1984; Williams, 1987).

3.3.1 Espectrofotometría de luz visible:

Los espectros de absorción de luz visible se presentan en longitudes de onda de 400 a 700 nm. El proceso de identificación se efectuó por la medición de la absorbancia de la muestra a ciertas longitudes de onda de la luz visible. Una de las características de las muestras de clorofilas leídas, es que son moléculas coloridas verdes, a causa de su capacidad para absorber o eliminar ciertos componentes de la luz que incide sobre ella. En la Fig. 5 se presentan los espectros de absorción de la

clorofila y de otros pigmentos presentes en las hojas de las plantas. Ver extracción y cuantificación de clorofila a y b.

Fig. No 5. Espectro de absorción de clorofila- a, clorofila- b y carotenos en la región de luz visible.



3.3.2 Espectrofotometría de luz ultravioleta:

El espectro de absorción en la región ultravioleta va de 200 a 400 nm y se debe a transiciones de energía de los electrones de la molécula que participan o no en los enlaces. Generalmente están implicados electrones deslocalizados.

Debido a la estructura y a las características de la molécula del naftaleno (Fig. 2), se presenta una alta resonancia, y en consecuencia el estado de transición en sus enlaces determina la absorción de luz de cierta longitud de onda, con lo cual se pueden registrar los picos de absorción específicos y relacionarlos con las subestructuras moleculares conocidas, como son sus anillos aromáticos.

3.3.1.1 Barrido espectroscopico del naftaleno soluble en agua

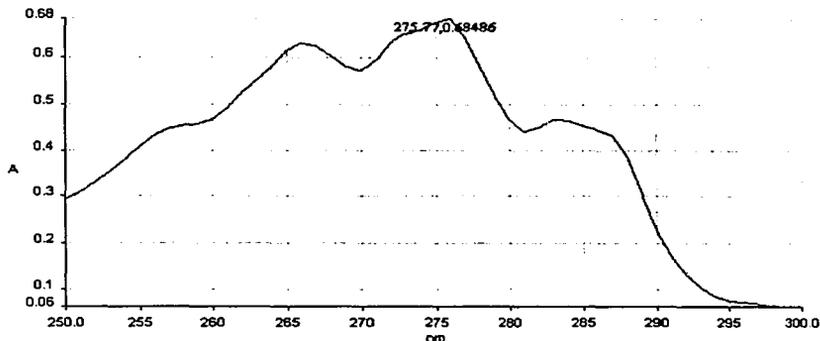


Fig. 6 Representación gráfica del espectro de absorción absoluta del naftaleno dada por la cantidad de luz absorbida (extinción) por este compuesto, frente a las longitudes de onda.

Como se observa en la Fig. 6, el máximo pico de absorción que presentó el naftaleno fue a 275.77 nm, por lo que la curva de calibración obtenida durante el seguimiento del naftaleno residual en solución, se realizó a 276 nm, longitud de onda que fue utilizada en todas las fases del trabajo experimental.

Para obtener el máximo pico de absorción del naftaleno soluble en agua, se utilizó en espectrofotómetro uv-vis instrumento Perkin-Elmer Modelo Lamda Bio 20, bajo las siguientes condiciones de operación:

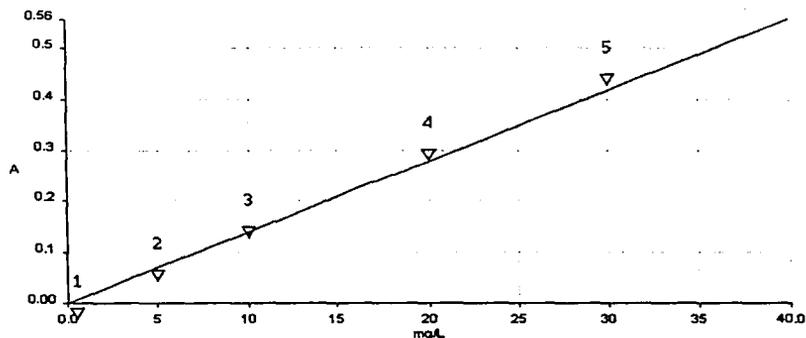
Método:	SCAN1
Modo Normal:	A
λ Inicial:	250.0 nm
λ Final:	300.0 nm
Intervalo:	1.00 nm
Ventana espectral:	1.00 nm
Velocidad de barrido:	480 nm/min
Muestra:	Naftaleno 30 mg/L soluble en agua
Celda:	1 ml

Una vez determinado el máximo pico de absorción del naftaleno, y señalada la longitud de onda óptima para la identificación de este compuesto se realizó una curva de calibración.

3.3.1.2 Curva de calibración obtenida a partir de una solución saturada de naftaleno

Para la elaboración de esta curva se partió de una solución saturada de naftaleno de 30 mg/L, a partir de la cual se prepararon diluciones de 1 mg/L, 5 mg/L, 10 mg/L, 15 mg/L, 20 mg/L y 30 mg/L. Estas se prepararon utilizando pipetas y micro pipetas Pipetman-Gilson de 10 ml, 5 ml, 1000 y 200 microlitros.

Fig. 7 Curva de calibración de Naftaleno soluble en agua a concentraciones de 1, 5, 10, 20 y 30 mg/L.



Ecuación: $y = 1.390190e-02 * x$
 Error residual: 0.026174
 Coeficiente de correlación: .990003

Las condiciones de operación del espectrofotómetro UV-VIS, fueron las siguientes:

Método: APPLIC 44
 Modo Normal: Una sola longitud de onda
 Línea base: Normal (0.00)
 Muestras: Naftaleno 30 mg/L soluble en agua. Diluciones de naftaleno a distintas concentraciones

La curva de calibración se realizó para medir la concentración de naftaleno a distintas concentraciones a partir de diluciones obtenidas de una solución de naftaleno de 30 mg/L, en agua. (Solución Stock).

3.3.1.3 Monitoreo del naftaleno residual

Mediante la técnica de espectrofotometría de luz ultravioleta y utilizando la curva de calibración obtenida previamente, se determinaron las concentraciones reales de las muestras tomadas de las diferentes soluciones de naftaleno expuestas a las plantas experimentales, leyendo la absorbancia de cada una de las muestras a dos tiempos diferentes 24 y 48 horas después de la administración o exposición de las plantas a las soluciones. Así mismo, se determinó la concentración de sus respectivos testigos y de las diluciones de las mismas concentraciones colocadas en recipientes sin plantas para cada tratamiento.

3.4 Análisis de datos

Para el manejo de los datos se utilizó el análisis de varianza unifactorial y bifactorial (ANOVA) del paquete estadístico SPSS® V 7-8, tomando como criterio de significancia estadística una $p < 0.05$.

Fotos 6 y 7 Cultivos hidropónicos de plantas de *Cyperus elegans* y *Glycine max*.



El cultivo hidropónico de ambas especies experimentales se mantuvo por 30 días después de la germinación de los achenios y semillas.

Foto 8 Prueba de la toxicidad del naftaleno en la germinación de los achenios de *Cyperus elegans*



Foto 9 Prueba de la toxicidad del naftaleno en la germinación de las semillas de *Glycine max*



Foto 10 y 11 Explotación del naftaleno en plantas de *Glycine max*



El método de cultivo hidropónico permitió el crecimiento de las plantas experimentales con las raíces libres en un medio acuoso.



Frascos cubiertos con plástico negro

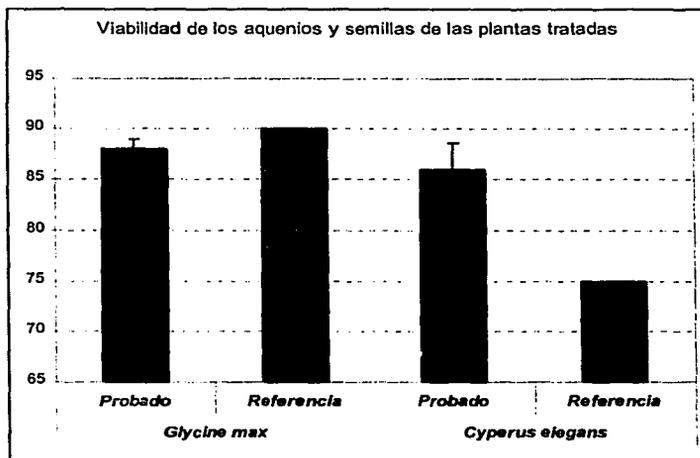
55

4. Resultados y Análisis

Los Resultados que se presentan a continuación fueron obtenidos siguiendo la metodología descrita anteriormente.

4.1 Viabilidad de los aquenios y semillas de las especies tratadas.

Los aquenios de *Cyperus elegans* presentaron una viabilidad del 86 %, y las semillas de *Glycine max* (Soya) una viabilidad del 88%, estos resultados se compararon con datos registrados en estudios anteriores con ambas especies.



Gráfica 1. En la gráfica se presentan los resultados obtenidos en las pruebas de viabilidad aplicadas a aquenios y semillas de las plantas estudiadas, comparados con datos de referencia por estudios anteriores: *Cyperus elegans* (Ortiz, 2000) y *Glycine max*, (PRONASE, 2000).

Ortiz (2000), encontró una viabilidad de los aquenios de *Cyperus elegans* obtenida bajo condiciones similares, menor respecto a la obtenida en este trabajo. Cabe mencionar que una de las características adaptativas de esta especie, es la

producción de una gran cantidad de semillas que pueden o no germinar en diferentes épocas del año o bien pueden conservar su viabilidad por largo tiempo, pudiendo permanecer en latencia durante períodos prolongados.

En el caso de las semillas de Soya no se encontraron diferencias significativas entre los valores obtenidos y los reportados por PRONASE (2000).

4.2 Crecimiento de plantas en cultivos hidropónicos en solución.

4.2.1 *Cyperus elegans*

El tamaño de las plantas de *Cyperus elegans* cultivadas bajo la técnica de hidroponía fue mayor en comparación con las plantas de los lotes testigo que se mantuvieron con agua. El valor de $p = 0.031$, obtenido del análisis de varianza unifactorial (ANOVA), muestra que hubo diferencias estadísticas significativas entre las plantas cultivadas bajo ambas condiciones experimentales (Plantas mantenidas con solución nutritiva, y plantas regadas con agua), tomando como criterio de significancia estadística una $p < 0.05$, Gráfica 2.

Adicionalmente a que *Cyperus elegans* es una especie de plantas silvestres flexibles a variaciones de las condiciones ambientales a las que están expuestas, presentando una favorable adaptación a condiciones adversas como sequías o inundaciones, falta de luz, espacio, suelos altamente contaminados y/o perturbados. Los resultados obtenidos muestran que el cultivo hidropónico y el constante suministro de nutrientes en forma de solución aceleró su desarrollo y crecimiento en laboratorio, reflejado en una mayor talla y producción de biomasa de las plantas tratadas, comparadas con plantas mantenidas solo con agua, Tabla 6.

4.2.2 *Glycine max* (Soya)

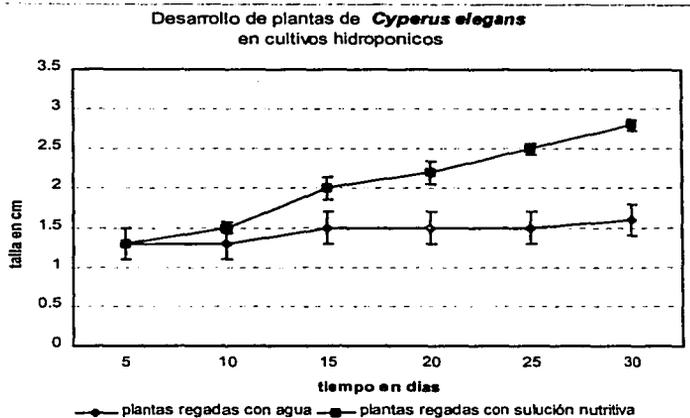
Las Plantas de soya cultivadas bajo la técnica de hidroponía, aparentemente presentaron un mayor crecimiento, comparado con las plantas de los lotes testigo

que se mantuvieron con agua (Tabla 6). Sin embargo el análisis de los datos obtenidos a partir de la cuantificación de la talla y biomasa en peso seco alcanzadas por las plantas expuestas en ambos tratamientos, no muestra diferencias estadísticas significativas, valor obtenido de $p = 0.155$ (Grafico 3).

Las semillas de *Glycine max*, contienen una mayor cantidad de tejido de reserva comparadas con los aquenios de *Cyperus elegans*, de donde ambos durante la germinación toman los nutrimentos necesarios para su desarrollo hasta la emergencia del primer cotiledón.

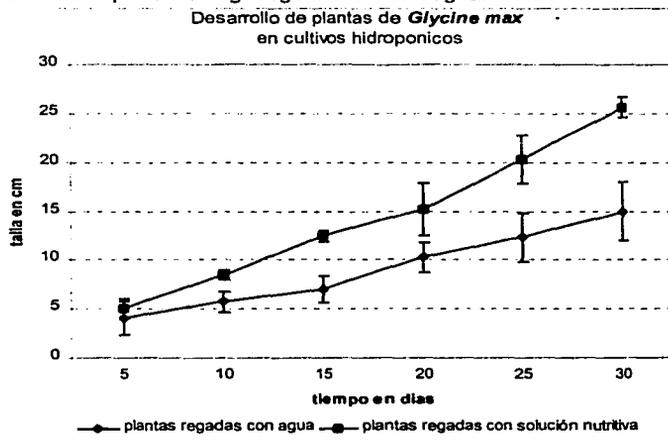
Plantas de <i>Cyperus elegans</i>			
Cultivadas en hidroponía		Regadas solo con agua	
Talla	Biomasa en peso seco	Talla	Biomasa en peso seco
Media = 2.8 cm	Media = .0035 g	Media = 1.5 cm	Media = .0011 g
Plantas de <i>Glycine max</i>			
Cultivadas en hidroponía		Regadas solo con agua	
Talla	Biomasa en peso seco	Talla	Biomasa en peso seco
Media = 25 cm	Media = .0085 g	Media = 15 cm	Media = .0053 g

Tabla 6 Comparación de la Media (valor obtenido del promedio de los datos registrados a partir de 3 repeticiones de lotes de 75 plantas) de los valores de talla y biomasa en peso seco de plantas de *Cyperus elegans* y *Glycine max*, cultivadas con y sin solución nutritiva durante 30 días después de la germinación de los aquenios y semillas.



p = 0.031

Gráfica 2. Crecimiento de plantas de *Cyperus elegans*, cultivadas en hidroponía, comparado con plantas testigo regadas sólo con agua.



p = 0.155

Gráfica 3. Crecimiento de plantas de *Glycine max* cultivadas en hidroponía, comparado con plantas testigo regadas sólo con agua.

4.3 Prueba de Germinación con plantas terrestres OPPTS-US EPA 850.4200 (1996)

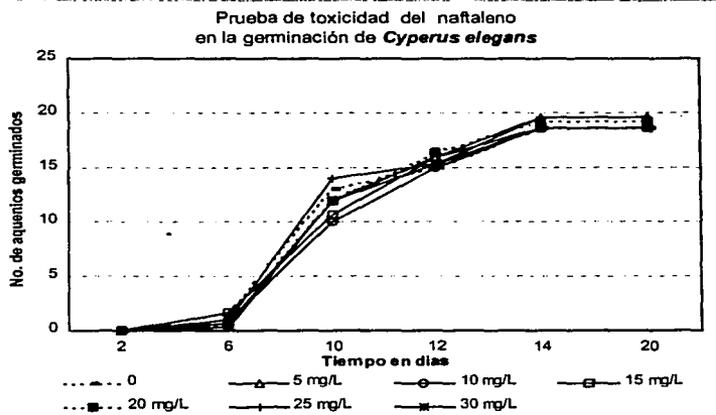
El Naftaleno agregado en concentraciones de 5, 10, 15, 20, 25 y 30 mg/L., a los aquenios de *Cyperus elegans* no causo un efecto notable sobre su germinación, el promedio de germinación para las diferentes concentraciones (Tabla 7) y el valor de $p = 0.99$ obtenido, indica estadísticamente que la germinación no resulto afectada ya que la respuesta de los aquenios expuestos fue igual para todas las concentraciones incluyendo los testigos (semillas tratadas únicamente con agua) (Gráfica 4).

En el caso de las semillas de Soya, (Gráfica 5), el naftaleno aplicado tuvo un efecto, retardando ligeramente el tiempo de inicio de la germinación y en el numero de semillas germinadas (Tabla 7), aunque el análisis de variancia no mostró diferencias significativas entre los distintos lotes experimentales (concentraciones de naftaleno aplicado de 5 a 30 mg/L). $p = 0.79$

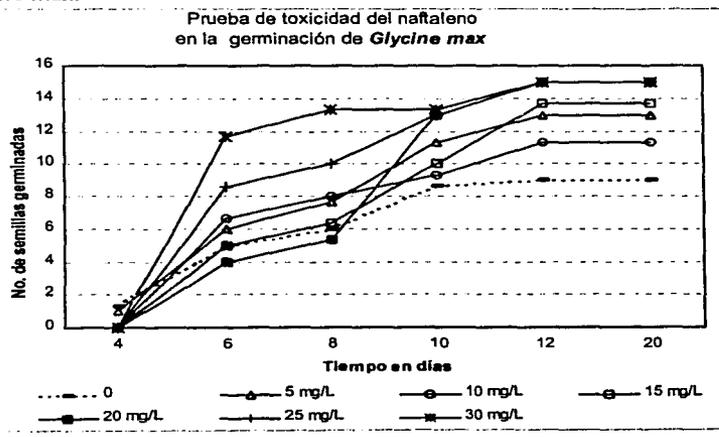
<i>Cyperus elegans</i>			<i>Glycine max</i>		
Concentración de naftaleno aplicado	Porcentaje de germinación de aquenios	Desviación estándar +-	Concentración de naftaleno aplicado	Porcentaje de germinación de semillas	Desviación estándar +-
0 mg/L testigo	93.3 %	1.11	0 mg/L testigo	60%	.19
5 mg/L	98.3 %	1.35	5 mg/L	86.66%	.96
10 mg/L	93.3 %	1	10 mg/L	75.53%	1.15
15 mg/L	93.3 %	1.11	15 mg/L	91.06%	2.11
20 mg/L	96.65 %	1.53	20 mg/L	100%	1.15
25 mg/L	98.3 %	1.73	25 mg/L	100%	1.15
30 mg/L	93.3 %	1.92	30 mg/L	100%	.96
P=Probabilidad	P=0.999		P=Probabilidad	P=0.794	

Tabla 7 Porcentajes de germinación y valor de P (en el análisis de varianza) para la prueba de toxicidad en la germinación de plantas de *Cyperus elegans* y *Glycine max*.

Gráfica 4. Prueba de toxicidad del naftaleno en la germinación de achenos de *Cyperus elegans*



Gráfica 5. Prueba de toxicidad del naftaleno en la germinación de semillas de *Glycine max*.

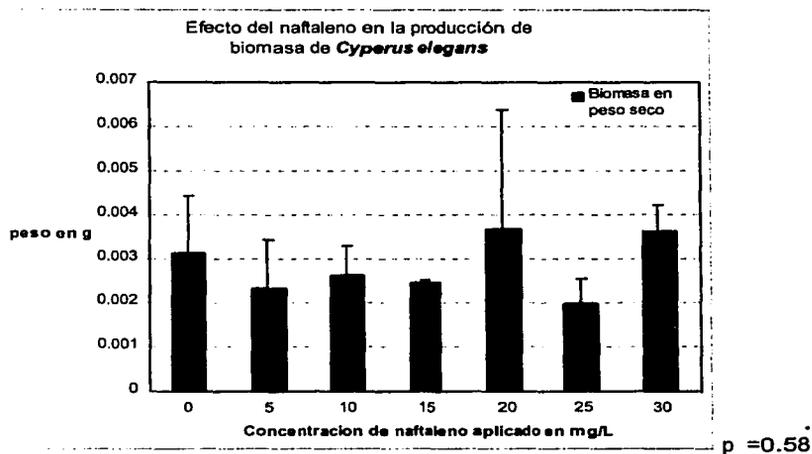


4.4 Efecto en Biomasa

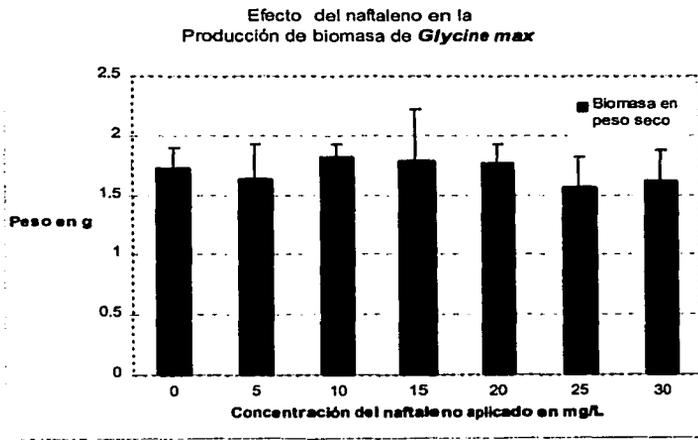
Como se puede apreciar en las gráficas 6 y 7, la producción de Biomasa cuantificada en el peso seco en las plantas experimentales, no se vio afectada por el naftaleno al compararse con los respectivos testigos. El análisis de varianza aplicado a los promedios de biomasa obtenidos en este bioensayo (Tabla 8), muestra que no hubo diferencias significativas en la producción de biomasa de las plantas de ambas especies expuestas al naftaleno a diferentes concentraciones. $p = 0.58$ para *Cyperus elegans* y $p = 0.64$ para las plantas de *Glycine max*. Esto posiblemente fue debido a que las concentraciones de naftaleno suministrado y/o el tiempo de exposición (20 días de exposición) de las plantas a este compuesto no fue el suficiente para provocar un efecto estadísticamente significativo, por lo que resulta necesario observar el efecto sobre la planta en crecimiento, debido a que el ciclo de vida de ambas especies experimentales dura mas de dos meses, duración del bioensayo aplicado.

Tabla 8 Resultados y valor de P (en el análisis de varianza) para el bioensayo de cuantificación de biomasa aplicados a plantas de *Cyperus elegans* y *Glycine max*.

<i>Cyperus elegans</i>		<i>Glycine max</i>	
(Valores promedio de 4 corridas experimentales de 7 lotes de 15 plantas con 3 repeticiones por concentración)		Valores promedio de 4 corridas experimentales de 7 lotes de 15 plantas con 3 repeticiones por concentración	
Concentración de naftaleno aplicado	Biomasa en peso seco (g)	Concentración de naftaleno aplicado	Biomasa en peso seco (g)
0 mg/L testigo	0.003	0 mg/L testigo	1.722
5 mg/L	0.002	5 mg/L	1.632
10 mg/L	0.002	10 mg/L	1.814
15 mg/L	0.002	15 mg/L	1.788
20 mg/L	0.003	20 mg/L	1.77
25 mg/L	0.001	25 mg/L	1.564
30 mg/L	0.003	30 mg/L	1.614
P=Probabilidad	P=0.583	P=Probabilidad	P=0.645



Gráfica 6. Efecto del naftaleno en la producción de biomasa en Plantas de *Cyperus elegans* *Valores promedio de 4 corridas experimentales de 7 lotes de 15 plantas con 3 repeticiones por concentración



Gráfica 7. Toxicidad del naftaleno en la producción de biomasa expresada en peso seco en Plantas de *Glycine max* **Valores promedio de 4 corridas experimentales de 7 lotes de 15 plantas con 3 repeticiones por concentración.

4.5 Prueba de fitotoxicidad utilizando la cuantificación de clorofila como un biomarcador de daño metabólico.

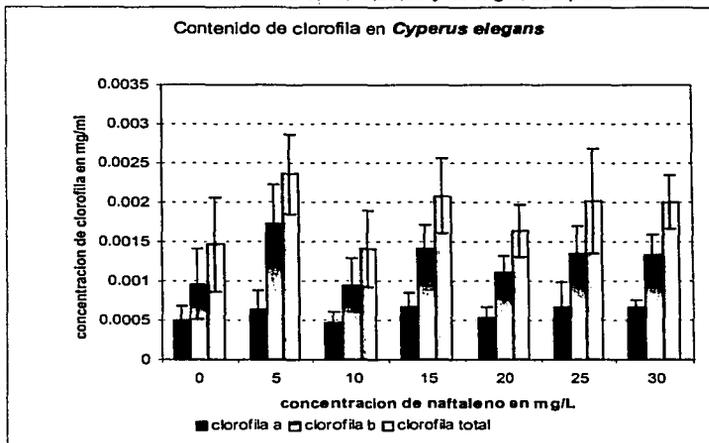
Los resultados obtenidos en este bioensayo fueron los siguientes:

Según las graficas 8 y 9 las proporciones de clorofila-a y b en los testigos y tratamientos, muestra que el contenido de clorofila-b en ambas especies de plantas es mayor que el contenido de clorofila-a. Según Salisbury (1994), el contenido de clorofila-a y b en plantas superiores varia según la especie, presentando la mayoría de las especies un mayor contenido de clorofila-a, 2/3 partes del total de clorofila constituyendo la clorofila-b un pigmento accesorio 1/3 parte del total. Cabe mencionar que en un trabajo previo con *Cyperus elegans* (Ortiz,2000), se cuantifico la misma proporción de clorofila-a y b obtenida en este trabajo (*mayor contenido de clorofila-b que a*).

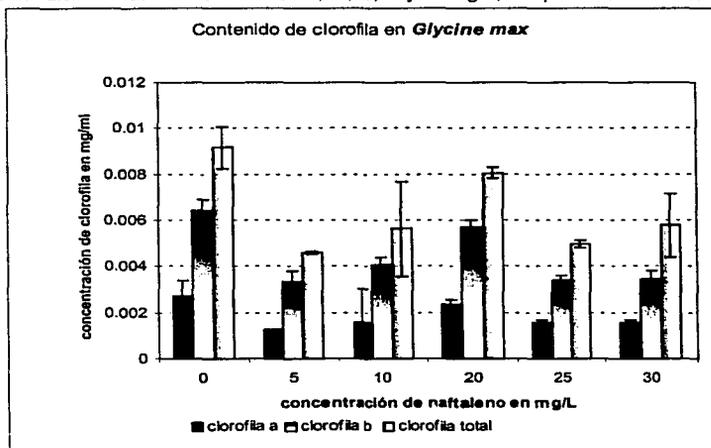
Por otro lado, el contenido de clorofila-a y b en las plantas de *Cyperus elegans* no resultó afectado al obtenerse valores de p mayores a 0.05, lo que demuestra que no hubo diferencias estadísticamente significativas o un efecto notable provocado por el naftaleno aplicado a las plantas comparadas con los testigos.

En el caso de las plantas de Soya (Grafica 8), para el caso de la clorofila-b se obtuvo una diferencia de $p = 0.0038$ y de la clorofila total $p = 0.0027$, observándose menor concentración de clorofila al aumentar la concentración del naftaleno (Tabla 9), lo cual refleja una posible incorporación y traslocación del naftaleno o sus derivados, causando un posible efecto en la ruta de biosíntesis de clorofila (Matringe *et al.* 1989; Halliwell, 1987).

Gráfica 8. Contenido de clorofila a, b y total en plantas de *Cyperus elegans* suspendidas en una solución de naftaleno en concentraciones de 5,10,15,20,25 y 30 mg/L, comparadas con un testigo.



Gráfica 9. Contenido de clorofila a, b y total en plantas de *Glycine max*, suspendidas en una solución de naftaleno en concentraciones de 5,10,20,25 y 30 mg/L, comparadas con un testigo.



Gráfica 10. Porcentaje del contenido de clorofila a, b en plantas de *Cyperus elegans* y *Glycine max*.Contenido de clorofila en plantas de *Cyperus elegans*Contenido de clorofila en plantas de *Glycine max*Tabla 9 Resultados y valor de P (en el análisis de varianza) para el bioensayo de cuantificación de clorofila aplicados a plantas de *Cyperus elegans* y *Glycine max*.

<i>Cyperus elegans</i>				<i>Glycine max</i>			
(Valores promedio de 4 corridas experimentales de 7 lotes de 15 plantas con 3 repeticiones por concentración)				(Valores promedio de 4 corridas experimentales de 7 lotes de 15 plantas con 3 repeticiones por concentración)			
Concentración de naftaleno aplicado	Contenido de clorofila			Concentración de naftaleno aplicado	Contenido de clorofila		
	Clorofila a	Clorofila b	Clorofila total		Clorofila a	Clorofila b	Clorofila total
0 mg/L testigo	0.00050	0.00096	0.001467	0 mg/L testigo	0.002719	0.006440	0.009159
5 mg/L	0.00062	0.001726	0.002356	5 mg/L	0.001247	0.003324	0.004572
10 mg/L	0.00046	0.000942	0.001406	10 mg/L	0.001563	0.004051	0.005614
15 mg/L	0.00067	0.001408	0.002082	20 mg/L	0.002340	0.005703	0.008044
20 mg/L	0.00052	0.001105	0.001634	25 mg/L	0.001542	0.003409	0.004952
25 mg/L	0.00067	0.001344	0.002018	30 mg/L	0.001542	0.003467	0.005777
30 mg/L	0.00067	0.001332	0.002004				
P=Probabilidad	P=0.612	P=0.345	P=0.345	P=Probabilidad	P=8.700	P=0.003	P=0.002

4.6 Monitoreo del naftaleno residual en el medio hidropónico.

Tabla 10 Concentraciones del monitoreo del naftaleno residual en muestras de las plantas de *Cyperus elegans*. Los valores de absorbancia fueron obtenidos a 274 nm

Valores promedio de Muestras de <i>Cyperus elegans</i>					
24 HORAS			48 HORAS		
Muestra	Concentración mg/l	Concentración mg/l	Muestra	Concentración mg/l	Concentración mg/l
	Con plantas	Controles Sin plantas		Con plantas	Controles Sin plantas
1 mg/L	2.2486	1.9364	1 mg/L	2.8075	0.6934
5 mg/L	6.2423	5.6395	5 mg/L	2.0429	0.5186
10 mg/L	12.155	11.060	10 mg/L	3.6470	0.4172
20 mg/L	23.399	23.138	20 mg/L	4.0779	2.3853
30 mg/L	30.032	33.404	30 mg/L	5.0468	1.1365

De acuerdo con los datos de la Tabla 10, la concentración del naftaleno disminuye a las 48 horas en presencia o ausencia de plantas de *Cyperus elegans*, sin embargo en presencia de las plantas el naftaleno se retiene en mayor cantidad que sin estas.

Por otro lado, de acuerdo con el punto 3.3.1.2 de la curva de calibración, los valores inferiores a 1 mg/L no son tan confiables debido a que esta es la primera concentración probada y no hay puntos menores a este, por lo que hay que tomarlo con reserva, esto no quiere decir que no se haya presentado una disminución en la concentración de naftaleno.

Tabla 11 Concentraciones del monitoreo del naftaleno residual en muestras de las plantas de *Glycine max*. Los valores de absorbancia fueron obtenidos a 274 nm.

Valores promedio de Muestras de <i>Glycine max</i> .					
24 HORAS			48 HORAS		
Muestra	Concentración mg/l	Concentración mg/l	Muestra	Concentración mg/l	Concentración mg/l
	Con plantas	Testigos Sin plantas		Con plantas	Testigos Sin plantas
1 mg/L	2.7449	2.2608	1 mg/L	1.6027	1.8105
5 mg/L	4.8965	5.5230	5 mg/L	3.5405	2.0393
10 mg/L	15.185	11.905	10 mg/L	19.014	4.0606
20 mg/L	21.701	12.337	20 mg/L	6.5423	4.0520
30 mg/L	32.081	41.422	30 mg/L	20.826	16.353

De acuerdo a los datos obtenidos a partir del monitoreo del naftaleno residual bajo un análisis de varianza bifactorial ($p = 0.030$) y dadas las condiciones de exposición para ambas especies de plantas tratadas, se puede decir que la concentración de la solución de Naftaleno aplicado a las plantas de *Cyperus elegans* se ve disminuida drásticamente en un periodo de 48 horas probablemente debido a la acción de la temperatura y/o de la luz participando en este decaimiento. Esto se puede corroborar con los datos obtenidos a partir de los testigos en donde la concentración de la solución que esta destapada y en contacto con la luz disminuye en su totalidad durante un periodo de tiempo similar, el naftaleno se pierde ya sea por foto modificación en su molécula o bien por volatilización. Cabe mencionar que dichos factores fueron controlados en los lotes experimentales, así como, también se garantizo que la concentración fuera constante durante la exposición, al recambiar la solución cada 48 horas, ya que antes de este tiempo no hay variaciones significativas.

Discusión

El uso de cultivos hidropónicos permite la obtención de plantas de un mayor tamaño en periodos de tiempo más cortos en comparación con plantas desarrolladas bajo condiciones normales de crecimiento. Además de que el crecimiento de las plantas se ve afectado solo por las variables a las que se somete el cultivo, evitando cualquier otra interferencia en la experimentación como si se hiciera en el suelo. El control de las condiciones ambientales a las que las plantas se exponen (luz, foto periodo, temperatura, humedad relativa etc), como se encuentra el testigo y el empleo de soluciones como sustrato, facilitó la valoración del efecto tóxico provocado por el Naftaleno en ambas especies experimentales (*Glycine max* y *Cyperus elegans*).

Cyperus elegans es una especie de plantas perennes cuyo crecimiento en laboratorio es relativamente lento cuando se reproduce sexualmente (por aquenios) comparado con el crecimiento de las plantas de *Glycine max* cuyo ciclo de vida es anual. La aplicación continua de nutrientes agiliza su desarrollo y permite además el desarrollo de plantas vigorosas.

De acuerdo a los resultados obtenidos en esta primera fase experimental el método de cultivo hidropónico aplicado a las plantas de *Cyperus elegans* y *Glycine max* aceleró su crecimiento reflejándose en el aumento en la talla y biomasa de ambas especies, comparadas con el crecimiento de plantas regadas sólo con agua (sin solución nutritiva) para cada caso. A partir del análisis estadístico de los datos del crecimiento de plantas regadas solo con agua y plantas cultivadas con solución nutritiva para cada especie, solo las plantas de *Cyperus elegans* presentaron diferencias estadísticas significativas $p = 0.031$ entre los lotes comparados.

En el caso de las plantas de *Glycine max*, el análisis estadístico de la comparación de ambos lotes (plantas regadas con y sin solución nutritiva) refleja un

valor de $p = 0.155$ que describe diferencias no significativas entre los lotes comparados.

Considerando el tamaño de las semillas de *Glycine max*, con los aquenios de *Cyperus elegans* (Foto 2 y 3), el tejido de reserva o nutricional en las primeras es mayor que el tejido de reserva de los últimos, por lo tanto, el requerimiento y asimilación de los nutrientes suministrados en la solución nutritiva expuesta para cada especie es diferente.

Por otro lado, debido a las características fisicoquímicas del Naftaleno (compuesto tóxico probado), el crecimiento de plantas con las raíces libres en solución permitió el monitoreo y el control de la concentración real de Naftaleno expuesto a las plantas tratadas así como el decaimiento de la misma, dado que el Naftaleno es un compuesto altamente susceptible a la biodegradación.

Es importante considerar que los HAP en el ambiente, tienden a asociarse fuertemente con la materia orgánica presente en el suelo convirtiéndose en compuestos altamente recalcitrantes, cuya biodisponibilidad en el medio es limitada, por lo que la continua exposición de este compuesto solubilizado en agua, pudo causar un efecto, notable o no, en las plantas tratadas. En este trabajo, las pruebas realizadas en laboratorio no reproducen las condiciones reales de exposición de las plantas a los contaminantes en el campo además de las variaciones ambientales que pueden influir en la respuesta del espécimen o en el compuesto químico.

Al evaluar el efecto tóxico del Naftaleno en concentraciones de 5 mg/L, 10 mg/L, 15 mg/L, 20 mg/L, 25 mg/L, y 30 mg/L., durante la germinación de los frutos (aquenios) de *Cyperus sp.* y las semillas de *Glycine max* a partir del análisis estadístico de los resultados obtenidos, los valores de probabilidad (p) muestran que no hubo diferencias significativas entre los distintos tratamientos aplicados, $p = 0.99$ para *Cyperus elegans*, y $p = 0.79$ para las semillas de *Glycine max*, sin embargo, cabe mencionar que en el caso de la semillas de *Glycine max*, el número de

semillas germinadas por lote expuestas al naftaleno fue mayor que el número de semillas germinadas solo con agua (Tabla 7).

Las semillas de *Glycine max* cuentan con una testa dura que cuando se remoja se suaviza y se pierde quedando los cotiledones libres y en contacto con la solución. Por otro lado, considerando que el naftaleno es un compuesto lipofílico, hidrofóbico que tiende a ser fuertemente absorbido por la materia orgánica presente en el medio así como por superficies hidrófobas como los cotiledones, al quedar expuestos a este compuesto es posible la formación de una capa que interfiere con la cantidad de agua asimilada. Además, estas semillas están constituidas por una alta cantidad de aceites, grasas y lípidos, siendo posible la absorción del naftaleno a los cotiledones. (Schwab, *et al.* 1998), mencionan que las superficies hidrófobas presentan diferente capacidad de absorción y que dicha afinidad depende de la especie de planta.

En el caso de los aquenios de *Cyperus elegans* la pared del fruto es dura y protege al endospermo por lo que probablemente la asimilación de moléculas orgánicas como el naftaleno por el tejido de reserva es menos factible, siendo más lenta la imbibición de los aquenios que en el caso de las semillas de *Glycine max* .

No todas las especies de semillas responden de la misma forma al ser sometidas a la interacción con hidrocarburos y al investigar el efecto de ciertos hidrocarburos o derivados del petróleo en la germinación de las semillas de especies de plantas superiores, Damián (1999); Ramanathan, *et al.*,(1996); Ren *et al.*, (1996), concluyeron que muchas semillas no presentan efectos tóxicos notables en este proceso, otros autores por el contrario, reportan efectos de inhibición en semillas de algunas especies de plantas (Damian (1999); Gil, *et al.*, (1992); Salinitro *et al.*,(1997); Sayles, *et al.*,(1999) y Wang, *et al.*, (1990)).

La valoración del efecto toxico del Naftaleno a partir de la cuantificación de la producción de biomasa expresada en peso seco medido en las plantas expuestas, no se vió afectado por el naftaleno en ambas especies.

Existiendo la tendencia de la absorción del naftaleno a las raíces de las plantas de *Glycine max*, debido a que según Schwab (1998) estas poseen una alta cantidad de contenido lipídico siendo esto un factor favorecedor para la absorción de compuestos hidrófobos como el naftaleno, además de que la absorción aumenta considerablemente con la edad de las plantas expuestas. Se puede pensar que las concentraciones de naftaleno suministrado y/o el tiempo de exposición (20 días de exposición) de las plantas a este compuesto en este trabajo no fue el suficiente para provocar un efecto notable en la germinación de los achenios y semillas a si como en la producción de biomasa de las plantas estudiadas tal vez debido a que la edad de las plantas puede ser un factor determinante para observar efectos tóxicos notables, ya que en este trabajo, se utilizaron plantas de un mes.

Neff, (1979); y Edward, (1983) mencionan que ahora se conoce la partición de compuestos hidrófobos como el naftaleno dentro de las membranas lipídicas y se sabe que existe la acumulación de estos compuestos en las membranas de los sistemas de raíces, suponiendo que a altas concentraciones (4-10 mg litro⁻¹) es cuando las raíces se saturan con los químicos, y los HAP pueden moverse a través de las plantas y de los brotes (Edwards, 1983).

La clorofila ha sido utilizada en estudios de los efectos de estrés ambiental en plantas, desde la reducción de fotosíntesis en plantas experimentales bajo condiciones adversas, como deficiencia de agua, temperatura, deficiencia de nutrientes, agentes de contaminación y ataque por patógenos. Aunque muchas veces el contenido de clorofila en las plantas superiores no siempre refleja o representa directamente el efecto de un proceso de contaminación ambiental (Powell; 1997).

La espectrofotometría permite medir los pigmentos de extractos celulares, la clorofila y feofitina absorben a una longitud de onda de 663-665 nm (región de absorción roja). Los métodos de extracción y cuantificación de este pigmento pueden sobre o subestimar significativamente las concentraciones de clorofila, ya que este pigmento es fotosensible y cuando se cuantifica por espectrofotometría, las bandas de absorción se traslapan y concurren pigmentos accesorios y productos de degradación de clorofila. La feofitina-a es producto de degradación de clorofila que se encuentra en todas las algas muertas o materia orgánica suspendida, puede interferir con la determinación de clorofila-a ya que ambas absorben luz y son fluorescentes en la misma región espectral. Esto puede ser la explicación al hecho de que la clorofila b este en concentraciones mayores que la clorofila a.

En el presente trabajo no se obtuvo diferencia estadística de la concentración de clorofila entre los tratamientos en *Cyperus elegans* en tanto que en *Glycine max* para el caso de la clorofila-b se obtuvo una diferencia de $p = 0.0038$ y de la clorofila total $p = 0.0027$, observándose menor concentración de clorofila al aumentar la concentración del naftaleno, lo cual refleja la incorporación o asimilación del naftaleno o derivado causando un posible efecto en la ruta de biosíntesis. (Halliwell, 1987, Matringe *et al.*, 1989).

Actualmente, son pocos los trabajos que hacen referencia a la cuantificación del contenido de clorofila como un marcador de daño tóxico, Huang, *et al.*, (1996). comprobó la reducción en la proporción de la concentración del contenido de clorofila en plantas superiores expuestas a algunos HAPs.

En este sentido se ha demostrado que la toxicidad de los HAP es dependiente de la concentración de los mismos en la solución expuesta a los organismos vivos y factores como la luz pueden inducir y causar efectos tóxicos algunas veces más notables sobre los organismos expuestos (Ren *et al.*, 1996). Por otro lado, la toxicidad de algunos HAP aumenta si estos compuestos son foto modificados.

Si bien, las especies de plantas experimentales en este trabajo no presentaron efectos tóxicos en los bioensayos aplicados no se puede descartar una posible bioacumulación del Naftaleno en las plantas expuestas, ya que este proceso ha sido ampliamente estudiado en muchas especies vegetales en donde se ha observado la tendencia de estas a la asimilación de los contaminantes aledaños a las raíces y a otras partes de las plantas como las hojas, translocando y acumulando dichos compuestos (Wang *et al.* 1997).

Se sabe que el proceso de acumulación inicial en las plantas se debe a la transferencia del compuesto químico directamente del exterior vía apoplasto de las plantas, en una rápida toma inicial dentro de las raíces libres en el espacio. Por lo que la bioacumulación de las plantas puede ser confinada a solo el proceso de transferencia xenobiótica del ambiente a la raíz y el subsecuente movimiento dentro de la planta o la transformación metabólica. Cuando el químico es metabólicamente estable y móvil éste puede ser transferido vía apoplasto, simplasto, o ambos (Salisbury, 1994).

Las especies de plantas superiores responden diferente a ciertos factores externos como la contaminación persistente de compuestos xenobióticos presentes en el suelo o en el medio en el que crecen. Dichas diferencias obedecen a factores genéticos que regulan características fenotípicas que favorecen la adaptación de las especies a la interacción con contaminantes. Las plantas de *Cyperus elegans* son un claro ejemplo de esto. Lo anterior se comprueba a partir de los análisis estadísticos de los datos obtenidos en las pruebas o bioensayos aplicados a ambas especies de plantas, ($p < 0.05$) y de datos reportados en estudios previos (Zermeño *et al.* 2000; Ocampo, 2000).

Glycine max, especie cultivada que presenta un sistema radical primario con una alta cantidad de contenido lipídico, que en teoría favorece la absorción del naftaleno biodisponible en el medio, presenta efectos fisiológicos en respuesta a esta exposición, lo que la hace un buen candidato para ser utilizada en este tipo de

valoraciones toxicológicas. Aunque algunas veces quedan limitadas a ciertos procesos debido a su genotipo específico y alta sensibilidad, que ofrece beneficios al hombre. Por otro lado, *Cyperus elegans*, que de alguna manera a lo largo del tiempo ha resultado favorecida para vivir bajo condiciones desfavorables. Su alta capacidad adaptativa les ha permitido colonizar nuevos espacios, competir con otras especies y constituir una herramienta útil de biotecnología para ser utilizadas en proyectos enfocados a la protección del medio ambiente, el control de la contaminación del mismo, la prevención de posibles daños causados por la interacción de los contaminantes en los ecosistemas con los seres vivos, así como, también la remediación de sitios contaminadas con compuestos persistentes como los hidrocarburos derivados del petróleo.

La producción de aqúenios por *Cyperus elegans*, el número, el tamaño, la forma, y la constitución de estos son características adaptativas que favorecen a esta especie en su reproducción y supervivencia. Considerando estos factores, además de la producción de enzimas, la forma general de los sistemas radicales y otros factores genotípicos presentados por las plantas son controlados por mecanismos genéticos que son influenciados por factores ambientales, (Klepper, 1987), las diferencias entre las respuestas de ambas plantas tratadas en este trabajo están asociadas a sus diferencias de especie. Woolhouse (1983) menciona que las plantas presentan una considerable variación genética en la capacidad de diversas especies para tolerar cantidades de otra forma tóxicas de metales no esenciales como Plomo, Cadmio, Plata y Mercurio presentes en el suelo.

Son muchas las diferencias resultantes al comparar a las plantas de *Glycine max* con las plantas de *Cyperus elegans* características que en un momento dado favorecen a *Glycine max* para ser utilizada en estudios ambientales como biomonitor o bioindicador de toxicidad y a *Cyperus elegans* como una especie útil en procesos de fitorremediación de suelos contaminados.

Conclusiones

- El uso de cultivos hidropónicos como una técnica alterna en estudios de valoraciones toxicológicas constituye una herramienta que permite la obtención de especímenes y facilita la estimación de los efectos de los compuestos tóxicos probados como el Naftaleno y su monitoreo, con recambios de solución por descenso de la concentración cada 48 hrs..
- ***Cyperus elegans*** es una especie de planta silvestre muy tolerante, viviendo bajo condiciones ambientales extremas, suelos altamente contaminados, carencia o saturación excesiva de agua, ya que se desarrolla en una zona pantanosa, al suministrarles continuamente nutrientes se induce un mayor crecimiento.
- ***Glycine max***, es una planta cultivada que presenta un sistema radical primario con una alta cantidad de contenido lipídico lo que favorece la absorción del naftaleno biodisponible en las soluciones probadas, presentando efectos en el contenido de clorofila b, en respuesta a esta exposición, lo cual la hace un buen candidato para ser utilizada en valoraciones toxicológicas sobre HAP.
- De acuerdo al análisis estadístico aplicado en cada uno de los bio-ensayos estudiados en este trabajo, en ambas especies de plantas, no hubo respuesta tóxica al naftaleno, en las determinaciones de índice de germinación y en biomasa. Por lo que parecen parámetros menos sensibles que la biosíntesis de clorofila.
- Respecto a la cuantificación de clorofila a, b y total, ***Cyperus elegans*** resultó ser una especie tolerante al naftaleno a concentraciones de 5 a 30 mg/L, lo

cual no significa que dicho contaminante no afecte a otro nivel o blanco en la biología de esta especie.

- La toxicidad del Naftaleno en este trabajo se hizo patente en la especie *Glycine max* expresada como la inhibición en la biosíntesis de clorofila parámetro que fue afectado hasta en una disminución del 50 % a concentraciones de naftaleno de 25 y 30 mg/L.

Recomendaciones

Dado a que en los parámetros de germinación y cuantificación de biomasa en peso sacco, para ambas especies experimentales, no se detectó un efecto tóxico aparente provocado por el naftaleno, se recomienda hacer estudios para valorar la respuesta de las plantas en periodos de exposición más largos, considerando además el ciclo de vida de las especies experimentales, es decir efectuar ensayos con plantas en diferentes etapas de su desarrollo.

Es recomendable, efectuar pruebas en laboratorio y en el campo, debido a que muchas veces en laboratorio es difícil reproducir las condiciones reales de exposición de las plantas a los contaminantes en el ambiente además de las variaciones ambientales que pueden influir en la respuesta del espécimen probado.

Por otro lado, para estudiar el potencial tóxico de los hidrocarburos poliaromáticos, es recomendable realizar pruebas más finas utilizando marcadores moleculares para determinar los efectos, la asimilación y translocación de compuestos xenobióticos o sus metabolitos, cuantificar la bioacumulación, y tolerancia de los mismos en las plantas expuestas.

Es importante hacer estudios para evaluar la toxicidad de compuestos presentes en el ambiente que permitan una mejor aproximación de los efectos que pueden tener en los organismos expuestos. Por otro lado este tipo de pruebas permiten proponer especies y determinar características que en algún momento dado favorecen a ciertas especies para ser candidatos en estudios de valoraciones de riesgo o impacto ambiental utilizadas como biomonitores o bioindicadores de toxicidad, así como en tecnologías de limpieza como la fitorremediación de suelos contaminados.

BIBLIOGRAFIA

- > 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
- > Albert A. Lilia. 1990. *Curso Básico de Toxicología Ambiental*. Ed Limusa. Noriega pag.311
- > Aprill. W., y Sims, R.C. 1990. *Evaluation of the use of praire grass for stimulating polycyclic aromatic hydrocarbon treatment in soil*. Chemosphere, 20, 253-265
- > ICA INFORMA. 1985. *Aspectos metabólicos de la germinación de las semillas*. Transferencia tecnológica. Julio-Agosto-Septiembre. pp. 39-42.
- > Baud-Grasset, F., S. Baud-Grasset, S.,Safferman. 1993. *Evaluation of the Bioremediation of a Contaminated Soil With Phytotoxicity Tests*. Chemosphere 26 (7): pp. 1365.1374.
- > Bregman, A. 1996. *Laboratory Investigations in Cell and Molecular Biology*. John Wiley & Sons, U.S.A. 3ª edición. pp.
- > Bouchez M. D. Blanchet F. Haeseler PVandecasteele 1996. *Les Hidrocarbures Aromatiques Polycycliques dans lenvironnement. La degradation par voie microbienne*. pp. 797-824
- > 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
- > Cerniglia E. 1992. *Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons*. Biodegradation. 3:351-368.
- > Cerniglia C.E., Gibson T., y Van Baalen, C. 1979. *Algal oxidation of aromatic hydrocarbons, formation of 1-naphthol from naphthalene by Agmenellum quadruplicatum strain PR-6*. Biochemistry and Biophysics Research Communications. 88: 50-8.

- Cerniglia, C.E., Van Baalen C., y Gibson, D.T. 1980*. *Metabolism of naphthalene by the cyanobacterium oscillatoria* s.p. strain J.C.M. Journal of general microbiology. 116 485-495
- Cooper G.T. 1984. *Instrumentos y técnicas de bioquímica*. Ed. Reverte. Pag. 442
- Connell D.W, Miller GJ, Eds. 1984 *Chemistry and Ecotoxicology of Pollution*, John Wiley & Son, New York, 444 pp.
- Cunningham S.D., T. A. Anderson. A.P. Schwab, and F.C. Hsu. 1996 *Phytoremediation of soils contaminated with organic pollutants*. Adv. Agron. 56:56-114.
- Damian, F. 1999. *Estudios de Ecotoxicidad, Biorremediación y Fitorremediación en Suelos Contaminados con Hidrocarburos (Diesel)*, Tesis de Licenciatura Biología, UNAM.
- De Jong, E., J.A..Field et. J.A.M. de Bont 1986. *Evidence for a New extracellular peroxidase: Manganese inhibited peroxidase from the white-rot fungus*. Bos55.FEBS Letters 299. p.107-110
- Diego-Pérez, N. y 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. Salinitro, 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. Salinitro 2000. *Temporal Ecological Assesment of Oil Contaminated Soils Before and After Biorremediation*. Chemosphere 40: 419-426
- Edwards, N. 1983. *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in the Terrestrial Environment -A Review*. J. Environ. Qual. 12 (4):427-441
- Edwards, NT 1986 Uptake, translocation and metabolism of anthracene in bus bean *Phaseolus vulgaris* L. Environ Toxicol. Chem 5: 659-665
- Efrogmson A. y M. Alexander 1991. *Role Of Partitioning inbiodegrasdatation of phenanthrene dissolved in nonaqueous-phase liquids*. Environ. Sci. Technol., 28: pp. 1172-1179
- Freemark, K., MacQuarrie, P., Swanson, S., Aand Peterson, H. 1990 *Development of guidelines for testing pesticide toxicity to nontarget plants in Canada*. ASTM STP 1091. Philadelphia, PA. pp. 14-29

- Gerrit Davidse, Mario Sousa *et.al.* editores generales. Flora mesoamericana Volumen 6. *Alismataceae a Cyperaceae*. U. N. A. M. INSTITUTO DE BIOLOGIA Missouri Botanical Garden The Natural History Museum London.
- Gil 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, Ba
- Gunter Th., U. Dornberger, W. Fritsche. 1996. *Effects of Ryegrass on Biodegradation of Hydrocarbons in soil.*, Chemosphere 11 (2):203-215
- Halliwell, B 1987. *oxidative Damage, lipid peroxidation and antioxidant protection in chloroplasts* Chem. Phys. Lipids 44 327
- Hund, K., W. Traunspurger. 1994. *Ecotox-Evaluation Strategy for Soil Bioremediation Exemplified for a PAH-Contaminated site.* Chemosphere 29 (2): 371-390
- 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) Simulated Solar Radiation.* Ecotox. Environ. Saf 35:190-197
- INDEX MERKC 6289. Naphthalene pag. 6287
- Kirchmann H. 1991 *Organic pollutants in sewage sludge.* Swedisch J. Agric Res 21: 107-113
- Kotterman M. 1998. *Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Degradation by the White rot Fungus Bjerkandera sp. Strain BOS55.* Thesis, U.S.A. Wageningen Agricultural University.
- Leninger Albert. 1985. *Las Bases Moleculares de la Estructura y Función Celular.* 2 edición. Ed Omega. España Pag. 1117
- Leyes y Codigos de México : *Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente*, LGEPA 2000. Colección PORRUA. Decimonovena edición.
- Liaasen-Jensen, B., A. Jessen. 1971. *Quantitative Determination of Carotenoids in Photosynthetic Tissues.* In: Colowick, C., N. Kaplan (Eds.). *Methods of Enzymology*, Academic Press, London, pp. 668-677
- Liste, H., M. Alexander 2000. *Plant-Promoted Pyrene Degradation in Soil.* Chemosphere 40:7-10

- Lijinsky W 1991. *The formation and occurrence of polynuclear aromatic hydrocarbons associated with food*. *Mutat. Res.* 259: 251-261
- Liu Z, Jacobson A.M. y Luthy R.G. 1995. *Biodegradation of naphthalene in aqueous nonionic surfactant systems*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:145-151
- Márquez J. Et al. 1986 *Manual de prácticas de Biología Celular*. Lab. De Citología; Facultad de Ciencias. UNAM
- Marine Pollution Bulletin. 1998. *Impact of petrochemicals on the photosynthesis of halophila ovalis using chlorophyll fluorescence.*, Vol. 36. No. 6. Pp 429-436
- Matringe, M et al . 1989. *Protoporphyrinogen oxidase as a Molecular target for diphenl ether herbicides*. *Biochem. J.* 260. 231
- Mueller G. J. Cerniglia E. and Pritchard Hap. 1998. *Bioremediation of environments contaminated by polycyclic aromatic hydrocarbons*. Pp. 125-193; in Crawford R.D. and Crawford. *Bioremediation. Principles and applications* Cambridge University Press U.K.
- Neff J.M. 1979 *Polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment*. Applied Science Publishers, London
- Neilson H. Alasdair 1998. *PAHs and Related Compounds, Biology*. The Handbook of Environmental Chemistry Volume 3. Anthropogenic Compounds, Part J. Springer- Verlag Berlin Heidelberg, Germany. Pp. 386.
- Ortiz M. 2000, *Bioensayos con **Cyperus elegans** para la determinación del potencial fitotóxico de suelos contaminados con hidrocarburos en el pantano de Santa Alejandrina Veracruz*. Tesis de Licenciatura Biología. UNAM.
- Powell R. 1997. *The Use of Plants as a Field Biomonitor* In: Wang, W.,J. Gorsuch, J. Hughes. *Plants for Environmental Studies*, Lewis Publishers, U.S.A.
- PRONASE 2000. *Información de Glycine max Var. Huasteca 2000*. Productora Nacional de Semillas Certificadas. Tamaulipas pp 1-8
- Qiu X., Leland, T.W., Shah, S.I., Sorensen, D.L., y Kendal, E.W. 1997. *Phytoremediation of soil and water contaminants*. Washington, D.C. American Chemical Society. Pp. 186.199
- 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 Test*. Bull. Environ. Contam. Toxicool. 56: 956-963.
- Ramírez, M.E. 1998. *Biodisponibilidad y biodegradación del Naftaleno en Suelo*. Tesis de Maestría, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa (UAM-1), México.
- Ren L. Lorelei F. Zeiler. D. George Dixon and Bruce M. Greenberg. 1996. *Photoinduced Effects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on Brassica napus (Canola) during Germination and Easrly Seedling Development*. Ecotoxicology and environmental safety 33, 73-80 (1996) pp73-80
- Salanitro J. P., Dorn, M. Huesemann, K., Moore, I., Rhodes, L., Rice Jacksson, T. Vipoonnd, M. Western, H. Wiisniewsky. 1997. *Crude Oil Hidrocarbon Bioremediation and Soil Ecotoxiciy Assesment*. Environ. Sci. Technol. 31. 1769-1776.
- Salisbury, F. 1994. *Fisiología Vegetal*. Iberoamericana, España, pp. 759
- Sandermann H, Scheel D, Trenck TvD. 1984. *Use of plant cell cultures to study the metabolism of environmental chemicals*. Ecotoxicol Environ Saf 8: 167-182
- Sanchez del Castillo Felipe y Escalante Rebolledo Edgardo. 1981. *Un sistema de producción e plantas Hidroponia. Principios y Métodos de cultivo*. Universidad Autónoma de Chapingo (PATUACH). Pp. 87
- 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.
- Schwab, A.A. Al-Assi, M. Banks. 1998. *Plant and Environment Interactions. Adsorption of Naphtalene onto Plants Roots*. J. Environ. Qual. 27: 220-224
- Schwab, A.p., Hsu, F.c. 1996. *Phytoremediation de los suelos contaminados con agentes contaminadores orgánicos*. Avances en agronomía. 56: 55-114.
- Semple, Kirk T. 1997 en <http://www.eng.clemson.edu/ees/lee/pahs.html>
- Shimabukuro RH, Walsh WC. 1979. *Xenobiotic metabolism in plants: In vitro tissue, organ, and isolated cell techniques*. In *Xenobiotic Metabolism: Methods*, Paulson GD, Frear DS, Marks EP, Eds., ACS Symposium Series Vol. 97, American Chemical Society, Washington, D.C., pp.3-34

- Sims, R. C. y Overcash, M. R. 1983. *Fate of polynuclear aromatic compounds (HAPs) in soil-plant systems*. Residue Rev. 88:1-68
- Stanley, M. 1992. *Toxic Organic Compounds and Hydrocarbons*. In: Toxicological Chemistry, 2nd edition. Lewis Publishers, U.S.A., pp. 449
- 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
- Volkering F., Breure A.M. y J.G. Van Andel 1993. *Effect of microorganisms on the bioavailability and biodegradation of crystalline naphthalene*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 40: 535-540.
- Wang Wuncheng y Kathryn Freemark 1995 *The Use of Plants for Environmental Monitoring and Assessment*. Ecotoxicology and environmental safety 3rd edition. U.S.A. pp. 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, 1994. *Effects of Bioremediación on Residues, Activity and Toxicity in Soil Contaminated by Fuel Spills*. Soil Biol. Biochem. 22 (4):501-505.
- Wain R. L., Carter G.A. 1967. *Uptake, translocation and transformations by higher plants*. In Fungicides. An Advanced Treatise, VOL. 1. Torgeson DG, Ed., Academic Press, New York, pp. 516-612.
- Wild S.R., and K.C. Jones and A.E. Johnston. 1992 *The polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs) content of herbage from a long-term glassland experiment*. Atmos. Environ. 26 A: 1299-1307.
- Williams, L. B. 1987. *Principios y técnicas de Bioquímica experimental* ed. Omega pp. 270
- Woolhouse (1983) en Salysburi 1994 : *Fisiología Vegetal*. Iberoamericana, España, pp. 759
- Zermeño, E. L., Uribe, H. R., Salazar., C.L. Camacho, R.A., Jaimes, L.C., Gutierrez, R.M., Escalante, E.E., Gallegos, M.M and Gómez, S.A. . 2000. *Feasibility studies and toxicity tests for phytoremediation of soils contaminated with hydrocarbons*. In First International Conference on Petroleum Biotechnology. State of the Art and Perspectives. Proceedings. 235-239

Índice de Tablas, Figuras , Gráficas y Fotos

Tablas

Tabla 1	Propiedades físicas, químicas y biológicas de 16 HAP de interés ambiental EPA y 10 HAP seleccionados por VROM, como indicadores de contaminación por HAP.....	16
Tabla 2	Propiedades físicas del Naftaleno.....	15
Tabla 3	Clasificación taxonómica de las plantas utilizadas en este trabajo.....	27
Tabla 4	Condiciones de exposición ambiental para cada una de las pruebas realizadas con aquenios, semillas y plantas de <i>Cyperus elegans</i> y <i>Glycine max</i> ...	40
Tabla 5	Lista de sales minerales para solución nutritiva de cultivos hidropónicos....	41
Tabla 6	Comparación de la Media de los valores de talla y biomasa en peso seco de plantas de <i>Cyperus elegans</i> y <i>Glycine max</i> , cultivadas con y sin solución nutritiva durante 30 días después de la germinación de los aquenios y semillas.....	58
Tabla 7	Porcentajes de germinación y valor de P (en el análisis de varianza) para la prueba de toxicidad en la germinación, de plantas de <i>Cyperus elegans</i> y <i>Glycine max</i>	60
Tabla 8	Resultados y valor de P (en el análisis de varianza) para el bioensayo de toxicidad en biomasa de plantas de <i>Cyperus elegans</i> y <i>Glycine max</i>	62
Tabla 9	Resultados y valor de P (en el análisis de varianza) para el bioensayo de cuantificación de clorofila de plantas de <i>Cyperus elegans</i> y <i>Glycine max</i>	66
Tabla 10	Concentraciones del monitoreo del naftaleno residual en muestras de los sustratos de las plantas de <i>Cyperus elegans</i>	67
Tabla 11	Concentraciones del monitoreo del naftaleno residual en muestras de los sustratos de las plantas de <i>Glycine max</i>	68

Figuras

Fig. 1 Representación esquemática del destino ambiental de los HAP.....	14
Fig. 2 Naftaleno (HAP).....	16
Fig. 3 Planta superior en suelo.....	18
Fig. 4 Estructura molecular de la clorofila-a y b.....	21
Fig.5 Espectro de absorción de clorofila a, b y carotenos en la región de luz visible..	47
Fig. 6 Representación gráfica del espectro de absorción absoluta del naftaleno dada por la cantidad de luz absorbida (extinción) por este compuesto, frente a las longitudes de onda.....	48
Fig. 7 Curva de calibración de naftaleno soluble en agua a concentraciones de 1, 5, 10, 20 y 30 mg/L.....	49

Gráficas

Gráfica 1 Viabilidad de aquenios <i>Cyperus elegans</i> y semillas de <i>Glycine max</i> , probado y reportado.....	56
Gráfica 2 Crecimiento de plantas de <i>Cyperus elegans</i> cultivadas en hidroponía, comparado con plantas testigo regadas solo con agua.....	59
Gráfica 3 Crecimiento de plantas de <i>Glycine max</i> cultivadas en hidroponía, comparado con plantas testigo regadas solo con agua.....	59
Gráfica 4 Prueba de toxicidad del naftaleno en la germinación de aquenios de <i>Cyperus elegans</i>	61
Gráfica 5 Gráfica No. 5 Prueba de toxicidad del naftaleno en la germinación de semillas de <i>Glycine max</i>	61
Gráfica 6 Efecto del naftaleno en la producción de biomasa en Plantas de <i>Cyperus elegans</i>	63
Gráfica 7 Toxicidad del naftaleno en la producción de biomasa expresada en peso seco en Plantas de <i>Glycine max</i>	63

Gráfica 8 Contenido de clorofila a, b y total en plantas de <i>Cyperus elegans</i> suspendidas en una solución de naftaleno en concentraciones de 5,10,15,20,25 y 30 mg/L, comparadas con un testigo.....	65
Gráfica 9 Contenido de clorofila a, b y total en plantas de <i>Glycine max</i> , suspendidas en una solución de naftaleno en concentraciones de 5,10,20,25 y 30 mg/L, comparadas con un testigo.....	65
Gráfica 10 Porcentaje del contenido de clorofila a y b en plantas de <i>Cyperus elegans</i> y <i>Glycine max</i>	66

Fotos

Foto 1 <i>Cyperus elegans</i> ., Herbario Nacional UNAM.....	28
Foto 2 <i>Glycine max</i> ., Herbario Nacional UNAM.....	28
Foto 3 Planta adulta de <i>Cyperus elegans</i> en su hábitat natural.....	32
Foto 4 Aquenios de <i>Cyperus elegans</i>	39
Foto 5 Semillas de <i>Glycine max</i> , Var. Huasteca 2000.....	39
Foto 6 Cultivos Hidropónicos de plantas de Plantas de <i>Cyperus elegans</i>	51
Foto 7 Cultivos Hidropónicos de plantas de Plantas de <i>Glycine max</i>	51
Foto 8 Prueba de toxicidad en la germinación de aquenios de <i>Cyperus elegans</i> ..	52
Foto 9 Prueba de toxicidad en la germinación de semillas de <i>Glycine max</i>	52
Foto 10-11 Exposición delas plantas experimentales al Naftaleno.....	53