

***Crotalaria incana* L. y *Leucaena leucocephala* Lam. (LEGUMINOSAE): ESPECIES INDICADORAS DE TOXICIDAD POR HIDROCARBUROS DE PETRÓLEO EN EL SUELO**

Dinora VÁZQUEZ-LUNA, Mepivoseth CASTELÁN-ESTRADA, María del C. RIVERA-CRUZ, Ángel I. ORTIZ-CEBALLOS y Francisco IZQUIERDO R.

Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Km. 36.5 carretera México-Texcoco, Montecillo 56230, Estado de México, México, dinovaz@colpos.mx

(Recibido julio 2009, aceptado mayo 2010)

Palabras clave: CE₅₀, contaminación del suelo, índice de fitotoxicidad, petróleo crudo

RESUMEN

En este estudio se evaluaron los efectos tóxicos que produce un suelo Gleysol mólico contaminado con petróleo crudo, sobre plántulas de dos especies de leguminosas. Para ello se generó un índice de impacto fitotóxico (IIF) que integra cinco parámetros, medidos a través de índices relativos de impacto (IRIF_(x)) para las variables emergencia, altura, longitud radicular, biomasa aérea y biomasa radicular. Los bioensayos se realizaron bajo un diseño completamente al azar, con tres repeticiones, en condiciones semicontroladas, para evaluar la sensibilidad de *Leucaena leucocephala* y *Crotalaria incana* a diferentes concentraciones de HTP (hidrocarburos totales del petróleo). En general, se observaron efectos altamente significativos ($P \leq 0.01$) al aumentar la concentración de HTP en el sustrato. La emergencia de *L. leucocephala* fue 29 % menor con 80 000 mgkg⁻¹ de HTP, mientras que *C. incana* disminuyó 30 % con 32 000 mgkg⁻¹ de HTP. Respecto a los testigos, ambas especies mostraron un retraso de cinco días en la emergencia de las plántulas cuando se expusieron a altas concentraciones de HTP. Una disminución significativa en la acumulación de materia seca (MS) con concentraciones superiores a 20 000 mgkg⁻¹ de HTP se observó en ambas especies. Los IIF respectivos mostraron una disminución de 50 % con 80 000 y 25 000 mgkg⁻¹ de HTP; sin embargo, *L. leucocephala* no presentó efectos significativos con 10 000 mgkg⁻¹ de HTP. Por su parte, la CE₅₀ en *L. leucocephala*, se presenta con 80 000 mgkg⁻¹ de HTP, mientras que en *C. incana* este parámetro se observa a partir de 25 000 mgkg⁻¹ de HTP.

Key words: EC₅₀, crude oil, phytotoxicity index, soil pollution, total petroleum hydrocarbons

ABSTRACT

This study assesses the toxic effects produced by a Gleysol molic soil contaminated with crude oil on seedlings of two species of legumes. A phytotoxic impact index (IIF) was generated, which includes five parameters measured by relative rates of impact (IRIF_(x)) for variables; emergency, height, root length, aboveground biomass and root biomass. Bioassays were conducted under a completely randomized design with three replications under semi-controlled conditions, to assess the sensitivity of *Leucaena leucocephala* and *Crotalaria incana* at different concentrations of HTP (total

petroleum hydrocarbons). Effects were highly significant ($P \leq 0.01$) with increasing concentrations of HTP in substrate. The emergence of *L. leucocephala* was 29 % lower with 80 000 mgkg⁻¹ HTP, while *C. incana* decreased 30 % with 32 000 mgkg⁻¹ HTP respect to control. Both species showed a five-day delay in the emergence of seedlings when exposed to high levels of HTP. A significant decrease in the accumulation of dry matter (DM) at concentrations above 20 000 mgkg⁻¹ HTP was observed in both species. The respective IIF declined of 50 % with 80 000 and 25 000 mgkg⁻¹ TPH, but *L. leucocephala* had no significant effect with 10 000 mgkg⁻¹ TPH. Finally, the EC₅₀ in *L. leucocephala*, is presented with 80 000 mgkg⁻¹ TPH whereas in *C. incana* this parameter is noted from 25 000 mgkg⁻¹ TPH.

INTRODUCCIÓN

La industria del petróleo en México ha tenido un impacto negativo sobre los recursos naturales. En el sureste del país extensas zonas han sido afectadas por derrames que ocurren durante la extracción, conducción y transporte del petróleo (Rivera-Cruz *et al.* 2005). Los efectos negativos aumentan debido al mal estado de los ductos y a la dispersión de los contaminantes (Vega *et al.* 2009) causados por las abundantes precipitaciones características de regiones tropicales (Rivera-Cruz y Trujillo-Narcia 2004).

Para entender el efecto de los contaminantes del petróleo sobre los suelos es necesario conocer la relación que existe entre la cantidad, composición y grado de afectación sobre los organismos vivos (Al-Mutairi *et al.* 2008). Los estudios de contaminación de suelos se pueden realizar por dos vías: mediante análisis químico de los suelos (Kisic *et al.* 2009), o bien por la evaluación de la respuesta *in vivo* de plantas que crecen en suelos contaminados (Shahriari *et al.* 2007), lo cual permite evaluar los efectos del contaminante sobre los organismos (Porta *et al.* 1999). El último es el método empleado en este estudio, por lo que se hacen pruebas de toxicidad en plántulas para medir la respuesta fisiológica a diferentes concentraciones de HTP (hidrocarburos totales del petróleo) (Chaîneau *et al.* 2003).

La fitotoxicidad estudia los cambios perjudiciales en el funcionamiento, aspecto y crecimiento de las plantas en respuesta a una sustancia dada (OECD 1984). Por ello, en el presente trabajo se hicieron pruebas de toxicidad mediante bioensayos *ex-situ* para determinar el efecto fitotóxico en plántulas de *Leucaena leucocephala* y *Crotalaria incana* expuestas a suelo contaminado con diferentes concentraciones de petróleo crudo. El objetivo de este estudio es desarrollar y evaluar un índice que permita establecer parámetros de referencia estadísticamente confiables para determinar el impacto fitotóxico que generan

los hidrocarburos contaminantes del suelo sobre la emergencia, longitud radicular, altura y acumulación de materia seca (MS) en especies leguminosas.

MATERIALES Y MÉTODOS

El suelo empleado en los bioensayos corresponde a un Gleysol mólico (FAO 1998) que fue colectado en el ejido Arroyo Hondo Santa Teresa, municipio de Cárdenas, Tabasco. Se determinó el contenido de HTP en las muestras, encontrando un valor de 150 mgkg⁻¹ de peso seco; según la NOM-138-SEMARNAT/SS-2003 este suelo se considera no contaminado (SEMARNAT 2005).

Para establecer los bioensayos se empleó un diseño completamente al azar (DCA) con tres repeticiones y dos leguminosas *Leucaena leucocephala* Lam., y *Crotalaria incana* L. Estas fueron seleccionadas por ser especies que crecen silvestres en áreas contaminadas con petróleo; la primera presenta tolerancia, mientras que la segunda muestra sensibilidad a altas concentraciones de petróleo crudo (Rivera-Cruz y Trujillo-Narcia 2004, Rivera-Cruz *et al.* 2005). Por lo anterior, con *L. leucocephala* se evaluaron seis tratamientos a altas concentraciones, mientras que con *C. incana* se evaluaron siete tratamientos a bajas concentraciones (Rivera-Cruz *et al.* 2005). En cada bioensayo se utilizó el Protocolo 208 de la Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico (OECD 1984) modificado (Rivera-Cruz y Trujillo-Narcia 2004), que permite identificar en forma sencilla los síntomas de estrés en la planta (Wang y Freemark 1995).

El suelo fue secado a la sombra hasta 13 % de humedad, se molió y tamizó a 5.0 mm. Los sustratos para los ensayos se prepararon a partir de suelo testigo (150 mgkg⁻¹ HTP) que se mezcló con diferentes cantidades de petróleo crudo ligero y se homogeneizó, sin agregar solvente alguno; las concentraciones a

probar se calcularon en base seca (p/p). *Leucaena leucocephala* se evaluó con 150 (testigo), 10 000, 20 000, 40 000, 60 000 y 80 000 mgkg⁻¹ de HTP. Para *Crotalaria incana* se evaluaron concentraciones de 150 (testigo), 1700, 3500, 7000, 12 000, 25 000 y 32 000 mgkg⁻¹ de HTP.

Después de homogenizar las mezclas se les adicionó agua destilada hasta llevarlas a 28-30 % de humedad; se incubaron 24 horas y posteriormente se sembraron 50 semillas de *C. incana* y 25 de *L. leucocephala* por repetición, respectivamente, en contenedores de vidrio de 32 x 22 x 5.5 cm de profundidad. La cantidad de semillas sembradas por especie vegetal, se calculó según el tamaño de la semilla (Leishman *et al.* 2000), la viabilidad de la especie (Carreras *et al.* 2001, Bosco 2009) y el área del contenedor (Rivera-Cruz y Trujillo-Narcia 2004). Las semillas fueron escarificadas previamente para eliminar los tegumentos impermeables que constituyen una barrera para la germinación (Antoniolli *et al.* 1993, Carreras *et al.* 2001). La escarificación consistió en sumergir las semillas en ácido sulfúrico durante 15 minutos y posteriores lavados sucesivos con agua corriente hasta eliminar todos los residuos de ácido (Huachin y Carvajal 1998). Se realizaron pruebas de germinación para determinar la viabilidad inicial de las semillas, encontrando valores estándar de viabilidad en ambos lotes (Carreras *et al.* 2001, Bosco 2009).

Durante los ensayos se proporcionó agua para mantener la humedad del sustrato a capacidad de campo; no se aportaron nutrimentos N, P y K, para evitar interferencia sobre el crecimiento de los ejemplares. Las variables observadas fueron emergencia, emergencia acumulada, altura, longitud radicular y acumulación de MS aérea y radicular. La primera se midió cada cinco días, mientras que las siguientes variables se evaluaron 30 días después de la siembra; al finalizar dicho período se extrajeron las plántulas de los contenedores y se eliminó el exceso de suelo, se separó la parte aérea de la radicular, se colocaron en bolsas de papel etiquetadas y se secaron en estufa (75 °C, 48 h). El material se pesó en una balanza analítica para obtener los valores de MS. La comparación múltiple de medias se realizó mediante la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$). Los resultados numéricos fueron analizados mediante el software SAS (1999) versión 9.1, utilizando el procedimiento PROC GLM.

El índice relativo de impacto fisiológico (IRIF) propuesto, se calculó para cada variable (x) en ambas especies bajo estudio. Para medir el efecto de tratamientos, los IRIF_(x) de cada variable fueron

comparados con la correspondiente del testigo (150 mg.kg⁻¹ de HTP). El IRIF_(x) se obtuvo al restar una unidad al índice de tolerancia (Porta *et al.* 1999), ya que éste permite evaluar la respuesta biológica en un suelo contaminado. El índice de impacto fitotóxico (IIF) se obtuvo de la suma de todos los IRIF_(x), divididos entre el total de las variables estudiadas, cuyo valor representa la respuesta de la planta al contaminante en función del total de las variables fisiológicas estudiadas. Para ello se utilizaron las ecuaciones siguientes:

$$IRIF(x) = 1 - \left[\frac{TpRI}{TtRI} \right] \quad (1)$$

$$IIF = \frac{\sum_{i=1}^n IRIF(x)}{n} \quad i = 1, 2, \dots, t \quad (2)$$

donde: IRIF_(x): índice relativo de impacto fisiológico para la variable x

IIF: índice de impacto fitotóxico

Tp: concentración de HTP

Tt: testigo

RI: repetición 1...n

n: número de variables

Los resultados se interpretaron con los siguientes criterios: si el IRIF_(x) es igual a cero, los HTP no afectan la variable en ningún sentido; si el IRIF_(x) es menor a cero, los HTP aumentan la expresión de la variable; si el IRIF_(x) es mayor a cero, los HTP producen efectos negativos sobre la variable.

Se determinó además la CE₅₀ (concentración-efecto) que produce efectos observables en 50 % de la muestra, y la CNOE (concentración efecto no observable), que es la máxima concentración que puede existir en el medio sin que se observen efectos después de 30 días de exposición al petróleo.

RESULTADOS

El análisis de varianza de la emergencia acumulada en plántulas de *L. leucocephala* mostró diferencias estadísticas altamente significativas entre tratamientos ($P \leq 0.01$). La mayor emergencia se concentró en los primeros cinco días, en los tratamientos con concentraciones de hasta 40 000 mgkg⁻¹ de HTP, pero se observó un retraso de cinco días en la emergencia de plántulas expuestas a 60 000 y 80 000 mgkg⁻¹. Se encontró una disminución

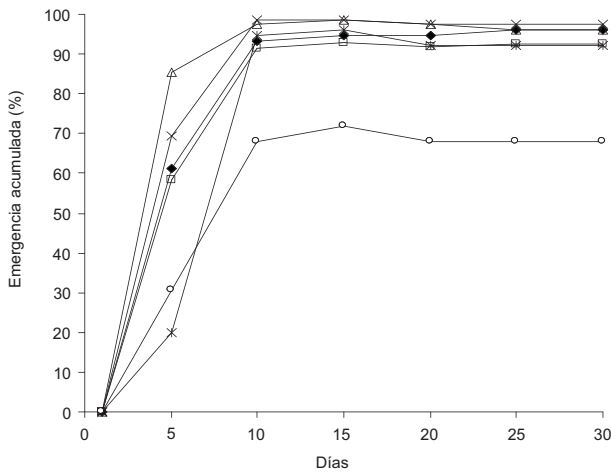


Fig. 1. Emergencia acumulada (%) durante 30 días de exposición a petróleo en un bioensayo con plántulas de *L. leucocephala* con 150 (◆); 10 000 (□); 20 000 (△); 40 000 (×); 60 000 (✱) y 80 000 (○) mgkg⁻¹ de HTP

altamente significativa en la emergencia acumulada con esta última concentración durante los 30 días de exposición al petróleo (**Fig. 1**). Lo anterior coincide con lo encontrado mediante el índice relativo de impacto fisiológico para la variable emergencia acumulada (IRIFe), el cual mostró ser 30 % menor respecto al testigo al final de la prueba.

El análisis de varianza de la emergencia acumulada de plántulas de *C. incana*, mostró diferencias altamente significativas entre tratamientos ($P \leq 0.01$). La mayor emergencia acumulada durante 30 días de exposición al petróleo se presentó con 1700 mgkg⁻¹, en tanto la menor emergencia se registró con 32 000 mgkg⁻¹ (**Fig. 2**). El IRIFe disminuyó 30 % con respecto al testigo.

IRIF para las variables altura, longitud radicular y acumulación de MS

El análisis de varianza del IRIF para las variables altura, longitud radicular, biomasa aérea, biomasa radicular y biomasa total de plántulas de *L. leucocephala* y *C. incana* mostró diferencias altamente significativas ($P \leq 0.01$) entre los tratamientos, durante el periodo de exposición al petróleo. Tanto la altura como longitud radicular de *L. leucocephala* disminuyeron a mayores dosis de petróleo. El tratamiento con 80 000 mgkg⁻¹ de HTP mostró el mayor IRIF sobre la altura y longitud radicular (**Fig. 3**), con una disminución respecto al testigo de 41 y 72 %, respectivamente. La mayor cantidad de biomasa aérea y radicular se encontró en el testigo y con 10 000 mgkg⁻¹ de HTP, lo que indica que esa

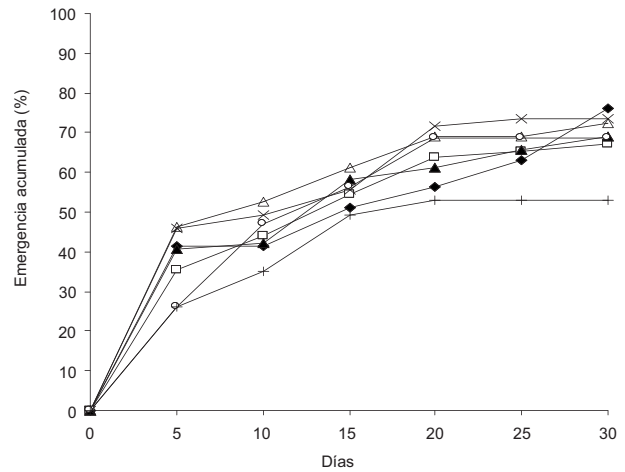


Fig. 2. Emergencia acumulada (%) durante 30 días de exposición a petróleo en un bioensayo con plántulas de *C. incana* con 150 (◆); 1700 (□); 3500 (▲); 7000 (×); 12 000 (△); 25 000 (○) y 32 000 (+) mgkg⁻¹ de HTP

concentración no es tóxica para esta especie. La menor acumulación de MS se encontró en suelos con concentraciones de 20 000 a 80 000 mgkg⁻¹ de HTP, donde se encontraron los mayores IRIF (**Fig. 3**). Este comportamiento se asoció con una producción 45 % menor de hojas; como consecuencia, el crecimiento de tallos y raíces fue afectado de manera sustancial, lo que redujo la biomasa radicular en 53 % respecto al testigo.

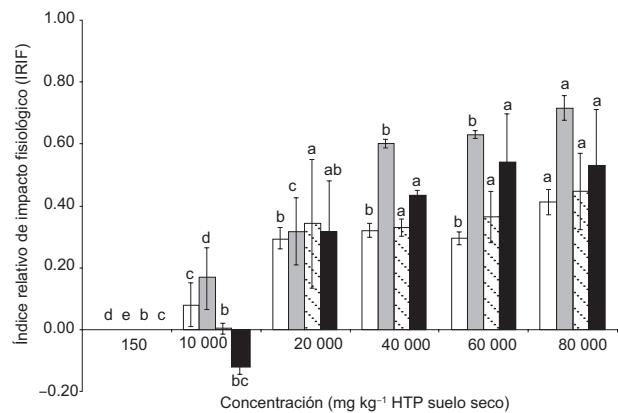


Fig. 3. Índice relativo de impacto fisiológico (IRIF) sobre las variables altura (□), longitud radicular (▒), acumulación de MS aérea (▨) y radicular (■) en plántulas de *L. leucocephala* por exposición a 150, 10 000, 20 000, 40 000, 60 000 y 80 000 mgkg⁻¹ HTP. Literales diferentes indican diferencia estadística entre tratamientos (Tukey $P \leq 0.05$; a>b>c)

En el bioensayo con *C. incana*, el análisis de varianza de los IRIF para las variables altura, longitud radicular y acumulación de MS, mostró efectos negativos con el incremento en la concentración de

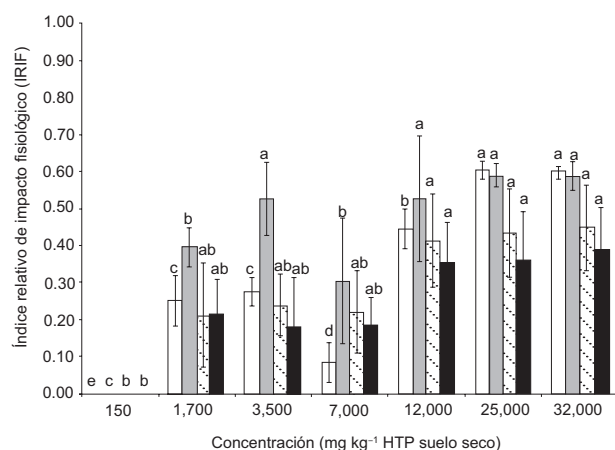


Fig. 4. Índice relativo de impacto fisiológico (IRIF) sobre las variables altura (□), longitud radicular (▨), acumulación de MS aérea (▤) y radicular (■) en plántulas de *C. incana* por exposición a 150, 1700, 3500, 7000, 12 000, 25 000 y 32 000 mgkg⁻¹ HTP. Tratamientos con literal diferente indican diferencia estadística (Tukey p ≤ 0.05; a>b>c)

petróleo (**Fig. 4**). La altura y longitud radicular mostraron menor magnitud en concentraciones de 12 000 a 32 000 mgkg⁻¹ de HTP, mientras que la mayor acumulación de MS aérea y radicular se encontró con concentraciones de 1700 a 7000 mgkg⁻¹ de HTP. Esta diferencia se explica porque los tallos de *C. incana* con bajas concentraciones presentaron 20 % mayor longitud-diámetro y longitud de la radícula que en concentraciones mayores a 12,000 mgkg⁻¹ de HTP.

Índice de impacto fitotóxico

El análisis de varianza del IIF en plántulas de *L. leucocephala* y *C. incana* expuestas a diferentes concentraciones de petróleo mostraron diferencias estadísticas altamente significativas (P ≤ 0.01). En ambas especies, los IIF se incrementaron al aumentar la concentración de petróleo en el sustrato, lo que tuvo repercusiones significativas sobre el crecimiento y desarrollo (**Cuadro I**). Excepcionalmente, en *L. leucocephala* con 10 000 mgkg⁻¹ de HTP se encontraron efectos negativos de sólo 7 %

La CE₅₀ para *L. leucocephala* se observó en suelo con 80 000 mgkg⁻¹ de HTP, mientras que para *C. incana* este parámetro fue obtenido a partir de 25 000 mgkg⁻¹ de HTP. En plántulas de *L. leucocephala* se encontró la CNOE con 10 000 mgkg⁻¹, ya que su efecto fue similar al testigo; en *C. incana* no se encontró una CNOE durante un periodo de 30 días de exposición al petróleo, lo que muestra una sensibilidad de la especie a concentraciones altas de petróleo (**Fig. 5**).

CUADRO I. ÍNDICE DE IMPACTO FITOTÓXICO (IIF) EN PLÁNTULAS DE *Leucaena leucocephala* Y *Crotalaria incana* DESPUÉS DE 30 DÍAS DE EXPOSICIÓN A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE HTP

Concentración de HTP mgkg ⁻¹	IIF
<i>L. leucocephala</i>	
150	0.00bc
10 000	0.07c
20 000	0.32ab
40 000	0.43a*
60 000	0.42a
80 000	0.54a
<i>C. incana</i>	
150	0.00e
1700	0.29cd
3500	0.35bc
7000	0.21d
12 000	0.42b
25 000	0.54a
32 000	0.54a

*Tratamientos con la misma letra son iguales estadísticamente (Tukey p ≤ 0.05) (a>b>c...)

DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio muestran efectos evidentes sobre la altura y la longitud de la raíz, lo que condujo a una menor acumulación de biomasa en ambas especies. Estos resultados son similares a los encontrados por Chaîneau *et al.* (1997, 2003), Issoufi *et al.* (2006) y Reynoso-Cuevas *et al.* (2008). Los efectos provocados por exposiciones agudas y generalizadas pueden ocasionar problemas de gran magnitud y desequilibrios en el ecosistema (Labud *et al.* 2007).

Durante el desarrollo metodológico de los bioensayos, la escarificación de las semillas fue una estrategia adecuada: al retirar los tegumentos impermeables se eliminó una barrera física para la germinación (Antoniolli *et al.* 1993, Carreras *et al.* 2001), lo que permite concluir que las respuestas observadas fueron resultado de las concentraciones de HTP en el sustrato.

Por otra parte, se encontró que la emergencia de ambas especies se retrasó cinco días con altas concentraciones de HTP. Esto puede deberse a que la capa hidrofóbica formada por el petróleo disminuye la retención de agua hasta en 50 % respecto a suelos no contaminados (Li *et al.* 1997, Sawatsky y Li 1997) y afecta la primera etapa de la germinación (Ross y Salisbury 2000), que consiste en la hidratación de proteínas y otros coloides e inicia la activación de las enzimas que aumentan el metabolismo, la elon-



Fig. 5. Efectos fitotóxicos observados después de 30 días de exposición a diferentes concentraciones de HTP (mgkg^{-1}) en plántulas de *Leucaena leucocephala* (A) y *Crotalaria incana* (B)

gación de las células de la radícula y la emergencia de la plántula. Resultados similares fueron reportados por Quiñones *et al.* (2003) en dos variedades de maíz expuestas en suelo con $35\,000\ \text{mgkg}^{-1}$ de petróleo. Otros autores también encontraron disminución e inhibición de la germinación en diferentes especies (Dorn y Salanitro 2000, Chaîneau *et al.* 2003, Besatpour *et al.* 2008, Kusic *et al.* 2009).

Las plántulas de *C. incana* fueron más sensibles a los HTP que aquellas de *L. leucocephala*, a pesar de que las primeras fueron expuestas a menores concentraciones. Esto indica que esta última especie presenta una tolerancia espontánea al petróleo en el suelo. Por otra parte, las semillas de *L. leucocephala* son de mayor tamaño que las de *C. incana* y numerosos estudios muestran que existe un efecto protector relacionado al tamaño de la semilla (Dolan 1984). Leishman *et al.* (2000) mencionan que el tamaño de la semilla es una característica evolutiva. Algunos estudios señalan que la germinación puede ser afectada por las fracciones volátiles de los hidrocarburos, las cuales penetran y dañan el embrión de las semillas, disminuyendo la germinación hasta en 70 % (Labud *et al.* 2007), lo que finalmente afecta la emergencia (Hou *et al.* 1999). Al respecto, Chaîneau *et al.* (1997) afirman que la fracción ligera del petróleo (naftas) es veinte veces más tóxica que la fracción pesada. Sin embargo, estudios realizados por Rivera-Cruz y Trujillo-Narcia (2004) mencionan que *Mimosa pigra* y dos especies de *Cyperus* aumentaron la germinación en 200 % por efecto del petróleo en el suelo. Bossert y Bartha (1985) y Salanitro *et al.*

(1997) señalan que ciertas fracciones del petróleo pueden funcionar como fitohormonas promotoras de la germinación.

La fitotoxicidad observada en plántulas de *L. leucocephala* y *C. incana* incrementó con las concentraciones de petróleo en el sustrato; sin embargo, cada especie mostró diferente sensibilidad. Este efecto puede deberse a que las plántulas de *L. leucocephala* tienen cotiledones más grandes y, por tanto, mayor cantidad de reservas que le permiten a la plántula mantenerse independiente de su medio durante un periodo mayor. Al respecto, Hampton y Coolbear (1990) mencionan que las diferencias en el vigor de las plántulas está asociado principalmente a la cantidad de reservas y eficiencia en el metabolismo, lo que podría representar una condición ventajosa para las especies con cotiledones de mayor tamaño. Por otra parte, los cotiledones de las leguminosas tienen una reserva importante de proteínas que se metaboliza durante el desarrollo de las plántulas (Chrispeels *et al.* 1976) para proveer al organismo en crecimiento de aminoácidos y energía antes del inicio de la fotosíntesis; si se presentan alteraciones en este proceso, el crecimiento posterior de la plántula será afectado.

Las dos especies en estudio evidenciaron disminución de la altura y longitud radicular de las plántulas por el efecto del petróleo en el suelo. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Chaîneau *et al.* (1997), quienes explican que la inhibición del crecimiento de las plantas muestra relación directa con el aumento de la concentración de hidrocarburos.

Quiñones *et al.* (2003) afirman que concentraciones altas de hidrocarburos impiden la absorción de agua y nutrimentos debido a la formación de una capa hidrofóbica sobre las raíces. Los resultados obtenidos confirman que el mayor daño ocurre sobre la biomasa radicular debido al contacto con el petróleo. Kapustka y Reporter (1998) encontraron que concentraciones altas de hidrocarburos ocasionan daños severos e inhiben el rebrote de meristemos, disminuyen la elongación radicular y el crecimiento e impiden la difusión del oxígeno celular debido a las condiciones anóxicas del suelo (Rentz *et al.* 2003). Lo anterior coincide con Reynoso-Cuevas *et al.* (2008), quienes identificaron disminución de la longitud radicular a medida que aumenta la concentración del hidrocarburo. Este efecto puede atribuirse a que el petróleo forma una capa que limita la absorción de agua y nutrimentos por la raíz (Quiñones *et al.* 2003), lo cual puede afectar el posterior desarrollo y fructificación. Al respecto, estudios de fructificación en maíz muestran disminución de la viabilidad de la semilla (Ogboghodo *et al.* 2004) y reducción de la composición química (carbohidratos y proteínas) de las semillas (Agbogidi *et al.* 2007).

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en los ensayos con *L. leucocephala* y *C. incana* muestran que los HTP en el suelo desencadenan varios daños fisiológicos sobre las plantas expuestas a altas concentraciones, entre ellos el retraso y disminución de las tasas de emergencia. Esto podría reducir la presencia de las especies en ecosistemas cuyo suelo sea contaminado con petróleo crudo.

El índice relativo de impacto fisiológico (IRIF) permite medir los efectos de los tratamientos sobre las variables altura, longitud de la raíz y acumulación de MS en plántulas, y compararlos con su variable correspondiente en el testigo.

Los IRIF indican que las dos especies estudiadas disminuyeron de manera significativa su producción de MS en concentraciones mayores a 20 000 mgkg⁻¹ de HTP, lo cual se expresó en menor producción de hojas, tallos y biomasa radicular respecto al testigo. Los resultados confirman que el daño principal ocurre sobre la radícula al entrar en contacto directo con el petróleo, lo cual afecta el posterior desarrollo de la planta.

Los IIF permitieron determinar que la CE₅₀ en *L. leucocephala*, se presenta con 80 000 mgkg⁻¹ de HTP, mientras que en *C. incana* este parámetro fue

observado a partir de 25 000 mgkg⁻¹ de HTP.

Los IIF permitieron determinar la CNEO en plántulas de *L. leucocephala*, que se observó con 10 000 mgkg⁻¹ y representa una alta tolerancia a los HTP. En *C. incana* no se observó la CNEO durante los 30 días que duraron los ensayos, lo que muestra alta sensibilidad de la especie.

El índice de impacto fitotóxico (IIF) generado en este estudio es útil para integrar y ponderar los daños causados en plantas que crecen en presencia de petróleo en el suelo; proporciona el valor global de los efectos acumulados sobre los organismos estudiados y los expresa como porcentaje de daño respecto a un testigo sin daño. El IIF representa de manera numérica el impacto que producen los hidrocarburos sobre el crecimiento de las plántulas, con confiabilidad estadística y alta correspondencia con los efectos observados visualmente.

AGRADECIMIENTOS

El primer autor agradece al CONACyT por la beca otorgada para realizar los estudios de posgrado, a la Dra. Luz del Carmen Lagunes Espinosa por su apoyo en el Comité Académico del Campus Tabasco y un agradecimiento especial a la Dra. Eustolia García López y Carlos Almeida por su ayuda para la identificación taxonómica de las especies utilizadas en el presente trabajo.

REFERENCIAS

- Agbogidi O.M., Eruotor P.G., Akparobi S.O. y Nnaji G.U. (2007). Evaluation of crude oil contaminated soil on the mineral nutrient elements of maize (*Zea mays* L.). *J. Agron.* 6, 188-193.
- Al-Mutairi N., Bufarsan A. y Al-Rukaibi F. (2008). Ecorisk evaluation and treatability potential of soils contaminated with petroleum hydrocarbon-based fuels. *Chemosphere* 74, 142-148.
- Antoniolli Z.I., Bellé R.A., Giracca E.M. y Thomas P.S. (1993). Dormancy break of *Crotalaria* seeds. *Ciência Rural* 23, 165-168.
- Besalatpour A., Khoshgoftarmanesh A.H., Hajabbasi M.A. y Afyuni M. (2008). Germination and growth of selected plants in a petroleum contaminated calcareous soil. *Soil Sediment Contam.* 17, 665-676.
- Bosco O. (2009). Influência de tratamentos pré-germinativos, temperatura e luminosidade na germinação de sementes de *Leucena* (*Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit.), cv. Cunningham. *Caatinga* 22, 132-138.

- Bossert I. y Bartha R. (1985). Plant growth in soils with a history of oily sludge disposal. *J. Soil Sci.* 140, 75-77.
- Carreras M.E., Pascualides A.L. y Planchuelo A.M. (2001). Comportamiento germinativo de las semillas de *Crotalaria incana* L. (Leguminosae) en relación a la permeabilidad de la cubierta seminal. *Agriscientia* 18, 45-50.
- Chaîneau C.H., Morel J.L. y Oudot J. (1997). Phytotoxicity and plant uptake of fuel oil hydrocarbons. *J. Environ. Qual.* 26, 1478-1483.
- Chaîneau C.H., Yepremian C., Vidalie J.F., Ducreux J. y Ballerini D. (2003). Bioremediation of a crude oil-polluted soil: biodegradation, leaching and toxicity assessments. *Water Air Soil Poll.* 144, 419-440.
- Chrispeels M.J., Baumgartner B. y Harris N. (1976). Regulation of reserve protein metabolism in the cotyledons of mung bean seedlings. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 73, 3168-3172.
- Dolan R.W. (1984). The effect of seed size and maternal source on individual size in a population of *Ludwigia leptocarpa* (Onagraceae). *Am. J. Bot.* 71, 1302-1307.
- Dorn P.B. y Salanitro J.P. (2000). Temporal ecological assessment of oil contaminated soils before and after bioremediation. *Chemosphere* 40, 419-426
- FAO (1998). World Soil Resources Reports 84. World Reference Base for Soil Resources, FAO-ISRIC-ISSS. Roma. 91 p.
- Hampton J.G. y Coolbear P. (1990). Potential versus actual seed performance – can vigour testing provided and answer? *Seed Sci. Technol.* 18, 215-228.
- Hou F.S.L., Leung D.W.M., Milke M.W. y MacPherson D.J. (1999). Improvement in ryegrass seed germination for diesel contaminated soils by peg treatment technology. *Environ. Technol.* 20, 413-418.
- Huachin C.J.A. y Carvajal J.A. (1998). Análisis de la semilla de doce leguminosas forrajeras tropicales. Memorias. XI Reunión Científica Tecnológica Forestal y Agropecuaria, INIFAP. Tabasco, México. pp. 6-327.
- Issoufi I., Rhykerd R.L. y Smiciklas K.D. (2006). Seedling growth of agronomic crops in crude oil contaminated soil. *J. Agron. Crop Sci.* 192, 310-317.
- Kapustka L. y Reporter M. (1998). Terrestrial primary producer. En: *Handbook of ecotoxicology*. (P. Calow, Ed.). Blackwell Science, Oxford, Vol. 1, pp. 280-294.
- Kisic I., Mesic S., Basic F., Brkic V., Mesic M., Durn G., Zgorelec Z. y Bertovic L. (2009). The effect of drilling fluids and crude oil on some chemical characteristics of soil and crops. *Geoderma* 149, 209-216.
- Labud V., García C. y Hernández T. (2007). Effect of hydrocarbon pollution on the microbial properties of a sandy and a clay soil. *Chemosphere* 66, 1863-1871.
- Leishman M.R., Wright I.J., Moles A.T. y Westoby M. (2000). The evolutionary ecology of seed size. En: *Seeds: the ecology of regeneration in plant communities*. (M. Fenner, Ed.). CAB International, Wallingford, pp. 31-57.
- Li X., Feng Y. y Sawatsky N. (1997). Importance of soil-water relations in assessing the endpoint of bioremediated soils. *J. Plant Soil* 192, 219-226.
- OECD (1984). Test 208. Terrestrial plant test: seedling emergence and seedling growth test. Organization for Economic Co-operation and Development. Guía técnica. París, Francia. 21 p.
- Ogboghodo I.A., Iruaga E.K., Osemwota I.O. y Chokor J.U. (2004). An assessment of the effects of crude oil pollution on soil properties, germination and growth of maize (*Zea mays*) using two crude types, Forcados Light and Escravos Light. *Environ. Monit. Assess.* 96, 143-152.
- Porta A., Filliat N. y Plata N. (1999). Phytotoxicity and phytoremediation studies in soils polluted by weathered oil. En: *Phytoremediation and innovative strategies for specialized remedial applications*. (B.C. Alleman y A. Lesson, Eds.). Battell, Columbus, pp. 51-56.
- Quiñones A.E.E., Ferrera C.R., Gavi R.F., Fernández L.L., Rodríguez V.R. y Alarcón A. (2003). Emergencia y crecimiento de maíz en un suelo contaminado con petróleo crudo. *Agrociencia* 37, 585-594.
- Rentz A.J., Chapman B., Álvarez P.J.J. y Schnoor J.L. (2003). Stimulation of hybrid poplar growth in petroleum-contaminated soils through oxygen addition and soil nutrient amendments. *Int. J. Phytoremed.* 5, 57-72.
- Reynoso-Cuevas L., Gallegos-Martínez M.E., Cruz-Sosa F. y Gutiérrez-Rojas M. (2008). *In vitro* evaluation of germination and growth of five plant species on medium supplemented with hydrocarbons associated with contaminated soils. *Bioresource Technol.* 99, 6379-6385.
- Rivera-Cruz, M.C. y Trujillo-Narcía A. (2004). Estudio de toxicidad vegetal en suelos contaminados con petróleos nuevo e intemperizado. *Interciencia* 29, 369-376.
- Rivera-Cruz M.C., Trujillo-Narcía A., Miranda C.M.A., Maldonado C.E. (2005). Evaluación toxicológica de suelos contaminados con petróleos nuevo e intemperizado mediante ensayos con leguminosas. *Interciencia* 30, 326-331.
- Ross C.W. y Salisbury F.B. (2000). *Fisiología de las plantas 3: desarrollo de las plantas y fisiología ambiental*. Thomson Paraninfo, Madrid, 458 p.
- Salanitro J., Dorn P., Huesemann M., Moore K., Rhodes I., Rice L., Vipond T., Western M. y Wisniewsky H. (1997). Crude oil hydrocarbon bioremediation and soil ecotoxicity assessment. *Environ. Sci. Technol.* 31, 1769-1776.
- SAS (1999). Statistical Analysis System: usage and reference. Version 9.1. Software. SAS Institute Inc. Cary, NC, EUA.

- Sawatsky N. y Li X. (1997). Importance of soil-water relations in assessing the endpoint of bioremediated soils. II. Water-repellency in hydrocarbon contaminated soils. *J. Plant Soil* 192, 227-236.
- SEMARNAT (2005). Norma Oficial Mexicana NOM-138-SEMARNAT/SS-2003. Límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y las especificaciones para su caracterización y remediación. Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. Diario Oficial de la Federación. 29 de marzo de 2005.
- Shahriari M.H., Savaghebi-Firoozabadi G., Azizi M., Kalantari F. y Minai-Tehrani D. (2007). Study of growth and germination of *Medicago sativa* (alfalfa) in light crude oil-contaminated soil. *Res. J. Agr. Biol. Sci.* 3, 46-51.
- Vega A.F., Covelo F.E., Reigosa J.M. y Andrade M.L. (2009). Degradation of fuel oil in salt marsh soils affected by the Prestige oil spill. *J. Hazard. Mater.* 166, 1020-1029.
- Wang W. y Freemark K. (1995). The use of plants for environmental monitoring and assessment. *Ecotox. Environ. Safe.* 30, 289-301.