

## FITOTOXICIDAD DE HAP, CRUDOS EXTRA PESADOS Y SUS FRACCIONES EN *Lactuca sativa*: UNA INTERPRETACIÓN INTEGRAL UTILIZANDO UN ÍNDICE DE TOXICIDAD MODIFICADO

Beatriz PERNÍA<sup>1\*</sup>, Diego ROJAS-TORTOLERO<sup>2</sup>, Lucía SENA<sup>2</sup>, Angela DE SISTO<sup>2</sup>,  
Ysvic INOJOSA<sup>2</sup> y Leopoldo NARANJO<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Guayaquil, Av. Raúl Gómez Lince s/n y Av. Juan Tanca Marengo, Guayaquil, Ecuador, C.P. 090150

<sup>2</sup> Dirección de Energía y Ambiente, Fundación Instituto de Estudios Avanzados (IDEA), Carretera Nacional Baruta-Hoyo de la Puerta, Valle de Sartenejas, Baruta, Caracas, Venezuela, C.P.1080

<sup>3</sup> Universidad Regional Amazónica (Ikiam), vía a Muyuna, km. 7, CP 150150, Tena, Ecuador

\*Autor de correspondencia; beatrizpernia@gmail.com

(Recibido noviembre 2016; aceptado junio 2017)

Palabras clave: hidrocarburos, índice integral de fitotoxicidad, germinación, plantas

### RESUMEN

La contaminación de ecosistemas por hidrocarburos tóxicos y carcinogénicos derivados del petróleo es un problema ambiental. Por ello, se han desarrollado técnicas como la biorremediación para sanear lugares contaminados utilizando microorganismos con capacidad de degradar hidrocarburos; sin embargo, algunos pueden biotransformar estos compuestos generando metabolitos más tóxicos. Con el objeto de detectar la posible formación de compuestos tóxicos se han diseñado pruebas de toxicidad sobre la germinación y el crecimiento de plántulas de *Lactuca sativa*, como marco de referencia. La finalidad del presente trabajo fue estudiar el efecto tóxico o estimulante de tres hidrocarburos aromáticos policíclicos: fenantreno, naftaleno y pireno; el efecto del crudo extrapesado Carabobo y sus fracciones de saturados y aromáticos, y finalmente la evaluación del posible efecto tóxico de hidrocarburos biotratados con *Penicillium aculeatum* (BM-83). Se demostró que bajas concentraciones de naftaleno, fenantreno, pireno y saturados, generaron un estímulo de crecimiento en las plántulas de *L. sativa*. Por otro lado, a altas concentraciones de hidrocarburos, el crecimiento del hipocótilo fue el parámetro más afectado, lo que sugiere la importancia de utilizar un índice de toxicidad modificado denominado índice integral de fitotoxicidad (IIF), el cual considera el crecimiento del hipocótilo. El orden de toxicidad de los hidrocarburos según el índice IIF fue el siguiente: naftaleno (100) > fenantreno (65) > pireno (64) > aromáticos (27) > CEP (7) > saturados (1). El IIF permitió evidenciar que el hongo BM-83 tuvo la capacidad de biotransformar los hidrocarburos sin generar compuestos más tóxicos que los originales.

Key words: hydrocarbons, integral index of phytotoxicity, germination, plants

### ABSTRACT

The pollution of ecosystems by toxic and carcinogenic hydrocarbons derived from petroleum is an environmental problem. Therefore, scientists have developed bioremediation

to clean up contaminated sites with microorganisms that have the ability to degrade hydrocarbons. However, some are capable of generating more toxic metabolites when they biotransform these compounds. To detect the possible formation of toxic compounds, toxicity tests on germination and seedling growth of *Lactuca sativa* have been designed as a frame of reference. The aim of this work was to study the toxic effects of extra-heavy crude Carabobo and its saturated and aromatic fractions; three polycyclic aromatic hydrocarbons, phenanthrene, naphthalene and pyrene, and finally the evaluation of the possible toxic effect of biotreated hydrocarbons with *Penicillium aculeatum* (BM-83). It was demonstrated that low concentrations of naphthalene, phenanthrene, pyrene and saturated hydrocarbons, generated stimulus for growth in the seedlings of *L. sativa*. On the other hand, high concentrations of hydrocarbons mainly affected the growth of hypocotyls, which suggests the importance of using a modified toxicity index that considers the growth of the hypocotyl. The order of toxicity of hydrocarbons according to the IIF was naphthalene (100) > phenanthrene (65) > pyrene (64) > aromatic (27) > CEP (7) > saturated (1). The IIF allowed showing that the fungus BM-83 is able to biotransform hydrocarbons without generating compounds that are more toxic than the original.

## INTRODUCCIÓN

El petróleo y sus derivados representan la fuente de energía más importante del mundo y se utilizan como materia prima en numerosos procesos de la industria química. Sin embargo, la explotación, producción, refinación y transporte de petróleo y sus derivados conlleva ocasionalmente accidentes técnicos y operacionales que causan graves deterioros al ambiente, generando daños irreversibles (León et al. 2009, Pernía et al. 2012).

Los hidrocarburos en general son compuestos tóxicos que pueden ser acumulados por plantas y animales generando mutaciones e incluso la muerte (Das y Chandran 2011). La Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (USEPA, por sus siglas en inglés) considera que algunos hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) son tóxicos y posiblemente carcinógenos humanos (Nadon et al. 1995).

Debido a la problemática de la contaminación por hidrocarburos y su potencial toxicidad se han desarrollado técnicas para solventar o mitigar los problemas de contaminación, entre las que se encuentran métodos físicos y químicos que resultan muy costosos (Plaza et al. 2005). Por ello en la actualidad se han desarrollado nuevas técnicas más amigables con el ambiente y de menor costo, como es el caso de la biorremediación.

La biorremediación comprende un conjunto de técnicas que se basan en el uso de bacterias, hongos y plantas, así como de sus compuestos metabólicos o enzimas, los cuales se emplean para neutralizar sustancias tóxicas transformándolas en compuestos menos tóxicos o inocuos para el ambiente (Bamforth y Singleton 2005). En este sentido, la micorremediación,

que se vale de los hongos como organismos que transforman los contaminantes, surge como una estrategia viable para el saneamiento de cuerpos de agua y suelos contaminados con hidrocarburos (Chaillan et al. 2004, Moreno et al. 2004, Naranjo et al. 2007, Pernía et al. 2012).

Para evidenciar la eficacia de los procesos de biorremediación, en la mayoría de los casos se realizan evaluaciones basadas sólo en análisis químicos de reducción en la concentración de contaminantes. No se toma en cuenta la posible transformación de los químicos en compuestos más tóxicos, con lo cual se subestima el verdadero riesgo ambiental (Plaza et al. 2005). Además, en algunos casos este tipo de estudios subestima los posibles daños, al no considerar la biodisponibilidad de los contaminantes. Por ello, se ha propuesto la realización de bioensayos que permitan integrar la información de la presencia de contaminantes, su biodisponibilidad y los posibles efectos tóxicos sobre los organismos vivos.

Una de las especies más estudiadas en ensayos de toxicidad ha sido *Lactuca sativa* L. (lechuga), ya que es una planta de crecimiento rápido, de pequeño tamaño, fácil de mantener en el laboratorio y de bajo costo. Además, en el caso de los hidrocarburos, se ha seleccionado trabajar con *L. sativa* debido a las siguientes evidencias: el bioensayo con esta planta está avalado internacionalmente por la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA, por sus siglas en inglés), la Organización para la Cooperación y Desarrollo Económicos (OCDE) y la USEPA (Wang y Freemark 1995).

Además, los ensayos con lechuga son sencillos, poco costosos y pueden utilizarse como indicadores de los efectos biológicos de sustancias químicas

presentes en muestras ambientales de diferentes orígenes (Torres et al. 2006). Banks y Schultz (2005) la reportan como especie óptima para realizar estudios de toxicidad en suelos impactados con crudos por su sensibilidad a este tipo de compuestos. Finalmente, su uso se ha propuesto para el monitoreo de suelos contaminados con crudos en procesos de biorremediación, demostrándose que *L. sativa* es la especie de planta más sensible para este fin (Plaza et al. 2005).

El bioensayo de fitotoxicidad con *L. sativa* se basa en la determinación de variaciones en la germinación y crecimiento inicial de las plántulas, debido a que en ese estadio de desarrollo son más sensibles a los contaminantes ambientales (Baud-Grasset et al. 1993). Para realizar este bioensayo se determina el porcentaje de germinación y se mide la longitud de los hipocótilos y las radículas (Greene 1988). Aunque estas pruebas de fitotoxicidad son sumamente útiles, la interpretación de los resultados en algunos casos es compleja, ya que se puede presentar inhibición en el crecimiento de la radícula y estímulo en el crecimiento del hipocótilo o viceversa. Por ello, se han generado una serie de índices para integrar la información y facilitar su interpretación.

En este sentido, se han utilizado diversos índices para evaluar los efectos fitotóxicos de los compuestos sobre las plántulas, entre los cuales se encuentran: 1) el índice de vigor de las plántulas (IVP), que considera el porcentaje de germinación y el crecimiento de la radícula (Abdul-Baki y Anderson 1973); 2) el índice de germinación que, al igual que el IVP, sólo considera el porcentaje de germinación y el crecimiento de la radícula (Zucconi et al. 1981); 3) el índice relativo de fitotoxicidad (IRF), en que se analizan los tres parámetros por separado (germinación, radícula e hipocótilo), y 4) el índice absoluto de fitotoxicidad (IAF), en que se suman los valores del IRF (Rivera-Cruz y Trujillo-Narcia 2004). Sin embargo, algunos de los índices señalados sólo consideran los efectos sobre la radícula y no los que se generan sobre los hipocótilos.

La finalidad del presente trabajo fue estudiar el efecto tóxico o estimulante de diversos hidrocarburos sobre la germinación y el crecimiento de plántulas de *L. sativa*, según el protocolo propuesto por la USEPA, con el empleo de los HAP (fenantreno, naftaleno y pireno), y el crudo extrapesado Carabobo y sus fracciones de saturados, aromáticos y asfaltenos, además de evaluar el efecto tóxico de estos compuestos biotratados con *Penicillium aculeatum* (BM - 83). Finalmente se logró modificar un índice de fitotoxicidad, el cual se adaptó al efecto tóxico de los hidrocarburos sobre la especie bioindicadora

*L. sativa* con el fin de facilitar la interpretación de los resultados de manera integral.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### **Hidrocarburos empleados en los bioensayos *Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP)***

Se prepararon soluciones acuosas de fenantreno, naftaleno y pireno (Sigma) a una concentración de 0, 10, 50, 100, 500 y 1000 mg/L para lo cual se constituyó una emulsión con Tween 80 al 0.1 % (Fisher Scientific) y acetona 10 % (Riedel-de Haën).

### ***Crudo extrapesado (CEP) Carabobo***

Se utilizó un crudo extrapesado venezolano del bloque Carabobo proveniente de la Faja Petrolífera del Orinoco (FPO), que según el Instituto Americano del Petróleo (API, por sus siglas en inglés) posee una gravedad de 8.5°, una concentración de azufre de 3.9 % y 480 mg/L de metales pesados Ni y V. Para la formación de emulsiones de CEP se utilizó el surfactante alcohol tridecílico etoxilado (TDA) a una concentración final de 5000 mg/L para generar emulsiones al 95 % p/v con un agitador Rustond. Se realizaron diversas diluciones para alcanzar concentraciones de CEP de 0, 2, 4, 6, 8 y 10 % p/v.

### ***Obtención de las fracciones de saturados y aromáticos del CEP Carabobo***

Para la obtención de dos de las fracciones del crudo (saturados y aromáticos) se utilizó el procedimiento descrito por la norma ASTM (2009). A fin de solubilizarlos y llevarlos a una concentración final de 0, 0.05, 0.1, 0.5, 1 y 5 % v/v se realizó una emulsión con el surfactante acetona al 10 % (Riedel-de Haën)-Tween 80 al 0.1 % (Fisher Scientific).

### ***Biotratamiento de HPA con el hongo *Penicillium aculeatum* BM-83***

A fin de comparar el efecto fitotóxico de los HAP con los HAP biotratados con el hongo filamentosos hidrocarbonoclasticos *Penicillium aculeatum* (BM-83) (Naranjo et al. 2007), se inocularon  $20 \times 10^4$  esporas del hongo en un ambiente líquido mínimo del medio salino basidiomicota (BSM, por sus siglas en inglés) y se incubaron en una estufa a 30 °C por siete días. Al séptimo día se añadieron 5 mg/L de cada uno de los HAP (naftaleno, fenantreno y pireno) y a los siete días de exposición se tomaron las muestras de los sobrenadantes para el estudio de su toxicidad. Se utilizó como emulsionante una mezcla acetona-tween 80. Como testigos se utilizaron el medio BSM con

los HAP sin el hongo, el medio BSM sin los HAP suplementado únicamente con el surfactante con el hongo y el medio BSM sólo con el surfactante. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

### Bioensayos de fitotoxicidad

Para cada una de las soluciones del apartado 1 (HAP, CEP, fracciones de saturados y aromáticos, y HAP biotratados) realizadas por triplicado se siguió el protocolo 600/3-88/029 propuesto por la USEPA (Greene 1988), para lo cual se utilizaron semillas comerciales de *L. sativa* variedad Great Lakes 659. Las semillas se mantuvieron selladas hasta el momento de su uso. Se desinfectaron en condiciones de esterilidad en una cabina de flujo laminar LABCONCO®, con una solución de cloro diluida a 3.33 g OCI/L durante 20 min (APHA 1998). Posteriormente se procedió a lavarlas cuatro veces con agua destilada estéril y se distribuyeron a razón de 20 semillas por placa de Petri de 90 mm de diámetro, las cuales contenían un papel de filtro Whatman núm. 2 estéril y 5 ml de cada una de las soluciones; se utilizó agua como testigo positivo. Las placas se guardaron en bolsas plásticas a fin de mantener el ambiente de humedad y se dejaron en oscuridad a 25 °C por 120 h. Estos ensayos se realizaron por cuatuplicado. Cumplidas las 120 h se procedió a determinar el porcentaje de germinación y la medición de la longitud de las radículas y los hipocótilos.

### Índice de fitotoxicidad modificado de Zucconi et al. (1981) propuesto en el presente trabajo de investigación

Se modificó el índice de toxicidad propuesto por Zucconi et al. (1981), al cual se añadió el parámetro de longitud de los hipocótilos que no estaba contemplado en el índice original. La fórmula del índice de toxicidad modificado propuesto en el presente trabajo, denominado índice integral de fitotoxicidad (IIF), se presenta a continuación:

$$IIF = 100 - \left( \frac{SGM}{SGC} \left( \frac{\frac{LRM}{LRC} + \frac{LHM}{LHC}}{2} \right) \right) 100$$

donde SGM es el número de semillas germinadas de la muestra (el promedio del número de semillas germinadas en las cuatro réplicas para cada tratamiento [n = 4]); SGC es el número de semillas germinadas del testigo (el promedio del número de semillas germinadas en las cuatro réplicas del testigo [n = 4]);

LRM es la longitud de la radícula de la muestra (el promedio de la medición en centímetros de las radículas de 10 plántulas por réplica de cada tratamiento [n = 40]); LRC es la longitud de la radícula del testigo (el promedio de la medición en centímetros de las radículas de 10 plántulas por réplica del testigo [n = 40]);

LHM es la longitud del hipocótilo de la muestra (el promedio de la medición en centímetros de los hipocótilos de 10 plántulas por réplica de cada tratamiento [n = 40]); y

LHC es la longitud del hipocótilo del testigo (el promedio de la medición en centímetros de los hipocótilos de 10 plántulas por réplica del testigo [n = 40]).

Este índice, además de considerar el efecto de los hidrocarburos sobre la longitud de los hipocótilos, tiene la ventaja de mostrar los resultados de -100 a 100, pudiéndose interpretar en términos de porcentaje. También permite observar no sólo los efectos de inhibición de crecimiento (valores positivos) sino también los de estimulación de crecimiento (valores negativos).

### Análisis estadísticos de los datos

Se compararon las medias entre los tratamientos utilizando un análisis de varianza de un factor, con un nivel de significancia de  $p < 0.05$ . Los resultados se verificaron por medio de una prueba de Dunnet. Los análisis se realizaron con el programa Minitab versión 17.0.

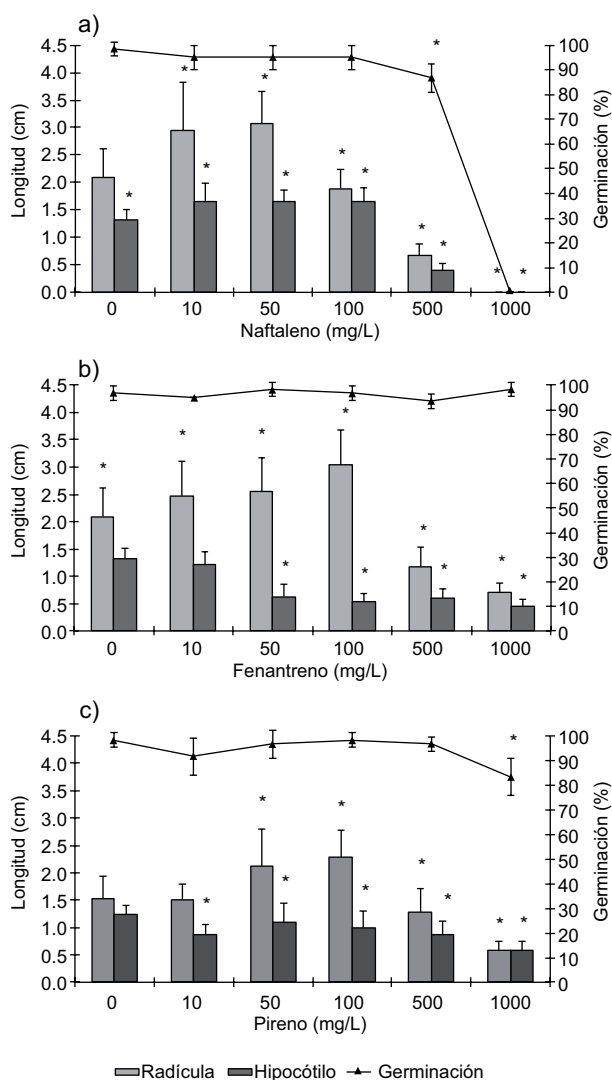
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Efectos fitotóxicos de los HAP

En el presente trabajo, la germinación de semillas se vio fuertemente afectada en presencia de naftaleno, con el cual se observó un efecto inhibitorio de 12 y 100 % a concentraciones de 500 y 1000 mg/L, respectivamente (**Fig. 1A**). El parámetro de germinación se ha utilizado en varios trabajos para evaluar la toxicidad de los HAP (Maliszewska-Kordybach y Smreczak 2000, Baek et al. 2004, Cofield et al. 2007). Al igual que los resultados obtenidos en el presente trabajo, en *L. sativa* se encontró que al incrementar las concentraciones de HAP en el suelo la germinación disminuía (Maliszewska-Kordybach y Smreczak 2000, Sverdrup et al. 2003).

De manera similar, Maila y Cloete (2002) demostraron que a 1000 mg/L de HAP la germinación se reduce a 16 %, en tanto que a 50 mg/L sólo a 75 %. Es decir, a mayor concentración de HAP, mayor





**Fig. 1.** Efecto de distintas concentraciones de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) sobre la germinación y el crecimiento de radículas e hipocótilos de plántulas de *Lactuca sativa*. (a) Naftaleno, (b) fenantreno y (c) pireno. Los resultados se muestran como medias  $\pm$  desviación estándar ( $n = 30$ ). Los asteriscos indican diferencias significativas en comparación con el testigo tween80/acetona,  $p \leq 0.05$

inhibición de la germinación. No obstante, Baek (2004) demostró que los HAP no afectan la germinación a bajas concentraciones. Para el tratamiento con naftaleno, los resultados aquí reportados coinciden con los de Henner et al. (1999), quienes hallaron una inhibición de la germinación con este HAP en *Zea mays* y *Lupinus albus*.

El crecimiento de las plántulas en presencia de naftaleno se vio estimulado a bajas concentraciones, donde se observó un incremento en la elongación de las radículas; a partir de 100 mg/L se presentó una re-

ducción en la longitud de las radículas de 10, 68 y 100 %, proporcional a concentraciones de naftaleno de 100, 500 y 1000 mg/L, respectivamente. En cuanto a los hipocótilos, el efecto fue menos marcado, generándose una inhibición del crecimiento a partir de 500 mg/L (69 %) y una inhibición total a 1000 mg/L (**Fig. 1A**). Estos resultados fueron similares a los obtenidos por Chaîneau et al. (1997) y Hulzebos et al. (1993), en los que el naftaleno resultó 20 veces más tóxico que los HAP de alto peso molecular debido a su volatilidad. Estos autores también reportaron una reducción de 50 % de crecimiento a una dosis de naftaleno de 100 mg/L en *L. sativa* en un suelo contaminado.

En el **cuadro I** se observa el efecto globalizado del naftaleno en *L. sativa*, en el cual se integran los efectos sobre la germinación y la elongación de las radículas y los hipocótilos en el IIF. Así, se demuestra el efecto de estimulación a concentraciones de 10, 50 y 100 mg/L de este HAP, con valores de IIF negativos de  $-30$ ,  $-31$  y  $-4$ , respectivamente, así como un efecto inhibitorio a 500 mg/L con un IIF de 72, hasta llegar a la inhibición total a 1000 mg/L con un valor de 100.

En este estudio se verificó que el fenantreno no afectó la germinación de las semillas, resultados opuestos a los obtenidos por Liu et al. (2009), quienes encontraron una reducción de 60 % en la tasa de germinación de *Arabidopsis* sp. al exponerla a altas concentraciones de fenantreno. Esto sugiere que *L. sativa* es más tolerante a este HAP (**Fig. 2A**). Sin embargo, este compuesto afectó el crecimiento de las radículas a concentraciones de 500 y 1000 mg/L en 44 y 66 %, respectivamente (**Fig. 1B**).

El crecimiento de los hipocótilos se vio fuertemente reducido a partir de 50 mg/L de fenantreno, obteniéndose una inhibición en el crecimiento de 52 % hasta llegar a 66 % a 1000 mg/L (**Fig. 1B**). En el **cuadro I** se observan las variaciones en el IIF con un estímulo en el crecimiento a 10 mg/L y toxicidad a partir de 50 mg/L, que se incrementó de manera directamente proporcional a las concentraciones probadas de este hidrocarburo.

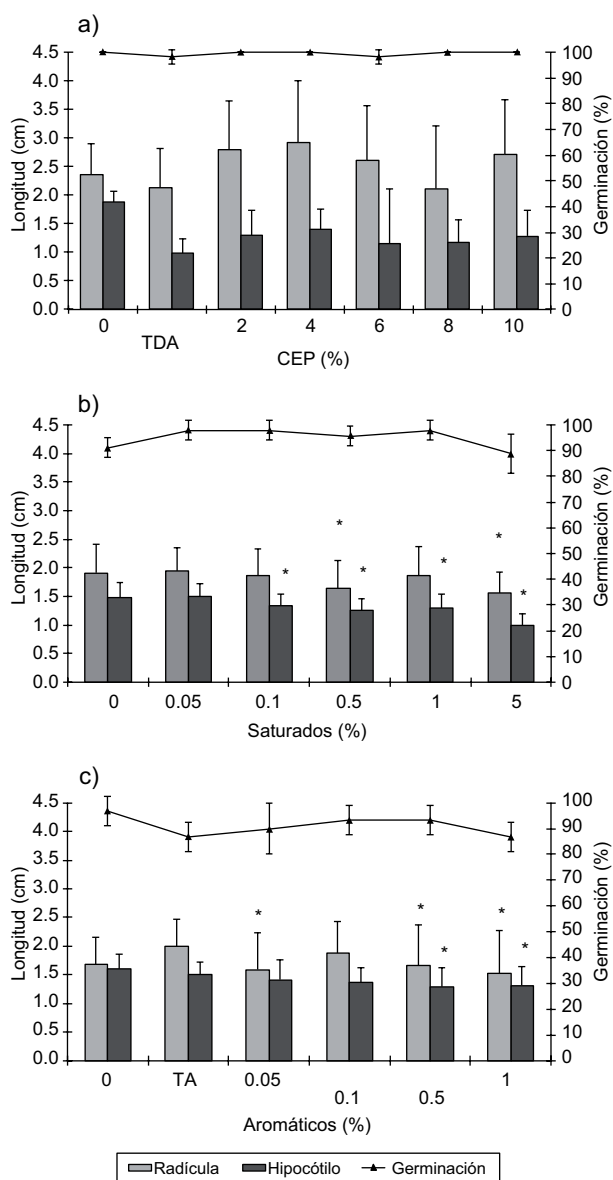
Estos resultados coinciden con los de Liu et al. (2009), quienes encontraron una reducción en el crecimiento a altas concentraciones de fenantreno, resultado del incremento en los niveles de  $H_2O_2$  en *Arabidopsis* sp. A su vez, los altos niveles de peróxido de hidrógeno generan daño oxidativo a nivel de peroxidación lipídica y, según Liu et al. (2009), ocurre una activación de las enzimas del sistema antioxidante tales como superóxido dismutasa (SOD), peroxidasas (POD), ascorbato peroxidasas (APX). Con altas concentraciones de este hidrocarburo los niveles de especies reactivas de oxígeno (ERO)

**CUADRO I.** VALORES DEL ÍNDICE INTEGRAL DE FITOTOXICIDAD (IIF) Y DEL ÍNDICE DE GERMINACIÓN DE ZUCCONI (IG) PARA LOS HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS NAFTALENO, FENANTRENO Y PIRENO, Y PARA CRUDO EXTRAPESADO Y SUS FRACCIONES DE SATURADOS Y AROMÁTICOS

Compuesto	Concentración (mg/L)	IG	IIF
Naftaleno	0	100 ± 4	0 ± 2
	10	137 ± 7	-29 ± 5
	50	142 ± 5	-31 ± 2
	100	87 ± 3	-4 ± 2
	500	29 ± 2	72 ± 1
	1000	0 ± 0	100 ± 0
Fenantreno	0	100 ± 4	0 ± 2
	10	116 ± 5	-3 ± 3
	50	124 ± 5	14 ± 3
	100	145 ± 5	7 ± 3
	500	54 ± 3	51 ± 2
	1000	35 ± 1	65 ± 1
Pireno	0	100 ± 5	0 ± 3
	10	91 ± 3	22 ± 2
	50	137 ± 8	-12 ± 4
	100	149 ± 6	-15 ± 4
	500	82 ± 5	24 ± 3
	1000	32 ± 1	64 ± 1
CEP	0 %	100 ± 4	0 ± 1
	TDA	88 ± 5	30 ± 1
	2 %	118 ± 6	7 ± 1
	4 %	123 ± 8	1 ± 0
	6 %	108 ± 7	15 ± 2
	8 %	89 ± 8	24 ± 2
	10 %	115 ± 7	8 ± 1
Saturados	0 %	100 ± 4	0 ± 3
	0.5 %	109 ± 4	-8 ± 3
	0.1 %	104 ± 4	0 ± 2
	0.5 %	90 ± 4	11 ± 2
	1 %	105 ± 5	1 ± 3
	5 %	80 ± 3	28 ± 2
Aromáticos	0 %	100 ± 5	0 ± 3
	0.05 %	74 ± 6	19 ± 4
	0.1 %	90 ± 5	11 ± 4
	0.5 %	80 ± 6	18 ± 4
	1 %	68 ± 6	27 ± 3

TDA: surfactante alcohol tridecílico etoxilado. Los resultados se muestran como medias ± error estándar

exceden la capacidad del sistema antioxidante de las plantas, generando una reducción en la germinación y en el crecimiento de las raíces, daño a los tejidos y los organelos, y disminución en el contenido de clorofila.



**Fig. 2.** Efecto de distintas concentraciones de hidrocarburos sobre la germinación y el crecimiento de radículas e hipocótilos de plántulas de *Lactuca sativa*. (a) Crudo extrapesado (CEP), (b) saturados y (c) aromáticos. TDA: surfactante alcohol tridecílico etoxilado. TA: surfactante Tween/acetona. Los resultados se muestran como medias ± desviación estándar (n = 30). Los asteriscos indican diferencias significativas en comparación con el testigo tween80/acetona,  $p \leq 0.05$ . IIF para las distintas concentraciones de crudo extrapesado (CEP)

Finalmente, el pireno (**Fig. 1C**) afectó la germinación sólo a altas concentraciones (1000 mg/L) con una reducción de 15%. Por otro lado, también afectó a las radículas, en las cuales se observó inhibición de crecimiento de 17% a partir de 500 mg/L y 62% a partir de 1000 mg/L. En cuanto a los hipocótilos,

su crecimiento se vio afectado en todas las concentraciones de pireno en 30, 12, 20, 30 y 53 % a 10, 50, 100, 500 y 1000 mg/L, respectivamente. En el **cuadro I** se observa un IIF negativo de -11 y -14 a 50 y 100 mg/L, respectivamente, y un efecto tóxico de 24 y 64 a 500 y 1000 mg/L, respectivamente. Estos resultados obtenidos coinciden con los reportados por Sverdrup et al. (2002), quienes demostraron que el pireno puede reducir el crecimiento temprano en las plantas terrestres.

Existen diversas vías por medio de las cuales las plantas pueden tomar los HAP: absorción aérea de compuestos volátiles a través de las hojas, penetración de partículas sólidas y polvo a través de las hojas y por transferencia del suelo a las raíces y su posterior transferencia al vástago, considerándose esta última como la vía principal de acumulación (Fismes et al. 2002, Khan et al. 2008). En cuanto al efecto tóxico observado sobre el crecimiento, se ha descrito que los HAP pueden atravesar las membranas celulares, reducir la eficiencia en el uso de agua y nutrientes e inhibir la actividad fotosintética y el transporte de electrones (Reilley et al. 1996, Chaîneau et al. 1997, Salanitro et al. 1997, Mallakin et al. 2002). Por otro lado, la reducción en el crecimiento de las plantas ante la exposición a HAP se ha atribuido al efecto tóxico de éstos sobre los pigmentos fotosintéticos, lo cual está asociado con una inhibición de la fotosíntesis que genera reducción en la producción de biomasa (Lewis 1995, Kummerová y Kmentová 2004).

Estos resultados podrían explicarse por las propiedades químicas de estos hidrocarburos, ya que el naftaleno presenta el menor peso molecular (128.2), número de anillos (dos) y un log de coeficiente de reparto octanol-agua (Kow, por sus siglas en inglés) de 3.32, seguido por el fenantreno, con mayor peso molecular (178.2), tres anillos y un log Kow de 4.60, y finalmente el pireno, cuyo peso molecular es superior (202.2), posee cinco anillos y su log Kow es de 5.20. Según Sverdrup et al. (2002), la lipofiliidad representada por el log de Kow se correlaciona negativamente con la solubilidad en agua; a mayor log Kow menor solubilidad, por lo que puede deducirse que el efecto tóxico de los HAP sobre las plantas fue proporcional a la solubilidad de los compuestos, como era de esperarse. Khan et al. (2006) también sugieren que las plantas pueden absorber HAP de bajo peso molecular en mayor proporción que los HAP pesados por su mayor solubilidad, proceso que se efectúa por una transferencia entre el continuum suelo-agua-planta-aire. Los resultados aquí obtenidos también coincidieron con los reportados por Henner et al. (1999), quienes observaron que los HAP que

más afectan el crecimiento de las plantas son aquellos que presentan menos de tres anillos aromáticos por ser más volátiles, solubles en agua y de bajo peso molecular. En cambio, los de mayor peso molecular, que poseen de tres a cinco anillos aromáticos, son menos fitotóxicos.

### Efectos fitotóxicos del CEP y sus fracciones de saturados y aromáticos

El CEP no generó efectos tóxicos a nivel de la germinación (**Fig. 2A**), resultado que coincide con los reportados por otros autores, quienes incluso mencionan que se ha observado un incremento en los porcentajes de germinación ante la exposición al crudo y sugieren que ese estímulo podría deberse a la presencia de sustancias semejantes a las auxinas vegetales (Bossert y Bartha 1985, Salanitro et al. 1997, Rivera-Cruz y Trujillo-Narcía 2004).

Sin embargo, los resultados aquí reportados fueron contrarios a los obtenidos por Baek et al. (2004), quienes estudiaron el efecto de distintas concentraciones de crudo sobre plantas de maíz y observaron inhibición completa de la germinación a 5 % p/p crudo. Cabe mencionar que a diferencia de este estudio, los autores consideraron un suelo contaminado con crudo liviano de 33.4°API. Salanitro et al. (1997) y Dorn y Salanitro (2000) han sugerido que los crudos livianos son más tóxicos que el crudo pesado y el CEP. En el presente trabajo, se empleó el CEP Carabobo de 8.5°API, por lo que la diferencia en los resultados podría deberse a que, por ser más pesado, este crudo fue menos tóxico que el utilizado por Baek et al. (2004). Por otro lado, Infante y Morales (2012) también realizaron bioensayos con CEP venezolano de 10°API y no encontraron toxicidad alguna.

Los resultados obtenidos no mostraron diferencias significativas en la elongación de las radículas y los hipocótilos de las plantas expuestas al crudo. Sin embargo, en el **cuadro I** se observa que el IIF mostró una toxicidad leve con un máximo de 24 a 8 % p/v de CEP. Fernández et al. (2005) encontraron que en un suelo impactado a 1600 mg/kg de crudo, se inhibió el crecimiento de las especies *Triticum aestivum*, *Brassica napus* y *Trifolium pratense*, en 60, 25 y 51 %, respectivamente.

En el caso de los saturados del crudo Carabobo, la germinación disminuyó en 8 % solamente con la concentración de 5 % p/v (**Fig. 2B**). En cambio, el hipocótilo fue la parte de las plántulas más afectada por la toxicidad, con una disminución en su longitud proporcional a la concentración de saturados de 10, 16, 13 y 33 % a 0.1, 0.5, 1 y 5 % p/v, respectivamente. Las radículas también se vieron afectadas pero en

menor proporción, con una reducción importante de 18 % a la mayor concentración de saturados. Los resultados del IIF mostraron un efecto estimulante a concentraciones de 0.05 y 0.1 % y un efecto tóxico a partir de una concentración de 5% de saturados, con un IIF de 27 (**Cuadro I**). Baek et al. (2004) reportaron que no se encontraron efectos tóxicos sobre el crecimiento de *Phaseolus sp.* y *Zea mays* en raíces expuestas a 1000 mg/L de C20. Es conocido que la toxicidad de los alcanos se incrementa al presentar mayor número de carbonos en su molécula, y los alcanos de cadena lineal son más tóxicos que los isómeros ramificados; en este estudio, al tenerse una mezcla compuesta de todos los saturados del crudo, se pudo haber generado un proceso de sinergia a nivel de toxicidad.

Por otro lado, los compuestos aromáticos (**Fig. 2C**) generaron mayor toxicidad sobre el crecimiento de las plántulas a partir de 0.05 % p/v; en el caso de la germinación, ésta se vio afectada a una concentración de 1 % p/v, que la redujo en 10%. Los compuestos aromáticos al 1 % generaron una fuerte reducción en la longitud de las radículas y los hipocótilos, llegando a inhibir su crecimiento en 24 y 13 %, respectivamente. El IIF mostró que estos compuestos son tóxicos en todas las concentraciones estudiadas (**Cuadro I**).

Finalmente, de acuerdo con los valores de IIF que dan cuenta de la toxicidad de los hidrocarburos del crudo Carabobo en la concentración al 1 % de éstos, el orden de toxicidad entre el crudo y sus fracciones es el siguiente: aromáticos > CEP > saturados.

### Efectos fitotóxicos de los HAP biotratados con el hongo *Penicillium aculeatum* BM-83

Se observó una reducción de 16 % en la germinación de las semillas tratadas con 5 mg/L de naftaleno y con el posterior biotratamiento de este HAP con *P. aculeatum* (BM-83). Este porcentaje se redujo a 5.3 %, lo que se podría interpretar como una reducción en la toxicidad del compuesto luego de ser biotransformado por el hongo. Sin embargo, en la respuesta de crecimiento de las radículas y los hipocótilos se presentó un incremento en comparación con las plántulas testigo, tanto para las semillas tratadas con naftaleno como para las biotratadas con el hongo (**Fig. 3A**). Los valores obtenidos del IIF variaron de -17 a -39, lo que implicó un estímulo en el crecimiento de *L. sativa* posterior al tratamiento del naftaleno con el hongo (**Fig. 3B**).

En el caso del fenantreno, no se observaron efectos adversos sobre la germinación. Se detectó un estímulo en el crecimiento de los hipocótilos y de las radículas de 29 % en presencia de fenantreno,

en comparación con el testigo. Sin embargo, una vez biotratado con el hongo se obtuvo una reducción de 22 % en la elongación de las radículas en comparación con el tratamiento con fenantreno no biotratado. Los valores del IIF mostraron una reducción de -31 a -1 posterior al biotratamiento (**Fig. 3B**).

Los bioensayos con pireno biotratado no afectaron el porcentaje de germinación pero estimularon el crecimiento de las radículas en 45 % con una posterior reducción de 16 %; se presentó también una reducción en el estímulo del crecimiento de los hipocótilos de 15 % en comparación con la exposición a pireno sin biotratamiento. De igual forma, los valores del IIF se redujeron de -42 a -16 (**Fig. 3B**), lo cual indica que hubo una reducción en el estímulo del crecimiento pero sin llegar a la toxicidad.

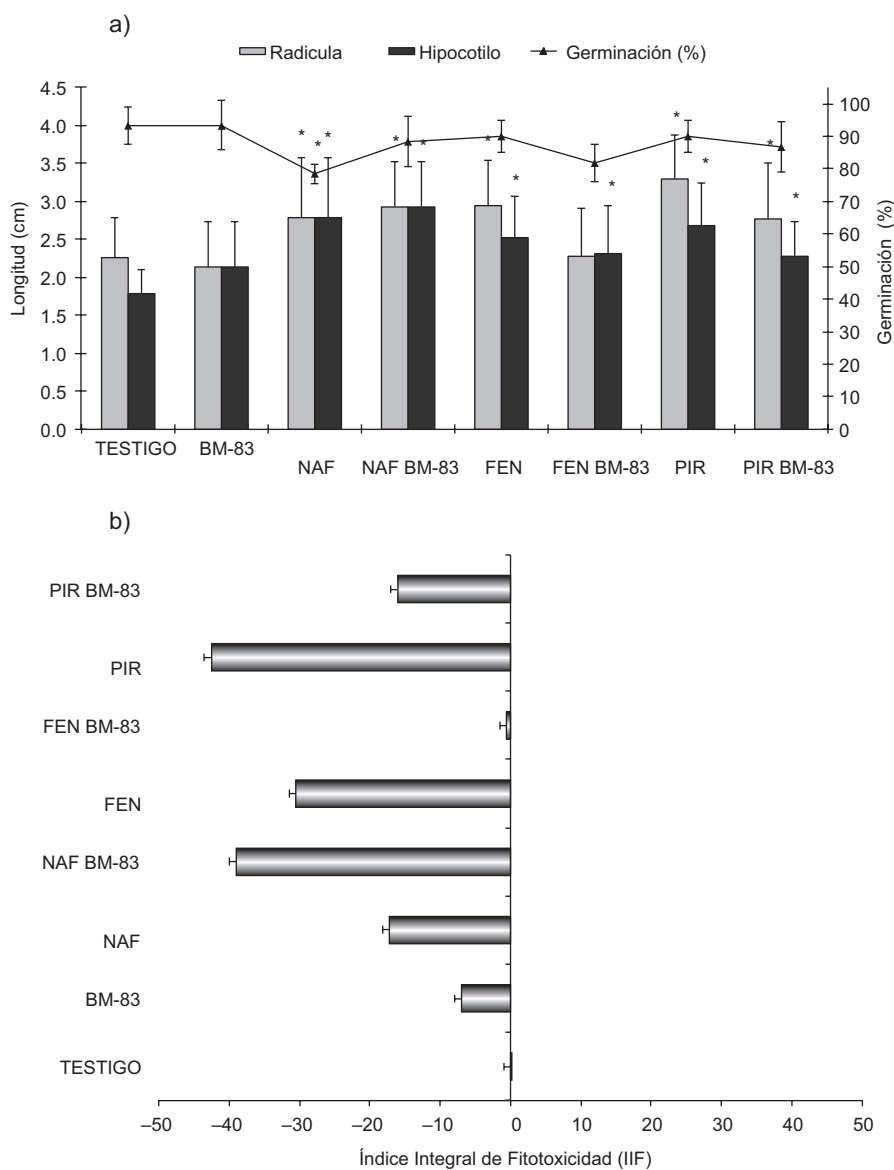
Aunque se encontraron variaciones en los valores del IIF en los bioensayos realizados, no se observó toxicidad ni para los HAP testigos ni para los biotratados, lo cual indica que este hongo tiene la capacidad de biotransformar los hidrocarburos sin generar compuestos más tóxicos que los originales.

Se ha demostrado que los hongos tienen la capacidad de degradar hidrocarburos, por lo que se han empleado en procesos de biorremediación (Pernía et al. 2012). Sin embargo, existen reportes de que al participar en estas transformaciones, algunos hongos generan compuestos más tóxicos que los originales. Tal es el caso de las especies *Aspergillus niger*, *Crinipellis stipitaria*, *Cunninghamella elegans* y *Phanerochaete chrysosporium*, las cuales producen pirenoquinonas, compuestos altamente mutagénicos, a consecuencia de la transformación de pireno (Okamoto y Yoshida 1980, Chesis et al. 1984, Lambert et al. 1994, Wunder et al. 1994, Flowers et al. 1996, Cerniglia 1997). En particular, no obstante que *Penicillium janthinellum* produce pirenoquinonas, éstas se reducen posteriormente, generando semiquinonas menos tóxicas (Launen et al. 2000). Por ello la realización de pruebas de fitotoxicidad es de suma importancia al estudiar la degradación de los hidrocarburos.

### Estimulación del crecimiento de *L. sativa* ante la exposición a bajas concentraciones de HAP

De los resultados obtenidos, se observó que las bajas concentraciones de naftaleno, fenantreno y pireno generaron un aparente proceso de hormesis, donde se aprecia un estímulo en el crecimiento de las plántulas de *L. sativa*. Este fenómeno de dosis-respuesta se caracteriza por el estímulo en el crecimiento de las plantas a bajas concentraciones y la inhibición de éste a altas dosis de compuestos tóxicos. Se ha propuesto





**Fig. 3.** Efectos de los sobrenadantes provenientes de los biotratamientos de los distintos hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) con el hongo *Penicillium aculeatum* BM-83. (a) Germinación y crecimiento de radículas e hipocótilos de plántulas de *Lactuca sativa*. Los resultados se muestran como medias  $\pm$  desviación estándar ( $n = 30$ ). Los asteriscos indican diferencias significativas en comparación con el testigo,  $p \leq 0.05$ . (b) Índice integral de fitotoxicidad (IIF) para las plantas expuestas a los distintos sobrenadantes. Testigo: testigo en medio salino para basidiomicetos (BSM, por sus siglas en inglés), BM-83: testigo hongo en medio BSM; NAF: medio BSM con 5 mg/L de naftaleno; NAF BM-83: medio BSM con 5 mg/L de naftaleno tratado por siete días con el hongo; FEN: medio BSM con 5 mg/L de fenantreno; FEN BM83: medio BSM con 5 mg/L de fenantreno tratado por siete días con el hongo; PIR: medio BSM con 5 mg/L de pireno; PIR BM-83: medio BSM con 5 mg/L de pireno tratado por siete días con el hongo

que este proceso se debe a sobrecompensación y alteración de la homeostasis, y se ha descrito para un gran número de sustancias químicas orgánicas e inorgánicas y una gran variedad de organismos incluyendo protozoarios, hongos, plantas, inverte-

brados y vertebrados (Stebbing 1982, Calabrese y Baldwin 1997). También se ha sugerido que este estímulo en el crecimiento a bajas concentraciones de un compuesto puede deberse a un mecanismo de retroalimentación; y se cree que los mecanismos

de control fisiológico en los organismos han evolucionado para sobre-reaccionar ante una pequeña desviación de la norma fisiológica (Stebbing 1982, Swart et al. 1995). Algunos autores han sugerido incluso que los HAP pueden ser promotores del crecimiento vegetal (Maliszewska-Kordybach y Smreczak 2000).

Según lo reportado por Ma et al. (2010), el efecto de los HAP sobre el crecimiento de las plantas es dependiente de su concentración, tal y como se observó en el presente trabajo. Es decir, que bajas concentraciones de HAP generan un incremento en su crecimiento y las altas concentraciones lo reducen o incluso lo inhiben, lo que se ha demostrado en *Zea mays*, *Phaseolus vulgaris* y *Helianthus annuus* (El-Fouly 1980, Maliszewska-Kordybach y Smreczak 2000).

#### **Variable del crecimiento más afectada por los hidrocarburos: elongación de los hipocótilos**

En el presente estudio, la presencia de los compuestos evaluados (fenantreno, pireno, aromáticos y saturados) generó efectos fitotóxicos, especialmente a nivel del crecimiento de los hipocótilos. En el caso del naftaleno y los compuestos aromáticos, el efecto más marcado de toxicidad se obtuvo a nivel de las radículas y en último lugar se vio afectada la germinación. Según varios autores, el crecimiento de las plantas es un parámetro más sensible que la germinación cuando se estudia el efecto tóxico de las sustancias (Keddy et al. 1995, Sverdrup et al. 2003, Eom et al. 2007). Se ha reportado que este parámetro se ve levemente afectado por la contaminación, y los estudios de germinación no permiten predecir los efectos del subsecuente crecimiento de las especies estudiadas, especialmente en suelos contaminados con HAP (Gong et al. 1999, Henner et al. 1999, Smith et al. 2006). En concordancia con este trabajo, Sverdrup et al. (2003) observaron que a concentraciones mayores a 1000 mg/L de fenantreno se inhibe la germinación de *Sinapsis alba*, *Trifolium pratense* y *Lolium perenne*, a pesar de que se obtuvieron valores de  $EC_{50}$  para las tres especies a concentraciones de 480, 79 y 760 mg/L de este HAP. Por ello estos autores señalan que el crecimiento de las plántulas se considera como un parámetro más sensible comparado con el porcentaje de germinación.

Sumado a lo anterior, otros autores encontraron inhibición del crecimiento de los hipocótilos. Por ejemplo, Baek et al. (2004) observaron inhibición en el crecimiento tanto de la radícula como del hipocótilo de plántulas de *Phaseolus nipponensis* y *Zea mays* expuestas a concentraciones de crudo mayores a 5 % y, en el caso de otros hidrocarburos, Ogbo (2009) determinó que el diesel inhibió el crecimiento de los

hipocótilos y plúmulas en plántulas de *Zea mays* y *Sorgum bicolor*.

Según Infante y Morales (2012), la evaluación del parámetro de la elongación del hipocótilo permite ponderar el efecto tóxico de compuestos solubles presentes en concentraciones que no afectan la germinación pero sí inhiben los procesos de elongación. Estos autores trabajaron con muestras de ripios y suelos contaminados con crudos livianos y medianos y demostraron que el mejor parámetro para detectar variaciones en la fitotoxicidad es la elongación del hipocótilo, lo que sugiere la importancia de utilizar un índice de toxicidad modificado que considere el crecimiento del hipocótilo.

#### **Comparación entre el IIF y el IG de Zucconi**

Los índices de toxicidad permiten determinar los efectos de los compuestos de manera global al utilizar varios parámetros de crecimiento. Sin embargo, algunos índices pueden ser más efectivos dependiendo del compuesto y de los órganos de las plantas que se vean afectados. En la **cuadro I** se comparan los índices IG y IIF. Aunque está normalizado, acotado y es comparable entre distintos experimentos, el índice IG de Zucconi et al. (1981) no considera el efecto tóxico de los compuestos sobre la longitud de los hipocótilos.

La diferencia entre los resultados obtenidos con el empleo de los índices mencionados se muestra en el **cuadro I**, donde puede observarse que, como se mencionó anteriormente, en el caso del fenantreno la inhibición en el crecimiento de los hipocótilos ocurre a partir de 50 mg/L, lo que demuestra la toxicidad del compuesto. Por el contrario, hubo un estímulo en el crecimiento de la longitud de las radículas, por lo que el índice IG indica que no hay toxicidad e incluso parece haber sólo un estímulo en el crecimiento. El índice que se utiliza en este estudio indica toxicidad de 14 y 7 % a 50 y 100 mg/L de fenantreno, respectivamente, por lo que genera un resultado más apegado a la realidad gracias a su mayor sensibilidad.

## **CONCLUSIONES**

Se demostró que bajas concentraciones de naftaleno, fenantreno, pireno y saturados, generaron estímulos de crecimiento en las plántulas de *L. sativa*. Por otro lado, a altas concentraciones de hidrocarburos el crecimiento del hipocótilo fue el parámetro más afectado, lo que sugiere la importancia de utilizar un índice de toxicidad modificado que considere el crecimiento de este segmento.

El orden de toxicidad de los hidrocarburos según el índice propuesto IIF fue el siguiente: naftaleno (100) > fenantreno (65) > pireno (64) > aromáticos (27) > CEP (7) > saturados (1).

El IIF permitió evidenciar que el hongo hidrocarboclastico *Penicillium* (BM-83) tiene la capacidad de biotransformar los hidrocarburos sin generar compuestos más tóxicos que los originales.

## AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue financiada por los Proyectos de I+D+i FONACIT-MppCTII No. G-2005000440 y Misión Ciencia-MppCTII, Subproyecto 3, No. 2007001401.

## REFERENCIAS

- Abdul-Baki A.A. y Anderson J.D. (1973). Vigour determination in soybean seed by multiple criteria. *Crop Sci.* 13 (6), 630-633.  
DOI: 10.2135/cropsci1973.0011183X001300060013x
- ASTM (2009). Standard D 4124-09. Test methods for separation of asphalt into four fractions. American Society for Testing and Materials. West Conshohocken, EUA, 8 pp.
- APHA (1998). Standard methods for the examination of water and wastewater. 20a ed. American Public Health Association. Washington, 1325 pp.
- Baek K., Kim H., Oh H., Yoon B., Kim J. y Lee I. (2004). Effects of crude oil, oil components, and bioremediation on plant growth. *J. Environ. Sci. Health A Tox. Hazard Subst. Environ. Eng.* 39 (9), 2465-2472.  
DOI: 10.1081/LESA-200026309
- Bamforth S.M. y Singleton I. (2005). Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 80 (7), 723-736. DOI: 10.1002/jctb.1276
- Banks M.K. y Schultz K.E. (2005). Comparison of plants for germination toxicity tests in petroleum-contaminated soils. *Water Air Soil Pollut.* 167 (1), 211-219.  
DOI: 10.1007/s11270-005-8553-4
- Baud-Grasset F., Baud-Grasset S. y Safferman S.I. (1993). Evaluation of the bioremediation of a contaminated soil with phytotoxicity tests. *Chemosphere* 26 (7), 1365-1374. DOI: 10.1016/0045-6535(93)90187-A
- Bossert I. y Bartha R. (1985). Plant growth in soils with a history of oily sludge disposal. *Soil Sci.* 140 (1), 75-77.
- Calabrese E.J. y Baldwin L. (1997). The dose determines the stimulation (and poison): development of a chemical hormesis database. *Int. J. Toxicol.* 16 (6), 545-555.  
DOI: 10.1080/109158197226874
- Cerniglia C. (1997). Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: Past, present and future applications in bioremediation. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 19 (1), 324-333. DOI: 10.1038/sj.jim.2900459
- Chaillan F., Flèche A.L., Bury E., Phantavong Y., Grimont P., Saliot A. y Oudot J. (2004). Identification and biodegradation potential of tropical aerobic hydrocarbon-degrading microorganisms. *Res. Microbiol.* 155 (7), 587-595. DOI: 10.1016/j.resmic.2004.04.006
- Chaîneau C.H., Morel J.L. y Oudot J. (1997). Phytotoxicity and plant uptake of fuel oil hydrocarbons. *J. Environ. Qual.* 26 (6), 1478-1483.  
DOI: 10.2134/jeq1997.00472425002600060005x
- Chesis P.L., Levin D.E., Smith M.T., Ernster L. y Ames B.N. (1984). Mutagenicity of quinones: Pathways of metabolic activation and detoxification. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 81 (6), 1696-1700.  
DOI: 10.1073/pnas.81.6.1696
- Cofield N., Schwab A.P., Williams P. y Banks M.K. (2007). Phytoremediation of polycyclic hydrocarbon contaminated soil: Part II. Impact on ecotoxicity. *Int. J. Phytorem.* 9 (5), 371-384. DOI: 10.1080/15226510701603866
- Das N. y Chandran P. (2011). Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: An overview. *Biotechnol. Res. Int.* 2011, Article ID 941810, 13 pp.  
DOI: 10.4061/2011/941810
- Dorn P.B. y Salanitro J.P. (2000). Temporal ecological assessment of oil contaminated soils before and after bioremediation. *Chemosphere* 40 (4), 419-426.  
DOI: 10.1016/S0045-6535(99)00304-5
- El-Fouly M.M. (1980). Effect of low concentration of 3,4-benzopyrene on growth and N-fraction of seedlings. *Landwirt. Forsch.* 33 (1), 108-117.
- Eom I.C., Rast C., Veber A.M. y Vasseur P. (2007). Ecotoxicity of a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-contaminated soil. *Ecotox. Environ. Saf.* 67 (2), 190-205. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2006.12.020
- Fernández M.D., Cagigal E., Vegac M.M., Urzelai A., Babina M., Proa J. y Tarazona J.V. (2005). Ecological risk assessment of contaminated soils through direct toxicity assessment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 62 (2), 174-184. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2004.11.013
- Fismes J., Perrin-Ganier C., Empereur-Bissonnet P. y Morel J.L. (2002). Soil to- root transfer and translocation of polycyclic aromatic hydrocarbons by vegetables grown on industrial contaminated soils. *J. Environ. Qual.* 31 (5), 649-656. DOI: 10.2134/jeq2002.1649
- Flowers L., Bleczinski W.F., Burczynski M.E., Harvey R.G. y Penning T.M. (1996). Disposition and biological activity of benzo[a]pyrene-7,8-dione. A genotoxic metabolite generated by dihydrodiol dehydrogenase. *Biochemistry* 35 (42), 13664-13672.  
DOI: 10.1021/bi961077w

- Gong P., Wilke B.M. y Fleischmann S. (1999). Soil-based phytotoxicity of 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT) to terrestrial higher plants. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 36 (2), 152-157. DOI: 10.1007/s002449900455
- Greene J.C., Bartels W.J., Warren-Hicks B.R., Parkhurst G.L., Linder B.R., Peterson S.A. y Miller W.E. (1988). EPA/600/3-88/029. Protocols for short-term toxicity screening of hazardous waste sites. Environmental Research Laboratory. Office of Research and Development. U.S. Environmental Protection Agency, Corvallis, OR, 102 pp.
- Henner P., Schiavon M., Druelle V. y Lichtfouse E. (1999). Phytotoxicity of ancient gaswork soils. Effect of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) on plant germination. *Org. Geochem.* 30 (8), 963-969. DOI: 10.1016/S0146-6380(99)00080-7
- Hulzebos E.M., Adema D.M.M., Dirven-van E.M., Henzen L., van Dis W.A., Herbold H.A., Hoekstra J.A., Baerselman R. y van Gestel C.A.M. (1993). Phytotoxicity studies with *Lactuca sativa* in soil and nutrient solution. *Environ. Toxicol. Chem.* 12 (6), 1079-1094. DOI: 10.1002/etc.5620120614
- Infante C. y Morales F.A. (2012). Evaluación de la toxicidad en desechos y suelos petrolizados empleando semillas de *Lactuca sativa* L. *Interciencia* 37 (10), 782-788.
- Keddy C.J., Greene J.C. y Bonnell M.A. (1995). Review of whole organism bioassays: soil, freshwater sediment, and freshwater assessment in Canada. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 30 (3), 221-251. DOI: 10.1006/eesa.1995.1027
- Khan S., Cao Q., Chen B. y Zhu Y.G. (2006). Humic acids increase the phytoavailability of Cd and Pb to wheat plants cultivated in freshly spiked, contaminated soil. *J. Soils Sediments* 6 (4), 236-242. DOI: 10.1065/jss2006.08.178
- Khan S., Aijun L., Zhang S., Hu Q. y Zhu Y.G. (2008). Accumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metals in lettuce grown in the soils contaminated with long-term wastewater irrigation. *J. Hazard. Mat.* 152 (2), 506-515. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2007.07.014
- Kummerová M. y Kmentová E. (2004). Photoinduced toxicity of fluoranthene on germination and early development of plant seedling. *Chemosphere* 57 (4) 387-393. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2004.01.007
- Lambert, M., Kremer S., Sterner O. y Anke H. (1994). Metabolism of pyrene by the basidiomycete *Crinipellis stipitaria* and identification of pyrenequinones and their hydroxylated precursors in strain JK375t. *Adv. Appl. Microbiol.* 60 (10), 3597-3601.
- Launen L.A., Pinto L.J., Percival P.W., Lam S.F.S. y Moore M.M. (2000). Pyrene is metabolized to bound residues by *Penicillium janthinellum* SFU403. *Biodegradation* 11 (5), 305-312. DOI: 10.1023/A:1011180231044
- León Y., De Sisto A., Inojosa Y., Malaver N. y Naranjo-Briceño L. (2009). Identificación de biocatalizadores potenciales para la remediación de desechos petrolizados de la faja petrolífera del Orinoco. *RET* 1 (1), 12-25.
- Lewis M.A. (1995). Use of freshwater plants for phytotoxicity testing: a review. *Environ. Pollut.* 87 (3), 319-336. DOI: 10.1016/0269-7491(94)P4164-J
- Liu H., Weisman D., Ye Y.B., Cui B., Huang Y.H., Colón-Carmona A. y Wang Z.H. (2009). An oxidative stress response to polycyclic aromatic hydrocarbon exposure is rapid and complex in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci.* 176 (3), 375-382. DOI: 10.1016/j.plantsci.2008.12.002
- Ma B., He Y., Chen H.H., Xu J.M. y Rangel Z. (2010). Dissipation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the rhizosphere: Synthesis through meta-analysis. *Environ. Pollut.* 158 (3), 855-861. DOI: 10.1016/j.envpol.2009.09.024
- Maila M.P. y Cloete T.E. (2002). Germination of *Lepidium sativum* as a method to evaluate polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) removal from contaminated soil. *Internat. Biodet. Biodegrad.* 50 (2), 107-113. DOI: 10.1016/S0964-8305(02)00059-8
- Maliszewska-Kordybach B. y Smreczak B. (2000). Ecotoxicological activity of soils polluted with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)—effect on plants. *Environ. Technol.* 21 (10), 1099-1110. DOI: 10.1080/09593330.2000.9618996
- Mallakin, A., Babu T.S., Dixon D.G. y Greenberg B.M. (2002). Sites of toxicity of specific photooxidation products of anthracene to higher plants: inhibition of photosynthetic activity and electron transport in *Lemna gibba* L. G-3 (duckweed). *Environ. Toxicol.* 17 (5), 462-471. DOI: 10.1002/tox.10080
- Moreno C.M., González A. y Blanco M.J. (2004). Tratamientos biológicos de suelos contaminados: contaminación por hidrocarburos. Aplicaciones de los hongos en tratamientos de biorrecuperación. *Rev. Iberoam. Micol.* 21 (1), 103-120.
- Nadon L., Siemiatycki J., Dewar R., Krewski D. y Guerin M. (1995). Cancer risk due to occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Am. J. Ind. Med.* 28 (3), 303-324. DOI: 10.1002/ajim.4700280302
- Naranjo L., Urbina H., de Sisto A. y León V. (2007). Isolation of autochthonous non-white rot fungi with potential for enzymatic upgrading of Venezuelan extra-heavy crude oil. *Biocatal. Biotransform.* 25 (2-4), 1-9. DOI: 10.1080/10242420701379908
- Ogbo E.M. (2009). Effects of diesel fuel contamination on seed germination of four crop plants—*Arachis hypogaea*, *Vigna unguiculata*, *Sorghum bicolor* and *Zea mays*. *Afr. J. Biotechnol.* 8 (2), 250-253.



- Okamoto H. y Yoshida D. (1980). Pyrenequinones as mutagens and enhancing agents to other mutagens. *Mutat. Res.* 73 (1), 203-207.
- Pernía B., Demey J.R., Inojosa Y. y Naranjo L. (2012). Biodiversidad y potencial hidrocarbonoclástico de hongos aislados de crudo y sus derivados: Un meta-análisis. *Rev. Latinoam. Biotecnol. Amb. Algal.* 3 (1), 1-40.
- Plaza G., Nalecz-Jawecki G., Krzysztof U. y Brigmon R.L. (2005). The application of bioassays as indicators of petroleum-contaminated soil remediation. *Chemosphere* 59 (2), 289-296.  
DOI: 10.1016/j.chemosphere.2004.11.049
- Reilley K.A., Banks M.K. y Schwab A.P. (1996). Dissipation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the rhizosphere. *J. Environ. Qual.* 25 (2), 212-219.
- Rivera-Cruz M.A. y Trujillo-Narcia A. (2004). Estudio de toxicidad vegetal em suelos con petróleos nuevo e intemperizado. *Interciencia* 29 (7), 369-376.
- Salanitro J.P., Dorn P.B., Huesemann M.H., Moore K.O., Rhodes I.A., Jackson L.M., Vipond T.E., Western M.M. y Wisniewi H.L. (1997). Crude oil hydrocarbon bioremediation and soil ecotoxicity assessment. *Environ. Sci. Technol.* 31 (6), 1769-1776.  
DOI: 10.1021/es960793i
- Smith M.J., Flowers T.H., Duncan H.J. y Alder J. (2006). Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on germination and subsequent growth of grasses and legumes in freshly contaminated soil and soil with aged PAHs residues. *Environ. Pollut.* 141 (3), 519-525.  
DOI: 10.1016/j.envpol.2005.08.061
- Stebbing A.R.D. (1982). Hormesis—The stimulation of growth by low levels of inhibitors. *Sci. Total. Environ.* 2 (3), 213-234. DOI: 10.1016/0048-9697(82)90066-3
- Sverdrup L.E., Nielsen T. y Krogh P.H. (2002). Soil ecotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons in relation to soil sorption, lipophilicity, and water solubility. *Environ. Sci. Technol.* 36 (11), 2429-2435.  
DOI: 10.1021/es010180s
- Sverdrup L.E., Krogh P.H., Nielsen T., Kjaer C. y Stenersen J. (2003). Toxicity of eight polycyclic aromatic compounds to red clover (*Trifolium pratense*), ryegrass (*Lolium perenne*), and mustard (*Sinapsis alba*). *Chemosphere* 53 (8), 993-1003.  
DOI: 10.1016/S0045-6535(03)00584-8
- Swart R., Schults D.W., Ozretich R., Lamberson J.O., Cole F.A., DeWitt T.H., Redmond M.S. y Ferraro S.P. (1995). PAH: a model to predict the toxicity of polynuclear aromatic hydrocarbon mixtures in field-collected sediments. *Environ. Toxicol. Chem.* 14 (11), 1997-1987. DOI: 10.1002/etc.5620141120
- Torres M.T., García M., Hernández N.M. y Fernández M. (2006). Toxicidad aguda de lixiviados acuosos mediante un ensayo con *Lactuca sativa* L. *Hig. Sanid. Ambient.* 6 (1), 170-172.
- Wang W. y Freemark K. (1995). The use of plants for environmental monitoring and assessment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 30 (3), 289-301.  
DOI: 10.1006/eesa.1995.1033
- Wunder T., Kremer S., Sterner O. y Anke H. (1994). Metabolism of the polycyclic aromatic hydrocarbon pyrene by *Aspergillus niger* SK 9317. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 42 (4), 636-641.  
DOI: 10.1007/BF00173932
- Zucconi F., Forte M., Mónaco A. y De Bertoldi M. (1981). Evaluating toxicity of in nature compost. *Biocycle* 22, 54-57.