

Germinación y supervivencia del pasto cubano *Tithonia tubaeformis* (Asteraceae) en suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo

GIOVANNA LARENAS PARADA & MARTA L DE VIANA ✉

Instituto de Ecología y Ambiente Humano, Consejo de investigación, Univ. Nacional de Salta, Salta, Argentina

RESUMEN. La fitorremediación está adquiriendo reconocimiento como método ambientalmente correcto, económico y estético de remediación de sitios contaminados. Estudiamos la respuesta de germinación y supervivencia de *Tithonia tubaeformis* a contaminantes derivados del petróleo. Realizamos un bioensayo analizando: contaminantes (gasoil: 0, 1.96%, 3.93%, aceite usado de auto: 0, 2.75%, 5.5%) y nutrientes (con y sin adición). Se encontraron diferencias en el porcentaje y la velocidad de germinación. El gasoil en ambas concentraciones fue el más tóxico. La concentración de HTP en el sustrato disminuyó (64% en los tratamientos con gasoil y 51% en los con aceite). Sería interesante realizar experiencias a campo, manejándose con cautela ya que, al ser invasora, su propagación sería un problema.

[Palabras clave: gasoil, aceite usado de autos, tolerancia, fitorremediación, invasora]

ABSTRACT. Germination and survival of *Tithonia tubaeformis* (Asteraceae) in soils containing petroleum hydrocarbon contaminants: Phytoremediation is an innovated technique, cheaper than traditional methods commonly used to decontaminate polluted soils. The objective of this work is to study the germination of *T. tubaeformis* and its survival responses to petroleum hydrocarbons. We carried out a bioassay using contaminated soil following a randomized factorial design and analyzing contaminants at three different concentrations (gas-oil: 0, 1.96% and 3.93%, car fuel-oil: 0, 2.75% and 5.5%) and nutrients conditions (with and without Rorison nutrient solution), with four replicates per treatment. HTP concentrations were assessed at the beginning and end of the experiment with the ASTM D1178 modified method. Significant differences were obtained in the percentage of germination and germination speed. No differences were found in the interaction nutrients*treatments for the percentages of germination and germination speed. There were no differences in the germination and germination speed in the control group and the fuel oil one (lowest concentration). Gas-oil at the lowest concentration allowed cotyledon emergence, while at the highest resulted in all seeds mortality. The concentration of TPH in the soil at the beginning and end of the experiment showed a greater reduction in the gas-oil treatments (64%) than in the fuel-oil ones (51%). We suggest further studies in contaminated open fields, though, being an alien species, precautions should be taken.

[Keywords: gas-oil, used car oil, tolerance, phytoremediation, alien plant]

INTRODUCCIÓN

Los hidrocarburos de petróleo están contemplados en la ley Argentina de residuos peligro-

sos número 24051/92. Sin embargo, en la ciudad de Salta, los responsables de estos residuos producidos en las estaciones de servicio y lubricentros no siguen la normativa vigente y realizan los depósitos en sitios como

✉ Instituto de Ecología y Ambiente Humano. Consejo de investigación. Universidad Nacional de Salta. Buenos Aires 177, 4400, Salta, Argentina. ecologia@unsa.edu.ar

Recibido: 5 de agosto de 2003; Fin de arbitraje: 26 de septiembre de 2003; Revisión recibida: 28 de agosto de 2004; Segunda revisión recibida: 28 de mayo de 2005; Aceptado: 11 de julio de 2005

orillas de ríos o caminos de tierra, contaminando amplios sectores de suelo, subsuelo y aguas superficiales y profundas (de Viana et al. 2003). Dado el alcance de este problema a nivel local, regional y global, es necesario comenzar investigaciones que contribuyan a evitar la contaminación por este tipo de residuos.

La fitorremediación es una tecnología emergente que emplea vegetales en combinación con microorganismos asociados a la rizósfera para remover, degradar o inmovilizar contaminantes localizados en suelos, sedimentos, aguas superficiales y profundas y en la atmósfera (com. pública). Los contaminantes de naturaleza orgánica e inorgánica pueden ser absorbidos por las plantas, como sucede con *Lolium perenne* en suelos contaminados con diesel (Gunther et al. 1996; Hou et al. 2001; Siddiqui & Adams 2002). Muchas especies vegetales pueden ser empleadas para tratar una gran cantidad de contaminantes tales como hidrocarburos de petróleo, metales pesados, compuestos radioactivos y boro, entre otros. Para aplicar fitorremediación, las especies se seleccionan teniendo en cuenta la tolerancia al contaminante, el potencial de evapotranspiración, las enzimas degradativas que producen, las tasas de crecimiento, el tipo de crecimiento radicular y la capacidad para bioacumular y/o degradar los contaminantes (com. pública), además de otros factores como ser la biodisponibilidad de los contaminantes debido a la absorción por las partículas del suelo y la adecuada actividad microbiana (Jonson et al. 2002; Jonson et al. 2004).

El pasto cubano, *Tithonia tubaeformis* (Jac) Cass., es una compuesta originaria de Centroamérica que se encuentra invadiendo importantes superficies agrícolas y otros ambientes perturbados por acción antrópica. En el noroeste argentino, existen grandes superficies de explotación petrolífera (SIMyRE 2003), lo que incrementa el riesgo de contaminación de suelos y aguas. Por otra parte, las características bioecológicas del pasto cubano como ser su gran plasticidad fenotípica, la capacidad de colonizar ambientes con distintos niveles y tipos de alteraciones, y su estrategia del tipo de las ruderales (Grime 1978), la convierten en una especie de interés para experiencias de fitorremediación (Larenas Parada 2002). En este trabajo, evaluamos la

germinabilidad de las semillas, la supervivencia de las plántulas y el porcentaje de hidrocarburos totales del petróleo (HTP) al comienzo y final del experimento.

MÉTODOS

Evaluación del efecto tóxico de hidrocarburos en la germinabilidad

Con el fin de comprobar el efecto del gasoil y el aceite usado de auto en la germinación, se realizó un experimento de laboratorio (temperatura de $24^{\circ}\text{C} \pm 2.1^{\circ}\text{C}$ y $60\% \pm 5.4\%$ de humedad) siguiendo un diseño factorial completamente aleatorizado, con cuatro réplicas por tratamiento. Los factores fueron adición o no de nutrientes (solución Rorison, Hendry & Grime 1993) y contaminantes: aceite usado de auto 0, 2.75% y 5.5 % y gasoil 0, 1.96% y 3.93% (concentraciones que producen deficiencia en el crecimiento, desarrollo o mortandad de las plantas) (Larenas Parada 2002). Las unidades experimentales fueron recipientes plásticos con 200 g de arena (esterilizada en autoclave a 1 atm. de presión y a 120°C , durante 1 hora), a los que se adicionaron los contaminantes derivados del petróleo (a cada unidad experimental se le adicionó el porcentaje correspondiente de contaminante y se mezcló de manera de obtener una distribución lo más homogénea posible del contaminante en el sustrato), y 20 semillas en cada una (previamente sumergidas en solución de HClO al 5% durante 5 minutos para evitar contaminación por microorganismos). Se registró diariamente el número de germinaciones y se estimó el porcentaje de germinadas, la velocidad de germinación y la supervivencia a los 20 y 40 días. Los resultados se evaluaron con el test (M) ANOVA de dos factores, empleando SYSTAT (1992).

Determinación de hidrocarburos remanentes

Los HTP se determinaron con la técnica de solubles en cloroformo ASTM D1178, modificada por INEAH (Larenas Parada 2002) a 25°C (la modificación de la técnica consistió en usar 120 ml del reactivo extractante en vez de 100 ml y el enjuague del balón fue triple).

Además, al finalizar la extracción, los balones fueron llevados a estufa a 60°C durante 1 hora para asegurar la completa evaporación del reactivo. Se estimó la concentración mínima detectable por la técnica y la concentración de HTP para cada concentración empleada al comienzo y al final del experimento (con duración de 40 días) y el porcentaje de HTP remanentes.

RESULTADOS

Se observaron diferencias altamente significativas debidas al tratamiento en el porcentaje de germinación (ANOVA $F = 29.4$, $P < 0.0005$), velocidad de germinación ($F = 22$, $P < 0.0005$) y supervivencia a los 20 ($F = 33$, $P < 0.0005$) y 40 días ($F = 10$, $P < 0.0005$). El gasoil en ambas concentraciones produjo inhibición en todas las variables consideradas. La mayor concentración empleada (3.93%) inhibió completamente la germinación. En cambio, el aceite usado de auto en ambas concentraciones no se diferenció del control y permitió la germinación y supervivencia de las plántulas. La velocidad de germinación y la supervivencia (a los 20 y 40 días) mostraron la misma tendencia (Tabla 1).

No se encontraron diferencias con relación al factor adición o no de nutrientes en el porcentaje de germinadas ($F = 0.009$, $P = 0.92$), velocidad de germinación ($F = 0.48$, $P = 0.5$), ni supervivientes a los 20 ($F = 0.17$, $P = 0.6$) y 40 días ($F = 0.1$, $P = 0.7$). Los mismos resultados se obtuvieron para la interacción nutrientes*tratamientos ($P > 0.7$ en todos los casos).

Respuestas fenotípicas notorias fueron registradas en los tratamientos con aceite usado de auto (en ambas concentraciones), ya que las plantas crecieron más rápido y fueron más vigorosas y verdes que el resto. El tratamiento con gasoil a la menor concentración, sólo permitió la aparición de los cotiledones sin crecimiento posterior.

La concentración mínima detectable de hidrocarburos fue del 0.1% a 25°C. La detección de los HTP (25°C) al comienzo del experimento fue similar a la concentración teórica empleada. La proporción de hidrocarburos livianos fue menor en aceite usado (0.1%) que en gasoil (13.7%). Al final del experimento, la concentración de hidrocarburos totales (40 días) disminuyó un 64% en los tratamientos con gasoil y un 51% en los tratados con aceite usado (Tabla 2).

DISCUSIÓN

El pasto cubano pudo germinar y sobrevivir en las concentraciones empleadas de aceite usado de auto. Resultados similares se obtuvieron con *Trichocereus terscheckii* (Plaza et al. 2003). Esta respuesta probablemente responde a una estimulación en la germinación debido a la riqueza en carbono y a que las plántulas son tolerantes al mismo en las concentraciones empleadas. Los aceites, al ser carbonados, pueden ser incorporados a la biomasa o pueden permanecer en la rizósfera donde podrían ser utilizados por los microorganismos del suelo (Gunther et al. 1996; Wiltse et al. 1998; Larenas Parada 2002; Jonson et al. 2004).

Tabla 1. Promedio ($\pm$ ES) del porcentaje de germinación, velocidad de germinación y supervivencia de las plántulas a los 20 y 40 días para cada tratamiento. (Sin) sin nutrientes; (Con) con nutrientes.

Table 1. Average ($\pm$ SE) percentage of seed germination, germination speed and survival at 20 and 40 days for each treatment. (Sin) without nutrients; (Con) with nutrients.

Tratamiento	Porcentaje germinación		Velocidad germinación		Supervivientes (20 días)		Supervivientes (40 días)	
	Sin	Con	Sin	Con	Sin	Con	Sin	Con
Control	12.5 (1.9)	11.7 (2.6)	10.5 (2.6)	9.7 (2.2)	10 (2.0)	8.5 (1.7)	9.5 (2.2)	7.7 (2.2)
Aceite 2.75%	14.7 (2.3)	13.7 (2.6)	13.5 (2.7)	12.0 (2.6)	10.2 (1.7)	12.5 (2.2)	4.5 (1.5)	6.2 (2.2)
Aceite 5.5%	10.2 (0.5)	10.7 (1.9)	11.2 (2.0)	8.5 (1.3)	8.7 (1.6)	9.7 (0.6)	4.7 (1.9)	4.5 (1.9)
Gasoil 1.96%	1.0 (0.7)	2.7 (1.0)	0.07 (0.05)	0.5 (0.2)	0	0	0.2 (0.2)	1.7 (0.6)
Gasoil 3.93%	0	0	0	0	0	0	0	0

Huang & Cunningham (1996) sostienen que los nutrientes facilitan la absorción de los contaminantes por las plantas. Sin embargo, en este estudio la adición de nutrientes no produjo efectos en ninguna de las variables consideradas. Una posible explicación de la diferencia, podría atribuirse al tiempo del experimento (40 días), y al tamaño que alcanzan las plántulas en tan corto periodo. Por otra parte, es importante destacar que no se midió el peso seco de las plantas, que es un mejor indicador de crecimiento.

El pasto cubano no es una especie tolerante al gasoil, ya que las concentraciones empleadas inhibieron la germinación. Adam & Duncan (2002) encontraron una gran variabilidad en la respuesta de germinación de 25 especies en concentraciones de gasoil de 2.5% y 5%, siendo las más tolerantes las especies de pasturas (como *Anthoxanthum odoratum* L., *Festuca rubra*, *Lolium multiflorum*), herbáceas y leguminosas (como *Medicago lupulina*, *M. sativa*, *Trifolium platense*) y de algunas comerciales (*Brassica napus* y *Linum usitatissimum*).

Trapp et al. (2001) realizaron bioensayos de toxicidad con gasoil con tres especies arbóreas: *Salix alba*, *S. viminalis* y *Populus nigra*, midiendo la inhibición de la transpiración. En concentraciones de 1000 mg/kg (1%), *S. alba* fue la menos afectada, mientras que *P. nigra* mostró una alta sensibilidad, y la mayor concentra-

ción (10000 mg/kg) afectó la transpiración de todas las especies.

La baja proporción de semillas de *T. tubaeformis* germinadas en los tratamientos con gasoil puede deberse a que la especie no es tolerante.

Si bien los porcentajes más bajos de hidrocarburos remanentes se detectaron en los tratamientos con gasoil, estos resultados pueden deberse a una combinación de procesos físico-químicos (ruptura de cadenas largas y anillos para dar lugar a hidrocarburos livianos) y biológicos (microorganismos). En estos tratamientos hubo colonización por hongos, los que pueden haber sido responsables, al menos en parte, de las bajas concentraciones de contaminantes detectadas al finalizar el bioensayo. Los tratamientos con aceite también mostraron crecimiento fúngico pero a una escala mucho menor, y en el tratamiento control no se observó la presencia de los mismos. En los tratamientos con aceite, la disminución en los niveles de contaminantes se puede atribuir a la especie invasora, aunque no se puede descartar la acción sinérgica de los procesos antes mencionados.

Los resultados de esta investigación sugieren que el pasto cubano podría convertirse en una especie de importancia para remediar suelos contaminados con aceite usado de autos. Sin embargo, habría que estudiar los costos y

Tabla 2. Concentración promedio (error estándar) de hidrocarburos totales al comienzo y al final del experimento, y porcentaje de hidrocarburos remanentes en el sustrato. (Con) con nutrientes; (Sin) sin nutrientes.

Table 2. TPH mean (standard error) concentration at the beginning and end of the experiment, and percentage of TPH remaining in the substratum. (Sin) with nutrients; (Con) without nutrients.

Tratamiento	Conc. inicial (%)		Concentración detectada (%)				Hidrocarburos eliminados (%)	
	Sin	Con	Inicio experimento		Fin de experimento		Sin	Con
Aceite	2.75 (0.005)	2.74 (0.008)	2.73 (0.01)	2.72 (0.06)	1.4 (0.003)	1.4 (0.006)	51.5	51.4
	5.5 (0.03)	5.5 (0.03)	5.44 (0.04)	5.44 (0.04)	2.7 (0.03)	2.7 (0.02)	50.3	50.2
Gasoil	1.96 (0.004)	1.96 (0.003)	1.7 (0.014)	1.7 (0.01)	0.6 (0.09)	0.5 (0.2)	65	65.4
	3.93 (0.01)	3.93 (0.04)	3.4 (0.01)	3.4 (0.01)	1.2 (0.02)	1.2 (0.04)	63.7	63.8

beneficios de su uso, ya que su empleo debería ser controlado para evitar posteriores invasiones.

Sería de interés realizar otras experiencias para probar las especies hipertolerantes a la presencia de contaminantes, ya que ésta es una característica primordial para que las plantas sean usadas en fitorremediación (Vogeli-Lange & Wagner 1994; Ortiz et al. 1995).

BIBLIOGRAFÍA

- ADAM, G & H DUNCAN. 2002. Influence of diesel fuel on seed germination. *Environmental Pollution* **120**:363-370.
- DE VIANA, ML; J PLAZA & V RUGGIERI. 2003. Relevamiento de la generación y destino final de residuos de hidrocarburos totales de petróleo (HTP) en la ciudad de Salta. *Andes* **14**:331-340.
- GRIME, JP. 1978. *Plant strategies and vegetation processes*. Chapman & Hall. New York.
- GUNTHER, T ; U DORNBERGER & W FRITSCH. 1996. Effects of ryegrass on biodegradation of hydrocarbons in soil. *Chemosphere* **33**(2):203-215.
- HENDRY, GAF & JP GRIME. 1993. *Methods in comparative plant ecology*. Chapman & Hall. London.
- HOU, FS; MW MILKE; DW LEUNG & DJ MACPHERSON. 2001. Variations in phytoremediation performance with diesel-contaminated soil. *Environ Technol* **22**(2):215-222.
- HUANG, JW & SD CUNNINGHAM. 1996. Lead phytoextraction: Species variation in lead uptake and translocation. *New Phytol.* **134**:75-84.
- JONSON, DL; KC JONES; CJ LANGDON; TG PEARCE & KT SEMPLE. 2002. Temporal changes in earthworm availability and extractability of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in soil. *Soil. Biol. Biochem.* **34**:1363-1370.
- JONSON, DL; KL MAGUIRE; DR ANDERSON & SP McGRATH. 2004. Enhanced dissipation of chrysene in planted soil: the impact of a rhizobial inoculum. *Soil Biology & Biochemistry* **36**:33-38.
- LARENAS PARADA, G. 2002. *Invasiones Biológicas: Banco de semillas del pasto cubano (Tithonia tubaeformis), características de los suelos y germinabilidad (Salta-Capital)*. Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional de Salta. Argentina.
- ORTIZ, DF; T RUSCITTI; KF McCUE & DW OW. 1995. Transport of metal-binding peptides by HMT1, a fission yeast ABC-type vacuolar membrane protein. *J. Biol. Chem.* **270**:4721-4728.
- PLAZA, J; ML DE VIANA & A CAZÓN. 2003. Evaluación de la supervivencia de *Trichocereus terscheckii* en suelos contaminados con residuos y productos peligrosos de estaciones de servicio. *Ecología Austral* **13**(1):63-65.
- SIDDIQUI, S & WA ADAMS. 2002. The fate of diesel hydrocarbons in soils and their effect on the germination of perennial ryegrass. *Environ Toxicol.* **17**(1):49-62.
- SIMYRE (Secretaría de Industria, Minería y Recursos Energéticos de la Provincia de Salta). 2003. *Investment opportunities. Mining and hydrocarbons*. Provincia de Salta, Argentina. 35pp.
- SYSTAT. 1992. SYSTAT for Windows: statistics. Version 5 edition. Illinois, USA.
- TRAPP, S; A KÖHLER; LC LARSEN; KC ZAMBRANO & U KARLSON. 2001. Phytotoxicity of fresh and weathered diesel and gasoline to willow and poplar trees. *J. Soils & Sediments* **1**(2):71-76.
- VOGELI-LANGE, R & GJ WAGNER. 1994. Subcellular localization of cadmium and cadmium-binding peptides in tobacco leaves: implication of a transport function for cadmium binding peptides. *Plant Phytol.* **92**:1086-1093.
- WILTSE, CC; WL ROONEY; Z CHEN; AP SCHWAB & MK BANKS. 1998. Greenhouse evaluation of agronomic and crude oil-phytoremediation potential among alfalfa genotypes. *J. Environ. Qual.* **27**:169-173.

