

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA

FACULTAD DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERIA AMBIENTAL



**VIABILIDAD DE UN MÉTODO TOXICOLÓGICO A PARTIR DE LA
GERMINACIÓN DEL RÁBANO (*Raphanus sativus* L.) PARA DETERMINAR
TOXICIDAD DE SUELOS CONTAMINADOS POR HIDROCARBURO EN
LABORATORIO**

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

INGENIERO AMBIENTAL

PRESENTADO POR:

CALLUPE VARGAS NATALIE JUANA

2020



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA
Tingo María – Perú

FACULTAD DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS N° 026-2020-FRNR-UNAS

Los que suscriben, Miembros del Jurado de Tesis, reunidos con fecha 09 de Octubre de 2020, a horas 09:10 a.m. en la en la Sala Virtual del Departamento Académico de Ciencias Ambientales para calificar la Tesis titulada:

“VIABILIDAD DE UN METODO TOXICOLOGICO A PARTIR DE LA GERMINACIÓN DEL RÁBANO (*Raphanus sativus* L.) PARA DETERMINAR TOXICIDAD DE SUELOS CONTAMINADOS POR HIDROCARBURO EN LABORATORIO”

Presentado por la Bachiller: **CALLUPE VARGAS, Natalie Juana**, después de haber escuchado la sustentación y las respuestas a las interrogantes formuladas por el Jurado, se declara **APROBADA** con el calificativo de **“BUENO”**

En consecuencia, el sustentante queda apto para optar el Título de **INGENIERO AMBIENTAL**, que será aprobado por el Consejo de Facultad, tramitándolo al Consejo Universitario para el otorgamiento del Título correspondiente.

Tingo María, 09 de Diciembre de 2020

Dr. LUIS EDUARDO ORÉ CIERTO
PRESIDENTE



Ing. MSc. JOSÉ LUIS PAREDES SALAZAR
MIEMBRO

Blga. MSc. GABRIELA CECILIA CARHUAMACA YABAR
MIEMBRO

Ing. MSc. VÍCTOR MANUEL BETETA ALVARADO
ASESOR

MSC.QUIM. MARY FLOR CESARE CORAL
ASESORA

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA

FACULTAD DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERIA AMBIENTAL



VIABILIDAD DE UN MÉTODO TOXICOLÓGICO A PARTIR DE LA GERMINACIÓN DEL RÁBANO (*Raphanus sativus* L.) PARA DETERMINAR TOXICIDAD DE SUELOS CONTAMINADOS POR HIDROCARBURO EN

LABORATORIO

Autor : Callupe Vargas, Natalie J. 

Asesor : Ing. Beteta Alvarado, Víctor M. 

Coasesora : Mg. Quím. Cesare Coral, Mary Flor 

Programa de Investigación : Biorremediación y recuperación de ambientes degradados

Línea de investigación : Ciencia y Tecnologías Ambientales 

Eje temático de investigación : Xenobioticos

Lugar de ejecución : Laboratorio de Tesis de la Universidad Nacional Agraria La Molina.

Duración de trabajo : seis meses 

Financiamiento : 2 331.80 

Propio : Si

Tingo María – Perú

DEDICATORIA

A DIOS por guiarme en el camino correcto, darme la fuerza para seguir adelante sin desmayar y enseñarme a perseverar en todo momento.

A mis queridos padres, Manuel Callupe Paita y Gloria Julia Vargas Anco, por el amor, apoyo y sacrificio incondicional que hicieron por mí en mi formación profesional.

A mis queridos hermanos Saúl, Yesenia, José, Keila y Karina por la motivación, ayuda y fuerza que me dan para seguir adelante en mi formación profesional.

A las personas que me rodean y que fueron de gran ayuda y motivación para seguir adelante en mi formación.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por guiarme y bendecir mi camino durante todos los días de mi vida.

A mis queridos padres y hermanos por ser el sustento económico, apoyo y motivación durante mi formación profesional.

A mi alma mater, Universidad Nacional Agraria de la Selva, por brindarme un buen y adecuado aprendizaje durante mi formación profesional.

A la Universidad Nacional Agraria La Molina por recibirme en su institución para realizar dichas mi tesis.

Al MSc. Víctor M. Beteta Alvarado, por brindarme el asesoramiento y apoyo durante la ejecución de mi tesis.

Al MSc. Quím. Mary Flor Cesaré Coral, por su apoyo durante la ejecución de mi tesis.

A mis miembros del jurado de tesis. Dr. Luis Eduardo Oré Cierito, Blga. MSc. Gabriela C. Carhuamaca Yabar e Ing. MSc. Jose Luis Paredes Salazar por cada momento dedicado para aclarar cualquier tipo de duda.

A mis amigos Elizabeth, Olinda, Estefany, Linda, Lucio, Luis, María, Bryan, Fátima, Johnson, Alexander y Elías por el apoyo incondicional que me brindaron durante mi formación profesional.

A Jorge por su amor y comprensión y su familia por el apoyo para seguir adelante y ayudarme a cumplir mis metas.

ÍNDICE

	Página
I. INTRODUCCIÓN.....	14
1.1. Objetivo general.....	15
1.2. Objetivos Específicos.....	16
II. REVISION DE LITERATURA.....	17
2.1. Hidrocarburos.....	17
2.2. Contaminación por hidrocarburo.....	18
2.3. Antecedentes.....	18
2.3.1. Reportes de derrame de petróleo en los últimos años en el Perú.....	18
2.4. Investigaciones realizadas.....	21
2.4.1. En rábano (<i>Raphanus sativus L.</i>).....	21
2.4.2. En otras especies vegetales.....	23
2.5. Hidrocarburos en los suelos.....	26
2.6. Algunas especies como reductoras de la concentración de hidrocarburos en suelos.....	28
2.7. Toxicidad.....	29
2.8. Extractor Soxhlet.....	30
2.9. Bioensayo con Rábano (<i>Raphanus sativa L.</i>).....	31
2.10. Proceso de germinación de semillas.....	32

2.11.	Bioensayos toxicológicos	33
2.12.	Tipos de ensayos	35
2.13.	Respuestas toxicológicas.....	36
2.14.	Umbral de sensibilidad.....	36
2.15.	Efectos toxicológicos.....	37
2.16.	Parámetros toxicológicos	37
2.16.1.	Nivel observado de sin efectos adversos (NOAEL).....	37
2.16.2.	Nivel más bajo de efectos adversos observados (LOAEL)	37
III.	MATERIALES Y METODOS	38
3.1.	Lugar de ejecución.....	38
3.1.1.	Ubicación geográfica	38
3.2.	Materiales equipos y software.....	39
3.2.1.	Materiales.....	39
3.2.2.	Muestra	40
3.2.3.	Organismo de prueba.....	40
3.2.4.	Reactivos.....	40
3.2.5.	Equipos	40
3.2.6.	Software	40
3.3.	Metodología	40
3.3.1.	Fase inicial	40

3.3.2.	Fase de laboratorio	41
3.3.3.	Fase de gabinete.....	49
3.3.4.	Análisis estadístico del trabajo de investigación.....	51
3.3.5.	Para determinar el umbral de sensibilidad en diferentes concentraciones de hidrocarburo para el rábano (<i>Raphanus sativus</i> L.) en placa y en maceta.....	57
3.3.6.	Determinación de la concentración de hidrocarburo aplicando la Dosis letal media DL50 para el rábano (<i>Raphanus sativus</i> L.).	58
3.3.7.	Determinar los parámetros toxicológicos, NOAEL Y LOAEL para el rábano (<i>Raphanus sativus</i>) mediante bioensayos de laboratorio	60
IV.	RESULTADOS	62
4.1.	Respuesta toxicológica de semillas de rábano	62
4.2.	Umbral de sensibilidad en diferentes concentraciones de hidrocarburo para el rábano (<i>Raphanus sativus</i> L.) en placa de vidrio y en maceta.	69
4.3.	Dosis letal media DL50 para la semilla de rábano (<i>Raphanus sativus</i>).....	73
4.4.	Parámetros toxicológicos, NOAEL Y LOAEL para el rábano (<i>Raphanus sativus</i>).	75
V.	DISCUSION.....	81

5.1.	De la respuesta toxicológica	81
5.2.	Del Umbral de sensibilidad	83
5.3.	De la Dosis letal media DL50	84
5.4.	De los parámetros toxicológicos, NOAEL Y LOAEL	85
VI.	CONCLUSION.....	86
VII.	RECOMENDACIONES.....	87
VIII.	ABSTRACT.....	88
IX.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
	ANEXOS.....	96

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Resumen de las condiciones recomendadas para las pruebas de toxicidad con rábano en placas Petri.....	45
2. Resumen de las condiciones recomendadas para las pruebas de toxicidad con rábano en macetas.....	47
3. Esquema del análisis de variancia	53
4. Análisis del ANVA.....	56
5. Concentraciones y respuestas o efectos.....	57
6. Respuesta toxicológica de las semillas de rábano.....	62
7. Respuesta toxicológica de las semillas de rábano en macetas.....	64
8. Longitud del hipocotílo en las semillas de rábanos en placas de vidrio, sometido a diferentes concentraciones.....	66
9. Longitud del hipocotílo en las semillas de rábanos en maceta, sometido a diferentes concentraciones.....	68
10. Concentraciones y respuestas o efectos en las semillas de rábano.	70
11. Concentraciones y respuestas o efectos en las semillas de rábano.	72
12. Análisis para la dosis letal media DL50 para las semillas se rábano.....	74
13. Análisis de varianza para las plántulas de rábano.....	76
14. Prueba estadística de Dunnett para el rábano en placas de vidrio.....	76
15. Estimación de la concentración mínima en la que se observan efectos adversos en rábano.....	77
16. Análisis de varianza para las plántulas de rábano.....	78
17. Prueba estadística de Dunnett para el rábano en placas de vidrio.....	79

18. Estimación de la concentración mínima en la que se observan efectos adversos en rábano	79
19. Porcentaje de hidrocarburo en 10 gramos de muestra de suelo contaminado por el método de Soxhlet.	96
20. Análisis fisicoquímico del suelo contaminado y extracto de hidrocarburo del suelo.	96
21. Porcentaje de semillas germinadas para el rábano plantadas en placa Petri.	97
22. Porcentaje de semillas germinadas para el rábano plantadas en macetas	98
23. Energía germinativa para el rábano en frascos de vidrio.....	98
24. Energía germinativa para el rábano en macetas.	99
25. Retraso germinativo para el rábano en frascos de vidrio.....	99
26. Retraso germinativo para el rábano en macetas.	101
27. Biomasa fresca para el rábano en frascos de vidrio	102
28. Biomasa fresca para el rábano en macetas.	104
29. Biomasa seca para el rábano en frascos de vidrio	106
30. Biomasa seca para el rábano en macetas.....	108
31. Porcentaje de humedad para el rábano en frascos de vidrio.....	110
32. Porcentaje de humedad para el rábano en maceta	112
33. Porcentaje de semillas muertas.....	114
34. Desempeño de Predicción para las semillas de rábano	116
35. Desempeño de Predicción para las semillas de rábano	117

INDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Destino de los hidrocarburos en el suelo	27
2. Mapa de ubicación política del Laboratorio de Tesis de la UNALM	39
3. Esquema general del procedimiento de prueba de toxicidad con semillas.	45
4. Se resume el procedimiento del ensayo de toxicidad en macetas.	48
5. Concentraciones de hidrocarburo y agua para cada tratamiento.	54
6. Diseño estadístico para rábano (<i>Raphanus sativus</i> L.)	55
7. Umbral de sensibilidad concentración vs la respuesta o efecto.	58
8. Análisis de Probit con el programa Excel.	60
9. Curva para determinar el NOAEL y LOAEC.	61
10. Respuesta toxicológica la semilla de rábano en placas de vidrio.	63
11. Respuesta toxicológica la semilla de rábano en macetas.	65
12. Longitud media de hipocotílo y la radícula en semillas de rábano en diferentes concentraciones del extracto de hidrocarburo.	67
13. Longitud media del hipocotílo en semillas de rábano en diferentes concentraciones del extracto de hidrocarburo.	69
14. Umbral de sensibilidad concentración vs la respuesta o efecto en semillas de rábanos en placas de vidrio.	71
15. Umbral de sensibilidad concentración vs la respuesta o efecto para las semillas de rábano en maceta.	73
16. Dosis letal media DL50 para las semillas se rábano en macetas.	75
17. Curva determinación de NOAEC y LOAEC.	78

18.	Curva determinación de NOAEC y LOAEC.....	80
19.	Muestra de suelo contaminado por hidrocarburo.	119
20.	Preparación con diclorometano para la extracción del hidrocarburo ...	119
21.	Extracción de Soxhlet del suelo contaminado.	120
22.	Medición del pH para el suelo contaminado.....	120
23.	Concentración de extracto de hidrocarburo para realizar los ensayos.	121
24.	Sembrado de las semillas de rabano en las placas Petri.	121
25.	Sembrado de las semillas de rabano en macetas.....	122
26.	Crecimiento de los rábanos en macetas a condiciones luz.....	122
27.	Crecimiento de las plántulas de rábano en placa Petri.....	123
28.	Medición de las plántulas de rábano.	123
29.	Pesado de las plántulas de rábano.	124
30.	Secado de las plántulas de rábano	124

RESUMEN

La investigación realizada posee como objetivo evaluar la viabilidad de un método toxicológico a partir de la germinación del rábano (*Raphanus sativus* L.) para determinar la toxicidad de suelos contaminados por hidrocarburo en laboratorio, adquirimos como patrón suelo contaminado por hidrocarburos extraído de Maestranza (cochera de carros) de la Universidad Nacional Agraria La Molina, para ello se realizó análisis físico-químico del suelo y se determinó el contenido de hidrocarburos en el suelo mediante el método de extracción Soxhlet, después se acondicionó las semillas de rábano en placas de vidrio y en macetas para observar su biometría y parámetros (porcentaje de germinación, energía germinativa, retraso germinativo, biomasa y porcentaje de humedad) que nos ayuden obtener la respuesta toxicológica de las plántulas. Como resultado se reporta que en placas Petri con una concentración de hidrocarburo de 100 % se encuentra un 49.95 de respuesta toxicológico; mientras que, los ensayos en macetas la respuesta toxicológica es de 63.78. Se concluye que el hidrocarburo a una concentración máxima tiene como efecto adverso en los ensayos trabajados en macetas, y que la especie *R. sativus* puede considerarse como un bioindicador de suelos contaminados por hidrocarburos.

Palabras claves: método toxicológico, *Raphanus sativus*, hidrocarburo, bioensayos, germinación.

I. INTRODUCCIÓN

A nivel global, existen problemas de contaminación del suelo como el agua y aire se atribuyen primordialmente a las labores antropogénicas; entre ellos se encuentra la extracción de recursos naturales, en este caso en particular, hidrocarburos. En los últimos años, el sector se ha expandido significativamente y se ha convertido en una parte importante del crecimiento económico mundial; actualmente se considerada como eje del incremento económico en varios países del orbe al consumo, las reservas y la producción de energía.

La presencia y persistencia de hidrocarburos contaminan el suelo, esto depende, de la composición y textura del suelo (el tamaño de las partículas que componen), porque según las características del suelo, el petróleo se adherirá a la capa superficial del suelo, por lo tanto se expandirá en el suelo y esta permanecerá por más tiempo.

Los riesgos ecológicos generalmente se juzgan en función del impacto sobre los organismos, sus poblaciones o comunidades. El valor de Dosis letal media (DL_{50}) representa mejor la toxicidad aguda de una sustancia.

Son visibles con los métodos tradicionales pues la cuantificación de la concentración que existe en el ambiente, después del tratamiento no es suficiente, dado que se puede alcanzar el valor límite máximo admisible, lo cual

no indica que podría causar problemas de salud a la población, por tanto, se requiere realizar ensayos con organismos para detectar la presencia del contaminante, pues se alterara el comportamiento de estos organismos.

En esta tesis se evaluó la aplicación de hidrocarburo para el proceso de toxicidad de semillas de rábano, se utilizaron extracto de suelo contaminado mediante el método de Soxhlet, con placas Petri mediante concentraciones y de esa manera se podrá ver su efecto toxicológico en su tiempo de germinación, biomasa y la longitud de la radícula y el hipocotilo. Así mismo se podrá determinar el efecto toxico en las semillas por hidrocarburo determinando la dosis letal media y los parámetros toxicológicos.

Con dichos antecedentes de empleo del rábano nos hacemos la pregunta ¿Cuál es la viabilidad del método toxicológico a partir de la germinación del rábano (*Raphanus sativus* L.) para determinar toxicidad de suelos contaminados en laboratorio? Y como hipótesis podemos decir, a una concentración de 0,2 mL/L (ECA-suelos), equivalente al 70% de hidrocarburo se obtendrá una viabilidad toxicológica en la semilla de rábano (*Raphanus sativus* L.) superior al DL 50 en los bioensayos de laboratorio.

1.1. Objetivo general

Evaluar la viabilidad de un método toxicológico a partir de la germinación del rábano (*Raphanus sativus* L.) para determinar la toxicidad de suelos contaminados por hidrocarburo en laboratorio.

1.2. Objetivos Específicos

- Determinar la respuesta toxicológica en las semillas de rábano (*Raphanus sativus*) en placas y maceta a diferentes concentraciones de hidrocarburos.
- Determinar el umbral de sensibilidad en diferentes concentraciones de hidrocarburo mediante bioensayos de laboratorio para el rábano (*Raphanus sativus*)
- Determinar la concentración de hidrocarburo mediante bioensayos de laboratorio aplicando la Dosis letal media DL50 para el rábano (*Raphanus sativus*)
- Determinar los parámetros toxicológicos, NOAEL Y LOAEL para el rábano (*Raphanus sativus*) mediante bioensayos de laboratorio

II. REVISION DE LITERATURA

2.1. Hidrocarburos

Son sustancias naturales derivadas de las algas establecidas a lo largo de un sinnúmero de años, gracias a la materia orgánica desarrollada en la superficie terrestre, el proceso se inicia por la fotosíntesis, que forma parte del ciclo del carbono; durante los períodos geológicos, este aporte ha producido una gran materia fósil (YAVARI et al. 2015).

Estas sustancias están compuestas principalmente por diferente volatilidad, disolución, y debido a que solo se forman a partir de átomos de carbono e hidrógeno, son compuestos orgánicos fácilmente biodegradables, que pueden ser eliminados o convertidos en sustancias menos tóxicas en el suelo y para agua que ha sido contaminada, por lo que se permite la investigación y el análisis para diseñar estrategias de fitorremediación que promuevan su degradación y con ello depuren el suelo y el agua. (VELASQUEZ, 2018).

Los hidrocarburos imposibilitan el intercambio de gases con el aire, liberando una cadena de procesos físicos y químicos simultáneos, como la evaporación y la infiltración, dependiendo del tipo de hidrocarburo, la temperatura, la humedad, la textura del suelo y las emisiones pueden ser un proceso más o menos lento que transporta a una mayor toxicidad. (BENAVIDES et al., 2006).

2.2. Contaminación por hidrocarburo

Los procedentes de hidrocarburos; gasolina, queroseno, aceite, combustible, parafina y asfalto, etc. No solo perturban la superficie del suelo, sino que además corren el riesgo de ser transportados hasta aguas subterráneas para causar su contaminación, o incluso pueden ser transportados por escorrentía, agravando aún más daño ambiental. La contaminación afecta las condiciones físicas y químicas del agua, porque se reduce la transferencia de oxígeno entre la atmósfera y la fase acuosa, y la luz ingresa al ambiente, inhibiendo así el crecimiento de ciertas especies y reduciendo el oxígeno disuelto, así como la fijación de nutrientes (VELÁSQUEZ, 2018).

La mayoría de los componentes tóxicos y volátiles se eliminan por evaporación. Aunque otros compuestos se oxidan por la radiación ultravioleta del sol, todos dependen del peso molecular, porque algunos hidrocarburos tóxicos son solubles en agua y se degradan, mientras que otros tienen la capacidad de depositarse en los sedimentos. Independientemente de las reacciones o efectos de estas sustancias, los animales y plantas de la zona se ven afectados directamente en primer lugar (GONZÁLEZ *et al.* 2011).

2.3. Antecedentes

El Perú es uno de los países afectados recientemente por cambios en los hidrocarburos provocados por el trabajo industrial y marítimo. A su vez, involucra las etapas relacionadas con el uso, transferencia y disposición del petróleo y sus derivados. Del mismo modo, las emisiones anuales son de

47.483.378,72 m³ por año, y solo alrededor del 5% de las aguas residuales industriales se reutilizan con hidrocarburos. (ANA, 2017).

2.3.1. Reportes de derrame de petróleo en los últimos años en el Perú

a. Reportes emitidos en el año 2016

El OEFA (2019), supervisa el derrame de emulsión asfáltica que ocurrió en el camión cisterna de Transtani E.I.R. L. el 2 de enero de 2016. Que llevaba alrededor de 8.500 galones de líquido asfáltico cayó a un afluente del río Colca a la altura del kilómetro 8 + 600 de la via Imata en el sector Colca del distrito de San Antonio de Chuca, ubicado en la provincia de Caylloma, departamento de Arequipa. En la vigilancia ejecutada por el OEFA se verificó que el derrame afectó la vegetación y tierra en un área aproximada de 300 metros cuadrados, y luego fluyó, aproximadamente, 100 metros lineales del lugar del derrame hasta uno de los afluentes del río Colca. Durante la supervisión en el área, se tomaron tres (03) muestras de suelo y cinco (05) muestras de agua para verificar el grado de impacto sobre estos recursos. Como autoridad competente para el seguimiento de las actividades de hidrocarburos, el OEFA verificará el cumplimiento de las medidas de emergencia de la empresa para la remediación en las áreas afectadas por el desastre.

b. Reportes emitidos en el año 2017

El OEFA (2019), por medio de su oficina descentralizada en Puno, inspeccionó el derrame de 11.000 galones de petróleo incitado por el vuelco de un camión de reabastecimiento de Lozapetrol Transportes S.R.L. de origen boliviano, que afectó el río Causilluma. El accidente aconteció el 22 de septiembre, en el km. 254+470 de la carretera Moquegua / Desaguadero, en el distrito de Huacullani, provincia de Chuchuito, departamento de Puno.

El OEFA, como autoridad de fiscalización ambiental, tomó muestras de agua y suelo del área del accidente para determinar la extensión del daño. Si la empresa no cumple con su plan de emergencia o no toma las medidas correctoras, la entidad implementará las medidas administrativas, civiles y penales correspondientes.

c. Reportes emitidos en el año 2018

El OEFA (2019), da a conocer el derrame de petróleo sucedido en el kilómetro 20+200 del tramo I del Oleoducto Norperuano, situado cerca a la comunidad San Pedro, en el distrito de Urarinas, departamento de Loreto. La supervisión que realiza el OEFA aprobará establecer la causa y el impacto generado por el derrame, además, verificará la implementación del Plan de Contingencia por parte de Petroperú S.A., que implica las acciones de contención y limpieza de la zona afectada. De acuerdo a lo notificado por la empresa, la fuga de petróleo ocasionado por acto de terceros, lo cual será materia de evaluación por la autoridad conveniente.

d. Reportes emitidos en el año 2019

El OEFA (2019), reporta el derrame de petróleo ocurrido en el kilómetro 549 del Tramo II del Oleducto Norperuano, en el distrito y provincia de Jaén, departamento de Cajamarca.

Las acciones de supervisión que viene realizando el OEFA permitirán estipular la causa de la emergencia ambiental, la responsabilidad de los hechos y el impacto generado por parte de Petroperú.

2.4. Investigaciones realizadas

2.4.1. En rábano (*Raphanus sativus* L.)

TRUJILLO *et al.* (2014), realizaron una prueba para determinar la microflora de la rizosfera, la fauna del suelo y los parámetros de la planta de rábano para medir el efecto de descontaminación de un Fluvisol afectado por el petróleo crudo. Se estableció un método de bioensayo para plantas de rábano en 0.85 hectáreas de suelo restaurado y 0.377 hectáreas de suelo de control adyacente localizado en Cunduacán, Tabasco, México. (*Raphanus sativus* L.) En las tres estaciones climáticas del año: nortes (noviembre a febrero), sures o sequía (marzo a mayo) y lluvias (junio a octubre). El diseño es completamente aleatorio a través de un arreglo factorial (tipo de suelo y época del año) y cuatro repeticiones. Evaluaron cinco variables de microflora, diversidad de fauna del suelo y siete variables de plantas. Utilizando la comparación ortogonal, ANDEVA y datos de análisis de correlación múltiple, también se calculó el índice de impacto ecotoxicológico (IIE). Después de la restauración, todavía hay de 6 480 a 11 210 mg kg⁻¹ de hidrocarburos totales de petróleo (HTP) en la capa

superficial del suelo que causan necrosis, y la tasa de mortalidad de las plantas es tan alta como 92%. No se formó el bulbo (-0,658), por lo que la biomasa vegetal disminuyó (-0,691), siendo ambos los parámetros más sensibles en la temporada sur. La variable más afectada ($p \leq 0.01$) en la temporada norte y la época de lluvias es la densidad de fauna del suelo (-0.729 **). El IIE propuesto proporciona los valores de los parámetros sensibles que pueden identificar los indicadores biológicos que se utilizan para evaluar la calidad de la remediación de fluvisoles contaminados por petróleo crudo.

CONTRERAS (2017), determinó la eficacia de biodegradación de hidrocarburos por diez siembras de hongos filamentosos hidrocarburo clástico seleccionados. Las muestras de suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo mostraron un contenido de HTP (25 987 mg/kg), recuento de hongos filamentosos (2.4×10^4 UFC/g), microorganismos totales ($>1.1 \times 10^7$ NMP/g), microorganismos hidrocarburo clásticos (1.1×10^6 NMP/g) y un nivel de toxicidad severo en el índice de germinación de *Raphanus sativus* L. “rabanito”. Los hongos filamentosos se aislaron en agar Bushnell Haas–petróleo 1%, obteniéndose 221 aislados, entre los que se clasificaron 15 géneros: *Cunninghamella* (12.6%), *Aspergillus* (11.3%), *Penicillium* y *Paecilomyces* (10.8%), *Alternaria*, *Rhizopus*, *Syncephalastrum*, *Periconia*, *Fusarium*, *Bipolaris*, *Monilia* y *Cladosporium* (9.5 a 2.7%), *Gliocladium*, *Memnoniella* y *Helminthosporium* (2.2%). Todas las variedades a excepción de *Helminthosporium* indicaron ser hidrocarbonoclásticos y se escogieron aquellos que alcanzaron altos valores de biomasa (1.78 a 1.95g). En el suelo tratado con *Aspergillus* sp. HP-031 se obtuvo el mayor índice de germinación desde los 30

días, la depreciación de la toxicidad a un nivel bajo a los 90 días y la mayor eficiencia (73%) en la degradación del HTP, demostrándose el potencial que tiene este hongo para la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo.

2.4.2. En otras especies vegetales.

BUENDIA (2012), realizó en 36 macetas un experimento de nivel biométrico, se utilizó fertilizante y aserrín como sustrato para la planta indicadora de maíz *Zea mays* L, sembrada y controlada durante dos meses. Los resultados mostraron que la dosis de suelo contaminado con hidrocarburos, fertilizantes y astillas de madera redujo el contenido de hidrocarburos en el suelo en un 22,5% en promedio, el uso de fertilizantes solos se redujo en un 16,5% y el uso de aserrín solo en un 9,6%. Esto ha sido confirmado y es complementario a los resultados de las plantas indicadoras de maíz, altura de planta, peso seco de hojas y peso seco de raíces. En comparación con el método de tratamiento experimental, la mejor manera de remediar el suelo es el suelo de tratamiento (T3) contaminado con vacaza más aserrín de bolaina, porque la concentración inicial de hidrocarburos totales de petróleo (TPH) es 21.81 g TPH / kg suelo, El TPH por kilogramo de suelo se reduce en 16,28 gramos, lo que equivale a una reducción del 25%. Este tratamiento es el más recomendado.

PETENELLO y FELDMAN (2012), evaluaron teniendo en cuenta la germinación de semillas, la emergencia de plántulas y la biomasa alcanzada en suelos con 1% y 2% de diesel, las plantas nativas *Spartina argentinensis*, *Paspalum atratum*, *Paspalum guenoarum* y *Melilotus albus* responden al diesel

en condiciones experimentales. Todos estos parámetros se ven afectados por la concentración de los contaminantes utilizados, pero las plantas son capaces de multiplicarse, por lo que demuestran que pueden utilizarse en proyectos de fitorremediación.

BUENDÍA et al. (2014), determinaron la volumen de la planta de girasol *Helianthus annuus* L, para crecer, absorber y almacenar metales pesados como el plomo en sus tejidos, se realizó un experimento en el Laboratorio de Fertilidad de la Universidad Agrícola La Molina durante 60 años. día. El diseño estadístico es completamente aleatorio y se repite 3 veces. Las muestras de suelo se tomaron del entorno de la refinería de aceite Maple Gas-Pucallpa, con reguladores: humus de lombriz, aserrín bolo blanca y perlita blanca y como planta fitoextractora, el girasol *Helianthus annuus* L. Los resultados y la prueba de significación estadística mostraron que el tratamiento T4 (suelo contaminado más humus y aserrín de bolaina) y el tratamiento T6 (suelo contaminado más humus y perlita) son ambos en términos de altura del tejido vegetal y peso seco. Hay mejor crecimiento. (Raíces, tallos y hojas). Además, en comparación con otros métodos de tratamiento, extraen y acumulan una gran cantidad de metales pesados de los hidrocarburos del petróleo (como el Pb). Esto confirma que la planta de girasol es un buen fitoextractor vegetal de plomo, y su contenido de plomo se encuentra entre 21.03 y 26.99 ppm.

MARÍN (2016), realizó con un extracto de cáscara de naranja (cítricos) para la bioestimulación para reemplazar el suelo contaminado por petróleo crudo, utilizó plantas de maíz (*Zea mays*) como indicador biológico de

los niveles de contaminación del suelo de la sabana. Tu tratamiento. Se procesaron tres muestras de suelo de sabana contaminado por crudo ligero, con una dilución de 1.3 y una dilución de extracto de piel de naranja al 5% en agua, con una dosis de 150 mL por kilogramo de suelo, y midiendo el contenido de aceite cada 7 días. Hasta 42 días. Luego, plantó semillas de maíz en muestras de suelo y midió el crecimiento del maíz cada 5 días durante 35 días consecutivos y lo comparó con semillas plantadas en muestras de suelo que no estaban contaminadas. Según una observación de contraste de rangos, el desarrollo de las plantas fue estadísticamente parejo en todas las muestras hasta los 20 días, luego se evidenciaron diferencias en relación al patrón

HERNÁNDEZ et al. 2017, dire a conocer que al estudiar los cambios en el contenido total de hidrocarburos de petróleo dentro de 120 días y los indicadores de actividad microbiana en el suelo (actividad deshidrogenasa, biomasa de carbono microbiano y respiración basal), esto se evaluó en dos métodos de tratamiento, uno de ellos fue Se trasplanta el suelo contaminado (trigo gigante), otro método de tratamiento es en el suelo contaminado sin plantas. La diferencia entre tratamientos es pequeña pero obvia Los resultados revelaron que en 120 días el contenido de hidrocarburos se comprimió en un 17.1 %, en el método con *M. maximus* y en 9.8 % en el tratamiento sin plantas. Las fracciones de los hidrocarburos que se redujeron fueron las de aromáticos y saturados para el tratamiento con *M. maximus* y la de aromáticos para el método sin plantas. El tratamiento con pastos mostró cambios en el período para todos los indicadores bioquímicos y microbiológicos evaluados, mientras que el tratamiento sin pastos sólo para la actividad de la enzima deshidrogenasa y el

coeficiente metabólico En tratamientos con plantas, la actividad microbiana es siempre mayor o similar, lo que puede deberse a la presencia de rizosfera que favorece la actividad.

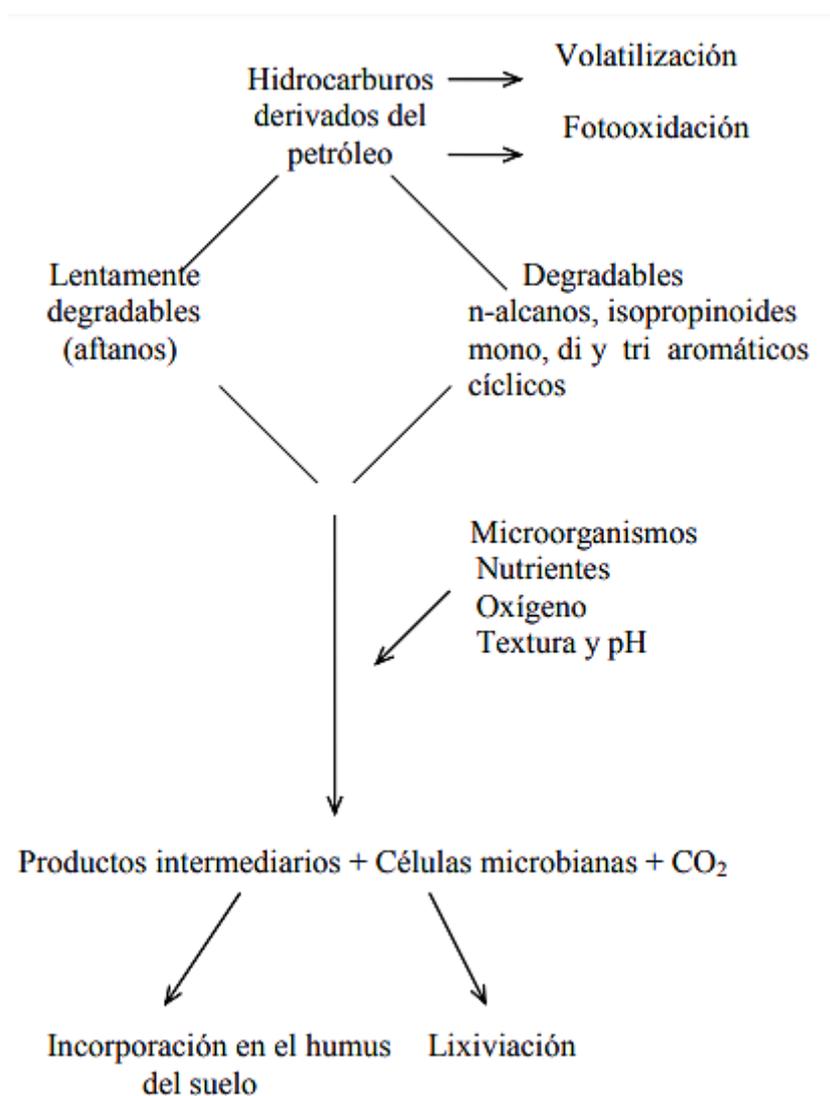
2.5. Hidrocarburos en los suelos

SERRANO *et al.* (2013), reportan que la contaminación de los hidrocarburos del petróleo afecta indirectamente a las plantas, produciendo minerales tóxicos que pueden ser absorbidos en el suelo, lo que conduce al deterioro de la estructura del suelo; pérdida de contenido de materia orgánica; y potasio, sodio, sulfato y ácido fosfórico en el suelo. Pérdida de minerales como sal y nitrato. Del mismo modo, el suelo sufre lixiviación y erosión.

MARTINEZ *et al.* (2001), Estableció que los efectos de los hidrocarburos en indudables propiedades mecánicas del suelo tal la cohesión, simultáneamente a los efectos en las propiedades físicas y químicas del suelo, ocurren cambios en las situaciones de abundancia, donde se observaron ampliaciones en nitrógeno y contenido de materia orgánica, entonces se observa mayor acción microbiológica en suelos saturados con hidrocarburos que en suelos independientes del mismo.

Las principales fuentes de contaminación por hidrocarburos fósiles en el suelo son los pozos de petróleo y su mantenimiento, la descarga de instalaciones de tratamiento y petroquímicas y la ruptura de oleoductos. En menor medida, los residuos municipales, los residuos transportados por medios atmosféricos y los residuos generados a partir de materia orgánica contaminan

el suelo. Como todos sabemos, en áreas donde llueve a menudo, los hidrocarburos derivados del petróleo permanecerán (TRUJILLO, 1995).



Fuente: HERNÁNDEZ et al. 2004.

Figura 1. Destino de los hidrocarburos en el suelo

MCGILL et al. (1981) al describir el destino de los hidrocarburos en el suelo que se muestra en la Figura 1, explicaron que los hidrocarburos primero se someten a dos procesos: volatilización y fotooxidación. Posteriormente, se someten a un proceso de descomposición biológica, en el que los

microorganismos, nutrientes, oxígeno, textura y pH se convertirán en la base. Como resultado del último proceso se obtienen productos intermedios, células microbianas y dióxido de carbono que ingresan a la atmósfera. Finalmente, los productos derivados de la descomposición biológica siguen dos enfoques: uno es incorporarlos al humus del suelo o lixiviarlos.

(BOSSERT y BARTHA, 1985), aseguran que ciertas fracciones de petróleo pueden funcionar como auxinas promotoras de la germinación.

2.6. Algunas especies como reductoras de la concentración de hidrocarburos en suelos.

Estas son ciertas plantas que logran progresar en suelos que contienen petróleo, pero no precisamente tienen suficientes capacidades de crecimiento y desarrollo, incluido el maíz *Zea mays* L. Por cuanto a las leguminosas, su aforo para fijar nitrógeno es su primordial ventaja. En estas se encuentran: pasto (*Agropyron smithi*), pasto (*Cynodon dactylon*), zanahoria (*Daucus carota*), trigo (*Triticum* sp.), girasol (*Heliantus annnus*), guaba (*Inga* sp), col (*Festuca arundinacea*), pasto grama (*Panicum coloratun*), maíz (*Zea mayz*), soya (*Glycine max*), (BUENDÍA, 2012).

Las plantas que desenvuelven en suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo logran comprimir la congregación de estos contaminantes a través tres mecanismos: degradación, contención o transferencia (FRICK et al., 1999).

AMAKIRI et al. (1984) analizaron que luego de 16 semanas de remojar semillas de maíz en aceite crudo, su germinación se retrasó y redujo en

un 10%. ESCALANTE (2000) también reportó la misma tendencia y señaló que a partir de una concentración de TPH del 10% se observaron efectos fitotóxicos durante el crecimiento.

ZEIGER Y TAIZ, 2007, menciona que este comportamiento puede deberse a las reservas de nutrientes contenidas en las semillas y a la acumulación activa de solutos, que generan un flujo osmótico y mezclan el agua en vacuolas, que pueden mantener el crecimiento vegetativo de las plantas.

2.7. Toxicidad

IRIS (1986), Daño al organismo relacionado con el importe o dosis de la sustancia dispuesta o absorbida en la vía de administración y su distribución en el tiempo (dosis únicas o repetidas), el tiempo necesario para causar dicho daño y la naturaleza del organismo afectado. Habilidad y otras condiciones de intervención.

La toxicidad medida mediante bioensayos, vinculado con los HAPS, BTEX y determinados metales, puede ser utilizada para establecer el riesgo, que es lo que debería definir el criterio de limpieza o remediación de un suelo (MCMILLEN et al 2001).

La toxicidad de un hidrocarburo es la consecuencia de una interacción complicada y variable entre las tipologías propias del crudo y del suelo, en general, suelos y desechos con hidrocarburos livianos presentan mayor toxicidad en comparación con crudos pesados y extra pesados o meteorizados (TARACHE, 2011).

GARCÍA et al. (2015) resume que la radícula y el hipocótilo son indicadores para estipular el establecimiento y progreso de las plantas. A discrepancia de las pruebas tradicionales de germinación de semillas, la apreciación del efecto sobre el alargamiento de la radícula e hipocótilo de las plántulas permite sopesar los efectos tóxicos de los compuestos solubles presentes en agrupaciones bajas de modo que no sean suficientes para inhibir la germinación. Sin embargo, pueden prevenir o inhibir completamente el proceso de elongación de la radícula o hipocótilo.

RIVERA y TRUJILLO (2004) obtienen que el efecto positivo del petróleo en la germinación de la semilla parece estar relacionado con el aumento de agua que ingresa al endospermo y la cubierta de la semilla, por lo que los cambios enzimáticos ocurren en un tiempo menor.

2.8. Extractor Soxhlet

La extracción de Soxhlet, es un ejemplo de extracción sólido – líquido, en la cual es un proceso consta de tres partes básicas y es en forma continua y automática; el matraz inferior que contiene el disolvente de extracción, la parte central o el propio extractor, donde se coloca la muestra sólida a extraer (donde se realiza la extracción) y la superior De refrigerante.

El solvente se calienta a ebullición, su vapor asciende por el tubo lateral del extractor y se condensa en el refrigerante superior, que cae sobre la muestra sólida en el cartucho de filtro cilíndrico (papel de filtro), acumulando y disolviendo (extrayendo) la solubilidad. El compuesto está adentro.

Cuando el nivel de solvente alcanza la parte superior del sifón (lado del extractor), todo el líquido contenido en el mismo caerá al matraz inferior, completando un ciclo o girando. A medida que continúa el calentamiento, solo se evapora el disolvente y las sustancias de la solución se acumulan en el matraz inferior. Este ciclo se repite varias veces para extraer los compuestos deseados, dependiendo de su cantidad y solubilidad en el extracto. (CUEVA *et al.*, 2011).

2.9. Bioensayo con Rábano (*Raphanus sativa* L)

Planta anual o bienal con raíces en forma de axón. Tallos de 20-100 cm, erectos, ligeramente ramificados, glabras o ligeramente basales en la base. Hay muy pocos espermatozoides individuales, parte superior de 25-70 mm, 8-15 mm de largo, cilíndricas, franjas longitudinalmente horizontales, con 2-10 semillas, terminando con un pico cónico de 10-15 mm. Estas semillas de 3-4 mm tienen un contorno truncado elíptico, que es de color verde cuando está inmaduro y se vuelve marrón cuando está madura, y está inmerso en el denso tejido esponjoso blanco que se desarrolla durante la maduración (PALMA *et al.* 2013).

Según GIACONI y ESCAFF (2004) describen las características germinativas de la semilla

- Semillas/gramo: 80
- Poder germinativo mínimo: 82 %
- Pureza: 99%
- Germinación: 4 – 10 días
- Longevidad: 3 a 4 años

La textura del suelo propicio para el cultivo de rábano son los francos y franco – arcillosos (MARTÍNEZ et al. 2003). Los importes adecuados de pH para este cultivo varían entre 6 y 7, consiguiendo desarrollar en superficies con pH de 4.3 y 8.3. Acepta una conductividad eléctrica de 1.2 dS/m sin alteraciones al rendimiento, y, a 2, 3.1, 5 y 8.9 dS/m el interés se reduce 10, 25, 50 y 100% (AYERS y WESTCOT, 1985).

Según ITIS (2020), clasifica taxonómicamente al cultivo de rabanito en:

Reino: Plantae

Subreino: Strptophyta

Superdivisión: Embryophyta

División: Tracherphyta

Subdivisión: Spermatophytina

Clase: Magnoliopsida

Superorden: Rosanae

Orden: Brassicales

Familia: Brassicaceae

Género: *Raphanus*

Especie: *Raphanus sativus* L.

2.10. Proceso de germinación de semillas

La germinación se refiere al avance de esas estructuras básicas del embrión, lo que indica la capacidad de la semilla para producir plantas normales en condiciones favorables (MORENO, 1984).

De esta manera, según DORIA (2010), La germinación es la etapa de llegada y desarrollo de las plántulas, la aparición de estructuras importantes indica si puede desarrollarse más en plantas adecuadas en condiciones favorables en el campo. La germinación incluye aquellos eventos que comienzan desde el remojo de semillas secas con agua hasta el final del alargamiento del hipocótilo. El proceso termina cuando la radícula penetra y atraviesa la estructura que rodea al embrión, lo que a menudo se denomina crecimiento perceptible (HERRERA *et al.*, 2006).

La germinación es el proceso que desencadena la rehidratación de las semillas y el comienzo de la expansión de la radícula. El desarrollo y la germinación de las semillas son etapas fisiológicas muy diferentes en el ciclo de vida de las plantas. La germinación eventualmente conduce al desarrollo de la radícula y su extensión a los tejidos adyacentes. Los factores ambientales directamente involucrados en el proceso de germinación son la temperatura, la luz, la utilización de gases y nutrientes. Promueve ligeramente la germinación, pero no es absolutamente necesario para la mayoría de las semillas. (CARBALLO *et al.*, 2015).

2.11. Bioensayos toxicológicos

Los bioensayos de toxicidad es una prueba que se utiliza para identificar y evaluar el impacto de los contaminantes en los grupos biológicos. En los bioensayos, se utilizan tejidos vivos, organismos o grupos de organismos como reactivos para evaluar los efectos de cualquier sustancia fisiológicamente activa. Básicamente, estas pruebas implican exponer ciertos organismos a una

cierta concentración de veneno durante un cierto período de tiempo. Estos organismos deben estar sanos, adaptarse a las condiciones de prueba de antemano y mantenerse entornos ambientales constantes. Además, hay grupos de grupos de control (que no están expuestos al tóxico). En seguida se evalúan y registran los efectos biológicos observados en cada uno de los grupos control y tratados y, posteriormente, se desarrolla un estudio estadístico de los datos conseguidos (BAUDO, 1987)

Las pruebas de toxicidad pueden establecer límites permisibles para diferentes contaminantes, evaluar el impacto de la mezcla en el ambiente que recibe los contaminantes y comparar la sensibilidad de una o más especies a diferentes toxinas o la misma toxina a diferentes ambientes. Es muy útil para la investigación primordial sobre fenómenos tóxicos, estableciendo estándares o modelos para la calidad de las aguas superficiales o residuales, evaluando los impactos ambientales y los peligros ecológicos y monitoreando las condiciones de las masas de agua (BUIKEMA et al. 1982).

Estas pruebas pueden ser en el laboratorio (el número de especies es reducido y bajo condiciones estandarizadas que replican solo parcialmente las situaciones naturales en el ambiente) o en el campo (el "caparazón" es afectado por las condiciones ambientales). A través de la prueba de toxicidad se estudia la dosis o concentración, el efecto y la relación dosis o concentración-respuesta (Efecto: los cambios biológicos se pueden evaluar por intensidad o severidad; efecto: la proporción de población expuesta que muestra un cierto efecto) (BUIKEMA et al. 1982).

Como también PENTREATH et al. (2015) Los bioensayos con plantas son considerados, de forma ascendente, para el diagnóstico ecotoxicológico, debido a que constituyen una óptima herramienta en la evaluación del riesgo ambiental. Representan una metodología ventajosa al brindar investigación acerca de alguna sustancia que resalte tóxica en el medio, es decir, algún agente que pueda afectar negativamente a los sistemas biológicos, destruir su estructura o función, o causar la muerte.

2.12. Tipos de ensayos

Según CASTILLO (2004), indica que una prueba de toxicidad típica implica reactivos o irritantes (por ejemplo, pesticidas, metales pesados o muestras ambientales con contaminantes químicos) que son adecuados para uno o más organismos (por ejemplo, cultivos bacterianos o algas, animales o Plantas), solemos llamarlo un tema, sobre el que se evalúan algunas respuestas preseleccionadas. El tamaño del estímulo o la dosis se puede medir como peso, volumen o concentración. Para analizar la relación cuantitativa entre dosis y respuesta, se debe buscar un modelo matemático que describa esta relación. Generalmente, los modelos matemáticos se pueden dividir en:

- **Mecanístico:** es un modelo que intenta describir un proceso basándose en postulados acerca de la mecánica de dicho proceso.
- **Empírico o descriptivo:** Es un modelo que intenta describir cuantitativamente el modo de observación sin depender del proceso subyacente o mecánica del proceso.

- **Determinístico o no estocástico:** es un modelo en el que, dados ciertos datos, las predicciones obtenidas del modelo son siempre del mismo valor.
- **Probabilístico o estocástico:** se trata de un modelo en el que, dados ciertos datos, las predicciones obtenidas del modelo son valores variables.

2.13. Respuestas toxicológicas

Según CASTILLO (2004), la respuesta toxicológica del sujeto se valora mediante la cuantificación final de determinadas características (peso corporal, peso del hígado, frecuencia cardíaca, etc.), sus cambios (aumento de peso, disminución de la presión arterial) o la posibilidad de que ocurra o no de un determinado fenómeno (muerte, inhibición del crecimiento, etcétera).

2.14. Umbral de sensibilidad

Los principales factores externos que modifican la estructura de la semilla y las condiciones internas son el tiempo de hidratación, la luz, la temperatura y el tiempo de raspado (JARA et al. 2006)

Se define como la capacidad de los cultivos para tolerar ciertos contaminantes del suelo sin afectar negativamente su desarrollo y / o producción. (GREENWAY y MUNNS, 1980). Otra estrategia adoptada por las plantas es la acumulación de contaminantes en las vacuolas celulares, controlando así la concentración de contaminantes en el citosol y manteniendo una alta relación K^+ / Na^+ en las células. (GLENN, 1999).

2.15. Efectos toxicológicos

Los efectos tóxicos o reacciones toxicológicas a evaluar pueden ser: mortalidad, inmovilidad, inhibición del crecimiento poblacional, cambios de comportamiento, etc. Determine diferentes variables, como la concentración letal 50 (CL50), que es la concentración letal del 50% de los individuos expuestos. Las condiciones de cultivo y prueba deben estar altamente estandarizadas para poder comparar los resultados. (BUIKEMA *et al.* 1982).

2.16. Parámetros toxicológicos

2.16.1. Nivel observado de sin efectos adversos (NOAEL)

NOAEL (por sus siglas en inglés: No Observed Adverse Effect Level) Es la dosis más alta de una sustancia que no ha manifestado en las pruebas poseer efectos perjudiciales para los seres vivos (CASTRO, 2013).

2.16.2. Nivel más bajo de efectos adversos observados (LOAEL)

LOAEL (por sus siglas en inglés: Lowest Observed Adverse Effect Level), Es la concentración o cantidad mínima de una sustancia que causa un cambio observable y distinguible de un control apropiado (CASTRO, 2013).

III. MATERIALES Y METODOS

3.1. Lugar de ejecución

La presente tesis se realizó en el laboratorio de Tesis de la facultad de ciencias, en la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM), situado en La Molina - Lima.

3.1.1. Ubicación geográfica

El proyecto de tesis se llevó a cabo, para la fase experimental en el laboratorio de tesis de la Universidad Nacional Agraria La Molina.

18 L : 8 663 625 E

UTM : 287 968 N

Altitud : 243.7 m.s.n.m.

3.2.2. Muestra

- Suelo contaminado por hidrocarburos traído de Maestranza (cochera de carros) de la Universidad Nacional Agraria La Molina.

3.2.3. Organismo de prueba

- 10 paquetes de semillas de rábano (*Raphanus sativus* L.)

3.2.4. Reactivos

- 50g de sulfato de sodio
- 700 mL de diclorometano

3.2.5. Equipos

- Cámara oscura de temperatura controlada elaborada
- Balanza analítica marca, Y GH-200.
- pH metro marca, Orión; modelo, 420A; referencia, UPV-053.
- Termómetro marca, Lanceta HG.

3.2.6. Software

Software estadístico: Excel 2013, Minitab 18 e InfoStat.

3.3. Metodología

3.3.1. Fase inicial

Se recolectó organismos de prueba rábano (*Raphanus sativus* L.) debidamente certificada para realizar la presente tesis. Seguimiento de muestra de suelo contaminado por hidrocarburo con el método utilizado por el ministerio del

ambiente en Guía para muestro de suelos, marco del Decreto Supremo N°002-2013- MINAM (ECA) para suelos; extraído de Maestranza (cochera de carros) de la Universidad Nacional Agraria La Molina. Después se llevó al laboratorio de Tesis para ser analizar sus características físicos y químicos.

3.3.2. Fase de laboratorio

3.3.2.1. Extractos de suelo

Para extraer los contaminantes orgánicos en superficies y sedimentos se ejecutó procediendo de distintas técnicas formulados por la USEPA (Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos). El proceso que se maneja es la extracción por el método de Soxhlet.

En una bandeja de vidrio o aluminio se colocó 40 g de suelo para secarlo durante 72 horas a temperatura ambiente (25-30 °C); no se expone a la luz solar. Posteriormente se trituro hasta obtener partículas finas y uniformes para mejorar la extracción del hidrocarburo. Finalmente, se colocó en un frasco limpio y seco.

El método adecuado para hidrocarburos es el de Soxhlet que se utiliza para extraer suelos mediante la extracción de diclorometano, Para ello se mezclaron de 10 g de suelo seco y triturado. Se le adiciono sulfato de sodio anhidro en relación 1:1 suelo: sulfato, y se depositó en un papel filtro en forma de cartucho y este se colocó dentro de la columna de extracción del Soxhlet usando la metodología de USEPA.

Se adicionó 140 mL de diclorometano en el matraz balón donde las parrillas se mantuvieron a 55 °C. A partir del primer reflujo, se calculó el tiempo para lograr un total de 6 reflujo por h durante 9 h.

3.3.2.2. Procedimiento para el desarrollo de prueba para la semilla de rábano.

a. Preparación de las semillas

Se desinfectó las semillas, sumergiéndolos en alcohol por un periodo de 15 minutos, en seguida lo enjuagaron con agua destilada e instalaron en un recipiente (USEPA, 1996).

b. Acondicionamiento y evaluación de los frascos

Se colocaron un disco de papel filtro en cada caja Petri, a continuación se reboso el papel filtro con 3 mL de la solución impidiendo que se creen bolsas de aire. Repitiendo este paso para cada una de las 7 concentraciones preparadas con el extracto de suelo para con el apoyo de un sujetador, se colocó diligentemente 15 semillas, apartando suficiente espacio entre las semillas para que las raíces se extiendan. En el caso del control negativo, sólo se añadió 3 mL de agua destilada al papel filtro y se depositó las 15 semillas

Las placas de Petri se resguardaron de la luz rápidamente a continuación de colocarlas las semillas dentro a una temperatura de 22 ± 2 °C Realizando lo mismo para las repeticiones de cada disolución experimentada.

Al observar por lo menos el 65 % de las semillas en el control negativo germinaron y la longitud de sus radículas fue de al menos 5 mm, se evaluó las características de respuesta en su totalidad de los tratamientos.

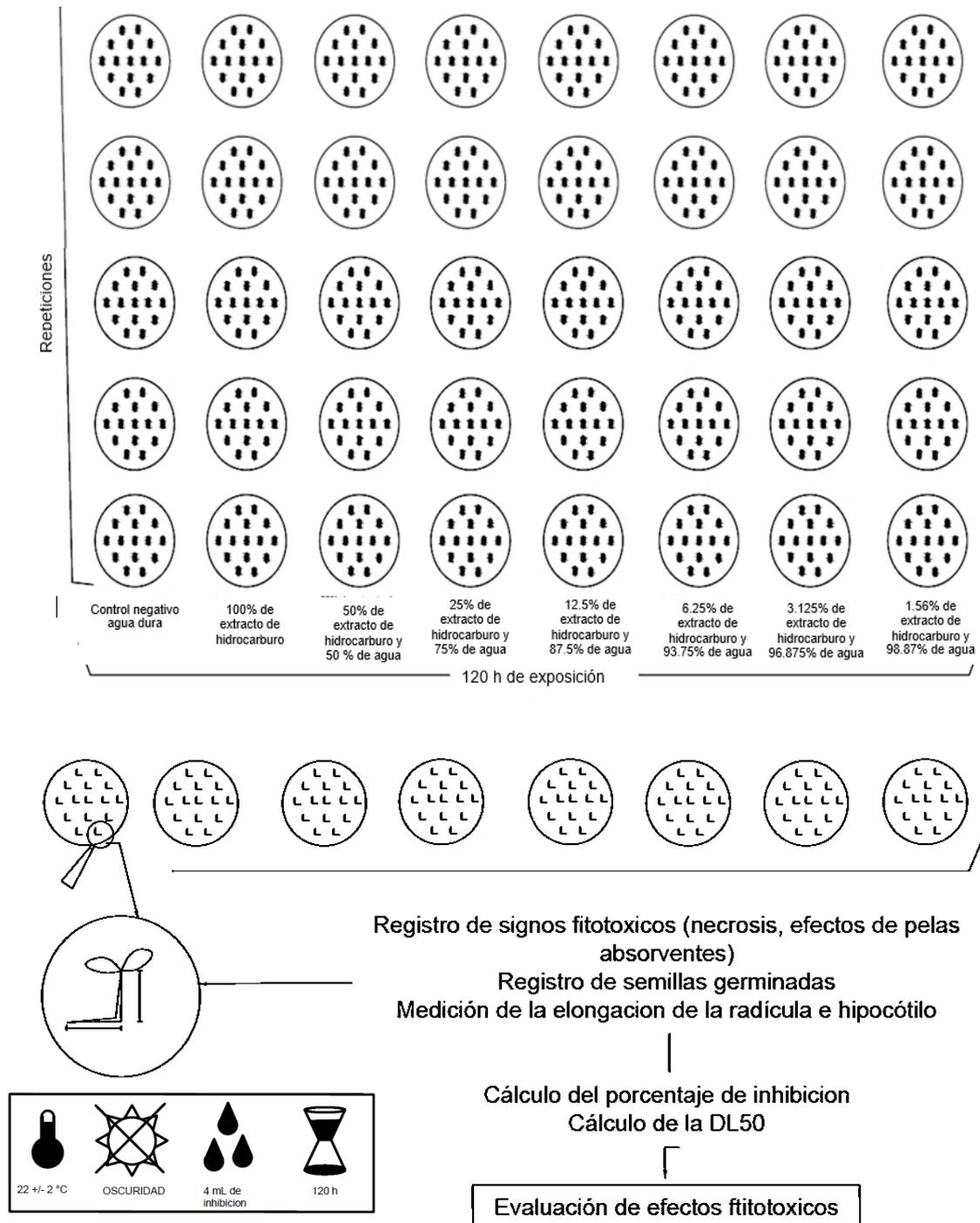
Una vez finalizado el período de exposición, se cuantificó el resultado del crecimiento y en la elongación de la radícula y del hipocótilo, luego, se sacó las plántulas de las placas de Petri. Usando una regla se mide la elevación de las plántulas; extensión del hipocótilo y la extensión de la radícula. Para hallar la fabricación de biomasa, en una balanza analítica se pesaron las plántulas, para lo cual anticipadamente se colocó en cajas de Petri y se colocaron en una estufa a 75 °C durante 20 a 24 horas para excluir el agua

c. Acondicionamiento y evaluación de sembrado de semillas en placas Petri.

Para los ensayos que se evaluaron el suelo problema a distintas concentraciones, se mezcló con suelo similar al del sitio contaminado para obtener diluciones de 0,1.5, 3.125,6.25, 12.5, 25, 50, 75 y 100 %. Para ello se pesaron 30 g de suelo de las diferentes diluciones y se colocaron en los frascos con el suelo contaminado y el suelo sin contaminar sin realizar mezclas. Se realizó por cinco por cada tratamiento.

Para los ensayos, se depositó 15 semillas en las placas de vidrio. Se prepararon 5 réplicas por cada dilución. También se preparó el control negativo con arena o suelo no contaminado (con aproximadamente un 3 % de materia orgánica) y agua destilada. Posteriormente los frascos se incuban en la cámara oscura a una temperatura de 22 ± 2 °C hasta que se observa un 65 % de

germinación de las semillas del control negativo. Fue necesario mantener durante la prueba un contenido de humedad del suelo de $70 \pm 5 \%$. En la Figura 3 y Cuadro 1 se sintetiza el procedimiento de la prueba de toxicidad con semillas.



Fuente: USEPA, 1989.

Figura 3. Representación general de la metodología de ensayo de toxicidad con semillas.

Cuadro 1. Resumen de las ambientes recomendadas para los ensayos de toxicidad con rábano en placas Petri.

Parámetro	Descripción
1 Tipo de ensayo	Estático
2 Temperatura	22± 2 °C
3 Calidad de luz	Oscuridad
4 Volumen de solución de prueba	4 mL
5 Agua de dilución	Agua dura reconstituida
6 Número de semillas por réplica	Quince
7 Número de réplicas	Cinco
8 Duración de la prueba	120 h
9 Efecto medido	Inhibición en elongación de la radícula e hipocótilo. Inhibición en la germinación
10 Resultado final	CE ₅₀ o CI ₅₀ 0% inhibición

11	Aceptabilidad de los resultados	Germinación > 90%
		Control negativo de acuerdo con los valores: admitidos en las cartas control

Fuente: (USEPA, 1989)

d. Acondicionamiento y evaluación de sembrado de semillas de rábano en frascos

Para las pruebas se evaluaron múltiples concentraciones del suelo problema, este se mezcló con suelo similar al del sitio contaminado para obtener concentraciones de 0,1.5, 3.125,6.25, 12.5, 25, 50, 75 y 100 %. A partir de 1 kg de suelo contaminado con hidrocarburo, se tomó de Maestranza (cochera de carros de la UNALM), se colocó 100 gr. en cada envase de plástico (5 repeticiones de cada uno), esto consistió de esta forma: tres capas, una superior e inferior de grava de 2 mm previamente tamizada y al centro el suelo contaminado con hidrocarburo, en donde se colocó 15 semillas de rábano (*Raphanus sativus* L.); finalmente estos test fueron puestos durante 10 días (8 horas de luz y 16 de sombra) en la cámara de germinación y se mantuvo en observación.

Cuadro 2. Síntesis de las condiciones recomendadas para los ensayos de toxicidad con rábano en macetas.

Parámetro	Descripción
1 Tipo de prueba	Estático
2 Temperatura	22± 2 °C
3 Disposición de luz	Luz/Oscuridad
4 Peso de suelo de prueba	100 g
5 Agua de disolución	Agua dura reconstituida
6 Número de semillas por réplica	Quince
7 Número de réplicas	Cinco
8 Duración de la prueba	7 a 10 días
9 Efecto moderado	Inhibición en elongación de la radícula e hipocótilo. Inhibición en la germinación
10 Resultado final	CE ₅₀ o CI ₅₀ 0% inhibición
11 Aceptabilidad de los resultados	Germinación > 90% Control negativo de acuerdo con los valores: admitidos en las cartas control

- Fuente: (USEPA, 1989)

En la Figura 4 resumen del procedimiento del ensayo de toxicidad en macetas.



Figura 4. Se sintetiza el procedimiento del ensayo de toxicidad en macetas.

3.3.3. Fase de gabinete

- Determinación de los parámetros toxicológicos para el rábano

Las siguientes fórmulas se emplearan en el experimento:

1. Para determinar el porcentaje de germinación

$$\%PG = \frac{N^{\circ} sg}{N^{\circ} st} \times 100 \dots (1)$$

Donde:

%PG: Porcentaje de germinación

N° sg: Número de semillas germinadas

N° st: Número de semilla total

2. Para determinar la energía Germinativo (EG)

En este caso interviene el número de semillas y el tiempo. Es buena cuando las 2/3 partes de las semillas germinan en 1/3 del total de días que dura la germinación.

$$EG = \frac{2}{3} \times \text{total de semillas germinadas} \dots (2)$$

Donde:

EG: Energía germinativo

2/3: si ha germinando mayor a esta

3. Para determinar el retraso germinativo

$$RGt = T_{GM} - T_{GC} \dots (3)$$

Donde:

RGt: Retraso germinativo

T_{GM} : Tiempo de germinación de la muestra

T_{GC} : Tiempo de germinación del control

4. Para determinar la biomasa fresca

$$Bm_f = \frac{W_{tf}}{w_{cf}} \times 100 \dots (4)$$

Donde:

Bmf: Biomasa muestra fresca

Wtf: Peso fresco promedio del tratamiento control

Wcf: Peso fresco promedio del tratamiento en evaluación

e. Para determinar la biomasa seca

$$Bm_s = \frac{W_{ts}}{w_{cs}} \times 100 \dots (5)$$

Donde:

Bms: Biomasa seca

Wts: Peso seco promedio del tratamiento control

Wcs: Peso seco promedio del tratamiento en evaluación

f. Para determinar el porcentaje de humedad

$$\%H = \frac{W_{tf} - W_{ts}}{W_{tf}} \times 100 \dots (6)$$

Donde:

%H: Porcentaje de humedad

Wtf: Peso fresco promedio del tratamiento en evaluación

Wts: Peso seco promedio del tratamiento en evaluación

3.3.4. Análisis estadístico del trabajo de investigación

3.3.4.1. Método de investigación

El método de investigación es cuantitativo.

Es aquella en la que se recopilan y examinan datos cuantitativos de las variables. Analiza la agrupación o relación entre variables cuantificadas. Cada etapa es anterior a la siguiente, y no podemos "saltarnos o evadirnos." El orden es estricto, aunque ciertamente podemos redefinir una determinada etapa. Una parte de un concepto es limitada. Una vez definido, puede trazar metas y preguntas de investigación, revisar la literatura y establecer un marco o punto de vista teórico. Establecer hipótesis y determinar variables a partir de estas preguntas; hacer un plan de prueba (diseño); las variables se calculan en un contexto dado; se indagán los cálculos obtenidos (generalmente usando técnicas estadísticas) y se constituyen una sucesión de conclusiones con simetría a la hipótesis (HERNÁNDEZ *et al.*, 2010).

3.3.4.2. Tipo de investigación

El tipo de investigación es experimental. El experimento observa su influencia sobre otras variables (variables dependientes) a través del control, estimulación, influencia o intervención (llamadas variables independientes). Es decir, cuando los investigadores intenten determinar la posible influencia de la causa de la manipulación, utilizarán el diseño experimental. (HERNÁNDEZ *et al.*, 2010).

3.3.4.3. Variables de investigación

Por ser una investigación experimental existió manipulación de variables. Dado que los datos son resultados de medición, se representan mediante números (cantidad) y se verifican mediante métodos estadísticos (HERNÁNDEZ *et al.*, 2010).

V. Independiente: Extracto de hidrocarburo.

V. Dependiente: Respuesta toxicológica de semillas de rábano.

3.3.4.4. Diseño de investigación

a. Diseño con post prueba únicamente y grupo de control

El diseño incluye dos o más grupos, donde además del grupo de control se utilizan dos o más tratamientos experimentales. Al final del período experimental, mida las variables dependientes en este estudio para todos los grupos (HERNÁNDEZ *et al.*, 2010).

Para el presente trabajo de investigación se usará 7 tratamientos experimentales y una muestra testigo o control, para realizar esto, se utilizará placas Petri y macetas experimentales con diferentes capacidades.

3.3.4.5. Diseño estadístico para el rábano

El diseño estadístico que se utilizó en el Diseño Completamente al Azar (DCA) con 5 repeticiones y un tratamiento control o control negativo.

Las particularidades evaluadas de cada uno de los procedimientos serán sometidas al análisis de variancia y pruebas de significación estadística Duncan a nivel de $\alpha = 0.05$ de significación.

El modelo lineal aditivo es el siguiente:

$$Y_{ij} = u + T_i + E_{ij} \dots (1)$$

Donde:

Y_{ij} =Es la respuesta obtenida en tres repeticiones donde se aplica 8 tratamiento o concentración de rábano con extracto de hidrocarburo.

U =Es el efecto toxico de hidrocarburos.

T_i =Efecto en cada concentración para el rábano.

E_{ij} =Efecto aleatorio del error experimental en las tres repeticiones, de los 8 tratamiento de rábano.

Para:

i : 1,2,3, ...,8 concentraciones de extracto de hidrocarburo.

j : 1,2,3,4,5 repeticiones.

Cuadro 3. Esquema del análisis de variancia

Fuente de variabilidad	Grados de libertad	
Tratamientos	(t-1)	7
Error experimental	T(r-1)	32
Total	(rt-1)	39

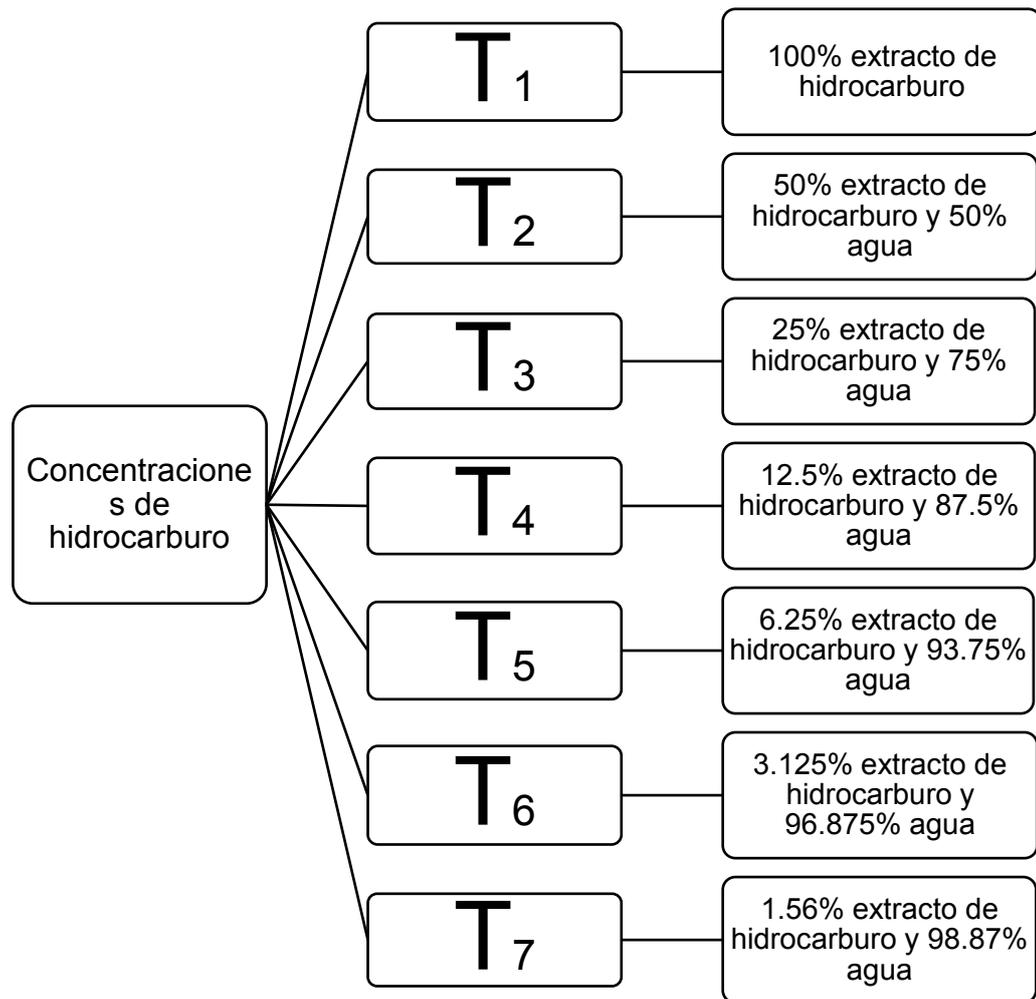
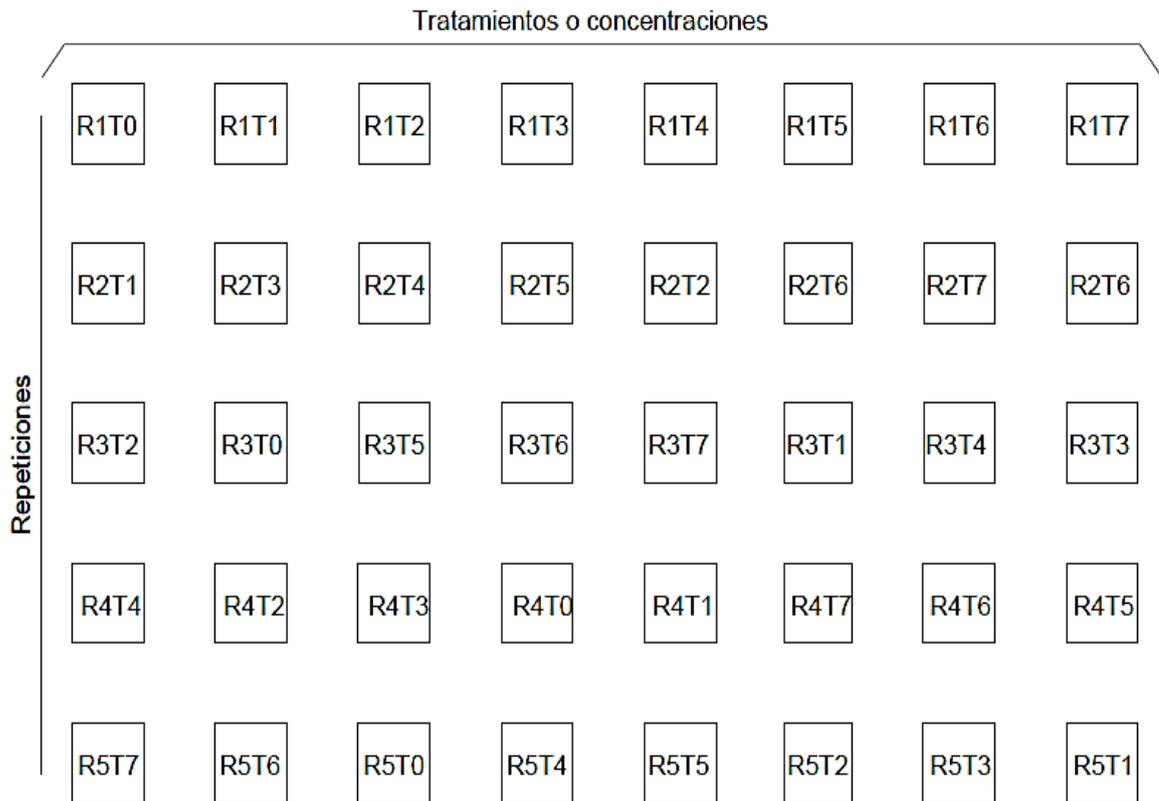


Figura 5. Concentraciones de hidrocarburo y agua para cada tratamiento.



R: repetición, T: tratamiento

Figura 6. Diseño estadístico para rábano (*Raphanus sativus* L.)

3.3.4.6. Análisis estadístico

Se distribuirán las variables estadísticas y tratamientos con forme al diseño experimental usando el modelo estadístico completamente al azar (DCA) con cinco duplicaciones con el programa InfoStat/E para un nivel de significación del 5%.

Cuadro 4. Análisis del ANVA

Fuentes de Variación	Suma de cuadrados	Grados libertad	Cuadrados medios	F_{Exp.}
Entre Grupos	SCT _r	l - 1	CMT _r	$\frac{CMT_r}{CMR}$
Fuera de grupos	SCR	n - l	CMR	
Total	SCT	n - 1	CMT	

Por formula:

$$SCT = SCT_r + SCR... (2)$$

Donde:

1) SCT: Suma de cuadrados total

2) SCT_r: Suma de cuadrados entre tratamientos

3) SCR: Suma de cuadrados dentro de los tratamientos o residual.

1') CMT: Cuadrado medio total: $CMT = SCT / (N - 1)$

2') CMT_r: Cuadrado medio entre tratamientos: $CMT_r = SCT_r / (l - 1)$

3') CMR: Cuadrado medio residual: $CMR = SCR / (N - l)$

- Prueba de múltiples rangos de diferencia francamente significativa de Duncan

Se empleará la diferencia francamente significativa de Duncan con la finalidad de establecer para tratamientos que existen diferencias significativas, para un nivel de significación del 5%, utilizando el programa Infostat/E.

3.3.5. Para determinar el umbral de sensibilidad en diferentes concentraciones de hidrocarburo para el rábano (*Raphanus sativus* L.) en placa y en maceta.

Después de realizar la prueba se procederá a realizar una tabla comparativa donde veremos las concentraciones y la respuesta o efectos que ocurren para cada caso, como a continuación describiremos en el cuadro 6.

Cuadro 5. Concentraciones y respuestas o efectos.

Tratamiento	Concentración de hidrocarburo (%)	Respuestas o efectos
T ₀	-	
T ₁	1.50	
T ₂	3.125	Número de especies
T ₃	6.25	muertos o con cambios
T ₄	12.50	físicos a causa del
T ₅	25.0	contaminante
T ₆	50.0	
T ₇	100	

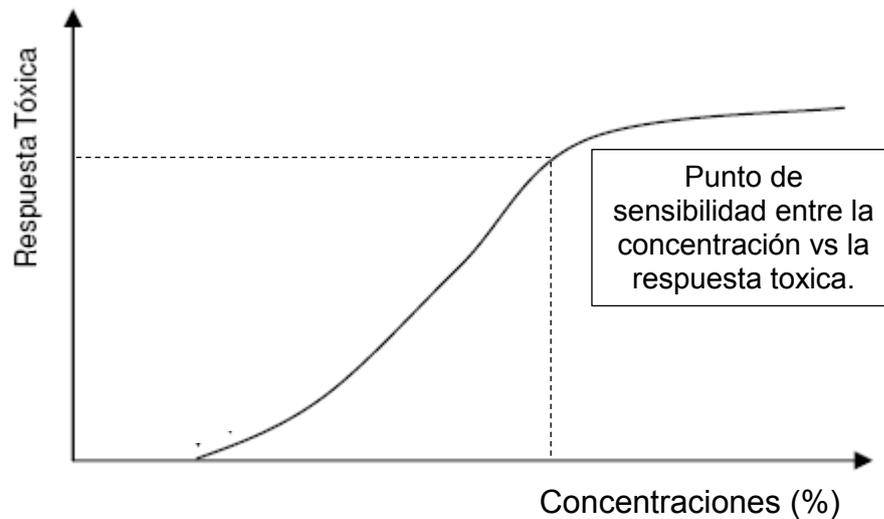


Figura 7. Umbral de sensibilidad concentración vs la respuesta o efecto.

3.3.6. Determinación de la concentración de hidrocarburo aplicando la Dosis letal media DL50 para el rábano (*Raphanus sativus* L.).

Se usará la prueba Probit Con los valores conseguidos, manejando el programa Infostat/E. El primordial objetivo de este tipo de análisis será analizar la concentración que se necesite para paralizar al 50% de organismos de la población.

a. Método Probit

El análisis Probit se usa para calcular los CL50/CE50/DL50 (con o sin ajuste). En un experimento típico de ensayos de toxicidad aguda se tiene el siguiente contexto:

- Concentración de la sustancia o dosis (d).
- Número de organismos (n).

- Número de población muerto o afectado (r).
- Porcentaje de consecuencia (p)

$$p = \left(\frac{r}{n}\right) \times 100 \dots (1)$$

Consecutivamente, Utilice la tabla Probit para convertir p (porcentaje del efecto) en unidades probit (encuentre el valor z correspondiente a la probabilidad acumulada igual a p en la tabla de distribución normal y luego agregue cinco unidades) y obtenga la distribución de puntos bivariada en un Sistema de tipo lineal, procesado según análisis de regresión típico. Vale la pena enfatizar que Probit es una conversión de la tasa de influencia (p), y la ecuación generada es:

$$y = a + bx \dots (2)$$

Donde:

y (expresado en unidad Probit) = z+5

z= Variable normal estándar = z₀ tal que la Prob (z<z₀) =p

a y b son los estimadores de los parámetros de la recta de regresión

Así, cuando p =50% entonces y 5, por lo tanto:

X₅ = log₁₀ DL₅₀ entonces DL₅₀ = 10^{x₅}

Para el análisis, se utiliza un software como programa Infostat/E.

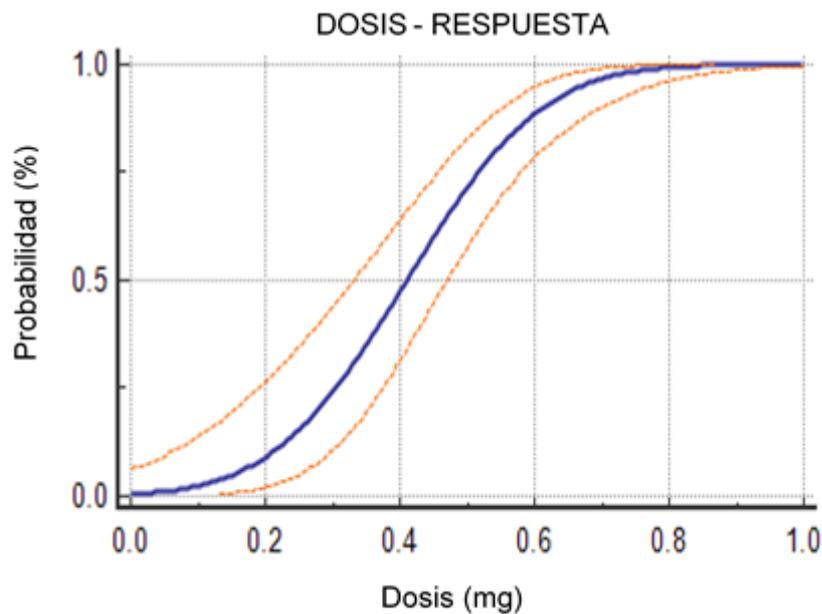


Figura 8. Análisis de Probit con el programa Excel.

3.3.7. Determinar los parámetros toxicológicos, NOAEL Y LOAEL para el rábano (*Raphanus sativus*) mediante bioensayos de laboratorio

Se evaluará el parámetro NOAEL Y LOAEL con la prueba de rango múltiple de Dunnett, para ello utilizamos la siguiente ecuación.

$$D_{\alpha} = d_{\alpha}(a-1, f) \sqrt{\frac{2MSE}{n}} \dots (1)$$

Donde:

n: Tamaño de la muestra

a: Tratamientos

f: Grados Libertad del error

MSE: Cuadrado medio del error

d_{α} : Constante de la prueba de Dunnett

D_{α} : Valor teórico estadístico de la prueba

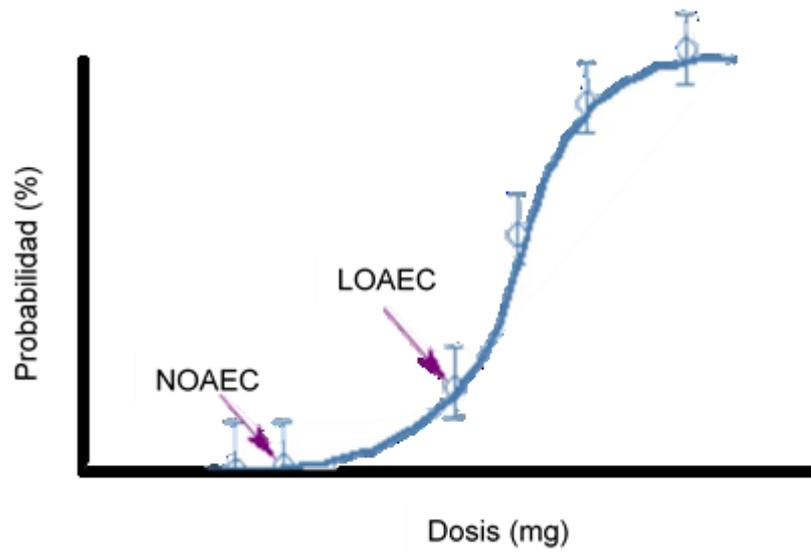


Figura 9. Curva para determinar el NOAEL y LOAEC.

IV. RESULTADOS

4.1. Respuesta toxicológica de semillas de rábano

En el Cuadro 6 se observa la respuesta toxicológica que sufren las semillas de rábano en placas de vidrio al utilizar el hidrocarburo a distintos concentraciones para ello se promedió cada tratamiento ejecutado para cada muestras con cinco repeticiones donde se puede estimar que el tratamiento T₇ presenta mayor inhibición mientras que para los tratamientos T₄, T₃ y T₁ presenta menor cambio al aplicar la dosis de hidrocarburo.

Cuadro 6. Respuesta toxicológica de las semillas de rábano.

Tratamiento	Concentraciones (%)	Crecimiento total de la semilla	Respuesta toxicológica de las semillas
T ₇	100	9.17	49.95
T ₆	50	11.78	35.70
T ₅	25	14.39	21.45
T ₄	12.5	16.90	7.75
T ₃	6.25	18.08	1.31
T ₂	3.125	16.21	11.52
T ₁	1.5	18.10	1.20
T ₀	0	18.32	100.00

En la figura 10 se muestra la respuesta toxicológica del desarrollo de la semilla para cada tratamiento con cinco repeticiones cada una, en este caso el análisis de regresión lineal indica que la variabilidad de los tratamientos se encuentra en el 0.92, y para los tratamientos T₄, T₃ y T₁ no presenta mayor variabilidad a diferencia del T₂ que presenta distanciamientos a los demás.

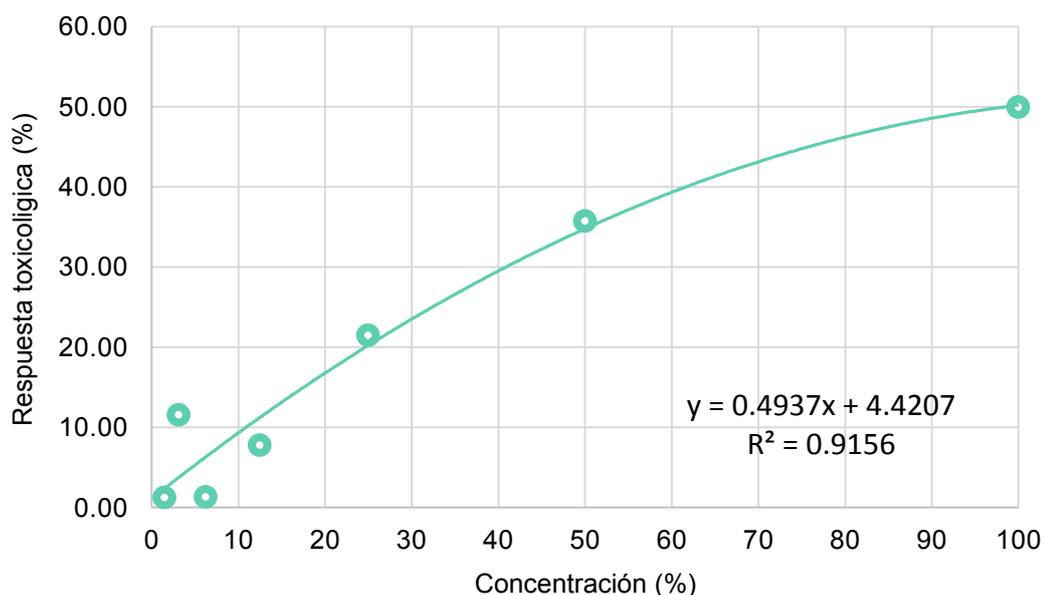


Figura 10. Respuesta toxicológica la semilla de rábano en placas de vidrio.

En el cuadro 7 se observa la respuesta toxicológica que sufren las semillas de rábano en macetas al aplicar el hidrocarburo a distintas concentraciones para ello se promedió las cinco repeticiones de cada tratamiento donde se puede apreciar que el tratamiento T₇ presenta mayor inhibición mientras que para los tratamientos T₁, T₂ y T₃ no presenta mayor significancia.

Cuadro 7. Respuesta toxicológica de las semillas de rábano en macetas.

Tratamiento	Concentraciones	Crecimiento total de la semilla	Respuesta toxicológica de las semillas
T ₇	100	8.75	63.78
T ₆	50	12.01	50.29
T ₅	25	19.04	21.19
T ₄	12.5	21.78	9.85
T ₃	6.25	23.34	3.39
T ₂	3.125	23.55	2.52
T ₁	1.5	23.87	1.20
T ₀	0	24.16	100.00

En la figura 11 se muestra la respuesta toxicológica del crecimiento de la semilla en macetas para cada tratamiento con cinco repeticiones cada una, donde se distingue que a mayor concentración es mayor la respuesta toxicológica, en este caso perturba el desarrollo de las semillas, también el análisis de regresión lineal indica que la variabilidad de los tratamientos se encuentra en el 0.93.

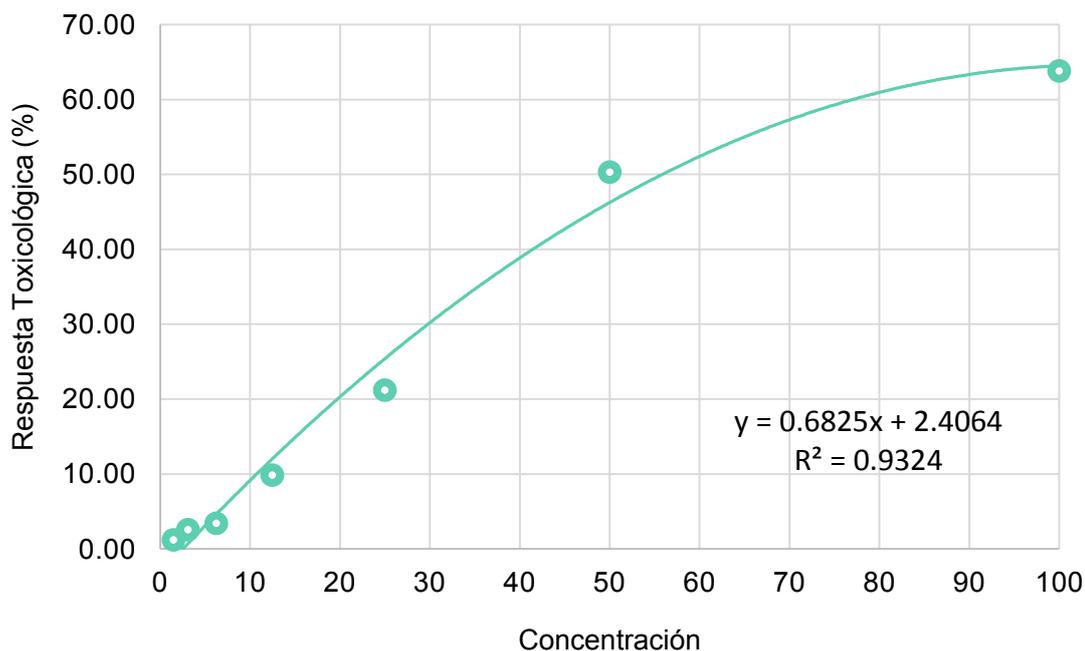


Figura 11. Respuesta toxicológica la semilla de rábano en macetas.

4.1.1. Análisis estadístico

4.1.1.1. Longitud del hipocotílo y radícula en las semillas de rábanos.

Del cuadro 8, nos muestra la variable longitud de los hipocotílo en siete tratamientos y un tratamiento control, por efecto del porcentaje de hidrocarburo en semillas de rábano en placas de vidrio durante 5 días, donde muestra que difieren desde 4.82 cm a 9.50 cm, donde indica que a medida que incrementa la concentración de hidrocarburo, el crecimiento del hipocotílo se oprime.

Cuadro 8. Longitud del hipocotílo en las semillas de rábanos en placas de vidrio, sometido a diferentes concentraciones.

Trat.	Conc.	Medias	N	D.E.	E.E.	Prueba Duncan ($\alpha=0.05$)
T ₇	100	9.17	5	0.42	0.43	A
T ₆	50	11.77	5	2.22	0.43	B
T ₅	25	14.40	5	0.66	0.43	C
T ₂	6.25	16.21	5	0.99	0.43	D
T ₄	3.125	16.90	5	0.44	0.43	D E
T ₃	12.5	18.08	5	0.62	0.43	E F
T ₁	0	18.10	5	0.46	0.43	E F
T ₀	1.5	18.33	5	0.46	0.43	F

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($\alpha > 0.05$)

En el promedio de longitud de hipocotílo para el rábano en placas en el cuadro muestra que la diferencia estadística significativa (Duncan $\alpha = 0.05$), existe que para los tratamientos T₅, T₆ y T₇, existe una diferencia de medias que son significativas en comparación de los otros tratamientos de menor diferencia estadística significativa.

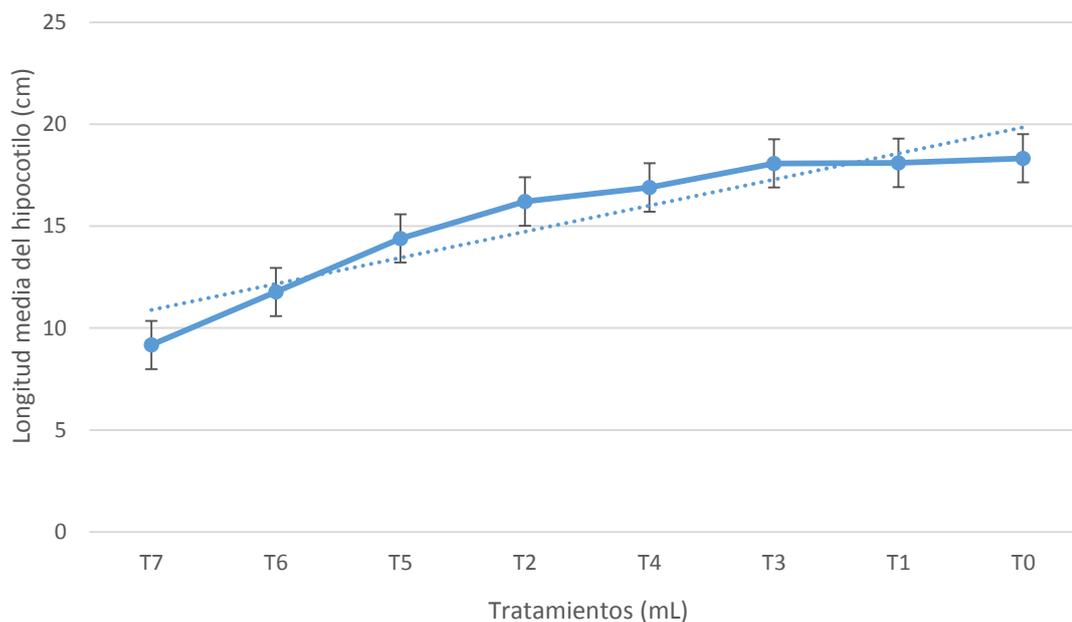


Figura 12. Longitud media de hipocotílo y la radícula en semillas de rábano en diferentes concentraciones del extracto de hidrocarburo.

En el cuadro 9, se consigue la variable de longitud del hipocotílo y la radícula, en siete tratamientos y un tratamiento control, por efecto de concentraciones de hidrocarburo en semillas de rábano en macetas durante 10 días, donde nos indica que difieren desde 2.99 cm a 15.84 cm, donde a medida que la concentración de hidrocarburo aumenta, el crecimiento del hipocotílo disminuye a una variable no significativa.

Cuadro 9. Longitud del hipocotílo en las semillas de rábanos en maceta, sometido a diferentes concentraciones.

Trat.	Conc.	Medias	N	D.E.	E.E.	Prueba Duncan ($\alpha=0.05$)
T ₇	100	8.74	5	0.41	0.34	A
T ₆	50	12.02	5	0.27	0.34	B
T ₅	25	19.04	5	0.23	0.34	C
T ₄	12.5	21.82	5	0.13	0.34	D
T ₃	6.25	23.34	5	0.54	0.34	E
T ₂	3.125	23.56	5	0.61	0.34	E
T ₁	1.5	23.88	5	1.81	0.34	E
T ₀	0	24.18	5	0.60	0.34	E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($\alpha > 0.05$)

Los tratamientos T₇, T₆, T₅ y T₄ se muestra significativamente estadísticas diferentes de sus medias, sin embargo, para los otros tratamientos restantes no existe divergencias significativas por que el hidrocarburo afecta en el desarrollo del hipocotílo en las semillas de rábano sembradas en macetas como se muestra en la figura 13.

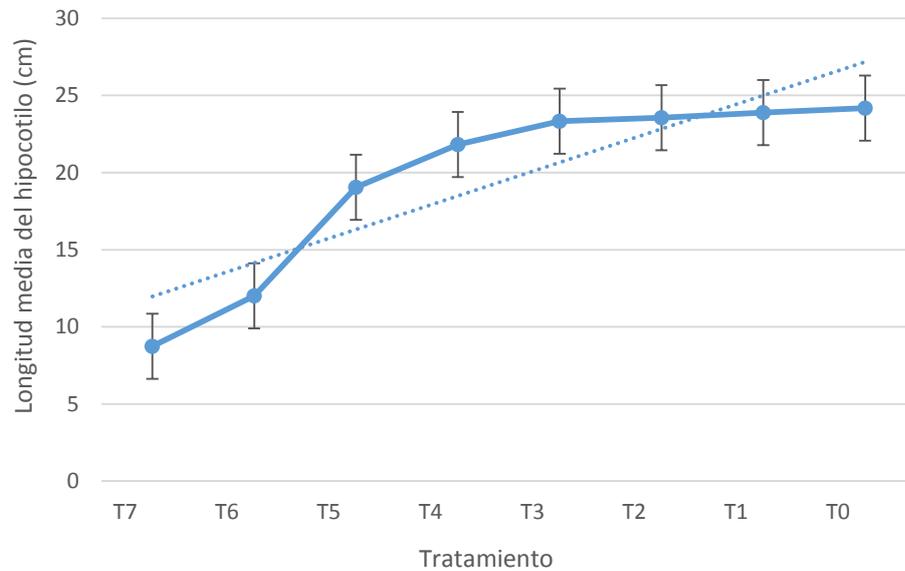


Figura 13. Longitud media del hipocotilo en semillas de rábano en diferentes concentraciones del extracto de hidrocarburo.

4.2. Umbral de sensibilidad en diferentes concentraciones de hidrocarburo para el rábano (*Raphanus sativus* L.) en placa de vidrio y en maceta.

Después de ejecutar los ensayos con semillas de rábano en placas de vidrio realizamos una tabla comparativa donde se calcula las concentraciones y la respuesta o efecto que ocurre para cada caso como se muestra en el cuadro 10.

Cuadro 10. Concentraciones y respuestas o efectos en las semillas de rábano.

Tratamientos	Concentraciones de hidrocarburo (%)	Respuestas o efectos
T ₀	-	15
T ₁	1.5	15
T ₂	3.125	15
T ₃	6.25	15
T ₄	12.5	14.8
T ₅	25	14.4
T ₆	50	14.2
T ₇	100	14

En el cuadro antepuesta se puede observar que la respuesta o efecto toxicológico donde T₀ es el punto de sensibilidad, indicando que para los tratamientos T₁, T₂ y T₄ no existe sensibilidad a las concentraciones de hidrocarburo, mientras que para los tratamientos T₃, T₅, T₆ y T₇ hay un porcentaje mayor de sensibilidad, dándonos referencia a la cifra de semillas germinadas en placas de vidrio expuestos a concentración con hidrocarburo como se observa en la figura 14.

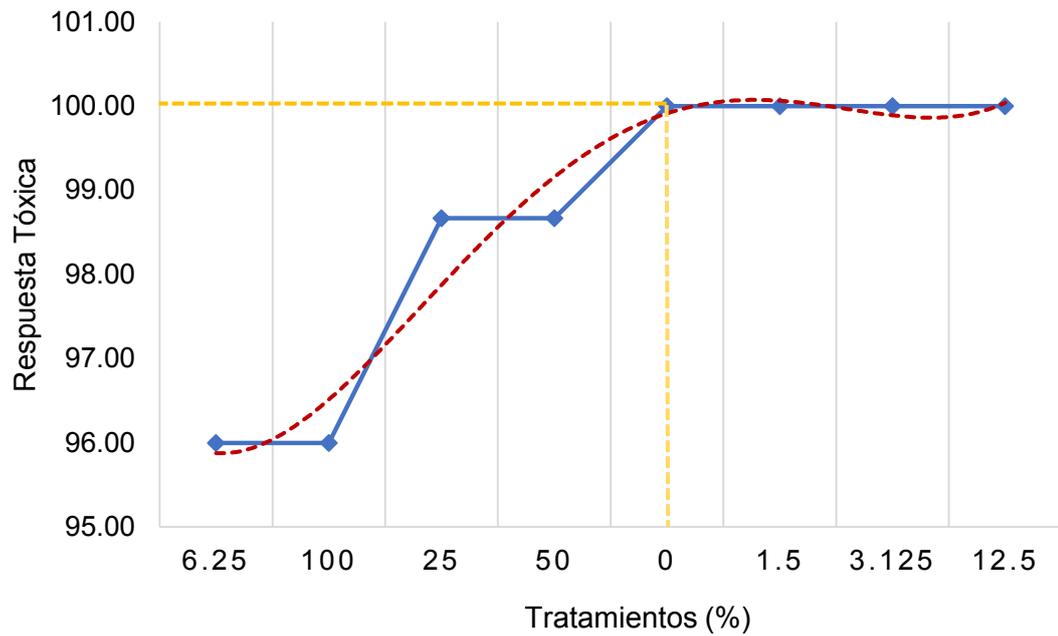


Figura 14. Umbral de sensibilidad concentración vs la respuesta o efecto en semillas de rábanos en placas de vidrio.

Los experimentos con semillas de rábano en macetas realizamos una tabla comparativa donde se evalúa las concentraciones y la respuesta o efecto toxico que ocurre para cada caso como se ve en el cuadro 11.

Cuadro 11. Concentraciones y respuestas o efectos en las semillas de rábano.

Tratamientos	Concentraciones de hidrocarburo (%)	Respuestas o efectos
T ₀	-	15
T ₁	1.5	15
T ₂	3.125	15
T ₃	6.25	15
T ₄	12.5	14.8
T ₅	25	14.4
T ₆	50	14.2
T ₇	100	14

Del cuadro anterior se puede observar que la respuesta o efecto toxicológico donde T₀ es el punto de sensibilidad, indicando que para los tratamientos T₁, T₂ y T₃ no existe sensibilidad a las concentraciones de hidrocarburo, mientras que para los tratamientos T₄, T₅, T₆ y T₇ hay un mayor porcentaje de sensibilidad, dándonos referencia al número de semillas germinadas en las placas de vidrio expuestos a concentración con hidrocarburo.

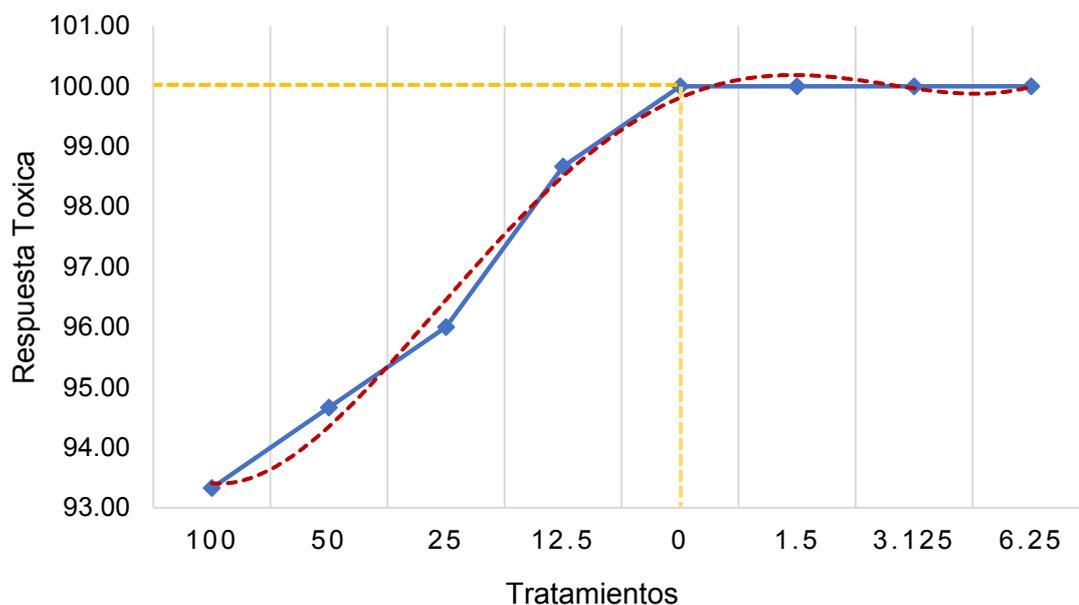


Figura 15. Umbral de sensibilidad concentración vs la respuesta o efecto para las semillas de rábano en maceta.

4.3. Dosis letal media DL50 para la semilla de rábano (*Raphanus sativus*).

Para determinar la Dosis letal Media DL50 en las semillas de rábano se ejecuta un análisis de Probit donde la Variable dependiente es el porcentaje de semillas muertas, donde nos muestra que las desviaciones son menores que 0.05, existe una relación estadísticamente significativa entre las variables, con un nivel de confianza del 95.0%.

Cuadro 12. Análisis para la dosis letal media DL50 para las semillas se rábano.

Tratamientos	Concentraciones	Promedio de % de semillas muertas	Total de semillas
T ₇	100	0.232	15
T ₆	50	0.15	15
T ₅	25	0.244	15
T ₄	12.5	0.12	15
T ₃	6.25	0	15
T ₂	3.125	0	15
T ₁	1.5	0	15
T ₀	0	0	15

En la figura 16 nos detalla el modelo ajustado de las predicciones inversas obtenidas. Y estos indican el valor de concentración al cual el modelo alcanza ciertos porcentajes, el valor correspondiente a $p=50\%$ (DL50) es igual a 243.692. Asimismo, se exponen intervalos mayores y menores cercanos de confianza para las predicciones inversas

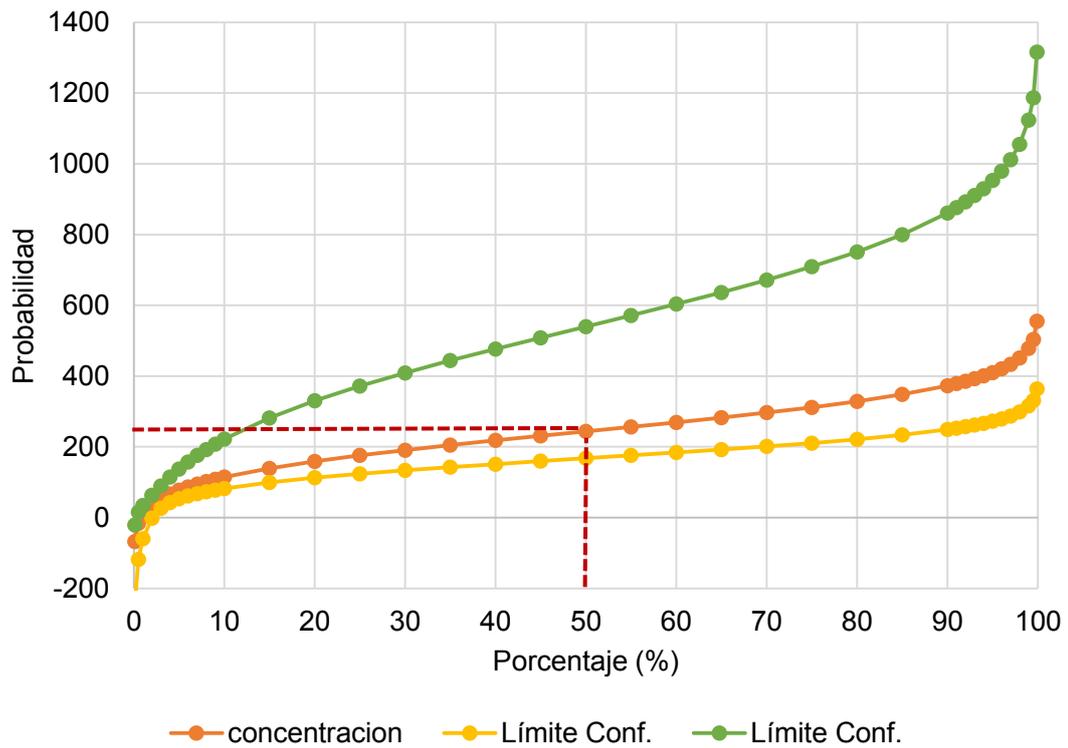


Figura 16. Dosis letal media DL50 para las semillas de rábano en macetas.

4.4. Parámetros toxicológicos, NOAEL Y LOAEL para el rábano (*Raphanus sativus*).

Para establecer los parámetros toxicológicos se ejecutó la prueba estadística de Dunnett donde nos indica que algunas concentraciones muestran un efecto diferente al control, Entonces presenta cierto grado de toxicidad. En el cuadro 13 se muestra el ANVA para las longitudes promedio de las plántulas de rábano en placas de vidrio sometidos a hidrocarburos.

Cuadro 13. Análisis de varianza para las plántulas de rábano

Fuentes de Variación	Suma de Cuadrados	Grados libertad	Cuadrados Medios	F	p-valor
Tratamientos	394.53	7	56.36	59.84	<0.0001
Error	30.14	32	0.94		
Total	424.67	39			

Cuadro 14. Prueba estadística de Dunnett para el rábano en placas de vidrio

tamaño de muestra	Trat.	N	Grados libertad del error	Cuadrado medio del error	Constante de la prueba de Dunnett	Valor teórico estadístico de la prueba
5	8	40	32	0.94	2.47	1.51

En el cuadro 15 se efectúa una comparación de los tratamientos con el tratamiento control para evaluar la concentración mínima que se observan efectos adversos (LOAEC) para las plántulas de rábano.

Cuadro 15. Estimación de la concentración mínima en la que se observan efectos adversos en rábano

tratamiento	Media	ABS (TM - T0)	Constante de la prueba de Dunnett	Comparación del tratamiento contra el control
T7	9.17	9.16	1.51	NOAEC
T6	11.77	6.56	1.51	NOAEC
T5	14.4	3.93	1.51	NOAEC
T4	16.21	2.12	1.51	NOAEC
T3	16.9	1.43	1.51	-
T2	18.08	0.25	1.51	-
T1	18.1	0.23	1.51	-
T0	18.33	-	-	-

Los resultados de la prueba para establecer los parámetros de toxicidad, revela que las concentraciones a partir de tratamiento T₄, T₅, T₆ y T₇ no se observa efectos adversos graves en la concentración máxima, por otro punto que a partir del T₃ para abajo hay concentración mínima en la que no observa efectos adversos, como se puede apreciar en el la figura 17.

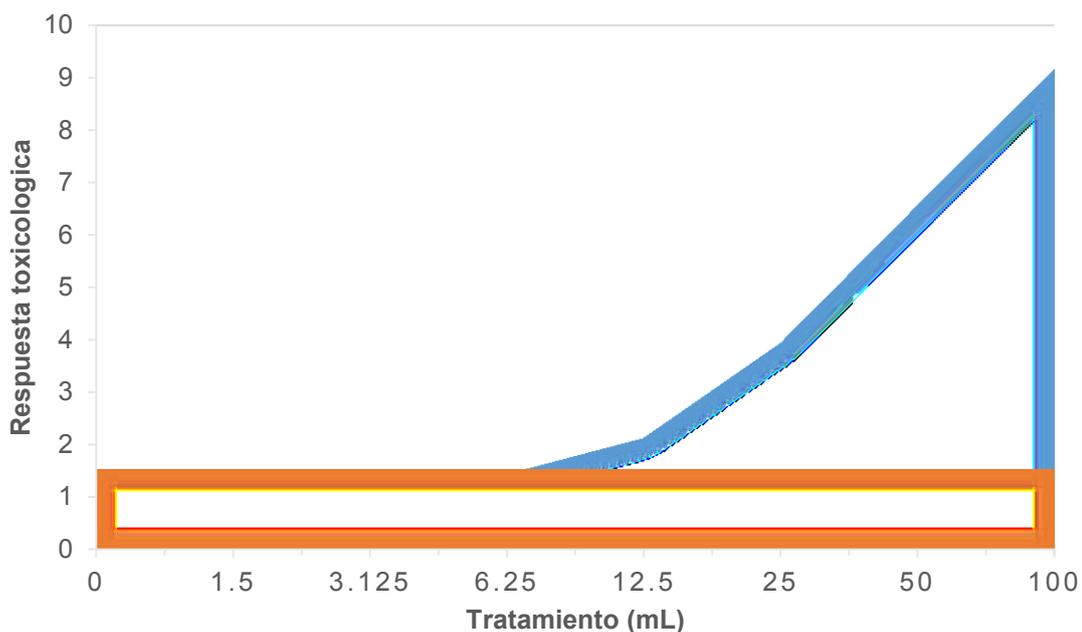


Figura 17. Curva determinación de NOAEC y LOAEC

En el cuadro 16 se estableció el análisis de varianza para los promedios de las longitudes de las plántulas de rábano en maceta sometido a hidrocarburos.

Cuadro 16. Análisis de varianza para las plántulas de rábano

Fuentes de Variación	Suma de Cuadrados	Grados libertad	Cuadrados Medios	F	p-valor
Tratamientos	1247.98	7	178.28	308.05	<0.0001
Error	18.52	32	0.58		
Total	1266.50	39			

Cuadro 17. Prueba estadística de Dunnett para el rábano en placas de vidrio

Tamaño de muestra	Trat.	N	Grados libertad del error	Cuadrado medio del error	Constante de la prueba de Dunnett	Valor teórico estadístico de la prueba
5	8	40	32	0.58	2.47	1.19

En el cuadro 18 se realiza una comparación de los tratamientos con el tratamiento control para estimar la concentración mínima en la que se observan efectos adversos (LOAEC) para las plántulas de rábano.

Cuadro 18. Estimación de la concentración mínima en la que se observan efectos adversos en rábano

tratamiento	Media	ABS (TM - T0)	Constante de la prueba de Dunnett	Comparación del tratamiento contra el control
T7	8.74	15.44	1.19	NOAEC
T6	12.02	12.16	1.19	NOAEC
T5	19.04	5.14	1.19	NOAEC
T4	21.82	2.36	1.19	NOAEC
T3	23.34	0.84	1.19	-
T2	23.56	0.62	1.19	-
T1	23.88	0.3	1.19	-
T0	24.18			

Los resultados de la prueba para determinar los parámetros de toxicidad, indica que las concentraciones a partir de tratamiento T₄ en adelante se observa que presenta la concentración máxima en la que no se observa efectos adversos agresivos, por otro lado que a partir del T₃ para abajo hay concentración mínima en la que no se observa efectos adversos, como se puede apreciar en la figura 18.

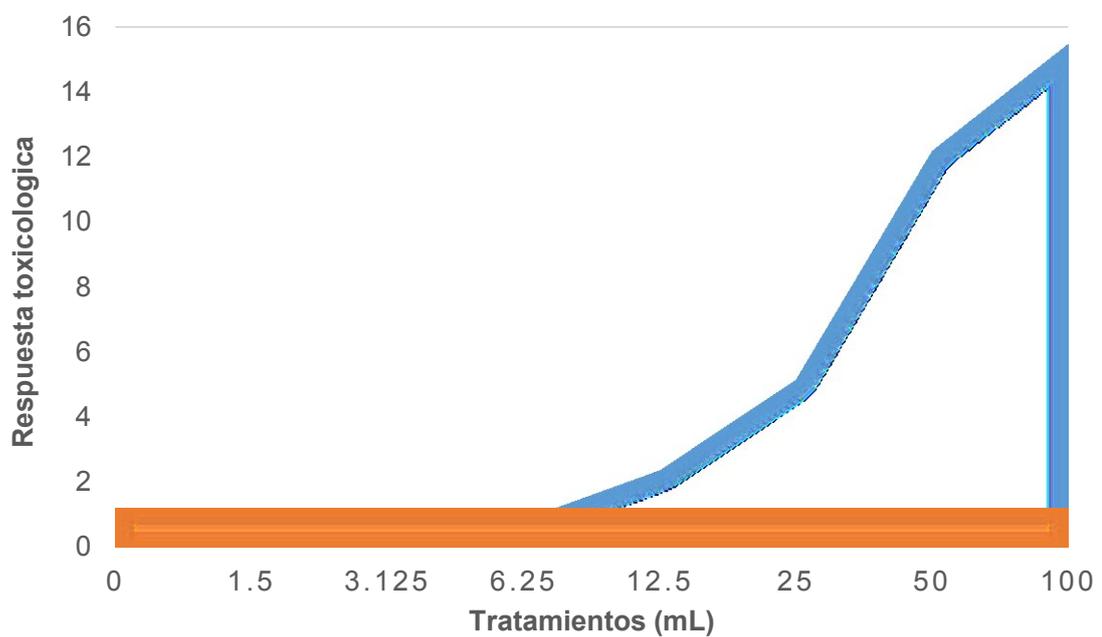


Figura 18. Curva determinación de NOAEC y LOAEC.

V. DISCUSION

5.1. De la respuesta toxicológica

En el cuadro 7 y 8 se muestra la respuesta toxicológica de las semillas de rábano; donde los ensayos trabajados en placa Petri nos da que para el 100% la respuesta es de 49.95 y para las pruebas trabajados en maceta la respuesta de la concentración en 100% es de 63.78, estos resultados confirman el hecho que durante el etapa de germinación y el primer día de progreso de la plántula, se producen muchos cambios fisiológicos, entre ellos la presencia de sustancias tóxicas interferirá con la supervivencia y el progreso normal de las plantas, convirtiéndose así en una etapa altamente sensible para las plantas. Factores externos desfavorables (SOBRERO y RONCO, 2005).

Asimismo, GARCÍA *et al.* (2015) resume que la radícula y el hipocótilo son indicadores para determinar el establecimiento y desarrollo de las plantas. Por otro lado la prueba tradicional de germinación de semillas, la evaluación del efecto del alargamiento de la radícula e hipocótilo de la plántula admite promediar los efectos tóxicos de la presencia de compuestos solubles en concentraciones lo suficientemente bajas que no permiten inhibir la germinación. Pero a pesar de esto, aún pueden retrasar o inhibir completamente el proceso de elongación de la radícula o hipocótilo.

En el T₇ de concentración 100% que las plántulas no se desarrollaron óptimamente debido a que la contaminación por hidrocarburos comprime el desarrollo de las plantas puesto que los hidrocarburos pueden envolver las raíces afectando la absorción de agua y nutrimentos, después penetrando dentro de los tejidos vegetales, las moléculas de hidrocarburos pueden dañar las membranas celulares, encerrando los lugares intercelulares, comprimiendo la transferencia de metabolitos y la tasa de respiración como sucedió (MÉNDEZ *et al.* 2006).

En otras evaluaciones referente a la respuesta toxicológica de las plantas de rábano a la presencia de hidrocarburo PETENELLO y FELDMAN (2012), investigaron la germinación de sus semillas, la emergencia de plántulas y la biomasa alcanzada en suelos que contenían hidrocarburo, en condiciones experimentales, observaron que los parámetros se vieron afectados con las concentraciones de contaminante empleadas, a pesar de ello, las plantas pudieron prosperar. Como se pueden ver en los cuadros 29, 30, 31 y 32 que para los tratamientos con una concentración de 100% de hidrocarburo, el porcentaje de humedad se elevó, por ello, no creció lo suficiente y sufrieron necrosis en el hipocótilo y en los brotes de las plántulas.

En nuestro caso el pH fue de 7.8 manteniéndose en medios favorables para propiciar su crecimiento pero en las investigaciones de MARTÍNEZ *et al.* (2003) indica que el suelo óptimo de la planta de *Raphanus sativus* L. debe tener un pH que oscile entre 6 y 7, pudiéndose desarrollar en suelos con un pH entre 4.3 y 8.3 y por otra parte AYERS y WESTCOT (1985)

indica que la planta soporta una conductividad eléctrica de 1.2 dS/m, mientras que, para el suelo analizado fue de 2.14 dS/m pudiendo afectar el crecimiento de las plántulas.

5.2. Del Umbral de sensibilidad

Según los resultados obtenidos, en el cuadro 11 y 12 se muestra los tratamientos a distintas concentraciones donde los efectos se manifiestan en el porcentaje de germinación, y se puede observar que el punto de sensibilidad está en el tratamiento testigo, indicando que para las concentraciones 1.5, 3.125, 6.25 y 12.5% las plántulas de rábano pueden tolerar dichos porcentajes, mientras que a partir de la concentración 25% para adelante existe una sensibilidad poco significativa, como describen (GREENWAY y MUNNS, 1980) acerca del umbral de sensibilidad, es la capacidad de tolerancia que tiene el cultivo para soportar algún contaminante del suelo sin experimentar efectos perjudiciales en su desarrollo y/o producción.

Asimismo, CONTRERAS (2017) indica que los hidrocarburos a un nivel de toxicidad severo, el índice de germinación es bajo para el *Raphanus sativus* L., situaciones similares se encontraron en los tratamientos como se puede observar en el cuadro 21 y 22 donde que las concentraciones 25, 50 y 100% el porcentaje de semillas germinadas son menores.

La germinación es el progreso de aquellas estructuras fundamentales que provienen del embrión, y que muestran la tolerancia de la semilla para producir una planta estándar bajo situaciones óptimas. Asimismo, (CARBALLO *et al.*, 2015) menciona que los elementos ambientales directamente

implicados en el proceso de germinación son temperatura, luz, gases y disponibilidad de nutrientes. La luz provoca la germinación, pero no es rigurosamente necesario para la mayoría de las semillas, por lo tanto durante el ensayo experimental la temperatura ambiente fue de 25.4 °C y la luminosidad fue de 8 horas de luz y 16 de sombra, conforme a la metodología que nosotros utilizamos.

5.3. De la Dosis letal media DL50

Para obtener este resultado se trabajó con el porcentaje de semillas muertas, donde se registra que en la figura 16, la dosis letal media alcanza una probabilidad baja, no cumpliendo con lo establecido para el DL50, pero en algunas plantas los hidrocarburos crean una película hidrofóbica en torno de la raíz, que paraliza el ingreso de agua; esto incita un estrés hídrico que perturba algunas fases de su crecimiento; también los parámetros biométricos son sensibles a las sustancias tóxicas con efectos negativos en los como el crecimiento y desarrollo de la plántula, además de su morfología entre otros.

En la figura 15 podemos observar que sucedería la DL50 si hay un porcentaje de 243.69% de hidrocarburo y por ello se puede concluir que la extensión en la ingreso del agua en el endospermo y en la cobertura seminal está ligada a la influencia positiva del hidrocarburo sobre la germinación de la semilla, de modo que suceden cambios enzimáticos en mínimo tiempo. Además ciertas fracciones de petróleo alcanzan trabajar como auxinas fundadoras de la germinación y cabe mencionar que puede traer un daño en el resto del crecimiento de la planta (RIVERA y TRUJILLO 2004).

5.4. De los parámetros toxicológicos, NOAEL Y LOAEL

Se puede observar en los cuadros 15 y 16, en función al tratamiento control, muestra que a partir de la concentración 12.5% para abajo, hay una concentración mínima y se no hay efectos adversos, a diferencia de la concentración 25% para adelante hay un máximo de hidrocarburo y se no se observa efectos adversos graves cabe mencionar que una de las etapas más significativos del desarrollo de una planta, es la germinación de las semillas al manar el primer cotiledón. Sin embargo, un suelo contaminado por hidrocarburos del petróleo tiene un efecto adverso sobre la especie vegetal (FERNÁNDEZ *et al.* 2006).

El NOAEL es la dosis más elevada de una sustancia que no ha mostrado en las pruebas tener efectos perjudiciales, como se muestra en los resultados que a una concentración de 100% germino en mayor porcentaje, pero no se desarrolló efectivamente. A la vez también Castro sustenta que el LOAEL es la concentración o cantidad más pequeña de una sustancia que causa una alteración observable y distinguible de un control apropiado, pero en los resultados mostrados no cumple con lo sustentado puesto que a una concentración de 1.5% no se registra una alteración distinguible del control (FERNÁNDEZ *et al.* 2006).

Al respecto ZEIGER Y TAIZ, 2007, menciona que esta conducta probablemente se debe a la reserva nutrimental que tiene la semilla y a la recolección activa de solutos que crean flujo osmótico e añade agua a la vacuola que admite sustentar el crecimiento vegetativo de la planta.

VI. CONCLUSION

1. En los ensayos con placas Petri con una concentración de hidrocarburo de 100 % se encuentra un 49.95 de respuesta toxicológico en las semillas de rábano, mientras que, los ensayos en macetas la respuesta toxicológica es de 63.78.
2. El umbral de sensibilidad, en el caso del ensayo en placa Petri a partir de la concentración 6.25 % presenta efectos tóxicos y para macetas fue en la concentración de 12.5 % de hidrocarburo.
3. En la Dosis letal media (DL50) para las semillas de rábano indica es igual a 243.69 de probabilidad que esto ocurra.
4. Se estimó que el NOAEC se presenta a partir de 12.5 % de concentración de hidrocarburo en adelante y el LOAEC en menores concentraciones de 6.25 % presenta niveles de toxicidad aguda.

VII. RECOMENDACIONES

1. Realizar ensayos con otras especies de plantas para evaluar los niveles de extracción de hidrocarburos contaminantes del suelo.
2. Realizar experimentos en campo con concentraciones de hidrocarburos utilizando la especie *Raphanus sativus* para el tratamiento del suelo contaminado.
3. Realizar investigaciones para evaluar el grado de toxicidad del petróleo y cuál es su nivel de contaminación si ocurre un derrame.

VIII. ABSTRACT

The research carried out aims to evaluate the viability of a toxicological method from the germination of the radish (*Raphanus sativus* L.) to determine the toxicity of hydrocarbon-contaminated soils in the laboratory. We acquired as a pattern soil contaminated by hydrocarbons extracted from Maestranza (a car park) of the National Agrarian University La Molina, for this purpose the physical-chemical analysis of the soil was carried out and the content of hydrocarbons in the soil was determined by means of the Soxhlet extraction method, The radish seeds were then conditioned on glass plates and in pots to observe their biometry and parameters (germination percentage, germination energy, germination delay, biomass and moisture percentage) to help us obtain the toxicological response of the seedlings. As a result, it is reported that in Petri dishes with a hydrocarbon concentration of 100%, a 49.95 toxicological response is found; while, in pot tests the toxicological response is 63.78. It is concluded that the hydrocarbon at a maximum concentration has as adverse effect in the tests worked in pots, and that the species *R. sativus* can be considered as a bioindicator of hydrocarbon contaminated soils.

Key words: toxicological response, *Raphanus sativus*, hydrocarbon, bioassays, germination.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANA, 2017. Derrame de petróleo: ANA evalúa y toma muestras de agua en zona afectada en Loreto, p 16. Lima, Perú.
- APHA, 1998. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20^{to} ed., American Public Health Association, Ap. 8010G., Washington D.C., pp. 8-20, 8-23
- BAUDO, R., 1987. Ecotoxicological testing with Daphnia, e Daphnia. Mem. Ist. Ital. Idrobiol. 45: 461 - 482.
- BENAVIDES, L., QUINTERO, G., GUEVARA, A., JAIMEs, A., GUTIÉRREZ, S. y GARCÍA, J. (2006). Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. NOVA Publicación científica. Vol.4 No. 5
- BOSSERT, I. y BARTHA, R (1985) Crecimiento de plantas en suelos con antecedentes de eliminación de lodos oleosos. Soil Sci. 140: 75-77.
- BUENDÍA, H. 2012. Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos mediante el compost de aserrín y estiércol. Revista del Instituto de Investigación (RIIGEO). FIGMMG-UNMSM. Lima, Perú.
- BUENDÍA, H.; CRUZ, F.; MEZA, C. y ARÉVALO, J. 2014. Fitorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos de petróleo. Revistas de

- Ciencias Sociales de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
Lima, Perú. 1 (1): 113 – 121
- BUIKEMA, L., NIEDERLEHNER, R. y CAIRNS, J. 1982. Biological monitoring.
Part IV. Toxicity testing. Water Res.16: 239 - 262.
- CARBALLO, A., HERNÁNDEZ, A., HERNÁNDEZ, A., y GONZÁLEZ, F. (2015).
Calidad fisiológica de semilla de y establecimiento en campo. I. Prueba
de germinación. México.
- CASTILLO, G. 2004. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad
de aguas: Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones.
1ra edición. Edit. Instituto Mexicano de Tecnología de Agua. México. 189
p.
- CASTRO, F., FORERO, D., RAMÍREZ, J. y REINA, M. 2014. Evaluación de la
contribución económica del sector de hidrocarburos colombiano frente a
diversos escenarios de producción. FEDESARROLLO para la Unidad de
Planeación Minero Energética –UPME.
- CONTRERAS, H. 2017. Eficiencia de la biodegradación de hidrocarburos de
petróleo por hongos filamentosos aislados de suelo contaminado. Tesis
para optar Licenciado en Biología, Microbiología y Parasitología.
Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo. Lambayeque, Perú. 106 p.
- CUBILLOS, A., GÄDICKE, P.BAER, D. y AHUMADA, F. 1999. Determinación de
la dosis letal media (DL₅₀) de alcaloides del lupino en pollas de reposición
blancas y marón. Valdivia, Chile.
- CUEVAS, M., ROSALDO, J. y LÓPEZ, J. 2011. Evaluación de la toxicidad de los
suelos mediante bioensayos con semillas. 3:87-105.

<http://www.publicaciones.inecc.gob.mx/libros/665/toxicidad.pdf>

Consultado en enero de 2018.

- DORIA, J. 2010. Revisión bibliográfica. Generalidades sobre las semillas: su producción, conservación y almacenamiento. *Cultivos Tropicales*, 31(1), 74-85.
- EPA. 2000. Introducción a la fitorremediación. Agencia de Protección Ambiental. Cincinnati, Ohio. 231 p.
- ESCALANTE, E. 2000. Estudio de Ecotoxicidad de un suelo contaminado con hidrocarburos. Tesis para obtener el grado de maestro en biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana, México. D.F.
- ESCLAPÉS, M. 1999. Protocolos estándares para bioensayos de toxicidad con especies acuáticas y terrestres (PDVSA- INTEVEP). Versión 2.0. Departamento de Ecología y Ambiente. Venezuela
- ESCOBAR, P. y LONDOÑO, R. 2009. Manual práctico de ensayos de toxicidad en medio acuático con organismos del género *Daphnia*. Bogotá, Colombia. 92p.
- FRICK, C.; FARRELL, R. y GERMIDA, J. 1999. Assessment of Phytoremediation as an in situ Technique for Cleaning Oil-Contaminated Sites. Petroleum Technology Alliance of Canada. Vancouver, British Columbia.
- GARCÍA, M., INFANTE, C. y LÓPEZ, L. 2015 Biodegradación de un crudo mediano en suelos de diferentes textura con y sin agente estructurante. *Bioagro* 24:93-102
- GONZÁLEZ, N.; SIMARRO, R.; MOLINA, M.; DELGADO, F. y VILLA, J. 2011. Efecto de los surfactantes en la biodegradación de PAH por un consorcio

bacteriano y en la dinámica de la comunidad bacteriana durante el proceso. *Tecnología Bioambiental*. 102 (1): 9438 – 9446.

HERNANDEZ, E.; RUBIÑOS, J. y ALVARADO, J. 2004. Restauración de suelos contaminados con hidrocarburos: conceptos básicos. 1ra Edición. Edit. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México. 160 p.

HERNÁNDEZ, I.; NAVAS, G. e INFANTE, C. 2017. Fitorremediación de un suelo contaminado con petróleo extra pesado con *Megathyrsus maximus* *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. México. 33 (3): 495 – 503

ITIS. 2020. Jerarquía taxonómica. [En línea]: https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=23290#null/, 28 enero 2020).

LANNACONE, J. y ALVARIÑO, L. 2005. Efecto Ecotoxicológico de tres Metales Pesados Sobre el Crecimiento Radicular de Cuatro Plantas Vasculares. *Agricultura Técnica, Chile*. 65(2):198-203

MARÍN, T. 2016. Crecimiento de plantas de maíz (*Zea mays*) en un suelo contaminado con petróleo y remediado con extracto de cáscaras de naranja (*Citrus sinensis*). *Revista Enfoque UTE*. Ecuador. 7 (3): 1 -13.

MARTÍNEZ, V. y LÓPEZ, F. 2001. Efecto de Hidrocarburos en las propiedades físicas y químicas de suelo arcilloso. *Terra* 19: 9-17

MENDELSSOHN, I.; ANDERSEN, G.; BALTZ, D.; CAFFEY, R.; CARMAN, K.; FLEEGER, J.; JOYE, S.; LIN, Q.; MALTBY, E.; OVERTON, E. y ROZAS, L. (2012). Impactos del petróleo en los humedales costeros: implicaciones para el ecosistema del delta del río Mississippi después

- del derrame de petróleo. Revista Deepwater Horizon. Estados Unidos. 62(1): 562-574.
- MENDENHALL, W. 1994. Estadística Matemática con Aplicaciones, el análisis de varianza. Editorial Iberoamericana. México D.F. 2 ed. Grupo.
- MORENO, M. (2006). Derrames de hidrocarburos. Grupo Evaluación Ambiental de Proyectos Subdirección Técnica Parques Nacionales Naturales.
- NÚÑEZ, M. y HURTADO, J. 2005. Bioensayos de toxicidad aguda utilizando *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Daphniidae) desarrollada en medio de cultivo modificado. Revista Perú. Biológica. Lima, Perú. 12(1): 165-170.
- ORGANISMO DE EVALUACIÓN Y FISCALIZACIÓN AMBIENTAL. 2019. Reportes de derrames de petróleo en el Perú. [En línea]: OEFA. <https://www.oefa.gob.pe/?s=derrame>, 28 junio 2019).
- PETENELLO, M. y FELDMAN, S. 2012. Evaluación de la tolerancia a suelos contaminados con aceite diésel en especies vegetal con potencial biorremediado. Acta Biológica Colombiana. Medellin, Colombia. 17 (3): 589 – 598
- RIVERA, M. y TRUJILLO, A. 2004. Estudio de toxicidad vegetal en suelos con petróleos nuevo e intemperizado. Interciencia. 29: 369.376
- REGUERO, T. 2017. Identificación y evaluación del riesgo. Biotecnología Gris. Bogotá, Colombia. 29 – 32.
- ROSA, C.; SIERRA, M. y RADETSKI, C. 1999. Use of plant tests in the evaluation of textile effluent toxicity. Ecotoxicol. Environ. Res. 2:56-61.

- SALT, D.; BLAYLOCK, N.; KUMAR, V.; DUSHENKOV, B.; ENSLEY, I. CHET, I. y RASKIN, I. 1995. Fitorremediación: Una nueva estrategia para remover los metales tóxicos desde el ambiente usando plantas. *Revista Biotecnología*. 13 (1): 468 – 474
- SERRANO, M.; TORRADO, L. y PÉREZ, D. 2013. Impacto de los derrames de crudo en las propiedades mecánicas de suelos arenosos. *Ciencia y Tecnología*. 11 (1): 233-244.
- TARACHE, A. 2011. Estudio de la Evolución de Toxicidad de Suelos Petrolizados durante un Proceso de Biorremediación. Venezuela. 178 pp
- TRUJILLO, A.; RIVERA, M.; LAGUNES, L.; PALMA, D.; SANCHEZ, S. y RAMIREZ, G. 2014. Parámetros biológicos de la restauración de suelos contaminados por petróleo crudo. *Revista Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*. Texcoco, Mexico. 1 (2): 107 – 122
- TRUJILLO, N. A. 1995. Metales pesados e hidrocarburos en suelos del estado de Tabasco. *Investigación Edafológica en México. Memorias XXVI Congreso Nacional de la Ciencia del Suelo*. Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo. Tamaulipas, México. 41 p.
- UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). 1996b. Soxhlet extraction. Test methods for evaluating solid waste, physical/chemical methods SWE 846 (Revisión 3).
- USEPA, 1989, Protocols for Short Term Toxicity Screening of Hazardous Waste Sites. US Environmental Protection Agency, 600/3-88/029, Corvallis.

- VELÁSQUEZ, J. 2018. Contaminación de suelos y aguas por hidrocarburos en Colombia. Análisis de la Fitorremediación como estrategia biotecnológica de recuperación. Yopal, Casanare, Colombia. 16p
- YAVARI, K., YEGANEH, E. y ABOLGHASEMI, H. 2015. Production and characterization of Ho polylactic acid microspheres. Journal of labelled compounds. Teherán, Irán. 59, 24-29.
- ZEIGER, E. y TAIZ, L. 2007. Fisiología vegetal Vol. 1. Ed. Universitat Jaume I. 2007. 1907 PP.

ANEXOS

Anexo A. Determinación de los parámetros toxicológicos para el rábano

Cuadro 19. Porcentaje de hidrocarburo en 10 gramos de muestra de suelo contaminado por el método de Soxhlet.

Rep.	Peso de balón inicial (g)	Peso de balón final (g)	Peso de hidrocarburo (g)	Porcentaje de hidrocarburo (%)
R ₁	93.65	94.82	1.17	11.7
R ₂	96.73	97.98	1.25	12.5
R ₃	92.27	93.48	1.21	12.1
Promedio				12.1

Cuadro 20. Análisis fisicoquímico del suelo contaminado y extracto de hidrocarburo del suelo.

Parámetros	Suelo contaminado
pH	7.8
T (°C)	25.4
Conductividad (dS/m)	2.14
Textura	Franco Arenoso

Cuadro 21. Porcentaje de semillas germinadas para el rábano plantadas en placa Petri.

Trat.	Conc.	Promedio de semillas germinada	Porcentaje de semillas germinadas
T ₀	-	15	100.00
T ₁	1.5	15	100.00
T ₂	3.125	15	100.00
T ₃	6.25	14.4	96.00
T ₄	12.5	15	100.00
T ₅	25	14.8	98.67
T ₆	50	14.8	98.67
T ₇	100	14.4	96.00

Cuadro 22. Porcentaje de semillas germinadas para el rábano plantadas en macetas

Trat.	Conc.	Promedio de semillas germinada	Porcentaje de semillas germinadas
T ₀	-	15	100.0
T ₁	1.5	15	100.0
T ₂	3.125	15	100.0
T ₃	6.25	15	100.0
T ₄	12.5	14.8	98.7
T ₅	25	14.4	96.0
T ₆	50	14.2	94.7
T ₇	100	14	93.3

Cuadro 23. Energía germinativa para el rábano en frascos de vidrio

Trat.	Conc.	Promedio de semillas germinada	Energía de semillas germinadas
T ₀	0	15	10.00
T ₁	1.5	15	10.00
T ₂	3.125	15	10.00
T ₃	6.25	14.4	9.60
T ₄	12.5	15	10.00
T ₅	25	14.8	9.87
T ₆	50	14.8	9.87
T ₇	100	14.4	9.60

Cuadro 24. Energía germinativa para el rábano en macetas.

Trat.	Conc.	Promedio de semillas germinada	Porcentaje de semillas germinadas
T ₀	0	15	10.00
T ₁	1.5	15	10.00
T ₂	3.125	15	10.00
T ₃	6.25	15	10.00
T ₄	12.5	14.8	9.87
T ₅	25	14.4	9.60
T ₆	50	14.2	9.47
T ₇	100	14	9.33

Cuadro 25. Retraso germinativo para el rábano en frascos de vidrio

Tratamientos	Repeticiones	Tiempo de germinación	Tiempo control	Retraso germinativo	Promedio
T ₀	R ₁	3	3	0	0
	R ₂	3	3	0	
	R ₃	3	3	0	
	R ₄	3	3	0	
	R ₅	3	3	0	
T ₁	R ₁	3	3	0	0.2
	R ₂	4	3	1	
	R ₃	3	3	0	
	R ₄	3	3	0	
	R ₅	3	3	0	

T ₂	R ₁	4	3	1	0.6
	R ₂	3	3	0	
	R ₃	3	3	0	
	R ₄	4	3	1	
	R ₅	4	3	1	
T ₃	R ₁	4	3	1	0.4
	R ₂	4	3	1	
	R ₃	3	3	0	
	R ₄	3	3	0	
	R ₅	3	3	0	
T ₄	R ₁	4	3	1	1.2
	R ₂	5	3	2	
	R ₃	4	3	1	
	R ₄	3	3	0	
	R ₅	5	3	2	
T ₅	R ₁	4	3	1	1
	R ₂	5	3	2	
	R ₃	3	3	0	
	R ₄	3	3	0	
	R ₅	5	3	2	
T ₆	R ₁	5	3	2	1.8
	R ₂	5	3	2	
	R ₃	4	3	1	
	R ₄	5	3	2	
	R ₅	5	3	2	
T ₇	R ₁	5	3	2	1.6
	R ₂	5	3	2	
	R ₃	4	3	1	
	R ₄	4	3	1	
	R ₅	5	3	2	

Cuadro 26. Retraso germinativo para el rábano en macetas.

Tratamientos	Repeticiones	Tiempo de germinación	Tiempo control	Retraso germinativo	Promedio
T ₀	R ₁	7	7	0	0
	R ₂	7	7	0	
	R ₃	7	7	0	
	R ₄	7	7	0	
	R ₅	7	7	0	
T ₁	R ₁	7	7	0	0
	R ₂	7	7	0	
	R ₃	7	7	0	
	R ₄	7	7	0	
	R ₅	7	7	0	
T ₂	R ₁	7	7	0	0.8
	R ₂	8	7	1	
	R ₃	7	7	0	
	R ₄	8	7	1	
	R ₅	9	7	2	
T ₃	R ₁	7	7	0	0.4
	R ₂	7	7	0	
	R ₃	7	7	0	
	R ₄	8	7	1	
	R ₅	8	7	1	
T ₄	R ₁	7	7	0	0.6
	R ₂	8	7	1	
	R ₃	7	7	0	
	R ₄	7	7	0	
	R ₅	9	7	2	

T ₅	R ₁	7	7	0	0.6
	R ₂	9	7	2	
	R ₃	8	7	1	
	R ₄	7	7	0	
	R ₅	7	7	0	
T ₆	R ₁	7	7	0	1.4
	R ₂	8	7	1	
	R ₃	8	7	1	
	R ₄	9	7	2	
	R ₅	10	7	3	
T ₇	R ₁	10	7	3	1.8
	R ₂	10	7	3	
	R ₃	8	7	1	
	R ₄	7	7	0	
	R ₅	9	7	2	

Cuadro 27. Biomasa fresca para el rábano en frascos de vidrio

Trat.	Rep.	Peso en fresco (g)	Promedio del peso en fresco (g)	Biomasa fresca (%)
T ₀	R ₁	1.3216	1.2001	100
	R ₂	1.4021		
	R ₃	1.2032		
	R ₄	1.0642		
	R ₅	1.0092		
T ₁	R ₁	1.5387	1.6409	73.13
	R ₂	1.8032		
	R ₃	1.7932		
	R ₄	1.6044		
	R ₅	1.4651		

	R ₁	1.4352		
	R ₂	1.4021		
T ₂	R ₃	1.4127	1.4503	82.75
	R ₄	1.5022		
	R ₅	1.4993		
	R ₁	1.3253		
	R ₂	1.3983		
T ₃	R ₃	1.2984	1.2821	93.60
	R ₄	1.1874		
	R ₅	1.2009		
	R ₁	1.1764		
	R ₂	1.2671		
T ₄	R ₃	1.1837	1.2421	96.61
	R ₄	1.2042		
	R ₅	1.3793		
	R ₁	1.2939		
	R ₂	1.0983		
T ₅	R ₃	1.1469	1.1579	103.64
	R ₄	1.0461		
	R ₅	1.2043		
	R ₁	1.2032		
	R ₂	1.0775		
T ₆	R ₃	1.1965	1.1522	104.15
	R ₄	1.0165		
	R ₅	1.2674		
	R ₁	1.1275		
	R ₂	1.2213		
T ₇	R ₃	1.0974	1.1446	104.85
	R ₄	1.2532		
	R ₅	1.0234		

Cuadro 28. Biomasa fresca para el rábano en macetas.

Trat.	Rep.	Peso en fresco (g)	Promedio del peso en fresco (g)	Biomasa fresca (%)
T ₀	R ₁	2.0237	1.9337	100.00
	R ₂	1.7758		
	R ₃	1.8560		
	R ₄	2.0965		
	R ₅	1.9167		
T ₁	R ₁	2.4654	2.5305	76.42
	R ₂	2.3756		
	R ₃	2.6674		
	R ₄	2.3641		
	R ₅	2.7802		
T ₂	R ₁	2.2111	2.2545	85.77
	R ₂	2.3596		
	R ₃	2.2790		
	R ₄	2.2762		
	R ₅	2.1465		
T ₃	R ₁	2.1636	2.1964	88.04
	R ₂	2.0699		
	R ₃	2.3992		
	R ₄	2.2672		
	R ₅	2.0823		

	R ₁	1.8625		
	R ₂	2.1474		
T ₄	R ₃	2.2135	2.0728	93.29
	R ₄	1.9532		
	R ₅	2.1873		
	R ₁	2.1013		
	R ₂	1.8214		
T ₅	R ₃	1.8753	1.9481	99.26
	R ₄	2.0821		
	R ₅	1.8603		
	R ₁	1.8212		
	R ₂	1.5213		
T ₆	R ₃	1.9244	1.7923	107.89
	R ₄	1.7913		
	R ₅	1.9034		
	R ₁	1.8032		
	R ₂	1.6324		
T ₇	R ₃	1.3103	1.6464	117.45
	R ₄	1.6932		
	R ₅	1.7931		

Cuadro 29. Biomasa seca para el rábano en frascos de vidrio

Trat.	Rep.	Peso en seco (g)	Promedio del peso en seco (g)	Biomasa seca (%)
	R ₁	0.0983		
	R ₂	0.1421		
T ₀	R ₃	0.1429	0.1172	100
	R ₄	0.1052		
	R ₅	0.0973		
	R ₁	0.1213		
	R ₂	0.1267		
T ₁	R ₃	0.1475	0.1405	83.38
	R ₄	0.1428		
	R ₅	0.1643		
	R ₁	0.1335		
	R ₂	0.1234		
T ₂	R ₃	0.0936	0.1238	94.64
	R ₄	0.1061		
	R ₅	0.1624		
	R ₁	0.1073		
	R ₂	0.1027		
T ₃	R ₃	0.1314	0.1191	98.39
	R ₄	0.1078		
	R ₅	0.1462		

	R ₁	0.1342		
	R ₂	0.1224		
T ₄	R ₃	0.1153	0.1227	95.47
	R ₄	0.1264		
	R ₅	0.1153		
	R ₁	0.1236		
	R ₂	0.1168		
T ₅	R ₃	0.1191	0.1182	99.14
	R ₄	0.1185		
	R ₅	0.1129		
	R ₁	0.1324		
	R ₂	0.1130		
T ₆	R ₃	0.1142	0.1150	101.88
	R ₄	0.1021		
	R ₅	0.1133		
	R ₁	0.1012		
	R ₂	0.1198		
T ₇	R ₃	0.1086	0.1123	104.36
	R ₄	0.1132		
	R ₅	0.1185		

Cuadro 30. Biomasa seca para el rábano en macetas.

Trat.	Rep.	Peso en seco (g)	Promedio del peso en seco (g)	Biomasa seca (%)
T ₀	R ₁	0.8799	0.9095	100
	R ₂	0.9846		
	R ₃	0.8340		
	R ₄	0.9543		
	R ₅	0.8946		
T ₁	R ₁	0.8534	0.9333	97.45
	R ₂	0.9953		
	R ₃	0.8839		
	R ₄	1.1211		
	R ₅	0.8129		
T ₂	R ₁	0.8469	0.9211	98.73
	R ₂	0.9079		
	R ₃	0.8032		
	R ₄	1.1041		
	R ₅	0.9436		
T ₃	R ₁	1.1234	0.9437	96.37
	R ₂	0.9622		
	R ₃	0.7802		
	R ₄	0.9853		
	R ₅	0.8675		

	R ₁	0.7027		
	R ₂	1.2118		
T ₄	R ₃	1.1696	0.9500	95.73
	R ₄	0.7460		
	R ₅	0.9201		
	R ₁	0.8201		
	R ₂	1.1896		
T ₅	R ₃	0.8932	1.0008	90.88
	R ₄	1.1248		
	R ₅	0.9762		
	R ₁	1.1993		
	R ₂	0.9227		
T ₆	R ₃	0.8289	0.9970	91.22
	R ₄	0.9125		
	R ₅	1.1216		
	R ₁	0.8372		
	R ₂	0.7560		
T ₇	R ₃	0.8062	0.8625	105.44
	R ₄	0.9481		
	R ₅	0.9652		

Cuadro 31. Porcentaje de humedad para el rábano en frascos de vidrio.

Trat.	Rep.	Peso en freso (g)	Peso en seco (g)	Peso del agua retenido	Humedad (%)	Promedio Humedad (%)
T ₀	R ₁	1.3216	0.0983	1.2233	92.56	90.20
	R ₂	1.4021	0.1421	1.2600	89.87	
	R ₃	1.2032	0.1429	1.0603	88.12	
	R ₄	1.0642	0.1052	0.9590	90.11	
	R ₅	1.0092	0.0973	0.9119	90.36	
T ₁	R ₁	1.5387	0.1213	1.4174	92.12	91.35
	R ₂	1.8032	0.1267	1.6765	92.97	
	R ₃	1.7932	0.1475	1.6457	91.77	
	R ₄	1.6044	0.1428	1.4616	91.10	
	R ₅	1.4651	0.1643	1.3008	88.79	
T ₂	R ₁	1.4352	0.1335	1.3017	90.70	91.48
	R ₂	1.4021	0.1234	1.2787	91.20	
	R ₃	1.4127	0.0936	1.3191	93.37	
	R ₄	1.5022	0.1061	1.3961	92.94	
	R ₅	1.4993	0.1624	1.3369	89.17	
T ₃	R ₁	1.3253	0.1073	1.2180	91.90	90.64
	R ₂	1.3983	0.1027	1.2956	92.66	
	R ₃	1.2984	0.1314	1.1670	89.88	
	R ₄	1.1874	0.1078	1.0796	90.92	
	R ₅	1.2009	0.1462	1.0547	87.83	

	R ₁	1.1764	0.1342	1.0422	88.59	
	R ₂	1.2671	0.1224	1.1447	90.34	
T ₄	R ₃	1.1837	0.1153	1.0684	90.26	90.07
	R ₄	1.2042	0.1264	1.0778	89.50	
	R ₅	1.3793	0.1153	1.2640	91.64	
	R ₁	1.2939	0.1236	1.1703	90.45	
	R ₂	1.0983	0.1168	0.9815	89.37	
T ₅	R ₃	1.1469	0.1191	1.0278	89.62	89.75
	R ₄	1.0461	0.1185	0.9276	88.67	
	R ₅	1.2043	0.1129	1.0914	90.63	
	R ₁	1.2032	0.1324	1.0708	89.00	
	R ₂	1.0775	0.1130	0.9645	89.51	
T ₆	R ₃	1.1965	0.1142	1.0823	90.46	90.00
	R ₄	1.0165	0.1021	0.9144	89.96	
	R ₅	1.2674	0.1133	1.1541	91.06	
	R ₁	1.1275	0.1012	1.0263	91.02	
	R ₂	1.2213	0.1198	1.1015	90.19	
T ₇	R ₃	1.0974	0.1086	0.9888	90.10	90.14
	R ₄	1.2532	0.1132	1.1400	90.97	
	R ₅	1.0234	0.1185	0.9049	88.42	

Cuadro 32. Porcentaje de humedad para el rábano en maceta

Rep.	Peso en fresco (g)	Peso en seco (g)	Peso del agua retenido	Humedad (%)	Promedio Humedad (%)
R ₁	2.0237	0.8799	1.1438	56.52	
R ₂	1.7758	0.9846	0.7912	44.55	
R ₃	1.8560	0.8340	1.0220	55.06	52.79
R ₄	2.0965	0.9543	1.1422	54.48	
R ₅	1.9167	0.8946	1.0221	53.33	
R ₁	2.4654	0.8534	1.6120	65.38	
R ₂	2.3756	0.9953	1.3803	58.10	
R ₃	2.6674	0.8839	1.7835	66.86	62.74
R ₄	2.3641	1.1211	1.2430	52.58	
R ₅	2.7802	0.8129	1.9673	70.76	
R ₁	2.2111	0.8469	1.3642	61.70	
R ₂	2.3596	0.9079	1.4517	61.52	
R ₃	2.2790	0.8032	1.4758	64.76	59.10
R ₄	2.2762	1.1041	1.1721	51.49	
R ₅	2.1465	0.9436	1.2029	56.04	
R ₁	2.1636	1.1234	1.0402	48.08	
R ₂	2.0699	0.9622	1.1077	53.51	
R ₃	2.3992	0.7802	1.6190	67.48	56.79
R ₄	2.2672	0.9853	1.2819	56.54	
R ₅	2.0823	0.8675	1.2148	58.34	

R ₁	1.8625	0.7027	1.1598	62.27	
R ₂	2.1474	1.2118	0.9356	43.57	
R ₃	2.2135	1.1696	1.0439	47.16	54.55
R ₄	1.9532	0.7460	1.2072	61.81	
R ₅	2.1873	0.9201	1.2672	57.93	
R ₁	2.1013	0.8201	1.2812	60.97	
R ₂	1.8214	1.1896	0.6318	34.69	
R ₃	1.8753	0.8932	0.9821	52.37	48.31
R ₄	2.0821	1.1248	0.9573	45.98	
R ₅	1.8603	0.9762	0.8841	47.52	
R ₁	1.8212	1.1993	0.6219	34.15	
R ₂	1.5213	0.9227	0.5986	39.35	
R ₃	1.9244	0.8289	1.0955	56.93	44.11
R ₄	1.7913	0.9125	0.8788	49.06	
R ₅	1.9034	1.1216	0.7818	41.07	
R ₁	1.8032	0.8372	0.9660	53.57	
R ₂	1.6324	0.7560	0.8764	53.69	
R ₃	1.3103	0.8062	0.5041	38.47	47.18
R ₄	1.6932	0.9481	0.7451	44.01	
R ₅	1.7931	0.9652	0.8279	46.17	

Anexo B. Determinación de la dosis letal media DL50.

Cuadro 33. Porcentaje de semillas muertas

Tratamientos	Concentraciones	Porcentaje de semillas muertas	total de semillas
T ₀	0	0	15
T ₀	0	0	15
T ₀	0	0	15
T ₀	0	0	15
T ₀	0	0	15
T ₁	1.5	0	15
T ₁	1.5	0	15
T ₁	1.5	0	15
T ₁	1.5	0	15
T ₁	1.5	0	15
T ₂	3.125	0	15
T ₂	3.125	0	15
T ₂	3.125	0	15
T ₂	3.125	0	15
T ₂	3.125	0	15
T ₃	6.25	0	15
T ₃	6.25	0	15
T ₃	6.25	0	15
T ₃	6.25	0	15

T ₃	6.25	0	15
T ₄	12.5	0.6	15
T ₄	12.5	0	15
T ₄	12.5	0	15
T ₄	12.5	0	15
T ₄	12.5	0	15
T ₅	25	0.6	15
T ₅	25	0	15
T ₅	25	0.31	15
T ₅	25	0	15
T ₅	25	0.31	15
T ₆	50	0.31	15
T ₆	50	0.31	15
T ₆	50	0	15
T ₆	50	0.13	15
T ₆	50	0	15
T ₇	100	0.23	15
T ₇	100	0	15
T ₇	100	0.31	15
T ₇	100	0.31	15
T ₇	100	0.31	15

Cuadro 34. Desempeño de Predicción para las semillas de rábano

Punto de Corte	CIERTO	FALSO	Total
0.0	100.00	0.00	9.32
0.05	100.00	55.14	59.32
0.1	51.21	77.70	75.22
0.15	31.10	89.41	83.97
0.2	31.10	89.41	83.97
0.25	31.10	89.41	83.97
0.3	0.00	100.00	90.67
0.35	0.00	100.00	90.67
0.4	0.00	100.00	90.67
0.45	0.00	100.00	90.67
0.5	0.00	100.00	90.67
0.55	0.00	100.00	90.67
0.6	0.00	100.00	90.67
0.65	0.00	100.00	90.67
0.7	0.00	100.00	90.67
0.75	0.00	100.00	90.67
0.8	0.00	100.00	90.67
0.85	0.00	100.00	90.67
0.9	0.00	100.00	90.67
0.95	0.00	100.00	90.67
1.0	0.00	100.00	90.67

Cuadro 35. Desarrollo de la dosis letal media para semillas de rábano

Porcentaje	concentración	LC Inferior 95.0%	LC Superior 95.0%
		Límite Conf.	Límite Conf.
0.1	-68.0425	-244.3	-20.639
0.5	-16.1493	-118.074	15.0084
1	9.01794	-59.2141	34.6543
2	36.5169	-1.57739	62.7968
3	53.9641	26.513	89.1303
4	67.0889	42.3959	114.188
5	77.7649	52.9775	136.909
6	86.8519	60.9483	157.284
7	94.8194	67.4236	175.662
8	101.953	72.9367	192.402
9	108.441	77.778	207.799
10	114.414	82.1221	222.085
15	139.14	99.3556	281.983
20	158.793	112.535	330.105
25	175.652	123.637	371.595
30	190.793	133.5	408.961
35	204.823	142.575	443.651
40	218.136	151.141	476.613
45	231.017	159.397	508.537

50	243.692	167.496	539.977
55	256.368	175.575	571.438
60	269.249	183.767	603.425
65	282.562	192.219	636.502
70	296.592	201.111	671.374
75	311.732	210.693	709.021
80	328.592	221.35	750.956
85	348.244	233.755	799.853
90	372.971	249.344	861.396
91	378.943	253.107	876.263
92	385.431	257.193	892.415
93	392.565	261.685	910.176
94	400.533	266.7	930.015
95	409.62	272.418	952.642
96	420.296	279.134	979.228
97	433.421	287.387	1011.92
98	450.868	298.354	1055.37
99	478.367	315.631	1123.88
99.5	503.534	331.434	1186.58
99.9	555.427	363.998	1315.89

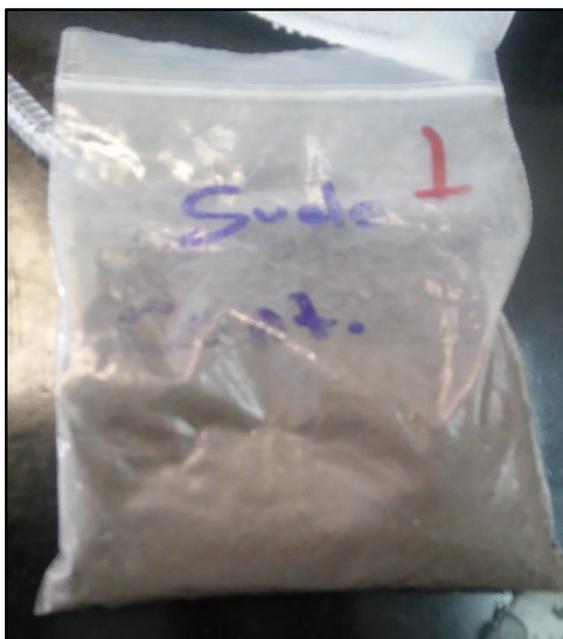


Figura 19. Muestra de suelo contaminado por hidrocarburo.



Figura 20. Preparación con diclorometano para la extracción del hidrocarburo



Figura 21. Extracción de Soxhlet del suelo contaminado.



Figura 22. Medición del pH para el suelo contaminado.



Figura 23. Concentración de extracto de hidrocarburo para realizar los ensayos.



Figura 24. Sembrado de las semillas de rebano en las placas Petri.



Figura 25. Sembrado de las semillas de rabano en macetas.



Figura 26. Crecimiento de los rábanos en macetas a condiciones luz.



Figura 27. Crecimiento de las plántulas de rábano en placa Petri.



Figura 28. Medición de las plántulas de rábano.



Figura 29. Pesado de las plántulas de rábano.



Figura 30. Secado de las plántulas de rábano