

EVALUACIÓN INICIAL DE LA TOXICIDAD DEL HEXACLOROCICLOHEXANO EN PLANTAS: CRECIMIENTO EN DISOLUCIÓN NUTRIENTE CONTAMINADA

R. Calvelo Pereira, M. C. Monterroso Martínez, F. Macías.

Laboratorio de Tecnología Ambiental. Instituto de Investigaciones Tecnológicas. Universidad de Santiago de Compostela, 15782-Santiago de Compostela, Spain

E-mail contacto: roberto.calvelo@usc.es

RESUMEN: 13 especies vegetales de interés económico y/o agrícola se han utilizado en la selección inicial de plantas candidatas a ser empleadas en ensayos de fitocorrección. Se ha llevado a cabo un experimento, en condiciones controladas, de crecimiento en disolución nutriente contaminada con una mezcla heterogénea de los isómeros principales de hexaclorociclohexano (α -, β -, γ - y δ -HCH). Se han detectado diferencias entre el tratamientos (CONTROL vs. HCH): modificaciones de la arquitectura de la planta, alteraciones de la fisiología (transpiración), reducción de la productividad (biomasa seca). Todas las plantas sufrieron estrés, si bien existen respuestas distintas según la especie vegetal considerada. *Triticum aestivum* L., *Hordeum vulgare* L., *Avena sativa* L., *Brassica* sp., y *Phaseolus vulgaris* L son capaces de mitigar los efectos negativos del HCH, adquiriendo cierta resistencia. Estas especies tolerantes, serían *a priori* las idóneas para continuar con ensayos de toxicidad de HCH.

Palabras clave: lindano, toxicidad en planta, fitocorrección.

ABSTRACT: 13 plant species of economic and/or agricultural interest has been used in an initial step of selection of best candidates of using in further phytoremediation studies. This article describes a greenhouse experience of plants growing in hydroponic systems contaminated with an heterogeneous mixture of main isomers of hexachlorocyclohexane (α -, β -, γ - y δ -HCH). It was found difference between treatments (CONTROL vs. HCH): modifications of plant architecture, altered physiology (respiration), fall of productivity (dry biomass). All plants were stressed, but the response is dependent upon plant species considered. *Triticum aestivum* L., *Hordeum vulgare* L., *Avena sativa* L., *Brassica* sp., and *Phaseolus vulgaris* L were able of alleviate negative effects of HCH, achieving resistance. These tolerant plants would be, *a priori*, ideal to following studies of HCH toxicity.

Key words: lindane, plant toxicity, phytoremediation.

INTRODUCCIÓN

La producción de pesticidas e insecticidas ha revolucionado las técnicas agrícolas, aumentando la productividad, desde la década de 1930. Los pesticidas organoclorados, biocidas muy selectivos, han sido muy utilizados (Turnbull, 1996). Estos compuestos son introducidos en los ecosistemas de modos diversos: aplicación directa (agricultura), control de plagas en bosques o seres humanos, depósito de residuos de producción, manejo inadecuado del stock de producto

comercial almacenado, etc. Esta acumulación constituye un problema ambiental a causa de la distribución entre ecosistemas a través del agua y el aire, interaccionando asimismo con los suelos (Rosen y Kraybill, 1966). Dada la gran persistencia en el ambiente y la posible toxicidad en plantas, animales y ser humano de muchas de estas sustancias, su producción y uso se han regulado desde la década de 1970 (Breivik *et al.*, 1999). Actualmente, los pesticidas más peligrosos se consideran Compuestos Orgánicos Persistentes (COPs), sometidos a una legislación restrictiva

(Reglamento CE, 850/2004¹).

Del hexaclorociclohexano (HCH, 1-,2-,3-,4-,5-,6-hexaclorociclohexano); existen 8 isómeros. Es un pesticida organoclorado considerado como COP, utilizado en todo el mundo durante gran parte del siglo XX (Vijgen, 2006). El HCH es un compuesto tóxico para animales y el ser humano (Willet *et al.*, 1998). Este pesticida se comercializó inicialmente como una mezcla de los principales isómeros del HCH (α -, β -, γ - y δ -HCH en proporciones variables: HCH técnico (Vijgen, 2006). El isómero γ -HCH es el responsable de las propiedades insecticidas; al enriquecer el HCH técnico en γ -HCH, se obtiene el lindano (aprox. 99% γ -HCH) (WHO, 1991, 1992). El lindano se ha utilizado durante los últimos 50 años para el control de plagas, tratamiento de la madera e incluso aplicaciones médicas, lo que ha causado una entrada reiterada de estos compuestos en el ambiente, contaminando aguas, suelos, vegetación y animales, amenazando la cadena alimenticia humana (Orchard *et al.*, 2000).

El HCH se acumula en los suelos y sedimentos de modo preferente, adsorbiéndose; su comportamiento está influenciado por diversos factores (pH, temperatura, potencial redox), que afectan a los microorganismos capaces de degradar estos compuestos (Siddique *et al.*, 2002; Courdouan *et al.*, 2004). Por otro lado, el HCH interactúa con la vegetación, capaz de acumularlo a través del sistema radicular y las hojas por mecanismos diferentes (Calvelo Pereira *et al.*, 2006,2008). La interacción con las raíces tiene lugar a través de la solución del suelo, que actúa de medio de transporte para el contaminante (ruta suelo→planta). No obstante, la presencia del HCH en medio

acuoso puede causar problemas de toxicidad sobre la biota del suelo: los lixiviados de los residuos de la fabricación de estos compuestos han sido caracterizados como inhibidores del crecimiento bacteriano (USC, 2003).

El HCH puede causar toxicidad en diferentes especies vegetales, alterando la tasa de germinación, la fisiología de la plántula, provocando daños a nivel molecular (ADN) (Hopkins, 1952; Selim *et al.*, 1970; Bidlan *et al.*, 2004). No se conocen estudios que se centren en la toxicidad del HCH sobre plantas de importancia económica, si bien existen estudios en cultivo hidropónico (disolución nutriente) diseñados para la evaluación de la bioacumulación y retención del HCH en especies vegetales (Li *et al.*, 2002; Marcacci, 2004). La fitotoxicidad puede afectar a la producción vegetal y a la calidad del cultivo, al alterar parámetros como la transpiración y la producción-reparto de biomasa seca (Trapp *et al.*, 2000; Fitter y Hay, 2002;). Una aproximación para conocer la toxicidad del HCH es caracterizar el grado de estrés que produce en las plantas, dependiente de la especie vegetal, el estado de crecimiento, la cantidad de biomasa o la densidad de individuos (Lichtenthaler, 1998; Lambers *et al.*, 1998). En esto también influye el potencial de absorción del contaminante, la reactividad bioquímica y la dosis (Campanella y Perrin, 1997; Medina *et al.*, 2003).

En la actualidad el desarrollo de técnicas de fitocorrección para proceder a la retirada efectiva de HCH de los suelos contaminados ha cobrado gran relevancia (Mackova *et al.*, 2006). La presencia de las plantas y su aprovechamiento como sumidero de contaminación y además estimuladora de actividad de la rizosfera, es un factor importante para la fitocorrección del HCH (Kidd *et al.*, 2008). Los posibles candidatos para ser empleados en fitocorrección deben ser primero escogidos en base a su resistencia a la presencia de HCH en las más diversas

¹ Reglamento 850/2004, del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, sobre contaminantes orgánicos persistentes y por el que se modifica la Directiva 79/117/CE.

condiciones ambientales (Marcacci *et al.*, 2006). Los estudios en cultivos hidropónicos facilitan el uso de ambientes simplificados para proyectar la toxicidad de diferentes compuestos, proporcionando alta sensibilidad (Gong *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2002).

El **objetivo** de este estudio es evaluar los posibles efectos tóxicos del HCH en 13 especies vegetales de interés agronómico. Se ha elaborado un experimento en disolución nutriente que simula la interacción HCH:planta en el entorno de las raíces; se considera el impacto del contaminante en la fisiología y el crecimiento. Este es el paso inicial del proceso de evaluación de especies vegetales para utilizar las más tolerantes para la fitocorrección de suelos en el Polígono Industrial de Torneiros, (O Porriño, Pontevedra), lugar donde se localizaba una antigua fábrica de producción de lindano (USC, 2003; Calvelo Pereira, 2008).

MATERIALES Y MÉTODOS

Especies vegetales

Se han escogido 13 especies de plantas superiores de características contrastadas (Tabla 1). Por un lado, cuatro monocotiledóneas de la familia Poaceae (grupo importante desde el punto de vista económico; Fletcher *et al.*, 1988): trigo común (*Triticum aestivum* L.), avena común (*Avena sativa* L.), cebada (*Hordeum vulgare* L.) y centeno (*Secale cereale* L.). Por otro lado, nueve dicotiledóneas, dada la mayor presencia de este grupo en condiciones naturales: de la familia Leguminosae (Fabaceae) se seleccionaron la judía común (*Phaseolus vulgaris* L.) y el guisante (*Pisum sativum* L.); se ha incluido una variedad de zanahoria (*Daucus carota* L.) y dos de lechuga (*Lactuca sativa* L.), así como cebolla (*Allium cepa* L.). Finalmente, se han considerado tres dicotiledóneas adicionales: dos variedades locales de nabicol, *Brassica* sp., por su

abundancia en la zona y una solanácea, *Solanum nigrum* L., dada su adaptación local a condiciones de contaminación por HCH (Calvelo Pereira *et al.*, 2006). Las semillas de estas plantas son de origen comercial excepto las de *Solanum nigrum* L., recogidas en el área contaminada de Torneiros. El vertido incontrolado de residuos de la fabricación y formulación de lindano (aprox., 1948-1964; mezcla heterogénea de los isómeros principales de HCH (α -, β -, γ - y δ -HCH) en concentraciones elevadas, ha causado gran contaminación en los suelos y aguas de la zona (USC, 2003; Calvelo Pereira, 2008).

Germinación y desarrollo inicial

Todas las semillas recibieron un tratamiento de limpieza y estimulación de la germinación con base fuerte y etanol (dilución 1:10 con agua ultrapura). Posteriormente se lavaron con abundante agua ultrapura para eliminar los restos de base y alcohol. Las semillas se pusieron a germinar en placas Petri de vidrio sobre papel de filtro humedecido con agua destilada (5 – 10 semillas/placa; 10 – 15 placas/especie). Durante 1-2 semanas se renovó periódicamente el agua, en condiciones estables de temperatura. El período máximo de germinación aceptable se estableció en 14 días, variable en función de la especie (Tabla 1). Algunas plantas de crecimiento muy rápido (*Triticum*, *Secale* o *Lactuca* sp.) pudieron ser utilizadas inmediatamente, gracias a un desarrollo vigoroso de las plántulas. En el caso de *Avena sativa* L., el traslado al cultivo hidropónico tuvo que retrasarse unos días debido a un desarrollo inicial escaso. *Allium* y *Lactuca* sp. (variedad II), por su parte, presentaron una germinación muy baja (<50%; Tabla 1) que las excluyó de fases posteriores del experimento.

En el estado inicial del desarrollo (plántula), los individuos se trasladaron a láminas de poliestireno perforadas para su acomodo en **macetas** (vasos de vidrio; 500

TABLA 1. Condiciones iniciales de germinación en placa y desarrollo posterior del ensayo en disolución nutriente contaminada para todas las especies utilizadas.

Especie	Código	Germinación (%) ¹		DIS ³ (días)	Supervivencia final	
		media	d.s. ²		CONTROL ⁴	HCH ⁵
<i>Triticum aestivum</i> L.	TRI	92	4	41	100	87
<i>Avena sativa</i> L.	AVE	68	10	35	82	65
<i>Hordeum vulgare</i> L.	HOR	76	18	28	100	88
<i>Secale cereale</i> L.	SEC	79	9	30	89	90
<i>Brassica sp.</i>	BRA1	88	10	37	86	92
<i>Brassica sp.</i>	BRA2	82	14	42	67	82
<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	PHA	87	13	31	55	78
<i>Lactuca sativa</i> L.	LAB1	90	7	28	66	68
<i>Daucus carota</i> L.	DAU	77	14	42	29	14
<i>Pisum sativum</i> L. ⁶	PIS	58	27	< 21	-	-
<i>Solanum nigrum</i> L. ⁶	SOL	71	11	< 21	-	-
<i>Allium cepa</i> L. ⁶	ALL	< 50	-	-	-	-
<i>Lactuca sativa</i> L. ⁵	LAB2	< 25	-	-	-	-

¹ máxima germinación en placa; n=10; t=14 días; ² d.s.: desviación estándar. ³ DIS: tiempo total de permanencia en disolución nutriente; ⁴ n variable entre 3 y 6; ⁵ n variable entre 2 y 6; ⁶ especies finalmente no utilizadas en el ensayo de crecimiento en contaminación.

a) aclimatación



b) experimento

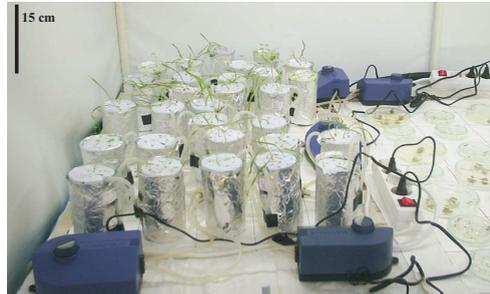


FOTO 1. Aspecto general de las macetas de vidrio del tratamiento CONTROL y el tratamiento HCH en la cámara de cultivo. La flecha indica la colocación de las bombas que mantienen el flujo de oxígeno en las macetas.

ml.) rellenos con **disolución nutriente** (Foto 1). Las plántulas de tamaño y desarrollo similares fueron separadas, colocadas en grupos al azar y asignadas, nuevamente al azar, a cada maceta; un mínimo de tres grupos de plantas se reservaron para la toma de medidas del momento inicial. Todos los grupos considerados estaban compuestos por

el mismo número de plantas. El poliestireno evitaba el contacto en la disolución nutriente y la parte aérea de las plantas. Cada vaso de vidrio individual fue recubierto por papel de aluminio para evitar el paso de la luz y la contaminación por presencia de algas. Las disoluciones se agitaron de modo continuo para facilitar la aireación, mediante el uso de

bombas. Todas las plantas se dejaron crecer en estas condiciones durante un período mínimo de 14 días.

La **disolución nutriente** se obtuvo a partir de disoluciones de reserva de macro y micronutrientes, cuya composición esencial fue (μM): 2000 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1000 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 250 NH_4NO_3 , 50 KH_2PO_4 , 200 NaOH , 150 KCl , 25 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 20 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 15 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 15 FeEDTA , 10 H_3BO_3 , 0.0143 $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. Inicialmente se prepararon disoluciones madre de mayor concentración (100 veces en el caso de los macronutrientes; 1000 veces en el caso de los micronutrientes), que luego se diluyeron para alcanzar los valores indicados (Kidd *et al.*, 2004).

Ensayo de crecimiento en condiciones de contaminación

Después de un período que oscilaba entre 14 y 29 días creciendo en disolución nutriente, las plántulas de tamaño y aspecto similares se colocaron en nuevas **macetas** de vidrio (2 - 6 individuos/maceta; distribución al azar): la mitad de las macetas con **disolución nutriente normal** (tratamiento **CONTROL**) y la mitad con **disolución nutriente contaminada** (tratamiento **HCH**). Para evaluar la transpiración en ausencia de plantas, se preparó un tratamiento **BLANCO**, con vasos de vidrio con disolución nutriente (sin HCH y con HCH; control sin planta).

En el **tratamiento HCH**, la disolución nutriente se contaminó con una mezcla heterogénea de residuos de HCH (α , 77%, β , 16%, γ , 5%, y δ , 2%), recogido en O Porriño (Calvelo Pereira, 2008). Se ha considerado la solubilidad acuosa de cada isómero (mg L^{-1}): α , 1.6; β , 0.32; γ , 6.20; δ , 9 (Manz *et al.*, 2001). Las mezclas contaminadas se agitaron durante dos días en periodos de ocho horas con intervalos de reposo de similar duración, para favorecer la disolución total del residuo en polvo. La disolución saturada

se hizo pasar a través de un filtro de fibra de vidrio para retirar restos sólidos. En función de la distribución de cada isómero en el residuo original y la solubilidad acuosa, la **concentración final** de cada isómero en la disolución contaminada fue (mg L^{-1}): α , 1.6; β , 0.32, γ , 1.8; δ , 0.7 (Calvelo Pereira, 2008). Todo el material de vidrio utilizado se lavó previamente con metanol para minimizar la pérdida del contaminante por adsorción (Concha Graña, 2004).

En todos los tratamientos, las disoluciones se agitaron de modo continuo para facilitar la aireación y evitar toxicidad por ausencia de oxígeno (flujo proporcionado por bombas; Foto 1), en un nivel bajo para reducir la posible pérdida de HCH por evaporación. La disolución se cambiaba de modo regular en ambos tratamientos durante todo el período de estudio, evitando las oscilaciones en la concentración del HCH. La parte aérea y la raíz se encontraban separadas por una lámina de poliestireno. Las macetas se colocaron en una cámara de crecimiento (temperatura: 17-24 °C; fotoperíodo: 16 horas de iluminación, 8 horas de oscuridad). Se utilizaron 6 réplicas para cada especie y tratamiento, distribuidos al azar (Foto 1). El ensayo duró 14 días; *Pisum* y *Solanum*, presentaron una adaptación negativa a la disolución nutriente (datos no mostrados), descartándose para la discusión de los resultados.

El **pH** de la disolución se monitorizó al inicio y al final del experimento. El valor medio de pH fue ligeramente distinto entre tratamientos al principio del ensayo (CONTROL, pH 6.3 ± 0.1 ; HCH, pH 7.1 ± 0.1). Al finalizar el período de contaminación, los valores de pH descendieron ligeramente en ambos tratamientos (CONTROL, pH final 5.9 ± 0.2 ; HCH, pH final 6.8 ± 0.1). Las especies vegetales respondieron de modo muy diferente a las condiciones de crecimiento. Esto podría estar relacionado con las condiciones de pH de la disolución

nutriente (6.3) que podría actuar como factor limitante al crecimiento de algunas especies. En la preparación de la disolución, se optó por mantener constante el pH y no modificarlo, ya que un valor alto favorece mucho la destrucción del HCH a causa de hidrólisis, reduciendo considerablemente la vida media de los diferentes isómeros de HCH en disolución acuosa por encima de pH 9 (Siddique *et al.*, 2002; Ngabe *et al.*, 1993; Mackenzie *et al.*, 2005)

Toma de muestras; medidas

Durante todo el período de crecimiento en maceta se tomaron medidas de **transpiración**, por diferencia de peso cada 4-7 días (T , g de disolución perdida hora⁻¹ planta⁻¹; se ha calculado con respecto al tratamiento BLANCO; Vose *et al.*, 2003).

Para una correcta evaluación del efecto tóxico del HCH es necesario normalizar los datos de transpiración: con respecto a la transpiración inicial dentro cada tratamiento, por un lado, y un tratamiento con respecto al otro, por otro lado. Para ello se utiliza la **Transpiración Relativa Normalizada** (Ucisik *et al.*, 2007), calculada como:

$$TRN = \left(\frac{1/m \left(\frac{T_1(HCH, t_x)}{T_1(HCH, t_0)} + \frac{T_2(HCH, t_x)}{T_2(HCH, t_0)} + \dots + \frac{T_n(HCH, t_x)}{T_n(HCH, t_0)} \right)}{1/m \left(\frac{T_1(CONTROL, t_x)}{T_1(CONTROL, t_0)} + \frac{T_2(CONTROL, t_x)}{T_2(CONTROL, t_0)} + \dots + \frac{T_n(CONTROL, t_x)}{T_n(CONTROL, t_0)} \right)} \right)$$

siendo: T la transpiración (g hora⁻¹ planta⁻¹), HCH tratamiento contaminado, CONTROL tratamiento sin contaminación, t_0 el inicio del experimento, t_x el tiempo en el momento x , n y m el número de réplicas para plantas contaminadas y no contaminadas respectivamente. La TRN de los controles es siempre 1; valores inferiores a 1 se consideran como una indicación de la inhibición de la transpiración.

La **Eficiencia de la Producción en el Uso del Agua** (cociente entre la materia seca y el agua transpirada durante el período de

crecimiento; mg g⁻¹) se utiliza como índice de estrés químico y medida de efectos subletales en plantas (Trapp *et al.*, 2000).

Una vez finalizado el ensayo (14 días; tratamiento CONTROL y tratamiento HCH; Tabla 1), las plantas fueron cosechadas. Se llevó a cabo una inspección visual cualitativa para evaluar el crecimiento óptimo de las plantas (aspecto de tallo, hojas y raíces, presencia o ausencia de tejidos decolorados o necróticos, etc.). Se midió la longitud del tallo más largo y de la raíz mas larga y se tomaron medidas adicionales (número de hojas, longitud de ramas). El material vegetal se separó (raíces, tallos y hojas), lavó con agua destilada y se determinó el peso fresco y el peso seco (al aire). Estas medidas se habían tomado previamente, en el momento del traslado inicial a las macetas (paso a la disolución nutriente, sin contaminante). Tres réplicas adicionales se utilizaron para tomar medidas de de peso fresco y peso seco (al aire) y ver la variación de biomasa durante el periodo de cultivo en solución nutritiva.

Estadística

Se ha realizado un contraste de medias, test t de Student, entre el tratamiento CONTROL y HCH. Se han calculado también la correlación y en su caso el análisis de regresión lineal entre las diferentes variables.

RESULTADOS

Aspectos cualitativos de la toxicidad del HCH

El desarrollo en disolución hidropónica fue relativamente óptimo en el tratamiento CONTROL; la aclimatación a la disolución nutriente se modificó con el tiempo en ambos tratamientos (Tabla 1). En el caso de *Lactuca* sp. y *Daucus caota* L., el número de plantas que finalmente pudieron ser utilizadas en el ensayo de contaminación fue bajo, mostrando un impacto negativo en el crecimiento en la disolución nutriente (Tabla 1).

a) CONTROL



b) HCH

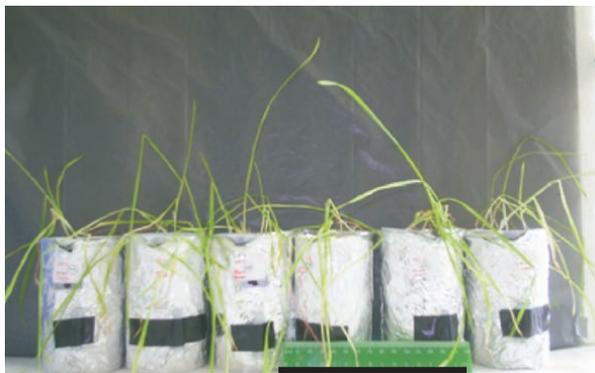
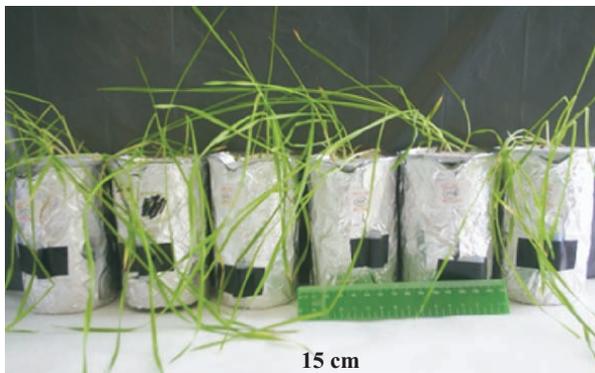
Brassica*Secale*

FOTO 2. Aspecto general de dos especies al finalizar el tratamiento sin contaminar (CONTROL) y el tratamiento contaminado (HCH). SEC es *Secale cereale* L.; BRA2 es *Brassica* sp.

En general, el aspecto de las plantas sometidas al tratamiento CONTROL es más vigoroso que el de las plantas con tratamiento HCH (Foto 2). En las macetas contaminadas con HCH el número de hojas y/o ramas tiende a reducirse (datos no mostrados). Por otra parte, la proporción de hojas que mostraban signos de necrosis aumentaba. Las raíces de las plantas sumergidas durante un período de 14 días en disolución contaminada con HCH son generalmente más cortas y gruesas, aunque no necesariamente en un número menor (Foto 3; indicado por una flecha). Todos estos efectos, por regla general, son más evidentes en las plantas monocotiledóneas estudiadas (*Triticum*, *Avena*, *Hordeum* y *Secale*).

Transpiración y transpiración relativa

En este experimento, se asume que justo en el momento de proceder al cambio de disolución nutriente limpia por disolución contaminada con HCH, las plantas están perfectamente adaptadas al cultivo hidropónico. En términos generales, los valores de transpiración son diferentes para cada una de las plantas utilizadas, pero en el rango $1 - 3 \text{ g h}^{-1} \text{ planta}^{-1}$ (Figura 1). Hay un aumento de la transpiración con el tiempo, variable entre tratamientos. *Lactuca* y *Daucus* muestran una elevada transpiración en el tratamiento CONTROL ($> 3 \text{ g h}^{-1} \text{ planta}^{-1}$; Figura 1). En el resto de

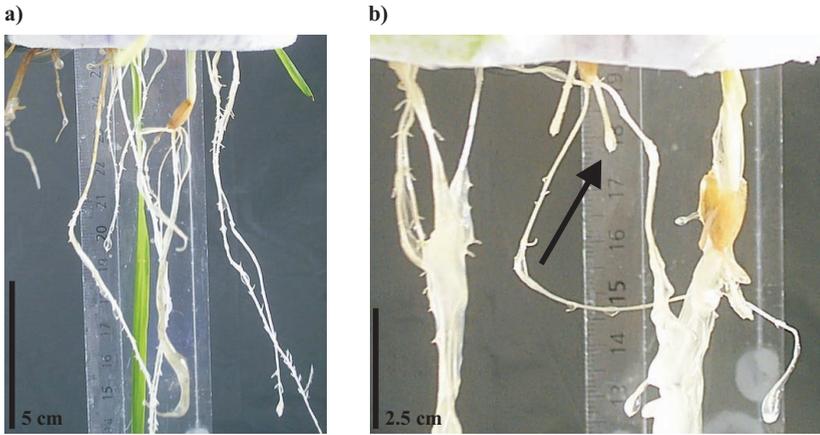


FOTO 3. Detalle de raíz no contaminada y raíz contaminada de la misma especie (*Avena sativa* L.). La flecha señala una zona de raíces de morfología alterada.

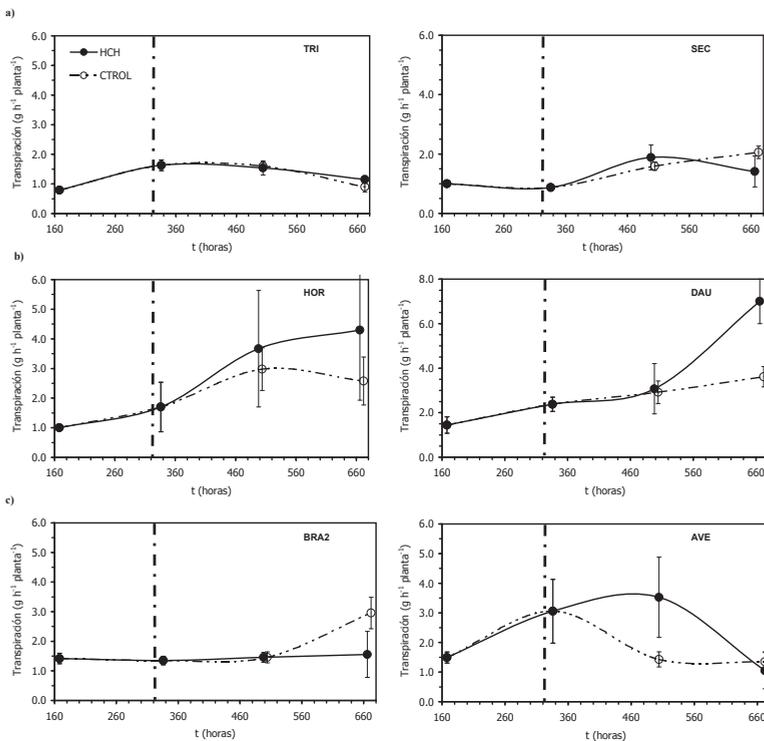


FIGURA 1. Transpiración absoluta (T , $\text{g hora}^{-1} \text{ planta}^{-1}$) de las especies vegetales (HCH: tratamiento HCH; CTROL: tratamiento CONTROL). a): *Triticum aestivum* L. (TRI) y *Secale cereale* L. (SEC); b): *Hordeum vulgare* L. (HOR) y *Daucus carota* L. (DAU); c) variedad 2 de *Brassica* sp. (BRA2) y *Avena sativa* L. (AVE). Se representa el valor medio \pm error estándar. El inicio del experimento se indica por una barra vertical discontinua. La escala de tiempo se ha recalculado a partir del fin del experimento.

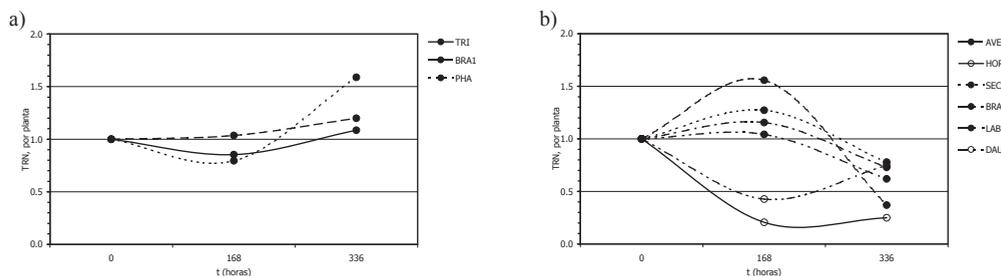


FIGURA 2. Transpiración Relativa Normalizada (TRN, adimensional, planta⁻¹) de las especies vegetales. Se representan los valores medios a lo largo del período del experimento (14 días). a): *Triticum aestivum* L. (TRI), variedad 1 de *Brassica* sp. (BRA1) y *Phaseolus vulgaris* L. (PHA); b): *Avena sativa* L. (AVE), *Hordeum vulgare* L. (HOR), *Secale cereale* L. (SEC); variedad 2 de *Brassica* sp. (BRA2), *Lactuca sativa* L. (LAB) y *Daucus carota* L. (DAU).

especies, el tratamiento CONTROL no eleva la transpiración y en ocasiones se constata un valor muy bajo (*Phaseolus*: <1.5 g h⁻¹ planta⁻¹); el resto de especies presentan valores intermedios; Figura 1).

Al comparar entre si los tratamientos (HCH vs. CONTROL) *Triticum*, *Secale*, *Lactuca*, *Brassica* sp. (variedad 1) y *Phaseolus* no muestran gran diferencia en el valor medio de la transpiración (Figura 1a). Por otro lado, en *Hordeum* y *Daucus*, el tratamiento HCH provoca un aumento de la transpiración media (no significativo a P<0.05; Figura 1b). Por su parte, en el caso de la variedad 2 de *Brassica* sp., las macetas CONTROL son las que muestran una transpiración mayor que las macetas HCH (aprox. 3 g h⁻¹ planta⁻¹ frente a 1.5 g h⁻¹ planta⁻¹). *Avena* presenta un comportamiento particular: la transpiración en el tratamiento HCH sufre un aumento inicial, para luego descender (Figura 1c).

La Transpiración Relativa Normalizada, TRN, al finalizar el ensayo, es muy variable, (entre 0.2 y 1.6; Figura 2). Por un lado, *Triticum*, la variedad 1 de *Brassica* y *Phaseolus* presentan valores de TRN>1 al final del ensayo y tendencia al ascenso (Figura 2a). El resto de especies vegetales muestran un valor de TRN<1, si bien con evolución contrapuesta (Figura 2b). *Avena*,

Secale, la variedad 2 de *Brassica* y *Lactuca*, a pesar del aumento inicial de TRN, con el paso del tiempo, muestran un descenso de la transpiración relativa; en el caso de *Hordeum* y *Daucus*, el valor de TRN tiende a ascender con claridad (Figura 2b).

Elongación

Se ha constatado un descenso relativo de la longitud de la raíz más larga en el tratamiento HCH, llegando incluso hasta un 40% con respecto al tratamiento CONTROL. Las especies vegetales utilizadas presentan una disminución en el tamaño del tallo más largo, si bien no parece una tendencia tan clara (máximo descenso: hasta un 20%, tratamiento HCH, *Hordeum*; Figura 3). Se diferencian dos grupos de plantas en función de la respuesta de la elongación de los tejidos vegetales. Por un lado, *Triticum*, *Avena*, *Hordeum* y *Secale* presentan un comportamiento uniforme, caracterizado por el descenso moderado de la longitud del tallo y el descenso más acusado de la longitud de las raíces (significativo; P<0.05; Figura 3). Por su parte, *Brassica* sp., *Phaseolus*, *Lactuca* y *Daucus* si bien muestran un descenso de la longitud relativa, la diferencia entre tratamientos no es, en general, significativa (P<0.05) (Figura 3).

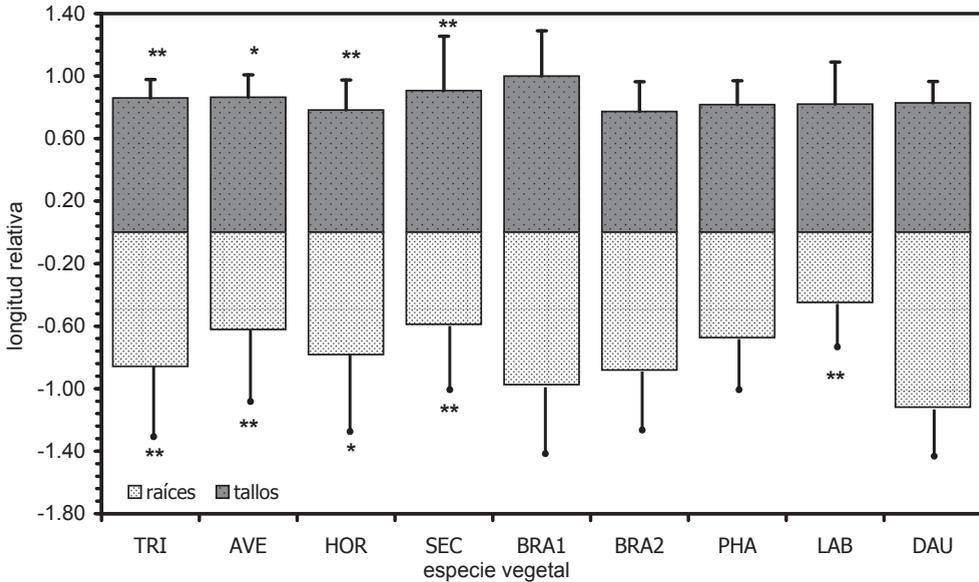


FIGURA 3. Variación de la longitud de tallo y raíz con respecto al tratamiento CONTROL (longitud tallo o raíz HCH / longitud tallo o raíz CONTROL; adimensional) en las especies vegetales. Las barras se corresponden con la desviación estándar. * diferencia significativa a $P < 0,05$; ** diferencia significativa a $P < 0,001$. TRI, *Triticum aestivum* L.; AVE, *Avena sativa* L.; HOR, *Hordeum vulgare* L.; SEC, *Secale cereale* L.; BRA1, BRA2, *Brassica* sp.; PHA, *Phaseolus vulgaris* L.; LAB, *Lactuca sativa* L.; DAU, *Daucus carota* L.

Biomasa: producción y reparto

En general, las macetas del tratamiento HCH presentan valores medios de biomasa total más bajos. No obstante, dada la gran variabilidad, las diferencias no son estadísticamente significativas, salvo en el caso de *Secale* (CONTROL, valor medio: 24 mg planta⁻¹; HCH, valor medio: 17 mg planta⁻¹; $P < 0,05$; Tabla 2). En el caso de *Lactuca* la presencia de HCH ocasiona un aumento de la biomasa total; en *Phaseolus* se detectó un descenso de producción en el tratamiento HCH (descenso del crecimiento – crecimiento negativo) (Tabla 2).

La acumulación de biomasa seca en las raíces de *Brassica*, *Lactuca*, y *Daucus* es mayor en el tratamiento HCH (p. ej., *Lactuca*: CONTROL, valor medio: 0.5 mg

planta⁻¹; HCH, valor medio: 0.8 mg planta⁻¹; diferencia no significativa a $P < 0,05$; Tabla 2). Por su parte, las plantas del tratamiento HCH acumulan menos biomasa seca en la parte aérea. En el caso de *Secale*, el descenso de biomasa seca es significativo: tratamiento CONTROL, valor medio: 20 mg planta⁻¹, tratamiento HCH, valor medio: 16 mg planta⁻¹ ($P < 0,05$; Tabla 2).

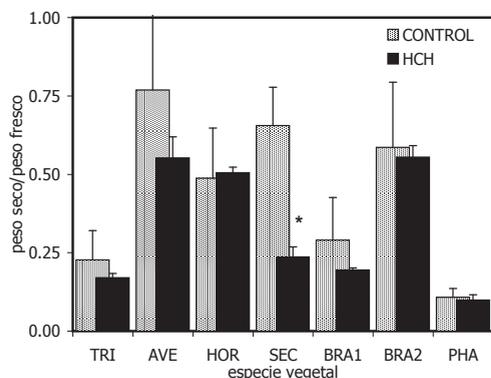
Al considerar el cociente biomasa seca/biomasa fresca, las raíces presentan valores más altos que en la parte aérea, independientemente del tratamiento; hay un descenso del cociente con el tratamiento HCH (*Secale*, diferencia significativa, $P < 0,001$; Figura 4). En la biomasa aérea, el valor de este cociente es más constante; en *Triticum* y *Hordeum*, hay un aumento significativo en el tratamiento HCH ($P < 0,05$; Figura 4).

TABLA 2. Incremento total de biomasa (mg planta⁻¹, peso seco; valor medio, n varía entre 2 y 6) durante el experimento, teniendo en cuenta toda la planta (Total), y los tejidos considerados (Raíz y Parte aérea), en función del tratamiento aplicado (CONTROL y HCH). TRI es *Triticum aestivum* L.; AVE es *Avena sativa* L.; HOR es *Hordeum vulgare* L.; SEC es *Secale cereale* L.; BRA1 y BRA2 son las dos variedades de *Brassica sp.*; PHA es *Phaseolus vulgaris* L.; LAB es *Lactuca sativa* L.; DAU es *Daucus carota* L.

Especie	BM total				BM raíz				BM parte aérea			
	CONTROL		HCH		CONTROL		HCH		CONTROL		HCH	
	media	d.s. ¹	media	d.s.	media	d.s.	media	d.s.	media	d.s.	media	d.s.
TRI	48.9 ± 19.6		33.3 ± 5.3		7.4 ± 5.7		5.0 ± 1.7		41.5 ± 14.1		28.3 ± 3.7	
AVE	16.4 ± 6.5		13.6 ± 1.9		3.0 ± 1.2		2.6 ± 0.8		13.4 ± 5.7		11.0 ± 1.3	
HOR	18.4 ± 5.2		14.0 ± 3.6		1.4 ± 1.0		0.5 ± 0.6		17.0 ± 4.6		13.5 ± 3.2	
SEC	23.6 ± 4.2		17.5 ± 3.8	*	3.4 ± 1.1		1.8 ± 0.6	*	20.2 ± 3.4		15.7 ± 3.4	*
BRA1	14.0 ± 4.3		13.6 ± 4.0		1.3 ± 0.2		1.6 ± 0.6		12.6 ± 4.1		12.0 ± 3.4	
BRA2	32.1 ± 9.6		24.1 ± 7.2		4.4 ± 1.4		3.4 ± 0.5		27.6 ± 8.3		20.7 ± 6.8	
PHA	6.2 ± 17.3		-3.5 ± 23.5		-4.0 ± 1.5		-3.2 ± 4.5		10.2 ± 16.1		-0.3 ± 19.0	
LAB	1.8 ± 0.9		3.0 ± 0.4		0.5 ± 0.2		0.8 ± 0.1	*	1.4 ± 0.9		2.2 ± 0.3	
DAU	4.4 ± 0.8		4.0 ± -		0.5 ± 0.2		0.9 ± -		3.9 ± 0.5		3.1 ± -	

¹ desviación estándar; * diferencia CONTROL-HCH significativa a P<0.05.

RAÍZ



PARTE AÉREA

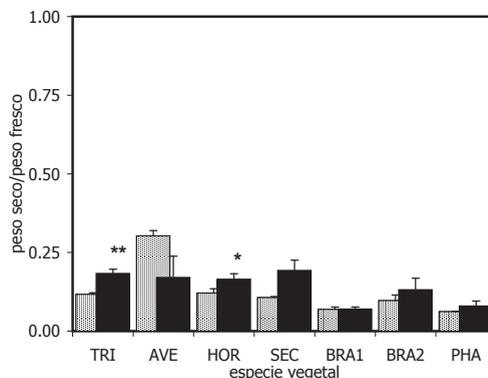
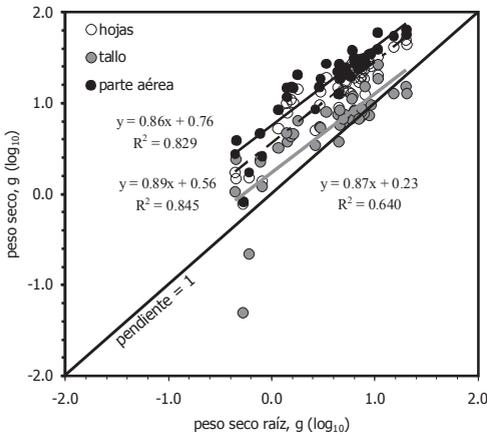


FIGURA 4. Variación del cociente peso seco/peso fresco en las especies vegetales consideradas. * diferencia significativa a P<0.05; ** diferencia significativa a P<0.001. TRI es *Triticum aestivum* L.; AVE es *Avena sativa* L.; HOR es *Hordeum vulgare* L.; SEC es *Secale cereale* L.; BRA1 y BRA2 son las dos variedades de *Brassica sp.*; PHA es *Phaseolus vulgaris* L.

a) CONTROL



b) HCH

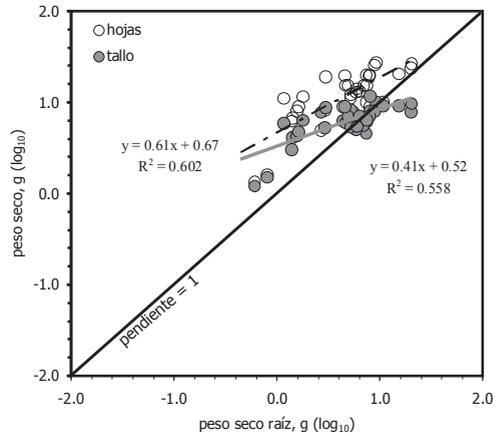


FIGURA 5. Relación entre biomasa seca raíz y los diferentes tejidos aéreos (hojas, tallos y parte aérea como hojas+tallos) para el conjunto de plantas utilizadas. a) tratamiento CONTROL; b) tratamiento HCH. Unidades: mg planta^{-1} (Log_{10}).

Para ilustrar el **reparto relativo** de la biomasa seca entre los tejidos vegetales, se representa el peso seco de la raíz frente al peso seco de los tejidos aéreos (mg planta^{-1} , escala logarítmica, Log_{10} ; Figura 5). En el tratamiento CONTROL, la correlación entre raíz-hojas, raíz-tallos, y raíz-parte aérea es similar, pudiendo ajustarse una recta común (pendiente: 0.86-0.89; $R^2 > 0.640$; Figura 5). En el tratamiento HCH, existen diferencias entre tejidos. La correlación raíz-tejidos aéreos, cambia; la pendiente del ajuste es inferior, más acusado en el caso de la correlación raíz-tallos (0.41; $R^2 > 0.558$; Figura 5).

Uso eficiente del agua transpirada

Las especies vegetales tienen unos valores medios de Eficiencia de la Producción en el Uso del Agua (EPUA; $\text{mg peso fresco g agua}^{-1}$) que oscilan entre 10.5 y 0.6 (Tabla 3). En general, la EPUA desciende en el tratamiento HCH. En el caso de *Avena*, y las dos especies de *Brassica*, no hay diferencia de los valores de EPUA entre tratamientos. En los casos de *Triticum* ($\text{EPUA}_{\text{CONTROL}}$: 10.6; EPUA_{HCH} : 5 $\text{mg peso fresco g agua}^{-1}$), *Hordeum* ($\text{EPUA}_{\text{CONTROL}}$:

6; EPUA_{HCH} : 2.7 $\text{mg peso fresco g agua}^{-1}$) y *Lactuca*, ($\text{EPUA}_{\text{CONTROL}}$: 0.9; EPUA_{HCH} : 0.3 $\text{mg peso fresco g agua}^{-1}$) la diferencia de los valores medios entre los dos tratamientos es significativa a $P < 0.05$ (Tabla 3).

DISCUSIÓN

Evaluación inicial de la toxicidad

Todas las especies vegetales utilizadas en este experimento han mostrado algún signo de **estrés**, relacionado con la presencia del HCH en la disolución acuosa. No obstante, al contaminar la disolución, el pH se modificó ligeramente. La presencia de las plantas tiende a acidificar las soluciones nutritivas en ambos tipos de reactores, como resultado de su actividad fisiológica; la exudación de ácidos orgánicos es habitual, especialmente en situaciones de estrés (Ramírez-Rodríguez *et al.*, 2005). En este caso, la respuesta sería similar, aunque las diferencias encontradas no se pueden explicar únicamente por la influencia del HCH en el pH de la disolución nutriente, ya que éste no sube de un valor de 7.

La inspección visual de los reactores

TABLA 3. Valores de la Eficiencia de la Producción en el Uso del Agua (EPUA; mg peso fresco g agua⁻¹; media±desviación estándar) para cada una de las especies utilizadas en este experimento, comparando ambos tratamientos. TRI es *Triticum aestivum* L.; AVE es *Avena sativa* L.; HOR es *Hordeum vulgare* L.; SEC es *Secale cereale* L.; BRA1 y BRA2 son las dos variedades de *Brassica sp.*; PHA es *Phaseolus vulgaris* L.; LAB es *Lactuca sativa* L.; DAU es *Daucus carota* L.

Especie	CONTROL		HCH	
	media	d. s. ¹	media	d. s.
TRI	10.55 ± 1.29		5.05 ± 0.62	**
AVE	2.12 ± 1.08		2.26 ± 0.86	
HOR	6.34 ± 1.63		2.73 ± 0.80	*
SEC	3.90 ± 0.64		1.56 ± 0.14	
BRA1	6.19 ± 1.74		6.31 ± 2.04	
BRA2	5.37 ± 1.61		5.42 ± 0.28	
PHA	7.60 ± 3.08		5.09 ± 3.88	
LAB	0.92 ± 0.10		0.32 ± 0.08	**
DAU	0.63 ± 0.41		0.21 ± 0.09	

¹ d. s. desviación estándar; * diferencia CONTROL-HCH significativa a P<0.05; ** diferencia CONTROL-HCH significativa a P<0.001

indica que, en general, la presencia de HCH provoca el desarrollo anormal de las plántulas, aumentando la proporción de tejidos necróticos, reduciendo el número medio de hojas, ramas y raíces por planta. El aspecto de las raíces indica que la actividad fisiológica de los tejidos ha sido alterada. La disposición (“arquitectura”) de las raíces se ha visto afectada, lo que puede tener consecuencias en la nutrición futura del vegetal completo y depende, además, del tipo de planta que se considere (monocotiledónea o dicotiledónea). Las raíces de las plantas monocotiledóneas, *a priori*, parecen ser las más afectadas por el HCH en este experimento (Foto 2; Foto 3). Alteraciones morfológicas similares han sido descritas en disolución hidropónica contaminada con otros pesticidas, incluyendo especies como *Gossypium hirsutum* L. y *Allium cepa* L. (Bayer y col, 1967). La plasticidad de la arquitectura del sistema

radical es muy grande, dependiendo de las condiciones del medio y de la presencia o no de contaminantes; puede estar relacionada con un desequilibrio en la regulación de las fitohormonas (Osmont *et al.*, 2007). El aspecto externo de algunas raíces recuerda al de las raíces proteoides (“cluster”) (Skene, 1998). La modificación de la morfología podría considerarse como una respuesta a un ambiente tóxico, cuya finalidad es aumentar la superficie de absorción para compensar la adquisición de nutrientes (Watt y Evans, 1999, Skene, 2000).

En este experimento, la transpiración de las plantas en presencia de HCH es variable en función de la especie. El HCH provoca estrés y una reducción de la **transpiración absoluta** (*Brassica sp.*); no obstante, otras plantas compensan el estrés aumentando la transpiración (*Hordeum* y *Daucus*). Otros estudios han encontrado que un descenso de

la transpiración se relaciona con la toxicidad de contaminantes orgánicos en disolución acuosa (MTBE, TNT, nitrobenzeno, PAHs), en plantas herbáceas (*Glycine max* L., *Hordeum vulgare* L., *Lactuca sativa* L.) y árboles (*Populus* sp., *Salix* sp.), tanto en condiciones de laboratorio como de campo (Mc Farlane *et al.*, 1990; Thompson *et al.*, 1998; Rubin y Ramaswami, 2001; Thygesen y Trapp, 2002). La tendencia al aumento de la transpiración se puede relacionar con la necesidad de satisfacer la demanda de disponibilidad de agua durante el crecimiento inicial de las plántulas, para facilitar la construcción de nuevos tejidos vegetales (Larcher, 2003).

El uso de la **Transpiración Relativa Normalizada** (TRN) en estudios ambientales es muy reciente, desarrollado por Trapp y sus colaboradores para investigar el efecto de contaminantes orgánicos (diclorofenol, derivados de la gasolina) en árboles del género *Salix*, en suelos y en condiciones de cultivo en disoluciones nutritivas (Trapp *et al.*, 2000, 2001; Trapp y Christiansen, 2003; Ucisik *et al.*, 2007). La variable TRN se ha demostrado como eficaz a la hora de evaluar la toxicidad de la contaminación. En lo que respecta a este experimento se distinguen dos grupos de plantas en función de la TRN. Por una parte, hay especies **tolerantes**, que compensan la transpiración relativa en presencia de HCH (*Triticum*, *Brassica* variedad 1, *Phaseolus*). El resto de plantas, en especial el resto de monocotiledóneas (*Avena*, *Hordeum*, *Secale*), reducen la transpiración relativa con el paso del tiempo, mostrando su **sensibilidad** al considerar este parámetro.

En la actualidad no se conocen estudios que consideren la toxicidad del HCH utilizando la transpiración y la transpiración relativa como herramientas para evaluar la respuesta de las especies vegetales a este contaminante ni en disolución ni en otro tipo de sustrato. Los trabajos que consideran

la toxicidad del HCH en disolución son escasos y poco concluyentes al utilizar un número bajo de especies vegetales; el efecto tóxico se relaciona con el isómero γ -HCH (Hulzebos *et al.*, 1993; Marcacci, 2004). No obstante, no conviene utilizar únicamente estas variables para estudiar la tolerancia/toxicidad del HCH en la vegetación; la fotosíntesis y la transpiración, y con ello la transpiración y el crecimiento, están estrechamente relacionados (Fitter y Hay, 2002). Los fenómenos de clorosis, necrosis, o marchitamiento de las hojas encontrados en este experimento indican interferencias en la fotosíntesis y el transporte de agua (Medina *et al.*, 2003).

ALTERACIONES DEL CRECIMIENTO DE LAS PLANTAS

El **tamaño** de las raíces y los tallos de las plantas ha sido utilizado para la evaluación de la fitotoxicidad en condiciones de crecimiento en suelo o crecimiento en disolución nutriente (Dalvi *et al.*, 1972; Gadallah, 1996). En este estudio, las plantas dicotiledóneas toleran mejor la presencia de HCH en disolución dado que la elongación no se ve tan reducida como en el caso de las monocotiledóneas. La longitud de las raíces es fundamental a la hora de considerar la nutrición de los individuos, al facilitar la exploración del sustrato, así como el sostén, en los suelos. Estas características, además, son especialmente adecuadas para la fitocorrección, al maximizar la capacidad de explotación del sustrato.

La **acumulación** de biomasa seca total al finalizar el experimento no se ve reducida de un modo significativo, si bien la tasa de crecimiento se ralentiza. Las diferencias, se aprecian en la acumulación de biomasa seca (estructural) frente a biomasa fresca (fotosintética). En condiciones de estrés las plantas necesitan mantener su contenido hídrico, de lo que nos informa el cociente peso seco/peso fresco (Huang *et al.*, 2004).

Las plantas monocotiledóneas utilizadas aumentan la acumulación de biomasa seca en la parte aérea en presencia de HCH, reduciendo la capacidad fotosintética. En las plantas dicotiledóneas el aumento biomasa estructural es más moderado. En las raíces, la tendencia es la contraria, al favorecerse la acumulación de biomasa fresca en presencia de HCH para facilitar la adquisición de nutrientes (nuevas raíces, más pequeñas y gruesas).

Para el análisis del **reparto** de biomasa seca entre los tejidos vegetales se han establecido ecuaciones que resumen dichas relaciones (Figura 5). La pendiente, en este tipo de ajustes, se interpreta como el cociente entre las tasas de crecimiento de los tejidos implicados (root weight ratio, $RWR = \text{peso raíz} : \text{peso planta}$; g g^{-1} ; Fitter y Hay, 2002). Un valor teórico de 1 indica que el cociente de las tasas de crecimiento es constante; en caso contrario (pendiente $\neq 1$) dicho cociente será variable a medida que la planta crezca (Evans, 1972; Farrar y Gunn, 1998). Una pendiente inferior a 1 indica la tendencia a un aumento de RWR con el tiempo, facilitando la acumulación de biomasa seca en la raíz. En este estudio, esta es la tendencia que se ha encontrado en el tratamiento CONTROL (pendiente: 0.87-0.89). No obstante, hay un claro descenso en el tratamiento HCH, con una pendiente inferior (0.61-0.41), descompensando así el crecimiento de la parte aérea, especialmente, el tallo. Con el tiempo, se producirá un descenso de la calidad de los tejidos de sostén en la parte aérea de la planta, que afectaría a la fotosíntesis y al desarrollo del vegetal. En este estudio no se han podido detectar diferencias entre las especies analizadas.

El HCH genera un estrés a las plantas de *Triticum*, *Hordeum* y *Lactuca* que tiende a favorecer el transporte de agua frente a la fijación de carbono. La Eficiencia de la Producción en el Uso del Agua (EPUA) permite

examinar como se mantiene la regulación de la transpiración (apertura de estomas) y la adquisición del CO_2 (intercambio de gases), necesario para la fotosíntesis, integrando la aumento acumulativo de materia seca y el consumo de agua durante largos períodos. La cantidad global de C fijado puede disminuir en función de las necesidades hídricas de la planta (Larcher, 2003; Trapp *et al.*, 2000).

Especies tolerantes y especies sensibles: selección inicial

Las especies utilizadas en este experimento están sometidas a un **estrés** de tipo químico provocado por la presencia del HCH, que se puede considerar como fitotóxico. En general la supervivencia no se ve afectada, si bien la toxicidad es acumulativa, actuando en una escala de tiempo mayor (efectos subletales, Newman y Unger, 2003). El crecimiento se altera, reduciendo la elongación de tallos y raíces y retrasando el desarrollo óptimo al disminuir la distribución de la biomasa seca producida durante las primeras semanas, así como el uso eficaz del agua. Las **plantas más sensibles** encontradas en este estudio son *Secale cereale* L., *Lactuca* sp., y *Daucus carota* L. Es necesario tener en cuenta que este experimento no considera la posible toxicidad del contaminante sobre la germinación. No obstante, efectos negativos a diferentes niveles han sido descritos en estudios que analizan la contaminación del HCH en suelos y su impacto sobre las plantas (Selim *et al.*, 1970; Bidlan *et al.*, 2004). Estos trabajos demuestran que el HCH (fundamentalmente el isómero gamma) puede tener un impacto negativo en las plantas, claramente tóxico, inhibiendo el crecimiento. Se han detectado problemas a nivel fisiológico (desajuste de la respiración y fotosíntesis) e incluso molecular (alteraciones del ADN). Los resultados obtenidos en suelos no se pueden extrapolar a condiciones de cultivo hidropónico, pero es factible que el HCH afecte de modo

similar a las plantas estudiadas, considerando que el nivel de contaminación es bajo y el tiempo de ensayo es corto. Asimismo, es posible que hubiese una leve pérdida de HCH por hidrólisis, evaporación, y/o adsorción sobre las superficies celulares de las raíces, disminuyendo la concentración del contaminante (Marcacci, 2004).

Por otro lado, algunas **plantas** se consideran **tolerantes** al HCH en disolución, acumulando menos biomasa seca, mejorando la transpiración relativa, es decir, favoreciendo el crecimiento y la fotosíntesis. Son plantas capaces de soportar las condiciones negativas que el HCH provoca al modificar las respuestas fisiológicas. Con el paso del tiempo, en condiciones naturales, es posible que puedan recuperar las condiciones óptimas, adquiriendo **resistencia** (Larcher, 2003; Medina *et al.*, 2003). En esta situación se encuentran, fundamentalmente, *Avena sativa* L., *Brassica* sp., y *Phaseolus vulgaris* L.

CONCLUSIONES

En este estudio se ha encontrado que, en general, el crecimiento de las plantas en disolución nutriente se ve afectado por la presencia de HCH, especialmente γ -HCH, en bajas concentraciones (1.8 mg L^{-1}). El vigor de todas las especies se ha reducido, afectando a la productividad y supervivencia. El estrés se relaciona con descensos en la transpiración y la eficiencia del uso del agua. Asimismo, el reparto de biomasa se ve alterado. Con el tiempo, se favorece la acumulación de biomasa seca en las raíces para contrarrestar el estrés.

Este experimento ha permitido una selección provisional de especies vegetales aptas para futuros ensayos de fitocorrección de suelos contaminados con HCH. *Avena sativa* L., *Brassica* sp., y *Phaseolus vulgaris* L. los efectos negativos son menos aparentes. Asimismo, se trata de plantas muy

productivas, de elevada tasa de germinación y muy extendidas. Son necesarios nuevos ensayos en suelo contaminado para completar la selección de especies, dado que las condiciones en hidropónico son muy diferentes a situaciones reales de campo. Asimismo, habría que saber si el HCH es absorbido por las plantas.

BIBLIOGRAFÍA

- Bayer, D. E., Foy, C. L., Mallory, T. E., Cutter, E. G. (1967): Morphological and histological effects of trifluralin on root development. *American Journal of Botany* 54, 945-952.
- Bidlan, R., Afsar, M., Manonmani, H. K. (2004): Bioremediation of HCH-contaminated soil: elimination of inhibitory effects of the insecticide on radish and green gram seed germination. *Chemosphere* 56, 803-811.
- Brevik, K., Pacyna, J. M., Munch, J. (1999): Use of α -, β - and γ -hexachlorocyclohexane in Europe, 1970-1996. *The Science of The Total Environment* 239, 151-163.
- Calvelo Pereira, R. (2008): Estudio del comportamiento del hexaclorociclohexano en el sistema suelo-planta para su aplicación en técnicas de fitocorrección. Tesis, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, España.
- Calvelo Pereira, R., Camps-Arbestain, M., Rodríguez Garrido, B., Macías, F., Monterroso, C. (2006): Behaviour of α -, β -, γ -, and δ -hexachlorocyclohexane in the soil-plant system of a contaminated site. *Environmental Pollution* 144, 210-217.
- Calvelo Pereira, R., Monterroso, C., Macías, F., Camps-Arbestain, M. (2008): Distribution pathways of hexachlorocyclohexane isomers in a soil-plant-air system. A case study with *Cynara sco-*

- lymus* L. and *Erica* sp. plants grown in a contaminated site. *Environmental Pollution* 155, 350-358.
- Campanella, B. y Perrin, D. (1997): Evaluation de la toxicite de l'antracene sur les vegetaux. Mise au point de deux tests biologiques visant a mesurer l'absorption de l'antracene par des racines transformees de *Calystegia sepium* (L.) Brown et *Medicago sativa* L. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 1, 257-263.
- Concha Graña, E. (2004): Desarrollo de métodos de análisis de pesticidas organoclorados en matrices ambientales. Tesis, Universidade de A Coruña, A Coruña.
- Courdouan, A., Marcacci, S., Gupta, S., Schwitzguebel, J. P. (2004): Lindane and technical HCH residues in Indian soils and sediments: a critical appraisal. *Journal of Soils and Sediments* 4, 192-196.
- Dalvi, R. R., Singh, B., Salunkhe, D. K. (1972): Influence of selected pesticides on germination and associated metabolic changes in wheat and mung bean seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 20, 1000-1003.
- Evans, G. C. (1972): The quantitative analysis of plant growth. Blackwell Scientific, Oxford, 734 p.
- Farrar, J. y Gunn, S. (1998): Allocation: allometry, acclimation and alchemy? En: *Inherent variation in plant growth. Physiological mechanisms and ecological consequences*, H. Lambers, H. Poorter, M. M. I. Van Vuren (Ed). Blackhuys Publishers, 183-198.
- Fitter, A. H. y Hay, R. (2002): Environmental physiology of plants. Academic Press, San Diego, 367 p.
- Fletcher, J. S., Johnson, F. L., McFarlane, J. C. (1988): Database assessment of phytotoxicity data published on terrestrial vascular plants. *Environmental Toxicology and Chemistry* 7, 615-622.
- Gadallah, M. A. A. (1996): Phytotoxic effects of industrial and sewage waste waters on growth, chlorophyll content, transpiration rate and relative water content of potted sunflower plants. *Water, Air, & Soil Pollution* 89, 33-47.
- Gong, J., Chan, K. C., Chiu, S. W. (2006): Toxicities of DDE on wheat and bioremediation of DDE by fungus *Pleurotus pulmonarius*. *Human and Ecological Risk Assessment* 12, 221 - 235.
- Hopkins, H. T. (1952): Inhibition of growth by benzene hexachloride isomers and protective effect of glucose as measured by cell counting technique. *Plant Physiology* 27, 526-540.
- Huang, X.-D., El-Alawi, Y., Penrose, D. M., Glick, B. R., Greenberg, B. M. (2004): Responses of three grass species to creosote during phytoremediation. *Environmental Pollution* 130, 453-463.
- Hulzebos, E. M., Adema, D. M. M., Dirven-van Breemen, E. M., Henzen, L., van Dis, W. A., Herbold, H. A., Hoekstra, J. A., Baerselman, R., van Gestel, C. A. M. (1993): Phytotoxicity studies with *Lactuca sativa* in soil and nutrient solution. *Environmental Toxicology and Chemistry* 12, 1079-1094.
- Kidd, P., Prieto-Fernández, A., Monterroso, C., Acea, M. (2008): Rhizosphere microbial community and hexachlorocyclohexane degradative potential in contrasting plant species. *Plant and Soil* 302, 233-247.
- Kidd, P. S., Díez, J., Monterroso Martínez, C. (2004): Tolerance and bioaccumulation of heavy metals in five populations of *Cistus ladanifer* L. subsp. *ladanifer*. *Plant and Soil* 258, 189-205.
- Lambers, H., Poorter, H., Van Vuren, M. M. I. (1998): Inherent variation in plant

- growth: physiological mechanisms and ecological consequences. Backhuys Publishers, Leiden, 591 p.
- Larcher, W. (2003): *Physiological Plant Ecology*. Springer, Berlin, 513 p.
- Li, H., Sheng, G., Sheng, W., Xu, O. (2002): Uptake of trifluralin and lindane from water by ryegrass. *Chemosphere* 48, 335-341.
- Lichtenthaler, H. K. (1998): The stress concept in plants: an introduction. *Annals of the New York Academy of Sciences* 851, 187-198.
- Mackenzie, K., Battke, J., Kopinke, F. D. (2005): Catalytic effects of activated carbon on hydrolysis reactions of chlorinated organic compounds: Part 1. γ -Hexachlorocyclohexane. *Catalysis Today* 102-103, 148-153.
- Mackova, M., Dowling, D. N., Macek, T. (2006): Phytoremediation and rhizoremediation: theoretical background. Springer, Dordrecht, 300 p.
- Manz, M., Wenzel, K. D., Dietze, U., Schürmann, G. (2001): Persistent organic pollutants in agricultural soils of central Germany. *The Science of The Total Environment* 277, 187-198.
- Marcacci, S. (2004): A phytoremediation approach to remove pesticides (atrazine and Lindane) from contaminated environment. Tesis, École Polytechnique Fédérale de Lausanne, Lausanne, Suiza.
- Marcacci, S., Raveton, M., Ravanel, P., Schwitzguebel, J.-P. (2006): Conjugation of atrazine in vetiver (*Chrysopogon zizanioides* Nash) grown in hydroponics. *Environmental and Experimental Botany* 56, 205-215.
- Mc Farlane, C., Pfleger, T., Fletcher, J. (1990): Effect, uptake and disposition of nitrobenzene in several terrestrial plants. *Environmental Toxicology and Chemistry* 9, 513-520.
- Medina, V. F., Marmiroli, M., Maestri, E., Dietz, A. C., McCutcheon, S. C. (2003): Plant tolerances to contaminants. En: *Phytoremediation: Transformation and Control of Contaminants*, J. L. S. Steven C. McCutcheon (Ed). Wiley, 189-232.
- Newmann, M. C. y Unger, M. A. (2003): *Fundamentals of Ecotoxicology*. CRC Press, 458 p.
- Ngabe, B., Bidleman, T. F., Falconer, R. L. (1993): Base hydrolysis of α - and γ -hexachlorocyclohexanes. *Environmental Science and Technology* 27, 1930-1933.
- Orchard, B. J., Doucette, W. J., Chard, J. K., Bugbee, B. (2000): A novel laboratory system for determining fate of volatile organic compounds in planted systems. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19, 888-894.
- Osmond, K. S., Sibout, R., Hardtke, C. S. (2007): Hidden branches: developments in root system architecture. *Annual Review of Plant Biology* 58, 93-113.
- Ramírez-Rodríguez (2005): Adaptive responses in plants to nonoptimal soil pH. En: *Plant Abiotic Stress*, M. A. Jenks and P. M. Hasegawa (Ed). Blackwell Publishing, 145-170.
- Rosen, A. A. y Kraybill, H. F. (1966): *Organic pesticide in the environment*. American Chemical Society, Washington, D.C., 309 p.
- Rubin, E. y Ramaswami, A. (2001): The potential for phytoremediation of MTBE. *Water Research* 35, 1348-1353.
- Selim, K., Mahmoud, S., El-Mokadem, M. (1970): Effect of dieldrin and lindane on the growth and nodulation of *Vicia faba*. *Plant and Soil* 33, 325-329.
- Siddique, T., Okeke, B. C., Arshad, M., Frankenberger, W. T. (2002): Temperature and pH effects on biodegra-

- dation of hexachlorocyclohexane isomers in water and a soil slurry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 5070-5076.
- Skene, K. R. (1998): Cluster roots: some ecological considerations. *Journal of Ecology* 86, 1060-1064.
- Skene, K. R. (2000): Pattern formation in cluster roots: some developmental and evolutionary considerations. *Annals of Botany* 85, 901-908.
- Thompson, P. L., Ramer, L. A., Guffey, A. P., Schnoor, J. L. (1998): Decreased transpiration in poplar trees exposed to 2,4,6-trinitrotoluene. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17, 902-906.
- Thygesen, R. S. y Trapp, S. (2002): Phytotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons to willow trees. *Journal of Soils and Sediments* 2, 77-82.
- Trapp, S. y Christiansen, H. (2003): Phytoremediation of cyanide-polluted soils. En: *Phytoremediation: Transformation and Control of Contaminants*, S. C. McCutcheon and J. L. Schnoor (Ed). Wiley-Interscience, 829-862.
- Trapp, S., Köhler, A., Larsen, L. C., Zambrano, K. C., Karlson, U. (2001): Phytotoxicity of fresh and weathered diesel and gasoline to willow and poplar trees. *Journal of Soils and Sediments* 1, 71-76.
- Trapp, S., Zambrano, K. C., Kusk, K. O., Karlson, U. (2000): A phytotoxicity test using transpiration of willows. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 39, 154-160.
- Turnbull, A. (1996): Chlorinated Pesticides. En: *Issues in Environmental Science and Technology. Chlorinated Organic Micropollutants*, R. E. Hester (Ed). RSC Publishing, 113-135.
- Ucisik, A. S., Trapp, S., Kusk, K. O. (2007): Uptake, accumulation, phytotoxicity, and removal of 2,4-dichlorophenol in willow trees. *Environmental Toxicology and Chemistry* 26, 1165-1171.
- USC (2003): Evaluación y bioremediación de suelos contaminados con isómeros de HCH en el Polígono de Torneiros, Porriño (Pontevedra). Santiago de Compostela, 176 p.
- Vijgen, J. (2006): The legacy of Lindane HCH isomer production. IHPA, www.ihpa.info/libraryaccess.php, 81 p.
- Vose, J. M., Harvey, G. J., Elliott, K. J., Clinton, B. D. (2003): Measuring and modelling tree and stand level transpiration. En: *Phytoremediation: Transformation and Control of Contaminants*, S. C. McCutcheon and J. L. Schnoor (Ed). Wiley-Interscience, 263-282.
- Watt, M. y Evans, J. R. (1999): Proteoid roots. Physiology and development. *Plant Physiology* 121, 317-323.
- WHO (1991): Environmental Health Criteria 124. Lindane. World Health Organization, Ginebra, 117 p.
- WHO (1992): Environmental Health Criteria 123. Alpha and Beta-Hexachlorocyclohexane. World Health Organization, Ginebra, 77 p.
- Willett, K. L., Ulrich, E. M., Hites, R. A. (1998): Differential toxicity and environmental fates of hexachlorocyclohexane isomers. *Environmental Science and Technology* 32, 2197-2207.