

EVALUACIÓN DE LA FITOTOXICIDAD DE LA FRACCIÓN SOLUBLE DE PETRÓLEO EN SUELOS ÁRIDOS EN PRESENCIA DE UN SORBENTE HÍBRIDO ARCILLA-ALGA (*Codium fragile*) SOBRE SEMILLAS DE LECHUGA

EVALUATION OF THE PHYTOTOXICITY OF SOLUBLE OIL FRACTION IN ARID SOILS IN THE PRESENCE OF A HYBRID CLAY-ALGAE (*Codium fragile*) SORBENT ON LETTUCE SEEDS

Hebe Blasetti¹, Ofelia Katusich¹

(1) Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud, Dpto. de Química, (9000) Comodoro Rivadavia, Chubut - Argentina
(e-mail: hebeira@gmail.com)

Recibido: 21/05/2021 - Evaluado: 29/07/2021 - Aceptado: 21/08/2021

RESUMEN

En este trabajo se evalúa la fitotoxicidad de las fracciones solubles de petróleo en muestras de suelo contaminado con petróleo y tratado con un material híbrido sorbente. Los materiales híbridos se prepararon a partir de una arcilla natural y el alga *Codium fragile*, utilizando distintos métodos de calentamiento (estufa y microondas). Se realizaron dos tipos de ensayos, uno directo sobre suelo y otro sobre elutriados, con semillas de *Lactuca sativa*. Los resultados evidencian que el agregado del material híbrido a muestras de suelo contaminados con petróleo (20-30% m/m), produce un aumento en el porcentaje de germinación. El índice de germinación muestra una toxicidad moderada o nula por ensayo directo sobre suelo y ensayo sobre elutriados, los valores indicarían un efecto beneficioso para el crecimiento de la semilla.

ABSTRACT

This work evaluates the phytotoxicity of oil soluble fractions in oil contaminated soil samples treated with a sorbent hybrid material. The hybrid materials were prepared from a natural clay and *Codium fragile* seaweed, using different heating methods (stove and microwave). Two types of tests were carried out, one directly on soil and the other on elutriated ones, with *Lactuca sativa* seeds. The results show that the addition of the hybrid material to soil samples contaminated with oil (20-30% m/m) produces an increase in the germination percentage. The germination index shows a moderate or null toxicity by direct test on soil and test on elutriates, the values would indicate a beneficial effect on seed growth.

Palabras clave: ecotoxicidad, *Lactuca sativa*, materiales híbridos, *Codium fragile*
Keywords: ecotoxicity, *Lactuca sativa*, hybrid materials, *Codium fragile*

INTRODUCCION

La actividad petrolera, una de las fuentes básicas de energía sobre las cuales se sustentan las actividades económicas de la sociedad actual, se desarrolla desde 1907 en Comodoro Rivadavia, ciudad que pertenece a la cuenca del golfo de San Jorge en la República Argentina y aporta una gran producción de crudo. Esta actividad trae aparejada eventuales situaciones de derrame y la introducción de contaminantes orgánicos e inorgánicos en el suelo dando como resultado cambios en las comunidades bióticas (Saterbak *et al.*, 1999). Para mitigar el daño causado en el ambiente, la adsorción se presenta como una alternativa económica que, dependiendo de la naturaleza de los materiales elegidos, puede minimizar la generación de residuos. En este sentido, las arcillas del tipo esmectita, más específicamente montmorillonita sola o modificada, han mostrado ser útiles debido a su capacidad como sorbentes de contaminantes (Vianna *et al.*, 2004; Sharafimasooleh *et al.*, 2011). Dentro de las arcillas modificadas están las organoarcillas, resultado de la combinación de un material inorgánico y otro orgánico, capaces de formar un material híbrido con diferentes características físicas y químicas atribuidas a la suma de las contribuciones individuales de sus componentes y a la fuerte sinergia creada por la presencia de una interfaz híbrida (Salcedo-Bellido, 2014; Paul & Roberson, 2008; Sharafimasooleh *et al.*, 2011). Ejemplo de este material híbrido es el obtenido por nuestro grupo de investigación entre una arcilla natural, (ARC), y un alga *Codium fragile*, (COD), de utilidad para la sorción de petróleo (Katusich & Ríos, 2016).

Es conocido que el aporte de materia orgánica al suelo en un proceso de remediación tiene ventajas económicas y ambientales (Huerta Muñoz *et al.*, 2015) y es recomendable para mejorar la fertilidad y propiedades físicas del suelo (Pagliai *et al.*, 2004). Por lo tanto, es necesario conocer el riesgo ambiental real de los materiales híbridos obtenidos para comparar sus ventajas ante la elección de un material adecuado para remediar suelos contaminados con petróleo.

La región Patagónica Argentina, de acuerdo a sus condiciones geográficas y climáticas es una zona semiárida, su suelo presenta un alto contenido de limo y arcillas y una baja proporción de materia orgánica y humedad, como consecuencia de la erosión eólica y las bajas precipitaciones (Simeoni, 2008). Para mejorar la condición del suelo, la aplicación de algas como biofertilizantes y bioestimulantes, proporciona una mejora en las propiedades biológicas del mismo, pudiendo verse aumentada la productividad en condiciones de estrés abiótico y biótico (Pérez-Madruga *et al.*, 2020).

Para evitar una subestimación del riesgo ambiental real, además de los ensayos químicos, es necesario analizar a los contaminantes presentes en el suelo, incluidos los metabolitos y subproductos, teniendo en cuenta la variación de las concentraciones totales y la reducción de la biodisponibilidad y posterior toxicidad del mismo a causa del proceso de envejecimiento, por medio de los bioensayos que integran estos efectos y ayudan a evaluar el riesgo asociado con la exposición a sustancias biodisponibles (Fernández *et al.*, 2005). Los ensayos de toxicidad avalados internacionalmente por la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA), la Organización para la Cooperación y Desarrollo Económicos (OCDE) y la USEPA (Pernía *et al.*, 2018) utilizan como indicadores distintas especies de plantas, entre ellas *Lactuca sativa* (Huerta Muñoz *et al.* 2015; Sirit *et al.* 2008).

El bioensayo con semillas de *Lactuca sativa* es simple, rápido y económico; es un ensayo estático que permite determinar la toxicidad de sustancias solubles en agua, la toxicidad de sustancias químicas presentes en suelos contaminados, evaluar los efectos tóxicos de sustancias químicas agregadas al suelo y la calidad de suelos contaminados. El período de germinación y los primeros días de desarrollo de la plántula es una etapa de gran sensibilidad frente a factores externos porque ocurren numerosos procesos fisiológicos en los que una sustancia tóxica puede alterar la supervivencia y el desarrollo de la planta. La evaluación del efecto en la elongación de la radícula permite determinar el efecto tóxico de compuestos solubles presentes en concentraciones tan bajas que no son suficientes para inhibir la germinación, pero que sí pueden retardar o inhibir completamente los procesos de elongación de la radícula (Sobrero & Ronco, 2004). Existen diferentes métodos para evaluar toxicidad en suelos empetroados, para este trabajo se comparó el ensayo sobre el elutriado de cada muestra estudiada y el ensayo directo sobre las muestras separando las semillas con un papel de germinación.

El derrame accidental de hidrocarburos en suelos puede afectar el crecimiento vegetal de distintas formas. Una de ellas es a causa de la presencia de las fracciones solubles en agua de los hidrocarburos derramados o de sus productos de degradación, las cuales podrían resultar tóxicas al ser asimiladas durante los procesos osmóticos radiculares en las plantas desarrolladas o durante la germinación de las semillas.

En la fracción soluble en agua del petróleo crudo predominan los compuestos más polares, responsables del efecto tóxico. Sus concentraciones son extremadamente variables según el origen del petróleo (Neff *et al.*, 2000). En general, la fracción soluble en agua del petróleo crudo contiene una mezcla de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), hidrocarburos monoaromáticos denominados BTEX (benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos), fenoles y compuestos heterocíclicos que contienen nitrógeno y azufre (Saeed & Al-Mutairi, 2000), y también metales pesados.

En este contexto, el objetivo de esta investigación es evaluar la fitotoxicidad de las fracciones solubles del petróleo de un suelo contaminado, el cual fue tratado con un material híbrido sorbente para su contención. La hipótesis inicial es que el aporte de materia orgánica proveniente del alga mejoraría la recuperación del suelo.

MATERIALES Y MÉTODOS

El material híbrido utilizado como sorbente fue preparado con arcilla natural (ARC), que se extrajo de los alrededores de la ciudad de Comodoro Rivadavia, provincia de Chubut, Argentina (latitud 45° 46' S y longitud 67° 22' O) y alga *Codium fragile* (COD), que se recolectó manualmente en playas aledañas a la ciudad (latitud 45°45' S y longitud 67° O), durante la marea baja. Dicho material se obtuvo por dos técnicas de calentamiento, una convencional en estufa (ARCCOD E) y la otra utilizando un horno de microondas (ARCCOD MO) (Blasetti *et al.*, 2021). El suelo artificial utilizado para los ensayos fue preparado con 50% de arena y 50% de arcilla, recolectadas en la provincia del Chubut (latitud 45° 35' S y longitud 68° 44' O).

El petróleo crudo utilizado como contaminante se extrajo del flanco sur del golfo San Jorge (Chubut y Santa Cruz, Argentina). La composición del petróleo se determinó por medio de cromatografía en columna o método SARA, nombre asignado ya que divide al petróleo en las siguientes fracciones: hidrocarburos saturados (S), aromáticos (A), resinas (R) y asfaltenos (A). La metodología fue adaptada del método 3600 C Cleanup de la EPA. Se utilizaron los solventes, hexano, benceno, mezcla cloroformo-metanol, de grado HPLC libres de impureza. Los protocolos de obtención y preservación de la muestra fueron los que se utilizaron en trabajos previos (Nudelman *et al.*, 2008).

El petróleo soluble en agua se determinó utilizando mezclas de agua y metanol como cosolvente para la extracción de los hidrocarburos, en diferentes proporciones de metanol (0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1). Los extractos se analizaron mediante espectrofotometría UV-vis (285 a 385 nm). Los espectros obtenidos permitieron cuantificar el petróleo soluble en agua (Nudelman *et al.*, 2002).

Se determinó la capacidad de sorción (CS), que expresa la masa de petróleo sorbido por gramo de material sorbente, siguiendo la norma ASTM F726/17 (2017) para sorbentes categoría II, se procedió a calcular la misma por medio de la ecuación (1).

$$C = \frac{(m_t - m_s)}{m_s} \quad (1)$$

donde CS es la capacidad de sorción de petróleo (g petróleo/g sorbente), m_t es la masa del sorbente y petróleo sorbido (g) y m_s es la masa del sorbente seco (g).

El ensayo de ecotoxicidad se realizó con muestras de suelo artificial, preparado en el laboratorio con arcilla (50%) y arena (50%), del cual una porción fue contaminada con petróleo crudo a dos concentraciones, 20% m/m y 30% m/m, otra porción fue contaminada con las mismas concentraciones de petróleo y mezclada con los materiales

híbridos. Simultáneamente se realizó un control negativo con el suelo artificial no contaminado. Las concentraciones de petróleo elegidas surgen de ensayos previos realizados en el laboratorio que resultaron adecuadas para observar los porcentajes de germinación. La cantidad de los materiales híbridos se agregó respetando el valor de capacidad de sorción de petróleo obtenido para cada sorbente.

Las semillas utilizadas fueron de *Lactuca sativa* (L), variedad cuatro estaciones. Su potencial de germinación se examinó a $24\pm 2^\circ\text{C}$ antes de los ensayos como un control de la viabilidad (90% garantizada) de las semillas. Como puntos finales para la evaluación de los efectos fitotóxicos se determinó la inhibición en la germinación y la inhibición en la elongación de la radícula.

Para el método directo se colocaron 20 g de cada muestra en placas de Petri, se cubrieron con papel de germinación, humedecido con agua destilada en una relación de 2:1 de agua/masa de muestras secas. Posteriormente se colocaron 10 semillas sobre el papel de germinación y se incubaron a $24^\circ\text{C}\pm 2^\circ\text{C}$ en la oscuridad (Plaza *et al.* 2005; Sirit *et al.* 2008).

Para el método del elutriado, se preparó un extracto acuoso con 1 g de cada muestra en 100 mL de agua destilada, que se agitó durante 7 días. Se filtró y a partir del extracto acuoso de la muestra se realizaron las diluciones a 1000, 100, 10, 1 y 0,1 ppm, siguiendo el procedimiento detallado en la norma IRAM 29114 (2008), para sustancias solubles en agua. Se colocaron 4 ml de cada dilución o agua destilada (control negativo) en cajas de Petri con papel de germinación. Para cada ensayo se sembraron 10 semillas y se incubaron durante 120 horas en oscuridad, a $24\pm 2^\circ\text{C}$ (Infante & García, 2012).

Todas las experiencias se realizaron por triplicado. Cumplido el tiempo de germinación se cuantificó el efecto sobre la germinación, el crecimiento de la radícula y los resultados obtenidos se expresaron como el porcentaje de la germinación relativa de semillas (GRS), el crecimiento relativo de la radícula (CRR) y el índice de germinación (IG) de acuerdo con Hoekstra *et al.* (2002) y Walter *et al.* (2006), según las ecuaciones 2, 3 y 4 respectivamente.

$$GRS = \frac{\text{Numero de semillas germinadas de la muestra}}{\text{Numero de semillas germinadas en agua (testigo)}} \times 100 \quad (2)$$

$$CRR = \frac{\text{Longitud promedio de la radícula de la muestra}}{\text{Longitud promedio de la radícula en agua (testigo)}} \times 100 \quad (3)$$

$$IG (\%) = \frac{GRS \times CRR}{100} \quad (4)$$

Los datos fueron expresados como media \pm SD (desviación estándar). Cada uno de estos índices se evaluaron mediante análisis de varianza ($p < 0,05$) usando el software estadístico libre InfoStat (<http://www.infostat.com.ar>), desarrollado por docentes-investigadores de la Universidad Nacional de Córdoba (UNC).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El petróleo utilizado en los ensayos posee de acuerdo a SARA la siguiente distribución por fracciones: 41% de fracción alifática, 37,5% de fracción aromática, 17,5% de fracción polar y 4% de fracción asfáltica. La información de estas fracciones podría brindar información acerca de los procesos involucrados debido a que, en la mayoría de estos procesos la solubilidad tiene un papel preponderante. El petróleo crudo está constituido por una mezcla de compuestos básicamente hidrofóbicos, por lo tanto, su solubilidad en agua es relativamente baja. Dicha solubilidad puede incrementarse mediante la utilización de un cosolvente que presente una polaridad inferior a la del agua y que sea miscible en proporciones variadas, como los alcoholes. En este trabajo se utilizó metanol como cosolvente orgánico, para favorecer la disolución de compuestos hidrofóbicos. Los resultados del ensayo permitieron estimar la cantidad de petróleo soluble en agua (2,8 mg/L), para el petróleo crudo utilizado en el presente trabajo. Para las muestras conteniendo materiales híbridos este valor disminuye (0,6 mg/L).

Los resultados de CS de petróleo muestran el siguiente orden creciente, ARCCOD E < ARC < COD < ARCCOD MO, y la CS promedio de 6,51 g de petróleo/g sorbente (Tabla 1). Estos valores son comparables con los obtenidos en bibliografía, para minerales como las esmectitas con una CS de petróleo de 7,2 g/g, para órgano-montmorillonitas, obtenidas por intercambio con cationes tales como octadeciltrimetilamonio (ODTMA), y bromuro de dodecil dimetilamonio (DDDMA), con CS de 1,6 g/g y 5,2 g/g respectivamente (Carmody et al., 2007), y para *Salvinia sp.* CS de 4,8 g/g (Ribeiro *et al.*, 2000)

Tabla 1: Capacidad de sorción de petróleo (g/g) de sorbentes ARC, COD, ARCCOD E y ARCCOD MO.

Material Sorbente	Capacidad de sorción CS (g/g)
ARCCOD E	5,85±0,2
ARC	6,27±0,2
COD	6,51±0,2
ARCCODMO	7,41±0,1

Las arcillas orgánicas obtenidas por intercambio catiónico presentan algunas desventajas, incluido el alto costo, la baja biodegradabilidad y la baja reciclabilidad. En cambio, la biomasa de alga que está disponible en abundancia podría utilizarse eficazmente como material de bajo costo, sin embargo, es una opción que aún debe explorarse (Olgún *et al.*, 2007).

En las ARC naturales empleadas en este estudio, de tipo esmectita, predominan las estructuras montmorillonita e illita, además de cuarzo y feldespato como fases acompañantes. En ellas las moléculas que interactúan con las cargas superficiales tendrían áreas pequeñas permitiendo, de esta manera, un aumento de la cantidad de ligandos en la superficie y en los espacios interlaminares. En COD, sus paredes celulares son estructuras complejas, constituidas por hidratos de carbono poliméricos, con grandes cantidades de (1→4)-β-D-mananos como el principal polisacárido y pequeñas cantidades de arabinogalactano (Estevez *et al.*, 2009), el resultado de su CS se podría atribuir a la existencia de fuerzas de atracción favorables debido a la mayor diversidad de los grupos funcionales presentes.

En referencia a las pruebas que implican el estudio de los efectos tóxicos de las fracciones solubles del petróleo, en la Tabla 2 se presentan los resultados de GRS, elongación de la raíz (mm) e IG, obtenidos por ambos métodos.

Tabla 2: Resultados de los ensayos de toxicidad en muestras de suelo contaminado con petróleo (20% y 30%) y tratado con sorbentes ARCCOD E y ARCCOD MO. a) ensayo directo sobre suelo y b) ensayo sobre elutriados (1000 ppm).

a) Ensayo directo sobre suelo						
	Contaminado 20%	Tratado ARCCOD E	Tratado ARCCOD MO	Contaminado 30%	Tratado ARCCOD E	Tratado ARCCOD MO
GRS	82,76±1	99,91±2,2	96,55±1,9	48,27	96,6±3	92,1±2,7
Elongación de raíz	8,3±1	12,24±2,2	13,98±1,9	0	12,07±3	14,06±2,7
IG	42,79±1	75,99±2,2	82,95±1,9	0	75,38±3	83,65±2,7
b) Ensayo sobre elutriados (1000 ppm)						
GRS	87,72±2	94,74±2,6	94,73±2,5	49,1±1,7	84,2±2,3	87,7±2,6
Elongación de raíz	9,86±2	12,26±2,6	12,88±2,5	3,4±1,7	13,7±2,3	13,25±2,6
IG	53,81±2	73,58±2,6	76,45±2,5	12,06±1,7	71,06±2,3	72,39±2,6

En la Figura 1, se muestran los resultados de GRS para el ensayo directo sobre suelo, observándose en suelo contaminado con 20% y 30% de petróleo una reducción de la germinación de 17% y 51% respectivamente, en comparación con el suelo utilizado como control. En aquellas muestras contaminadas con 20% de petróleo, luego de agregarles ARCCOD E se observó un aumento en el porcentaje de germinación del 17% con respecto a las muestras contaminadas sin ningún agregado de material híbrido y en el caso en que se les incorporó ARCCOD MO

el aumento observado en el porcentaje de germinación fue de 20%. En las muestras contaminadas con 30% de petróleo a las que se les agregó el material híbrido, el aumento del porcentaje de germinación fue de 92% para ARCCOD E y 99% para ARCCOD MO, con respecto a las muestras contaminadas con 30% sin el agregado de dichos materiales.

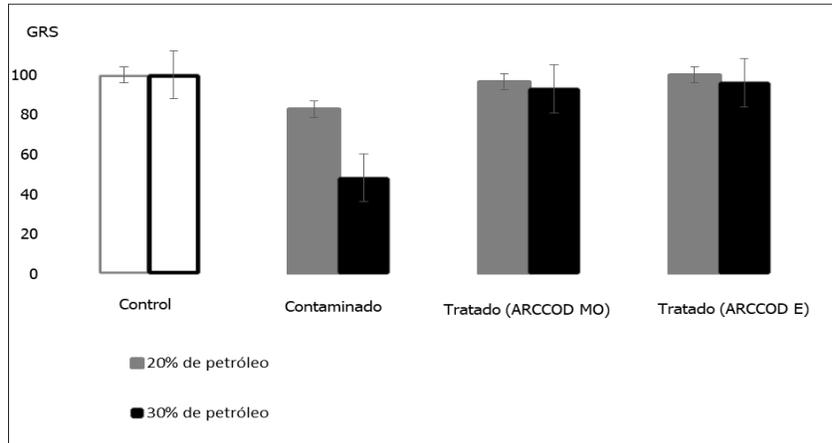


Fig. 1: Porcentaje de la germinación relativa de semillas (GRS) para muestras de suelo control, contaminado con petróleo (20% y 30%) y tratado con sorbentes ARCCOD E y ARCCOD MO. Ensayo directo sobre suelo.

En el ensayo sobre el elutriado de las muestras con 20% de petróleo, se observó una disminución de la germinación, con respecto al suelo control, del 10% a mayor concentración del mismo y en las muestras contaminadas con 30% de petróleo la disminución observada fue del 48% para los extractos más concentrados. En las muestras de suelo contaminadas con 20% de petróleo a las que se le incorporó el material híbrido se observó un aumento de 8% para las muestras más concentradas, comparadas con el suelo contaminado. En las muestras contaminadas con 30% de petróleo (Figura 2) a las que se les agregó ARCCOD E, el aumento del porcentaje de germinación fue del 78%. Y en los casos del agregado de ARCCOD MO el aumento del porcentaje de germinación observado fue del 71%, siempre comparando con el suelo contaminado.

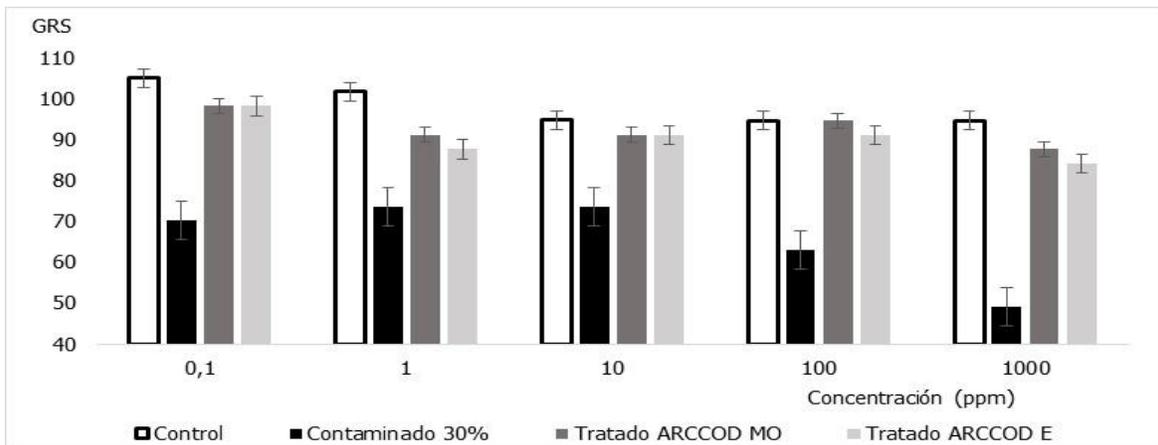


Fig. 2: Porcentaje de la germinación relativa (GRS) para el elutriado de las muestras de suelo control, contaminado con petróleo (30%) y tratado con sorbentes (ARCCOD E y ARCCOD MO).

La reducción en el porcentaje de germinación podría deberse a la acción de los componentes del petróleo que afectan la membrana celular, reducen la eficacia del uso de agua y nutrientes (Pernía *et al.*, 2018). El aumento del porcentaje de germinación, ante el agregado de los materiales híbridos sobre el suelo contaminado, se podría atribuir a la sorción de petróleo entre las capas del material híbrido (Cosultchi *et al.*, 2004), al aporte de nutrientes del alga como proteínas, carbohidratos y minerales (Ortiz, 2011), y además a la mayor disponibilidad de agua contenida en el material híbrido, lo cual mejoraría las condiciones del suelo y tendría un potencial uso como bioestimulante y/o biofertilizante (Pérez-Madruga *et al.*, 2020; Hamed *et al.*, 2018).

Los cálculos del índice de germinación (IG) para el ensayo directo sobre suelo (Figura 3) indican una alta toxicidad (valores menores a 50%) en el suelo contaminado con 20% y 30% de petróleo.

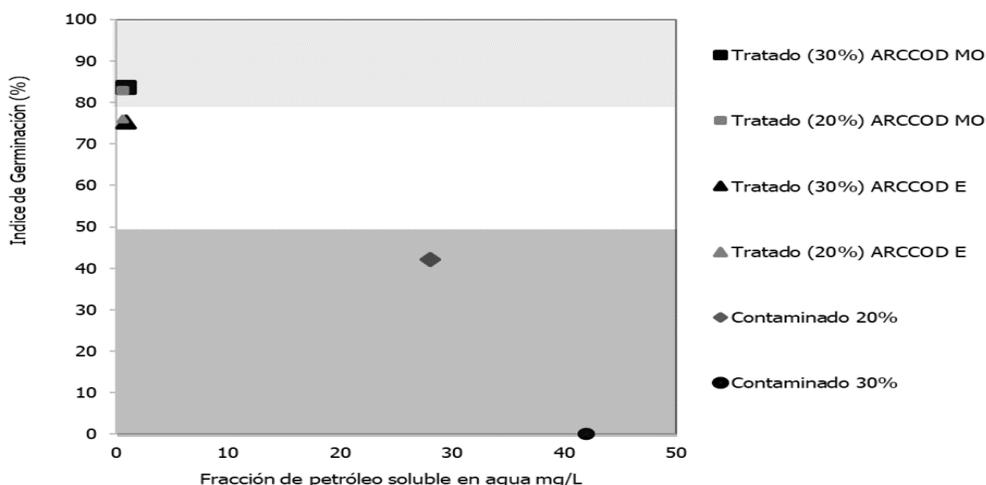


Fig. 3: Índice de germinación (%) para el ensayo directo sobre suelo versus fracción de petróleo soluble en agua (mg/L) para las muestras contaminadas con 20% y 30% de petróleo, y muestras con los sorbentes (ARCCOD E y ARCCOD MO).

Para las muestras contaminadas con petróleo y que contienen el material híbrido se observa que la toxicidad se reduce a moderada (entre 50 y 80%) cuando el material híbrido se preparó con estufa y sin efecto tóxico (valores mayores a 80%) en los casos en los que el sorbente se preparó en el microondas. Los índices de germinación indicarían que existe una relación directa entre la concentración de la fracción soluble de petróleo en agua y el porcentaje de germinación y el crecimiento de la de las plantas de *Lactuca sativa*.

El índice de germinación obtenido en los ensayos realizados con el elutriado de las muestras contaminadas con petróleo va disminuyendo a medida que aumenta la concentración del contaminante, en concordancia con los resultados obtenidos por Pernía *et al.* (2018). Las muestras contaminadas con 20% de petróleo presentan una toxicidad moderada mientras que las contaminadas con 30% de petróleo (Figura 4) poseen alta toxicidad. Se observa que todos los valores de IG de las muestras contaminadas que estuvieron en contacto con el sorbente son mayores que el valor de las muestras sin sorbente, obteniéndose en algunos casos toxicidad moderada o nula.

Se encontró diferencia en los valores obtenidos para IG y GRS entre el ensayo directo sobre suelo y el ensayo sobre el elutriado, presentando el primero una mayor sensibilidad a los efectos tóxicos del petróleo, en concordancia con lo informado por Sirit *et al.* (2008).

Estos resultados indicarían que las fracciones solubles de petróleo en agua causan inhibición en la germinación de semillas, diversos estudios atribuyen esta inhibición a la escasez de oxígeno y agua, así como de nutrientes esenciales como fósforo y nitrógeno (Dutta *et al.*, 2017) y una vez disueltos, estos componentes son los que

tienen más facilidad de introducirse en los organismos (Brown, 1989), lo que podría causar la disminución en el IG. El efecto de la sorción de los componentes del petróleo, sería la disminución de la biodisponibilidad de contaminantes (Kottler & Alexander, 2001) los cuales no pueden ejercer su efecto fitotóxico. Por otro lado, el aumento del IG, en las muestras con agregado de material híbrido podría atribuirse a la presencia de algas y sus extractos, las que causan la estimulación de la germinación de las semillas (Calvo *et al.*, 2014).

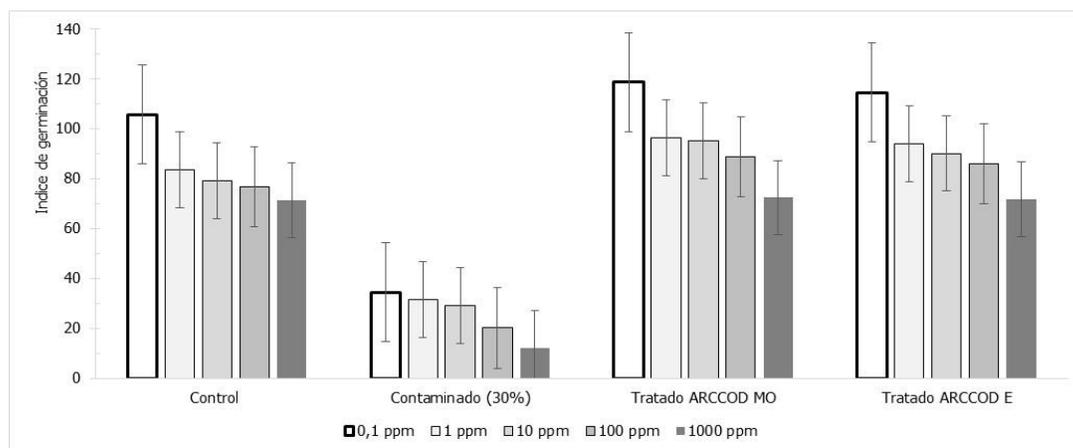


Fig. 4: Índice de germinación para el elutriado de las muestras contaminadas con 30% de petróleo, y muestras con los sorbentes (ARCCOD E y ARCCOD MO).

CONCLUSIONES

Las muestras contaminadas con petróleo crudo en concentración de 20% m/m y 30% m/m presentaron disminución del GRS con respecto al suelo control en los dos ensayos analizados, directo sobre suelo y elutriados.

El GRS e IG aumenta en las muestras que contienen los materiales híbridos, ARCCOD MO y ARCCOD E. Se evidencia mayor sensibilidad a los agentes tóxicos del suelo en el ensayo directo sobre suelo, en comparación con el ensayo realizado con el elutriado.

El material híbrido obtenido a partir de arcilla y alga sería un potencial sorbente de petróleo con propiedades bioestimulantes y no presentaría toxicidad para la biota por ninguno de los dos ensayos analizados, los cuales se preparan con técnicas acordes a la química verde y con reducción del gasto energético en el caso del material obtenido por microondas, además de la reducción del tiempo del proceso.

AGRADECIMIENTOS

A la SeCyT de la UNPSJB por el apoyo económico para la realización de la presente investigación.

REFERENCIAS

ASTM F726-17 (2017). *Standard Test Method for Sorbent Performance of Adsorbents for use on Crude Oil and Related Spills*, ASTM International, West Conshohocken, PA, www.astm.org

Blasetti, H., Alassia, F., Katusich, O., & Rios, S.M. (2021). Híbridos arcilla-alga (*Codium fragile*). Comparación de dos métodos de obtención mediante DRX y FT-IR. *Av. cien. ing.*, 12 (1), 33-43.

- Brown, M. (1989). *Biodegradation of oil in freshwaters*. In: The fate and effects of oil in freshwater. Editors: Springer, Dordrecht, pp. 197-213. https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-009-1109-3_6
- Calvo P., Nelson L. & Kloepper, J.W. (2014). Agricultural uses of plant biostimulants. *Plant soil*, 383 (1-2), 3-41.
- Carmody, O., Frost, R., Xi, Y. & Kokot, S. (2007). Adsorption of hydrocarbons on organo-clays-implications for oil spill remediation. *J. Colloid Interface Sci.*, 305, 17-24.
- Cosultchi, A., Bosch, P. & Lara, V. H. (2004). Adsorption of petroleum organic compounds on natural Wyoming montmorillonite. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.*, 243 (1-3), 53-61.
- Dutta, T., Kwon, E., Bhattacharya, S.S., Jeon, B.H., Deep, A., Uchimiya, M. *et al.* (2017). Polycyclic aromatic hydrocarbons and volatile organic compounds in biochar and biochar-amended soil: a review. *Gcb Bioenergy*, 9 (6), 990-1004.
- Estevez, J.M., Fernández, P.V., Kasulin, L., Dupree, P. & Ciancia, M. (2009). Chemical and in situ characterization of macromolecular components of the cell walls from the green seaweed *Codium fragile*. *Glycobiology*, 19 (3), 212-228.
- Fernández, M.D., Cagigal, E., Vega, M.M., Urzelai, A., Babín, M., Pro, J. *et al.* (2005). Ecological risk assessment of contaminated soils through direct toxicity assessment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 62 (2), 174-184.
- Hamed, S.M., Abd El-Rhman, A.A., Abdel-Raouf, N. & Ibraheem, I.B. (2018). Role of marine macroalgae in plant protection & improvement for sustainable agriculture technology. *Beni-Seuf Univ. J. Appl. Sci.*, 7(1), 104-110.
- Hoekstra, N.T., Bosker, T. & Lantinga, E.A. (2002). Effects of cattle dung from farms with different feeding strategies on germination and initial root growth of cress (*Lepidium sativum* L.). *Agricult. Ecosys. Environ.*, 93, 189-196.
- Huerta Muñoz, E., Cruz Hernández, J., Aguirre Álvarez, L., Caballero Mata, R. & Pérez Hidalgo, L.F. (2015). Toxicidad de fertilizantes orgánicos estimada con bioensayo de germinación de lechuga. *Terra Latinoam.*, 33 (2), 179-185.
- Infante, C. & García, F.A.M. (2012). Evaluación de la toxicidad en desechos y suelos petrolizados empleando semillas de *Lactuca sativa* L. *Interciencia*, 37 (10), 782-788.
- IRAM 29114 (2008). Calidad ambiental - Métodos biológicos. Método de ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L.). Método en papel. <http://catalogo.iram.org.ar>
- Katusich, O. & Ríos, S.M. (2016). Materiales naturales alternativos para la remoción de hidrocarburos en suelos. *Mat. Ads. y Cat.*, 8, 5-12.
- Kottler, B.D. & Alexander, M. (2001). Relationship of properties of polycyclic aromatic hydrocarbons to sequestration in soil. *Environm. Pollut.*, 113 (3), 293-298.
- Neff, J.M., Ostazeski, S., Gardiner, W., & Stejskal, I. (2000). Effects of weathering on the toxicity of three offshore Australian crude oils and a diesel fuel to marine animals. *Environ. Toxicol. Chem.: An Int. J.*, 19 (7), 1809-1821.
- Nudelman, N.S., Ríos, S.M., & Katusich, O. (2008). Application of some physical organic chemistry models to the study of oil spills residues in Patagonian soils. *J. Phys. Org. Chem.*, 21 (4), 329-337.
- Nudelman, N.S., Rios, S.M & Katusich, O. (2002). Efecto del cosolvente orgánico en la estimación de concentraciones acuosas de equilibrio de residuos de petróleo en suelo patagónico. *Environ. Technol.*, 23 (9), 961-970.
- Olguín, E.J., Hernández, M.E. & Sánchez-Galván, G. (2007). Hydrocarbon mangroves pollution and bioremediation, phytoremediation and restoration strategies. *Rev. Int. Contam. Ambient.*, 23 (3), 139-154.

- Ortiz, J. (2011). *Composición Nutricional y Funcional de las Algas Clorofíceas Chilenas: Codium fragile y Ulva lactuca*. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. <http://biomar.fciencias.unam.mx/Sobretiros/2019/Informacion%20algas/Algas/clorofitas/Compocisi%C3%B3n%20bioquimica%20de%20Codium%20y%20Ulva.PDF>
- Paul, D.R. & Robeson, L.M. (2008). Polymer nanotechnology: nanocomposites. *Polymer*, 49 (15), 3187-3204.
- Pagliai, M., Vignozzi, N. & Pellegrini, S. (2004). Soil structure and the effect of management practices. *Soil Tillage Res.*, 79 (2), 131-143.
- Plaza, G., Nałęcz-Jawecki, G., Ulfig, K. & Brigmon, R.L. (2005). The application of bioassays as indicators of petroleum-contaminated soil remediation. *Chemosphere*, 59 (2), 289-296.
- Pérez-Madruga, Y., López-Padrón, I. & Reyes-Guerrero, Y. (2020). Las Algas como alternativa natural para la producción de diferentes cultivos. *Cult. trop.*, 41 (2), e09.
- Pernía, B., Rojas-Tortolero, D., Sena, L., Sisto, A. D., Inojosa, Y. & Naranjo, L. (2018). Fitotoxicidad de HAP, crudos extra pesados y sus fracciones en *Lactuca sativa*: una interpretación integral utilizando un índice de toxicidad modificado. *Rev. Int. Contam. Ambient.*, 34 (1), 79-91.
- Ribeiro, T.H., Smith, R.W. & Rubio, J. (2000). Sorption of oils by the nonliving biomass of a *Salvinia sp.* *Environ. Sci. & techn.*, 34 (24), 5201-5205.
- Saeed, T. & Al-Mutairi, M. (2000). Comparative composition of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the sea water-soluble fractions of different Kuwaiti crude oils. *Adv. Environ. Res.*, 4 (2), 141-145.
- Salcedo-Bellido, I. (2014). *Nanocomposites de quitosano y montmorillonita como protectores de la permeabilidad celular de oxitetraciclina*. Tesis doctoral. Facultad de Farmacia, Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Universidad de Granada, España. <https://hera.ugr.es/tesisugr/22508235.PDF>
- Saterbak, A., Toy, R.J., Wong, D.C, McMain, B.J., Williams, MP, Dorn, P.B., *et al.* (1999). Ecotoxicological and analytical assessment of hydrocarbon-contaminated soils and application to ecological risk assessment. *Environ. Toxicol. Chem.*, 18 (7), 1591-1607.
- Sharafimasoooleh, M., Bazgir, S., Tamizifar, M. & Nemati, A. (2011). Adsorption of hydrocarbons on modified nanoclays, *IOP Conf. Ser.: Mater. Sci. Eng.*, 18, 18201218.
- Simeoni, A. (2008). *Mesetas y Bajos de la Patagonia Central Extraandina. La inversión del relieve. Sitios de Interés Geológico de la República Argentina*. CSIGA (Ed.) Instituto de Geología y Recursos Minerales. Servicio Geológico Minero Argentino, *Anales* 46, II, 461 págs., Buenos Aires. <http://repositorio.segemar.gov.ar/308849217/1368>
- Sirit, L.R., Ehrmann, E.U., & Infante, C. (2008). Comparación de dos métodos de bioensayos para evaluar toxicidad en suelo contaminado con hidrocarburos. *Isla*, 2 (6), 1-6.
- Sobrero, M.C. & Ronco, A. (2004). *Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga (Lactuca sativa L.)*. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. IDRC/IMTA. Canadá, Capítulo, 4, 71-79.
- Vianna, M.M.G., Franco, J.H.R., Pinto, C.A., Valenzuela Díaz, F.R. & Büchler, P.M. (2004). Sorption of oil pollution by organoclays and a coal/mineral complex. *Braz. J. Chem. Eng.*, 21 (2), 239-245.
- Walter, I., Martínez, F. & Cala, V. (2006). Heavy metal speciation and phytotoxic effects of three representative sewage sludges for agricultural uses. *Environ. Pollut.*, 139, 507-514.