

EVALUACIÓN DE LA TOLERANCIA A SUELOS CONTAMINADOS CON ACEITE DIESEL EN ESPECIES VEGETALES CON POTENCIAL BIORREMIADOR

Evaluation of Tolerance to Soils Contaminated with Diesel Oil in Plant Species with Bioremediation Potential

MARÍA CRISTINA PETENELLO¹, M.Sc.;

SUSANA RAQUEL FELDMAN², Ph. D.

¹ Microbiología Agrícola, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Rosario, Parque Villarino, Zavalla, Argentina.

² Biología y Consejo de Investigaciones de la UNR, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Rosario, Parque Villarino, Zavalla, Argentina.

Correspondencia: María Cristina Petenello, Facultad de Ciencias Agrarias, UNR, Parque Villarino, Zavalla, Argentina;

Telefax: 00 54 341 497 00 80. petenello@arnet.com.ar

Presentado el 8 de mayo de 2012, aceptado el 29 de agosto de 2012, correcciones el 4 de septiembre de 2012.

RESUMEN

Los suelos contaminados con petróleo o sus derivados pueden ser remediados a través de diversos métodos, dentro de los cuales se encuentran aquellos que emplean organismos vivos tales como plantas, que poseen la capacidad de mineralizar estos compuestos transformándolos en otros más simples, asimilables a compuestos naturales. Al encarar proyectos de fitorremediación es importante emplear plantas nativas porque están adaptadas a las condiciones ecológicas particulares de la región. En el presente trabajo como primera etapa se evaluó la respuesta de *Spartina argentinensis*, *Paspalum atratum*, *Paspalum guenoarum* y *Melilotus albus* a la presencia de aceite diesel, considerando la germinación de sus semillas, la emergencia de plántulas y la biomasa alcanzada en suelos que contenían 1 y 2 % de aceite diesel, en condiciones experimentales. Todos estos parámetros se vieron afectados con las concentraciones de contaminante empleadas, sin embargo, las plantas pudieron prosperar demostrando en consecuencia que podrían ser empleadas en proyectos de fitorremediación.

Palabras clave: fitorremediación, *Melilotus albus*, *Paspalum atratum*, *Paspalum guenoarum*, *Spartina argentinensis*.

ABSTRACT

Soils contaminated with hydrocarbons or their derivatives can be remediated by different methods. Many of them use live organisms such as plants that are able to mineralize these compounds, turning them into more simple molecules, similar to natural molecules.

When the use of plants is decided, it is important to employ native plants because they are already adapted to the particular ecological conditions of the site. The response of *Spartina argentinensis*, *Paspalum atratum*, *Paspalum guenoarun* and *Melilotus albus* to the presence of diesel oil was evaluated considering seed germination, plant emergence and biomass production of plants growing on soils experimentally contaminated with different concentrations of diesel oil (1 and 2 %). Although all the parameters evaluated showed the negative impact of the presence of diesel-oil, the plants continued growing; therefore they can be considered useful management options for soil phytoremediation.

Keywords: *Melilotus albus*, *Paspalum atratum*, *Paspalum guenoarum*, phytoremediation, *Spartina argentinensis*.

INTRODUCCIÓN

La industria genera productos socialmente deseados y que han mejorado significativamente la calidad de vida del hombre, sin embargo, como aspecto colateral, estos desarrollos han tenido un impacto negativo en ciertas áreas del ambiente, particularmente debido al aporte de productos de baja biodegradabilidad. En la República Argentina, entre los contaminantes más frecuentes del suelo se encuentra el aceite diesel, compuesto utilizado principalmente como combustible en motores aceite diesel y en calefacción. El aceite diesel es un derivado líquido del petróleo, de densidad de $850 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$ ($0,850 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$), un punto de ebullición entre 200 y 360 °C. En el suelo, los hidrocarburos impiden el intercambio gaseoso con la atmósfera, iniciando una serie de procesos físicoquímicos simultáneos como evaporación y penetración que, dependiendo del tipo de hidrocarburo, temperatura, humedad, textura del suelo y cantidad vertida pueden ser más o menos lentos, ocasionando una mayor toxicidad (Benavides *et al.*, 2006). En función de conocimientos científicos y tecnológicos, es posible implementar diversos métodos de mitigación de la contaminación entre los que se encuentran aquellos que aprovechan la capacidad de los organismos vivos de transformar estos compuestos complejos en moléculas simples y que se denominan biorremediación. Entre estas técnicas, la fitorremediación parecería tener un importante potencial para remediar suelos (Garbisu, 2007). Las plantas pueden extraer, filtrar, volatilizar, estabilizar o degradar contaminantes, o bien generar condiciones rizosféricas adecuadas para estimular la degradación microbiana de los mismos, específicamente cuando de compuestos orgánicos se trata, tal como sostienen Pérez Vargas *et al.*, 2002; Merkl, 2005a; Liao y Xie, 2006. Es por esto que el uso de plantas para absorber, acumular y transformar contaminantes en el sustrato en el que crecen a través de procesos biológicos es una práctica que tiende a incrementarse (White *et al.*, 2006).

La cuestión más importante a resolver cuando se intenta un proyecto de fitorremediación es la elección de la o las plantas a ser empleadas. Es necesario tener en cuenta una serie de factores como el clima, el suelo, el tipo de raíz, así como cuál es el comportamiento de la planta frente al contaminante (Margaretich, 2005). Muchas plantas pueden crecer en ambientes adversos, suelos salinos, valores de pH extremos o condiciones de anaerobiosis transitorias o permanentes (Mendoza y Portal, 2000; Larcher, 2003) y aun así presentar altas tasas de crecimiento. En el caso de la contaminación del suelo con

hidrocarburos, la fitorremediación se basa principalmente en la estimulación de microorganismos rizosféricos que los mineralizan total o parcialmente. Esta técnica puede ser empleada en suelos que están medianamente contaminados con petróleo o sus derivados, representando una alternativa a los tratamientos físicos y químicos (Merkl, 2004; Spriggs *et al.*, 2005). La bibliografía menciona diversas especies que podrían ser adecuadas para la fitorremediación, la mayoría de ellas gramíneas C4, entre las que están las del género *Spartina*, características de marismas y bajos salinos inundables. Rivera-Cruz *et al.* (2006) constataron que *Echinochloa polystachia* puede remover hasta el 6,5 % de benzo(a)pireno y Lin *et al.* (2002), trabajando con *Spartina alterniflora*, determinaron que la microflora rizosférica era muy eficiente en remediar áreas costeras contaminadas con hidrocarburos. Asimismo, Patrignani *et al.*, 2006, aislaron esporas de una especie micorrizica, *Glomus mosseae*, en la rizosfera de plantas de *S. argentinensis* que crecía en suelo contaminado con residuos de hidrocarburos, lo cual favorecería la absorción de fósforo del suelo por parte de las plantas. En todo caso, es importante utilizar especies nativas para la fitorremediación de suelos, tal como sostienen Oliva *et al.* (2005). Garcia-Blanco *et al.* (2007) establecieron que la efectividad fitorremediadora de *S. alterniflora* se veía incrementada por el agregado de nutrientes como el nitrógeno y el fósforo.

Spartina argentinensis Parodi (Poaceae) es la especie dominante de comunidades halófilas que ocupan grandes extensiones de áreas deprimidas de la República Argentina, con suelos con alta concentración de sales y sodio, con pH superior a ocho y sujetas a incendios frecuentes (Cabrera y Willink, 1973). Estas plantas pueden rebrotar después de severos disturbios, aún en condiciones de sequía extrema (Feldman *et al.*, 2004). *Paspalum guenoarum* Arechav y *P. atratum* Swallen son Poaceae perennes características del cono sur de América Latina. *P. guenoarum* está presente en el noreste de la Argentina, mientras que *P. atratum* llega hasta el sur de Brasil y Paraguay, ambas en ambientes con periodos de déficit hídrico (Zuloaga y Morrone, 2005). *Melilotus albus* Desr., pertenece a la familia Fabaceae, es una hierba erecta, con hojas trifolioladas alternadas e inflorescencias en racimos axilares, introducida en la Argentina como forrajera adecuada para ambientes con déficit hídricos, que está naturalizada en el país (Pensiero y Gutiérrez, 2005).

No existe información sobre la capacidad fitorremediadora de estas especies, que pueden considerarse como materiales aptos por su condición de tolerantes a condiciones ambientales adversas (Grime, 1979) en el caso de *S. argentinensis*, subtropicales con altas tasas de crecimiento en los *Paspalum* o exótica naturalizada y que prevalece en diferentes condiciones ambientales, en *M. albus*. El objeto de este trabajo fue establecer la tolerancia de estas especies a concentraciones crecientes de aceite diesel, evaluando germinación, emergencia y producción de biomasa, como etapa inicial para su uso como fitorremediadoras (Larenas y De Viana, 2005).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se trabajó con cariopses de *Spartina argentinensis*, *Paspalum guenoarum* y *Paspalum atratum* y semillas *sensu stricto* de *Melilotus alba*, mencionados “semillas” en este texto. Las semillas de *Spartina* provenían de una población natural de la reserva Federico Wildermuth (Santa Fe, Argentina), las semillas de las especies del género *Paspalum* provenían de la Universidad Nacional del Nordeste (Argentina) y las de *M. albus*, de una variedad comercial.

Se utilizó aceite diesel, mezcla compleja de alcanos de ocho a 26 carbonos y compuestos aromáticos que incluyen mono, di y poliaromáticos (Adam y Duncan, 2002) como hidrocarburo contaminante. El porcentaje de germinación se obtuvo empleando placas de Petri de 10 cm de diámetro a 28 °C y en oscuridad. Se trabajó incorporando aceite diesel sobre los papeles de filtro previamente humedecidos con 10 ml de agua (concentraciones finales: 15; 5; 1; 0,8; 0,5 y 0,25 %), empleando cuatro cajas por especie y concentración y 50 semillas por placa. Las semillas fueron desinfectadas superficialmente con hipoclorito de sodio al 2,5 % durante 5 min y posteriormente enjuagadas convenientemente con agua destilada estéril.

La emergencia de plántulas se evaluó empleando macetas que contenían 300 g de suelo con concentraciones del 1 y 2 % p/p de aceite diesel, además de un testigo con suelo sin contaminar, 50 semillas por maceta y diez macetas por especie y tratamiento en condiciones de invernadero, regadas por subirrigación. El suelo se obtuvo en el Campo Villarino, Zavalla, Argentina (32°43'27"S; 60°55'18"O). Se trata de un argiudol vértico, con 3,27 % materia orgánica, 0,223 % de nitrógeno total y pH 5,9 en agua (1:2,5) en su horizonte superficial (0-15 cm), de acuerdo con Ferreras *et al.*, 2006. Las semillas de *M. albus* se inocularon con *Sinorhizobium meliloti*, previo a la siembra.

A los 15 días de siembra se midió la altura de plántulas de *S. argentinensis* (altura de coleoptile) y de *Paspalum* (hoja desplegada) y la longitud del folíolo central en *M. albus*. El peso seco se evaluó a los 60 y 90 días. Las muestras de la primera cosecha de *M. albus* se alteraron por problemas de laboratorio y es por ello que no se presentan sus resultados. Para cada especie, las diferencias entre tratamientos se compararon usando ANOVA y Tuckey (Infostat, 2003), previa comprobación de los supuestos de homogeneidad de varianzas.

RESULTADOS

GERMINACIÓN

Las concentraciones de 15, 5 y 1 % de aceite diesel fueron tóxicas para *S. argentinensis* y las dos especies de *Paspalum* (0 % de germinación), mientras que *M. albus* mostró un comportamiento diferencial frente a las mismas. Las concentraciones menores de aceite diesel (0,8; 0,5 y 0,25 %), no afectaron al poder germinativo de *S. argentinensis*, pero si tuvieron un efecto negativo sobre *P. guenoarum* y *P. atratum* (Tabla 1).

Tratamiento	<i>S. argentinensis</i>	<i>M. albus</i>	<i>P. guenoarum</i>	<i>P. atratum</i>
Testigo	14,38 a	88,80 a	72,00 a	78,40 a
0,25 %	11,88 a	(np)	42,50 b	41,67 b
0,5 %	15,00 a	(np)	29,17 bc	39,17 b
0,8 %	14,38 a	(np)	15,83 c	23,33 c
1 %	0	75,83 ab	0	0
5 %	0	79,17 ab	0	0
15 %	0	68,33 c	0	0

Tabla 1. Porcentaje de germinación de semillas de *S. argentinensis*, *M. albus*, *P. guenoarum* y *P. atratum* en función de concentraciones crecientes de aceite diesel (n = 4). Para cada especie, valores seguidos de igual letra no difieren significativamente (p < 0.05) (np: dosis no probadas).

EMERGENCIA Y MORFOLOGÍA

El agregado de aceite diesel no afectó al número de plántulas de *M. alba* que emergieron, aunque sí afectó inicialmente a los de *S. argentinensis* y *P. guenoarum*. Una semana después de la siembra, hubo un efecto diferencial de *S. argentinensis*, según la dosis aplicada y hacia el final del período la dosis más baja no difirió del testigo. *P. guenoarum* demoró más en emerger, pero finalmente no se observó depresión por el agregado de aceite diesel, al igual que en *P. atratum* (Fig. 1). La incorporación de aceite diesel afectó la altura de *P. guenoarum* y la expansión de la hoja de *M. albus* (Tabla 2).

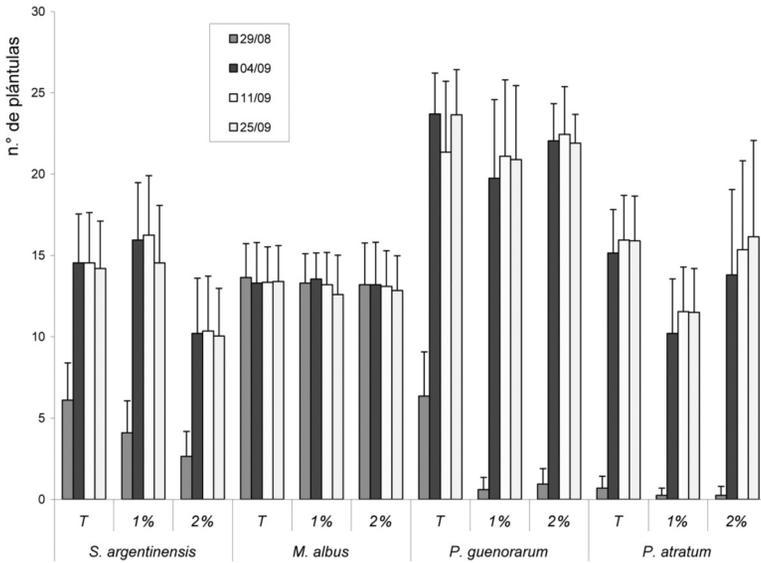


Figura 1. Número promedio de plántulas de *S. argentinensis*, *M. albus*, *P. guenoarum* y *P. atratum*, en potes con tratamiento testigo (T) o contaminados con aceite diesel al 1 y al 2%, ($n = 10$ potes; 50 semillas en cada uno; fecha de siembra: 20/08).

	<i>S. argentinensis</i>	<i>P. guenoarum</i>	<i>P. atratum</i>	<i>M. albus</i>
T	29,66 ± 2,9 a	53,58 ± 3,7 a	33,56 ± 2,6 a	4,39 ± 0,2 a
1%	18,42 ± 5,1 a	38,06 ± 3,5 b	30,66 ± 4,3 a	2,6 ± 0,1 b
2%	13,41 ± 6,3 a	35,3 ± 2,3 b	22,90 ± 2,2 a	2,44 ± 0,08 b

Tabla 2. Efectos de concentraciones de aceite diesel (T: testigo; 1 y 2 %) sobre altura (mm) de plántulas en *S. argentinensis*, *P. guenoarum* y *P. atratum* y de expansión del foliolo central (mm) en *M. albus*. Dentro de cada especie, valores seguidos de igual letra no difieren significativamente ($p < 0.05$; promedio ± e.s.m.)

PESO SECO

A los 60 días, la presencia de aceite diesel afectó negativamente la acumulación de biomasa en *S. argentinensis* en las dos concentraciones evaluadas (1 y 2 %); en tanto que para las dos especies de *Paspalum*, solo la dosis del 2 % disminuye la acumulación de biomasa (Tabla 3). Treinta días más tarde, las diferencias se mantuvieron en las gramíneas,

mientras que en *Melilotus*, ambas concentraciones de aceite diesel deprimieron el crecimiento con igual intensidad (Tabla 4).

Tratamiento	<i>S. argentinensis</i>	<i>P. guenoarum</i>	<i>P. atratum</i>
T	48,85 ± 2,9 a	169,99 ± 6.21 a	254,74 ± 3.8 a
1 %	27,72 ± 1.5 b	152,58 ± 30.5 a	196,03 ± 29.8 a
2 %	20,04 ± 1.2 c	59,36 ± 7.04 b	95,45 ± 14.3 b

Tabla 3. Efectos de concentraciones (T: testigo; 1 y 2 %) de aceite diesel sobre el peso seco (mg) de plántulas de *S. argentinensis*, *P. guenoarum* y *P. atratum*, a los 60 días de iniciado el experimento. Dentro de cada especie, valores seguidos de igual letra no difieren significativamente ($p < 0.05$; promedios ± e.s.m.).

	T	1 %	2 %
<i>S. argentinensis</i>	435,0 ± 145,9 a	337,5 ± 108,1 b	237,8 ± 92,6 c
<i>P. guenoarum</i>	1443,8 ± 289,5 a	1373,2 ± 201,7 a	534,2 ± 146,7 b
<i>P. atratum</i>	1782,9 ± 345,8 a	1572,2 ± 305,4 a	667,5 ± 178,9 b
<i>M. albus</i>	554,8 ± 119. 8a	173,1 ± 55,5 b	205,3 ± 49.8 b

Tabla 4. Efectos de concentraciones (T: testigo; 1 y 2 %) de aceite diesel sobre el peso seco promedio (mg) de plántulas de *S. argentinensis*, *P. guenoarum*, *P. atratum* y *M. albus*, a los 90 días de iniciado el experimento. Dentro de cada especie, valores seguidos de igual letra no difieren significativamente ($p < 0.05$; promedios ± e.s.m.).

DISCUSIÓN

La germinación y el crecimiento inicial son etapas claves para el establecimiento de una planta en una comunidad (Harper, 1977). Debido al efecto fitotóxico de los hidrocarburos, no cualquier especie puede germinar y crecer en su presencia, siendo estos los primeros requisitos para fitorremediación (Korade y Fulekar, 2009). Otro aspecto importante es trabajar con especies nativas o naturalizadas, no malezas, puesto que muchas veces las introducidas pueden llegar a ser problemáticas en relación a su manejo posterior (Larenas y De Viana, 2005; Oliva *et al.*, 2005). Además, dado que la fitorremediación es una técnica específica para cada sitio, el factor clave para el éxito de este proceso es la correcta selección de plantas que, en principio, toleren altas concentraciones de contaminantes en el suelo (Shirdam *et al.*, 2008).

Las especies probadas pudieron germinar y establecerse con el contaminante mostrando ciertas alteraciones morfológicas, coincidiendo con lo hallado por Rivera y Trujillo, 2004, en *Echinochloa polystachya*, *Brachiaria mutica*, *Cyperus articulatus*, *Cyperus* sp. y *Mimosa pigra*, y por lo encontrado en *Pisum sativum* por Baldyga *et al.* (2005). Esta capacidad de germinar en presencia del contaminante es particularmente importante en el caso de *S. argentinensis*, por tratarse de una especie que naturalmente presenta bajo poder germinativo (Feldman y Lewis, 2007). Las semillas comerciales de *M. albus* demostraron ser muy tolerantes y tuvieron una buena germinación con dosis relativamente altas. El efecto fitotóxico de los hidrocarburos sobre la germinación podría estar ligado a la solubilización parcial de las membranas biológicas de forma similar a lo que Sikkema *et al.* (1995), verificaron en bacterias o a la formación de una película alrededor de la semilla actuando como una barrera

que reduce la transferencia de agua y oxígeno (Adam y Duncan, 2002). El recubrimiento de las semillas por parte del aceite diesel, terminaría afectando sus funciones fisiológicas (Vwioko y Fashemi, 2005). Achuba, 2006, postula que esta alteración podría deberse a que las moléculas más tóxicas del aceite diesel inhibirían las actividades de las enzimas amilasa y fosforilasa del almidón y, consecuentemente, afectarían su asimilación.

La reducción en biomasa fue acorde a la que presentan *Paspalum scrobiculatum* (Ogbo *et al.*, 2009) y *Zea mays* (Quiñones *et al.*, 2003; Méndez *et al.*, 2006) en presencia de petróleo crudo, así como otras especies del género *Spartina* (Pezeshki *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2002) y *Festuca arundinacea*, *Lolium perenne*, *Medicago sativa* y *Brassica napus* (Cheema *et al.*, 2010). La bibliografía destaca que el efecto fitotóxico de los hidrocarburos ocasiona una menor acumulación de biomasa (Merkl *et al.*, 2005a; Merkl *et al.*, 2005b) y diversos efectos sobre la morfología, por ejemplo en raíz (Glick, 2003). Si bien no se evaluó la morfología de raíces, se pudo observar mayor grosor en las de *S. argentinensis* sometidas a la mayor dosis de aceite diesel, coincidiendo con lo registrado por Merkl *et al.* (2005a) en *Brachiaria bryzantha* en suelos con petróleo crudo, atribuyéndolo a mayor resistencia mecánica del suelo contaminado o posible déficit hídrico.

Debido al carácter hidrofóbico de los hidrocarburos puede producirse una deficiencia hídrica en el suelo, aún cuando haya disponibilidad de agua porque la presencia de este tipo de contaminante provoca la disrupción de las relaciones planta-agua-aire (Reilley *et al.*, 1996; Renault *et al.*, 2000). Asimismo, se afectaría la dinámica de la solubilización de nutrientes y el intercambio iónico en el suelo (Odjegba y Sadiq, 2002) o tal como sostienen (Mendoza *et al.*, 2000), el aceite diesel deprimiría el intercambio de nutrientes entre las fases sólida y líquida del suelo disminuyendo así su disponibilidad. En nuestro caso, en que el suelo empleado en los ensayos estaba naturalmente bien provisto de nutrientes, posiblemente no haya sido este el factor que incidió en la menor producción de biomasa vegetal (Wright y Weaver, 2004). Por otro lado, Watts *et al.*, 2006, al estudiar si los hidrocarburos polinucleares pueden ser absorbidos por *S. alterniflora*, llegó a la conclusión de que este proceso tenía lugar de acuerdo a diversos factores como la lipofilicidad de la planta, el contenido orgánico del suelo y el coeficiente octanol-agua, y que en consecuencia, al iniciar un proceso de fitorremediación deberían considerarse los riesgos ecotoxicológicos.

Las especies evaluadas, si bien produjeron menor biomasa, demostraron tolerancia al contaminante lo cual es importante como primer paso para un proceso fitorremediador. El empleo de leguminosas es particularmente interesante dada la capacidad que poseen estas plantas de agregar nitrógeno al sistema contaminado, lo que podría estimular a los microorganismos degradadores (Sangabriel *et al.*, 2006). Por consiguiente sería interesante evaluar en experimentos posteriores la capacidad fitorremediadora de estas especies incorporando fertilizantes y/o micorriza.

AGRADECIMIENTOS

Las autoras agradecen a sus auxiliares de cátedra por su colaboración durante la conducción de los experimentos y a la Universidad Nacional de Rosario por el apoyo económico dado al proyecto.

BIBLIOGRAFÍA

ACHUBA FI. The effect of sublethal concentration of crude oil on the growth and metabolism of cowpea (*Vigna unguiculata*) seedlings. *Environmentalist*. 2006;26(1):17-20.

ADAM G, DUNCAN H. Influence of aceite diesel fuel on seed germination. *Environ Pollution*. 2002;120(2):363-370.

BALDYGA B, WIECZOREK J, SMO CZYŃSKI S, WIECZOREK Z, SMO CZYŃSKA K. Pea plant response to anthracene present in soil. *Polish J Environ Studies*. 2005;14(4): 397-401.

BENAVIDES LÓPEZ DE MESA J, QUINTERO G, GUEVARA VIZCAINO AL, JAIMES CÁCERES DC, GUTIÉRREZ RIAÑO SM, MIRANDA GARCÍA J. Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. *Nova*. 2006;4(005): 82-90.

CABRERA AL, WILLINK A. Biogeografía de América Latina. Serie de Biología, Monografía n.º 13, OEA. Washington. E.E. U.U. 1973.

CHEEMA SA, KHAN MI, SHEN C, CHEN L, ZHANG C, CHEN Y. Degradation of phenanthrene and pyrene in spiked soils by single and combined plant cultivation. *J Haz Mat*. 2010;177(1-3):384-389.

FELDMAN SR, BISARO V, LEWIS JP. Photosynthetic and growth responses to fire of the subtropical temperate grass *Spartina argentinensis* Parodi. *Flora*. 2004;199(6): 491-499.

FELDMAN SR, LEWIS JP. Effect of fire on *Spartina argentinensis* Parodi demographic characteristics. *Wetlands*. 2007;27:785-793.

FERRERAS L, GOMEZ E, TORESANI S, FIRPO I, ROTONDO R. Effect of organic amendments on some physical, chemical and biological properties in a horticultural soil. *Bioresour Technol*. 2006;97(4):635-640.

GARBISU C, BECERRIL JM, EPELDE L, ALKORTA I. Bioindicadores de la calidad del suelo: herramienta metodológica para la evaluación de la eficacia de un proceso fitorremediador. *Ecosistemas*. 2007;16(2):44-49.

GARCIA BLANCO S, VENOSA AD, SUIDAN MT, LEE K, COBANLI S, HAINES JR. Biostimulation for the treatment of an oil-contaminated coastal salt marsh. *Biodegradation*. 2007;18(1):1-15.

GLICK B. Phytoremediation: Synergistic use of plant and bacteria to clean up the environment. *Biotechnol Adv*. 2003;21(5):383-393.

GRIME JP. *Plant strategies and vegetation processes*. Chichester: J. Wiley & Sons Ltd.; 1979.

HARPER JL. *Population biology of plants*. Londres: Academic Press. 1977.

INFOSTAT. *InfoStat version 1.5*. Grupo InfoStat, FCA, Córdoba: Universidad Nacional de Córdoba; 2003.

KORADE DL, FULEKAR MH. Effect of organic contaminants on seed germination of *Lolium multiflorum* in soil. *Biol Med*. 2009;1(1):28-34.

LARENAS PARADA G, DE VIANA ML Germinación y supervivencia del pasto cubano *Tithonia tubaeformis* (Asteraceae) en suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo. *Ecol austral*. 2005;15(2):177-181.

LARCHER W. *Physiological plant ecology: ecophysiology and stress physiology of functional groups*. 4th Ed. Springer-Verlag; 2003.

LIN Q, MENDELSSOHN I, SUIDAN M, LEE K, VENOSA A. The dose-response

relationship between N° 2 fuel oil and the growth of the salt marsh, *Spartina alterniflora*. Mar Pollut Bull. 2002;44(9):897-902.

LIAO M, XIE X. Plant enhanced degradation of phenanthrene in the contaminated soil. J Environm Sci. 2006;18(3):510-513.

MARGARETICH M. Phytoremediation. Illumin. 2004;5(2). Disponible en: URL: <http://illum.in.usc.edu/80/phytoremediation/fullView/>

MÉNDEZ NATERA JR, SALAZAR GARANTON R, VELÁZQUEZ A. Efecto del derrame petroléoo simulado y la aplicación de un remediador sobre la germinación de semillas y desarrollo de plántulas en dos tipos de maíz (*Zea mays* L.). Revista UDO Agrícola. 2006;6(1):102-108.

MENDOZA R, PORTAL R. Landfarming of petroleum wastes in a cold dry climate of Tierra del Fuego, effect on soil and vegetation. Ciencia del Suelo. 2000;18(1):36-43

MENDOZA R, MAC CORMACK W, MARBAN L, RIOS MERINO L, PORTAL RJ. Contaminación con crudo. Efecto sobre propiedades del suelo, la vegetación y la microflora degradadora de hidrocarburos. Jornadas de preservación de agua, aire y suelos en la industria del petróleo y del gas. 3 al 6 de octubre de 2000. Salta, Argentina.

MERKL N, SCHULTZE-KRAFT R, INFANTE C. Phytoremediation in the tropics- influence of heavy crude oil on root morphological characteristics of graminoids. Environ Pollut. 2005;138(1):86-91.

MERKL N, SCHULTZE-KRAFT R, INFANTE C. Assessment of tropical grasses and legumes for Phytoremediation of petroleum-contaminated soils. Water Air Soil Poll. 2005;165:195-209.

ODJEGBA V, SADIQ A. Effects of spent engine oil on the growth parameters, chlorophyll and protein level of *Amaranthus hybridus* L. Environmentalist. 2002;22(1): 23-28.

OGBO EM, ZIBIGHA M, ODOGU G. The effect of crude oil on growth of the weed (*Paspalum scrobiculatum* L.) - phytoremediation potential of the plant. Af J Environ Sci Technol. 2009;3(9):229-233.

OLIVA GJ, LUQUE A, CESA D, FERRANTE J, KOFALT H, CASTRO DASSEN E. Rehabilitación con bioestimulación y gramíneas nativas de un derrame en la trampa Scaper Las Horquetas, Santa Cruz 6° Jornadas de Preservación de Agua, Aire y Suelo. Instituto Argentino del Petróleo y del Gas. Neuquén. 2005.

PÉREZ VARGAS J, GARCÍA ESQUIVEL G, ESPARZA GARCÍA F. Papel ecológico de la flora rizosférica en fitorremediación. Avance y Perspectiva. 2002;21:297-300.

PEZESHKI SR, HESTERB MW, LINC Q, NYMAND JA. The effects of oil spill and clean-up on dominant US Gulf coast marsh macrophytes: a review. Environ Pol. 2000;108(2):129-139.

QUIÑONES-AGUILAR EE, FERRERA-CERRATO R, GAVI-REYES F, FERNÁNDEZ-LINARES L. Emergencia y crecimiento de maíz en un suelo contaminado con petróleo crudo. Agrociencia. 2003;37(8):585-594.

REILLEY KA, BANKS MK, SCHWAB AP. Dissipation of polycyclic aromatic aromatic hydrocarbons in the rhizosphere. J Environm Qual. 1996;25(2):212-219.

RENAULT S, ZWIWEK JJ, FUNG M, TUTTLE S. Germination, growth and gas Exchange of selected boreal forest seedlings in soil containing oil sands tailings. Environ Pollut. 2000;107(3):357-365.

RIVERA MC, TRUJILLO A. Estudio de toxicidad vegetal en suelos con petróleos nuevo e intemperizado. Interciencia. 2004;29(7):369-376.

RIVERA MC, TRUJILLO A, FERRERA R, RODRÍGUEZ R, VOLKE V, SÁNCHEZ P, FERNÁNDEZ L. Fitorremediación de suelos con benzo(a)pireno mediante microorganismos autóctonos y pasto alemán (*Echinochloa polystachya* (H.V.K.) HITCHC). Universidad y Ciencia. 2006;22(001):1-12.

SANGABRIEL W, FERRERA CERRATO R, TREJO AGUILAR D, MENDOZA LÓPEZ MR, CRUZ SÁNCHEZ JS, LÓPEZ ORTIZ C, DELGADILLO MARTÍNEZ J, ALARCÓN A. Tolerancia y capacidad de fitorremediación de combustóleo en el suelo por seis especies vegetales. Rev Int Con Ambient. 2006;22(2):63-73.

SHIRDAM R, ZAND AL, BIDHENDI GN, MEHRDADI N. Phytoremediation of hydrocarbon-contaminated soils with emphasis on the effect of petroleum hydrocarbons on the growth of plant species. Phytoprotection. 2008;89(1):21-29.

SIKKEMA J, DE BONT JA, POOLMAN B. Mechanisms of membrane toxicity of Hydrocarbons. Microb Rev. 1995;59(2):201-222.

VWIOKO D, FASHEMI D. Growth response of *Ricinus communis* L. (castor oil) in spent lubricating oil polluted soil. J Appl Sci Environ Manage. 2005;9(2):73-79.

WATTS AW, BALLESTERO TP, GARDNER KH. Uptake of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in salt marsh plants *Spartina alterniflora* grown in contaminated sediments. Chemosphere. 2006;62(8):1253-1260.

WRIGHT AL, WEAVER RW. Fertilization and bioaugmentation for oil biodegradation in salt marsh mesocosms. Water Air Soil Pollut. 2004;1(56):229-240.

ZULOAGA FO, MORRONE O. Revisión de las especies de *Paspalum* para América del Sur Austral (Argentina, Bolivia, Sur de Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay). Monographies Syst Bot Missouri Bot Garden 2005;102:1-297.