

## ESTUDIO DE TOXICIDAD VEGETAL EN SUELOS CON PETRÓLEOS NUEVO E INTEMPERIZADO

María del Carmen Rivera-Cruz y Antonio Trujillo-Narcía

### RESUMEN

El estudio del comportamiento de plantas en suelos contaminados con petróleo permite identificar y seleccionar especies fitoindicadoras de tal contaminación. Se estudió el efecto del petróleo en el suelo sobre la diversidad, cobertura y productividad en una pradera en el sureste de México. Se evaluaron diferentes concentraciones de petróleo nuevo e intemperizado en la germinación, crecimiento, biomasa aérea, radical y total, y número de nódulos. La pradera se dividió en cuatro áreas según la concentración de hidrocarburos totales de petróleo (HTP): 150, 2791, 9035 y 79457 mg·kg<sup>-1</sup>. La mayor diversidad vegetal se encontró en los dos suelos más contaminados pero la producción de biomasa se redujo hasta 50% respecto al suelo con menos HTP. Se realizaron tres experimentos secuenciales en plántulas durante 32 días de exposición al petróleo, y en plantas durante 150 días de exposición, en arreglo factorial y

diseño al azar, con las especies *Echinochloa polystachya*, *Brachiaria mutica*, *Cyperus articulatus*, *Cyperus sp.* y *Mimosa pigra*. Se prepararon tres concentraciones (50000, 100000 y 150000 mg·kg<sup>-1</sup>) para compararlos con el petróleo intemperizado (79457 mg·kg<sup>-1</sup>). Se aplicó el protocolo OCDE N°208 para evaluar efecto tóxico en plántulas y para plantas se diseñó un protocolo. Se evaluaron germinación, altura, longitud de raíz, biomasa y número de nódulos. Hubo diferencias significativas en todas las variables en plántulas y plantas de las cinco especies. La germinación se asoció positivamente con las mayores concentraciones de petróleo intemperizado, pero se redujeron crecimiento, longitud de la raíz, biomasa y número de nódulos en plántulas. En plantas todas las variables fueron reducidas. Las especies más sensibles, mejores fitoindicadoras de niveles tóxicos, fueron *E. polystachya* y *B. mutica* en plántulas, y *M. pigra* en plantas.

### Introducción

El petróleo está formado (Huesemann, 1994; Dorn *et al.*, 1998) por la fracción polar (asfaltenos y resinas), por los hidrocarburos (saturados y aromáticos) y por concentraciones bajas de Ni, Fe y V (Freedman, 1995). Los hidrocarburos producen efectos dañinos en animales y plantas (Pothuluri y Cerniglia, 1994; Dorn *et al.*,

1998; Lin y Mendelsohn, 1998;). La inhibición de la germinación, la disminución del crecimiento vegetal y la muerte de las plantas son indicadores de la toxicidad de los hidrocarburos (Powell, 1997). El crecimiento de las plantas puede ser inhibido por la exposición a concentraciones iguales o superiores a 40000 mg·kg<sup>-1</sup> de hidrocarburos totales del petróleo (HTP), mientras que

concentraciones inferiores a 5000 mg·kg<sup>-1</sup> normalmente no causan efectos dañinos en el crecimiento vegetal (Kulakow, 1998). Salanitro *et al.* (1997) identificaron que concentraciones de 4200 a 9600 ppm de crudo mediano, y 25000 a 26000 ppm de crudo liviano inhibieron la germinación de las semillas de avena (*Avena sativa*), trigo (*Triticum aestivum*) y maíz (*Zea mays*).

Pruebas ecotoxicológicas realizadas por Dorn y Salanitro (2000) con concentraciones de 37700 a 122200 ppm de crudos liviano, mediano y pesado inhibieron la germinación de semillas de maíz. La producción de biomasa total de plantas de cebada (*Hordeum vulgare*) disminuyó hasta 57% por el efecto de la exposición a 40000 mg·kg<sup>-1</sup> de HTP (Porta *et al.*, 1999).

### PALABRAS CLAVE / *Brachiaria* / *Cyperus* / *Echinochloa* / Fitotoxicidad / Hidrocarburos / *Mimosa* /

Recibido: 09/01/2004. Modificado: 26/05/2004. Aceptado: 31/05/2004.

María del Carmen Rivera-Cruz. Ingeniero Agrónomo, Colegio Superior de Agricultura Tropical, Tabasco, México. Maestría en Ciencias y Doctorado en Ciencias en Edafología, Cole-

gio de Postgraduados, Montecillo, México. Profesor Investigador, Colegio de Postgraduados, Tabasco, México. Dirección: Periférico Carlos A. Molina s/n, km. 3.5, H. Cárde-

nas, Tabasco, México. e-mail: mariari@colpos.mx  
Antonio Trujillo-Narcía. Ingeniero Agrónomo, Colegio Superior de Agricultura Tropical, Tabasco, México. Maestría en

Ciencias en Edafología, Colegio de Postgraduados, Montecillo, México. Estudiante de Doctorado, El Colegio de la Frontera Sur, Unidad Villahermosa, Tabasco, México.

## SUMMARY

The study of plant behavior in petroleum contaminated soils allows the identification and selection of oil pollution indicator species. The effect of soil petroleum on the diversity, canopy and productivity of a prairie in Southeastern Mexico was studied. Different and tempered petroleum concentrations were evaluated on the germination, growth, aerial, root and total biomasses, and number of nodules. The prairie was divided in four areas according to the total petroleum hydrocarbons (THP) concentration: 150, 2791, 9035 and 79457mg·kg<sup>-1</sup>. The largest diversity was found in the two most contaminated soils but biomass production was 50% lower than in the soil with less THP. Three sequential experiments were carried out, on sprouts for a 32 day exposure to oil, and on plants for a 150 day exposure, using a random factorial analysis and the species

*Echinochloa polystachya*, *Brachiaria mutica*, *Cyperus articulatus*, *Cyperus sp.* and *Mimosa pigra*. Three concentrations (50000, 100000 y 150000 mg·kg<sup>-1</sup>) were prepared for comparison with tempered petroleum (79457mg·kg<sup>-1</sup>). OECD Protocol N°208 was applied to evaluate the toxic effects on sprouts and a protocol was designed for plants. Germination, height, root length, biomass and number of nodules were evaluated. Significant differences were found in all variables in sprouts and plants of the five species. Germination was positively associated with the largest tempered petroleum concentrations but growth, root length, biomass and number of nodules were reduced in sprouts. In plants all the variables were reduced. The most sensitive species, best phytoindicators of toxic levels were *E. polystachya* and *B. mutica* in sprouts and *M. pigra* in plants

## RESUMO

O estudo do comportamento de plantas em solos contaminados com petróleo permite identificar e selecionar espécies fito-indicadoras de tal contaminação. Estudou-se o efeito, do petróleo no solo, sobre a diversidade, cobertura e produtividade em um prado no sudeste do México. Avaliaram-se diferentes concentrações de petróleo novo e intemperizado na germinação, crescimento, biomassa aérea, radical e total, e o número de nódulos. O prado dividiu-se em quatro áreas segundo a concentração de hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP): 150, 2791, 9035 e 79457mg·kg<sup>-1</sup>. A maior diversidade vegetal encontrou-se nos dois solos mais contaminados mas, a produção de biomassa reduziu-se até 50% com respeito ao solo com menos HTP. Realizaram-se três experimentos sequenciais em plântulas durante 32 dias de exposição ao petróleo, e em plantas durante 150 dias de exposição, em arranjo fatorial e modelo ao azar, com as espécies

*Echinochloa polystachya*, *Brachiaria mutica*, *Cyperus articulatus*, *Cyperus sp.* e *Mimosa pigra*. Prepararam-se três concentrações (50000, 100000 y 150000 mg·kg<sup>-1</sup>) para comparar com o petróleo intemperizado (79457mg·kg<sup>-1</sup>). Aplicou-se o protocolo OCDE N°208 para avaliar efeito tóxico em plântulas e para plantas se desenhou um protocolo. Avaliaram-se germinação, altura, longitude da raiz, biomassa e número de nódulos. Houve diferenças significativas em todas as variáveis em plântulas e plantas das cinco espécies. A germinação se associou positivamente com as maiores concentrações de petróleo intemperizado, mas se reduziram crescimento, longitude da raiz, biomassa e número de nódulos em plântulas. Em plantas, todas as variáveis foram reduzidas. As espécies mais sensíveis, melhores fito-indicadoras de níveis tóxicos, foram *E. polystachya* e *B. mutica* em plântulas, e *M. pigra* em plantas.

Las plantas que crecen en suelos con hidrocarburos como las gramíneas *Cynodon dactylon* y *Festuca arundinacea* (Banks, 1997), *Echinochloa polystachya* y *Paspalum virgatum* (Rivera-Cruz et al., 2002) y las leguminosas *Phaseolus vulgaris* y *Trifolium repens* (Banks, 1997; Chañeau et al., 1997) pueden ser bioindicadores de la calidad del suelo, lo que permite valorar y determinar los factores de riesgo asociados con la exposición de la planta a petróleos nuevo (recién extraído del subsuelo) o intemperizado (expuesto a las condiciones ambientales al menos durante 20 años) y al petróleo acumulado en el suelo por derrames crónicos.

La Norma Oficial Mexicana NOM-EM-138-ECOL-2002 establece que los límites máximos permisibles de contaminación en suelos con usos agrícola, o de conservación o forestal, no deben rebasar 1000mg de HTP por

cada kg de suelo seco (NOM, 2002). La norma ambiental en México no utiliza plantas como indicadores de toxicidad en el suelo, y la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente no especifica el uso de estos bioindicadores. Para obtener indicadores de fitotoxicidad del petróleo en suelos de las zonas petroleras de Tabasco, es necesario identificar y medir la sensibilidad de las plantas nativas. Los objetivos del presente trabajo fueron: a) estudiar el efecto del petróleo en el suelo sobre la diversidad, cobertura y productividad de una pradera; b) evaluar y explicar el efecto de diferentes concentraciones de petróleos nuevo e intemperizado en la germinación, crecimiento, biomasa aérea, de raíz y total, y en el número de nódulos; y c) identificar especies fitoindicadoras de la toxicidad del petróleo en el suelo.

## Materiales y Métodos

Se realizaron tres actividades secuenciales: 1) Colecta de plantas en cuatro áreas con diferentes concentraciones de petróleo en el suelo. 2) Muestreo de suelos en las cuatro áreas, análisis de las propiedades físicas y químicas, y cuantificación de los HTP. 3) Ensayos de toxicidad del petróleo con plántulas y plantas, con protocolos estandarizados (Figura 1).

### Trabajo de campo

El estudio se realizó en 6,25ha, en el ejido José N. Roviroso, municipio Huimanguillo, Tabasco, México ubicado en 94°02'31"N y 18°04'54"O. La temperatura media anual es de 32°C y la altitud de 20msnm. El suelo es un Gleysol antráquico (FAO, 1998) cultivado con pastos de uso forrajero y en algunas partes existe vegetación nativa herbácea y arbus-

tiva. La concentración de HTP en el suelo superficial (0-30cm), determinada con el método analítico EPA 418.1 (EPA, 1986), varió de 150 a 79457 por kg de suelo seco (mg·kg<sup>-1</sup>). La concentración de HTP fue la base para dividir el terreno evaluado en cuatro áreas (Tabla I). Se determinó la cobertura vegetal y la producción de biomasa vegetal en dos épocas (primavera y otoño de 2002) mediante el método del metro cuadrado. Se cuantificó la diversidad vegetal por cobertura (Stiling, 1999) con el índice de Simpson [ $DI = \sum(n_i/N)^2$ ]. La selección de plantas utilizadas para los ensayos en invernadero se determinó por la mayor cobertura vegetal.

### Ensayos de fitotoxicidad

Los tres ensayos en invernadero (Figura 1) se realizaron en las instalaciones del *Campus* Tabasco del Colegio de Postgraduados, localizado

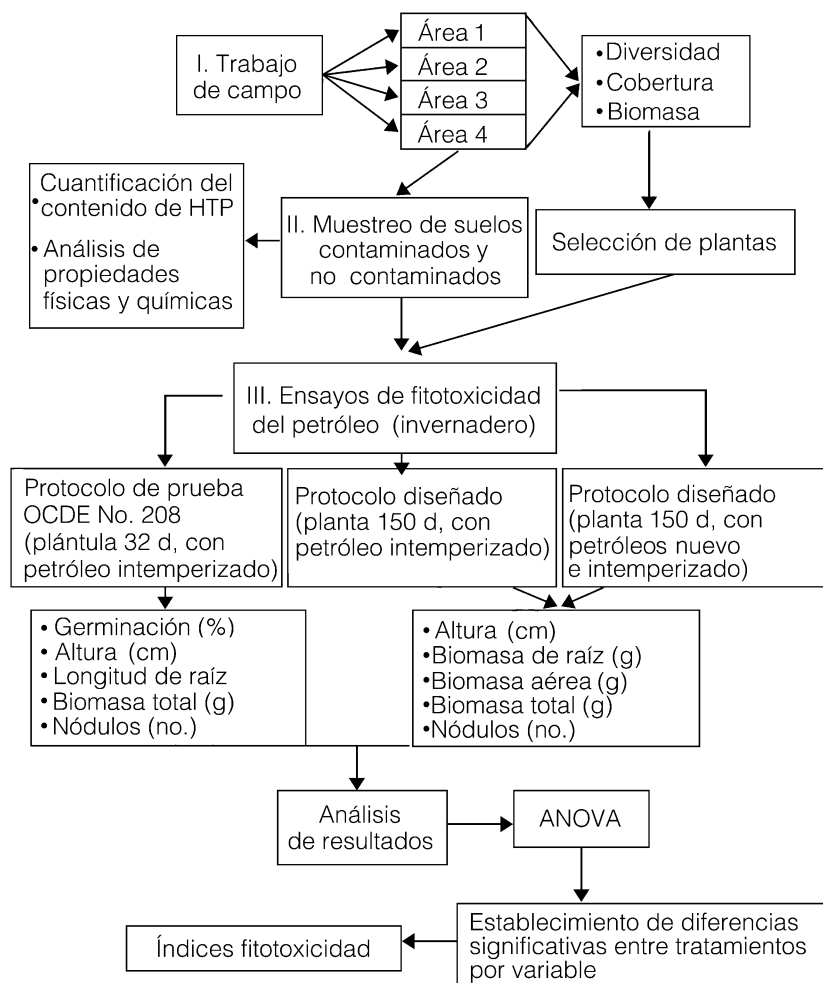


Figura 1. Flujograma del trabajo de campo y de los ensayos de fitotoxicidad.

en H. Cárdenas, Tabasco, México. El clima es cálido húmedo con abundantes lluvias en verano y la temperatura media anual es 25,8°C (INEGI, 2001). Los ensayos de fitotoxicidad se realizaron

con las cinco especies con mayor cobertura en las cuatro áreas evaluadas: los pastos alemán (*Echinochloa polystachya*) y egipcio (*Brachiaria mutica*), dos especies nativas localmente denominadas ce-

por unidad experimental; y c) se evaluaron otras variables. El ensayo se realizó del 16 ene al 17 feb, 2003. Se utilizaron el suelo del Área 1 con concentración basal de HTP (150mg·kg<sup>-1</sup>), los suelos de

bollín (*Cyperus* sp), tulillo (*Cyperus articulatus*) y la leguminosa arbustiva también nativa, denominada zarza (*Mimosa pigra*). La identificación de las plantas se corroboró con la información de Magaña (1995).

**Primer ensayo: Evaluación de plántulas en suelo con petróleo intemperizado.** Se utilizó el Protocolo N°204 de la Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico (OECD, 1984). Se hicieron tres modificaciones: a) se utilizó un recipiente de vidrio más grande (envase de 22cm de ancho, 32cm de largo y 7cm de profundidad) en lugar de la caja de Petri de 20cm de diámetro; b) se sembraron 100 semillas o yemas

de las cinco especies vegetales se sembraron en suelo sin petróleo 30 días antes del inicio del experimento, se trasplantaron dos plántulas de 10cm de altura a cada contenedor, 15 días después se eliminó una plántula de cada contenedor. Se aplicó riego con agua destilada cada 24h y la humedad se mantuvo en 23%. Las variables evaluadas se mencionan en la Figura 1.

Áreas 2 a 4, con 2791, 9035 y 79457mg·kg<sup>-1</sup> de petróleo intemperizado, respectivamente, y las cinco especies vegetales arriba mencionadas, con cuatro repeticiones por tratamiento. Se aplicó un diseño completamente al azar con arreglo factorial 4x5. Se sembraron 100 yemas de cada pasto (alemán y egipcio) y 100 semillas (cebollín y zarza) en cada envase de vidrio. El riego con agua destilada se efectuó cada 24h y la humedad del suelo se mantuvo en 23%. Las plántulas se cosecharon a los 32 días. En la Figura 1 se observan las variables para medir el efecto del petróleo intemperizado.

**Segundo ensayo: Evaluación de plantas en suelo con petróleo intemperizado.** El segundo estudio se realizó durante 150 días (23 nov 2002 a 23 abr 2003) utilizando los cuatro suelos, las cinco especies vegetales, el diseño experimental, el arreglo factorial y las repeticiones como en el primer ensayo. Se utilizaron contenedores (frascos de vidrio ámbar) con capacidad de 1800g de suelo. Las yemas y las semillas de las cinco especies vegetales se sembraron en

**Tercer ensayo: Evaluación de plantas en suelos con petróleos nuevo e intemperizado.** Este se realizó durante 150 días (8 feb a 8 de jun 2003). Se utilizaron las cinco especies vegetales y cinco concentraciones de petróleo: el testigo consistente en el suelo del Área 1 con el menor contenido de HTP (150mg·kg<sup>-1</sup>), tres niveles (50000, 100000 y 150000mg·kg<sup>-1</sup>) de crudo liviano nuevo (extraído el 4 feb 2003), y el mayor nivel

TABLA I  
CARACTERÍSTICAS FÍSICAS Y QUÍMICAS DE LA CAPA SUPERFICIAL (<0,30M)  
DEL SUELO UTILIZADO

Variable	Área 1	Área 2	Área 3	Área 4
NO <sub>3</sub> (mg·kg <sup>-1</sup> )	2	10	2,8	9
NH <sub>4</sub> (mg·kg <sup>-1</sup> )	10	55	17	59
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> Olsen (mg·kg <sup>-1</sup> )	21	15	17	3,6
CIC (cmol <sup>+</sup> ·kg <sup>-1</sup> )	17	24	56	44
pH (H <sub>2</sub> O, relación 1:2)	5,0	4,6	4,7	4,2
CE (dS·m <sup>-1</sup> )	0,47	0,81	1,56	0,55
Na (cmol <sup>+</sup> ·kg <sup>-1</sup> )	2,4	7,57	16,17	5,04
Ca (cmol <sup>+</sup> ·kg <sup>-1</sup> )	8,5	9,6	25,0	11,9
Mg (cmol <sup>+</sup> ·kg <sup>-1</sup> )	3,87	9,21	15,63	3,63
K (cmol <sup>+</sup> ·kg <sup>-1</sup> )	0,12	0,11	0,20	0,40
MO (%)	3	28	44	84
Textura	Migajón-arcillosa*	Migajón-arcillosa	Migajón-arcillosa	Migajón-arcillosa
HTP (mg·kg <sup>-1</sup> )	150	2791	9035	79457

\* También denominada franco-arcillosa (*loam clay*).

TABLA II  
COBERTURA (%), ÍNDICE DE DIVERSIDAD Y BIOMASA TOTAL EN SUELOS  
CONTAMINADOS CON CRUDO INTEMPERIZADO

Especie vegetal	Primavera (abril 2002)				Otoño (noviembre 2002)			
	Área				Área			
	1	2	3	4	1	2	3	4
Pasto alemán ( <i>E. polystachya</i> )	95	93	3	5	97	90	2	5
Pasto egipcio ( <i>B. mutica</i> )			50				50	5
Pasto cabezón ( <i>P. virgatum</i> )							3	
Cebollín ( <i>Cyperus</i> sp.)			2	40			5	25
Tulillo ( <i>Cyperus articulatus</i> )		2	40	20		5	25	20
Espadaño ( <i>Typha</i> sp.)				30				35
Ojilla ( <i>Thalia</i> sp.)							3	2
Florequilla (Asteraceae)	5	2	2		3	2		
Uña de gato ( <i>S. lanceifolium</i> )							3	
Tule (Juncaceae)				3				5
Bejuco 1 (Convolvulaceae)							4	
Bejuco 2 (Curcubitaceae)							3	
Chipilín silvestre ( <i>Crotalaria</i> sp.)		3				3		
Zarza ( <i>Mimosa pigra</i> )			3	2				3
Diversidad (Número de especies)	2	4	6	6	2	4	9	8
HTP (mg·kg <sup>-1</sup> )	150	2791	9035	79457				
Índice de Simpson (% cobertura)	0,905	0,866	0,413	0,294	0,942	0,814	0,322	0,234
Biomasa total (g)	2350	2300	1905	1053	7190	7091	6135	3858

de crudo intemperizado (79457mg·kg<sup>-1</sup>). Se aplicó un diseño completamente al azar con arreglo factorial 5x5 y cuatro repeticiones por tratamiento. El manejo y las variables evaluadas fueron las mismas del segundo ensayo.

#### Análisis estadístico

Se aplicó el procedimiento GLM para el análisis estadístico, así como la prueba de Tukey para determinar diferencias estadísticas de las medias de los tratamientos ( $p < 0,05$ ; SAS, 1989).

#### Índices de fitotoxicidad

El índice de fitotoxicidad representa la respuesta de la plántula o la planta a la exposición a los petróleos nuevo o intemperizado. Se compararon a nivel de plántula con la

prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ) los resultados de medias de la germinación, altura de plántula, longitud de raíz, biomasa total y el número de nódulos de la leguminosa zarza. En las plantas se compararon la altura, biomasa de raíz, aérea y total, y número de nódulos. El cálculo del índice relativo de fitotoxicidad (IRF) se realizó para cada especie vegetal y para cada variable. Los IRF de cada una de las variables evaluadas del tratamiento control (150mg·kg<sup>-1</sup>) se tomaron como referencia para medir los efectos del petróleo nuevo o intemperizado. El índice absoluto de fitotoxicidad (IAF) se determinó para cada una de las cinco especies vegetales mediante la suma de los IRF correspondientes. Los IRF y los IAF mayores representan mayor efecto fitotóxico y viceversa. Los valores de los índices se calcularon como  $IRF = \frac{\text{Tratamiento testigo}}{\text{Tratamiento con petróleo}}$ ; e  $IAF = \sum IRF$ .

#### Resultados y Discusión

##### Diversidad vegetal y biomasa total en suelos contaminados con petróleo intemperizado

La diversidad vegetal y la biomasa total en las cuatro áreas fueron diferentes en los muestreos realizados en abril y noviembre de 2002 (Tabla II). La diversidad fue mayor en ambos muestreos en las Áreas 3 y 4, que tienen 9035 y 79457mg de HTP por kg de suelo seco, respectivamente, pero la producción de biomasa total fue hasta 50% menor respecto al Área 1 (150mg·kg<sup>-1</sup>), donde hubo manejo agrícola intensivo del productor (praderas compuestas por los pastos alemán y egipcio). Las Áreas 1 y 2 tuvieron menor diversidad vegetal porque el pasto alemán o el pasto egipcio, con numerosos tallos vigorosos, alcanzaron una alta dominancia, con coberturas mayores al 90%. Las Áreas 3 y 4 tuvieron mayor diversidad vegetal al haber menor competencia, encontrándose espacios libres entre los macollos de los pastos, cuyos tallos primarios son delgados,

TABLA III  
RESPUESTA DE LAS PLÁNTULAS A LOS 32 DÍAS DE EXPOSICIÓN EN SUELOS  
CONTAMINADOS CON PETRÓLEO INTEMPERIZADO

Especie vegetal	Suelo	Concentración HTP (mg·kg <sup>-1</sup> )	Germinación (%)	Altura plántula (cm)	Longitud raíz (cm)	Biomasa total (g)	Nódulos (N°)
Pasto alemán	1	150	100a*	16,6b	12ba	3,4a	-
	2	2791	49b	31a	18,7a	4a	-
	3	9035	33d	8b	4,6b	2b	-
	4	79457	46c	8,7b	9,6b	2,3b	-
Pasto egipcio	1	150	88b	17b	13b	3,4b	-
	2	2791	33c	32a	22a	4,5a	-
	3	9035	17d	14b	9cb	2,3c	-
	4	79457	100a	5,9c	6c	1,9c	-
Cebollín	1	150	35d	19a	9b	6a	-
	2	2791	80b	17a	14a	5b	-
	3	9035	100a	6b	5c	3,7c	-
	4	79457	50c	1c	1d	1d	-
Tulillo	1	150	36d	20a	10b	8a	-
	2	2791	82b	18a	16a	6b	-
	3	9035	100a	7b	6c	4,5c	-
	4	79457	50c	2c	2d	2d	-
Zarza	1	150	46c	6a	6a	8,2a	3a
	2	2791	67b	7a	8a	8ab	4a
	3	9035	47c	6a	7a	6b	0,47b
	4	79457	100a	4b	3b	4c	0b

\* Medias con la misma letra dentro de cada especie vegetal no tienen diferencias estadísticas (Tukey,  $p < 0,05$ ).

TABLA IV  
RESPUESTA DE LAS PLANTAS A LOS 150 DÍAS DE EXPOSICIÓN EN SUELOS  
CONTAMINADOS CON PETRÓLEO INTEMPERIZADO

Especie vegetal	Suelo	Concentración HTP (mg·kg <sup>-1</sup> )	Altura plántula (cm)	Biomasa raíz (g)	Biomasa aérea (cm)	Biomasa total (g)	Nódulos (n)
Pasto alemán	1	150	69a*	28a	14a	14a	-
	2	2791	59b	11b	7b	18b	-
	3	9035	34c	10b	7b	17b	-
	4	79457	27c	2c	2c	4c	-
Pasto egipto	1	150	143a	16a	17a	33a	-
	2	2791	131a	11b	16a	27b	-
	3	9035	96b	9b	13a	22b	-
	4	79457	36c	1c	1b	2c	-
Cebollín	1	150	39a	6a	6a	12a	-
	2	2791	37a	3b	5,6ba	8,6b	-
	3	9035	35a	3b	4,6b	7,6b	-
	4	79457	6b	0,2c	0,4c	0,6c	-
Tulillo	1	150	50a	1,1a	1,9a	3,09a	-
	2	2791	49a	0,8b	2a	2,8a	-
	3	9035	43a	0,4b	1,4b	1,8a	-
	4	79457	13b	0,05c	0,09c	0,14b	-
Zarza	1	150	129a	15a	28a	43a	30a
	2	2791	84b	2,3b	8,7b	11b	0b**
	3	9035	36c	0,5b	1,5c	2,0c	0b**
	4	79457	9,6d	0,5b	0,29c	0,34c	0b**

\* Medias con la misma letra dentro de cada especie vegetal no tienen diferencias estadísticas (Tukey, p<0.05).

\*\* No hubo producción de nódulos.

elongados y sin tallos secundarios ni terciarios (plántulas). El espacio fue ocupado por las otras especies vegetales (Tabla II). La supervivencia de las plantas en los suelos con petróleo intemperizado posiblemente se debe a lo señalado por Cunningham *et al.* (1996), que disminuyen los niveles de toxicidad de los contaminantes por los procesos bioquímicos que ocurren en el sistema rizosférico.

La dominancia, medida como índice de Simpson, varió de 0,234 en el Área 4 donde se encontraron ocho especies vegetales a 0,94 en el Área 2 con solo dos especies, de las que el pasto alemán alcanzó 97% de cobertura. Las menores biomasa vegetal en primavera y otoño, encontradas en las Áreas 3 y 4, tienen relación inversa con los contenidos de petróleo intemperizado. Estos resultados fueron similares a los obtenidos por Porta *et al.* (1999) en cultivo de cebada (*Hordeum vulgare*) y por Lin y Mendelssohn (1998) en plantas de *Spartina alterniflora* y *S. patens*.

#### Plántulas en suelo con petróleo intemperizado

La germinación evidenció diferencias estadísticas significativas entre tratamientos (p<0,05). El porcentaje de germinación varió según la especie vegetal y la concentración de petróleo en el suelo (Tabla III). La germinación de las yemas del pasto alemán fue inhibida por el petróleo hasta en 33%, en cambio el petróleo promovió ligeramente la germinación de las yemas del pasto egipto y en más de dos veces la de las semillas de las dos ciperáceas y de la leguminosa. Los resultados de ensayos de germinación de Ortiz (2001) con *Cyperus elegans* fueron similares a los obtenidos con las de cebollín (*Cyperus* sp.) y con tulillo (*C. articulatus*). De acuerdo con Salisbury y Ross (1999) la germinación de la semilla inicia con la hidratación o imbibición; el agua entra al embrión e hidrata las proteínas, después inicia la formación o activación de enzimas que originan un incremento en la

actividad metabólica. La influencia positiva del petróleo sobre la germinación de la semilla parece estar ligada a un aumento en la entrada del agua en el endospermo y en la cubierta seminal, de modo que ocurren cambios enzimáticos en menor tiempo. Los resultados obtenidos no identifican las causas que promovieron la germinación, y las reacciones deben ser explicadas a nivel enzimático y bioquímico. De acuerdo con Bossert y Bartha (1985) y Salanito *et al.* (1997) ciertas fracciones del petróleo pueden funcionar como auxinas promotoras de la germinación.

La mayor altura de las plántulas y la mayor longitud de las raíces de las cinco especies se presentó en el suelo con un valor de HTP de 2791mg·kg<sup>-1</sup> (Tabla III). Resultados semejantes fueron encontrados por Plice (1946) en cultivo de algodón con aplicaciones de concentraciones bajas de productos aceitosos para el control de plagas. La mayor producción de biomasa total de los pastos ale-

mán y egipto se encontró en el suelo con 2791mg·kg<sup>-1</sup>, lo cual demuestra mayor tolerancia al petróleo. En las otras tres especies fue en el suelo con 150mg·kg<sup>-1</sup> donde se produjo mayor biomasa. Cabe señalar que aunque el porcentaje de germinación fue mayor en el suelo más contaminado, no se reflejó en la biomasa porque las raíces crecieron muy atrofiadas (cortas y gruesas); además la altura de la planta y la longitud de la raíz fueron severamente afectadas (Tabla III).

La exposición de las plantas al petróleo pueden inhibir el crecimiento y la producción de biomasa (Huang *et al.*, 1995; Ramanathan y Burks, 1996), aumentar la biomasa (Bossert y Bartha, 1985; Salanito *et al.*, 1997; Dorn *et al.*, 1998; Dorn y Salanito, 2000), e incluso no producir efectos fitotóxicos (Ren *et al.*, 1996; Ortiz, 2001). Esta respuesta variable depende, según Ortiz (2001), de los tipos de petróleo y de suelo, de la especie vegetal y de las condiciones generales de experimentación. El efecto promotor del petróleo es atribuible a que ciertos hidrocarburos o sus metabolitos funcionan como auxinas naturales (Bossert y Bartha, 1985; Salanito *et al.*, 1997). La mayor sensibilidad de la zarza a la exposición del petróleo intemperizado fue evidente en el número de nódulos en las raíces. Los nódulos se formaron en los dos suelos con menor concentración de petróleo intemperizado (Tabla III).

#### Crecimiento, biomasa y nodulación de plantas en suelo con petróleo intemperizado

La altura de la planta, la biomasa y la nodulación evidenciaron diferencias estadísticas significativas (p<0,05) entre las medias de los tratamientos con diferentes concentraciones de petróleo intemperizado en el suelo (Tabla IV). La altura y la biomasa de las cinco especies vegetales y la nodulación de la

zarza fueron severamente reducidas por el efecto de 79457mg·kg<sup>-1</sup> de petróleo en el suelo. La mayor disminución de la altura fue 14 veces en plantas de zarza; la mayor reducción de la producción de biomasa total fue 126 veces en plantas de zarza; la nodulación en esta leguminosa tuvo el mismo comportamiento.

Las plantas de cebollín y tulillo, pertenecientes al género *Cyperus*, presentaron menor sensibilidad al petróleo en el suelo, los resultados de altura de planta y biomasa total no tuvieron diferencias significativas entre los tratamientos con 150, 2791 y 9035mg·kg<sup>-1</sup> pero sí hubo diferencia al establecerla en suelo con 79457mg·kg<sup>-1</sup>. Las plantas del género *Cyperus* acompañan a los cultivos que han evolucionado en sitios contaminados (Grime, 1982). Estas plantas son ruderales cuya adaptación esta dirigida hacia la supervivencia en situaciones en donde imperan factores limitantes y alta perturbación.

Las plantas de zarza fueron las más sensibles a la presencia de petróleo intemperizado en el suelo. Los valores mayores de altura, biomasa de raíz, aérea y total, así como del número de nódulos ocurrieron en el suelo con 150mg·kg<sup>-1</sup>, y los más bajos se encontraron en el suelo con 79457mg·kg<sup>-1</sup>. La ausencia total de nódulos en la raíz de las plantas de zarza en los tres suelos más contaminados puede ser atribuible a las condiciones ambientales desfavorables (Drevon, 1995), que en este caso particular se debe a la presencia de petróleo, lo que inhibe las poblaciones de rizobia. No obstante lo anterior, si se comparan los datos de nodulación reportados en las Tablas IV y V, parece ser que una fracción del petróleo intemperizado, no presente en el tratamiento con 50000mg·kg<sup>-1</sup> de petróleo nuevo, es el factor restrictivo que inhibe o elimina en el suelo la población de rizobia específicos en la rizosfera de

TABLA V  
CRECIMIENTO, BIOMASA Y NODULACIÓN DE LAS PLANTAS A LOS 150 DÍAS DE EXPOSICIÓN EN SUELOS CON PETRÓLEOS NUEVO E INTEMPERIZADO

Especie vegetal	Suelo	Concentración HTP (mg·kg <sup>-1</sup> ) Base seca	Altura planta (cm)	Biomasa raíz (g)	Biomasa aérea (cm)	Biomasa total (g)	Nódulos (n)
Pasto alemán	1	150*	142a**	19b	23a	42b	-
	2	50000*	84ba	29a	23a	52a	-
	3	79457***	18c	3,6c	2b	5,6c	-
	4	100000*	59b	33a	22a	55a	-
	5	150000*	8d	1,3c	1b	2,3c	-
Pasto egipto	1	150	160a	44a	34a	78a	-
	2	50000	144b	34ba	29a	63a	-
	3	79457	34c	1c	0,8b	1,8c	-
	4	100000	141b	30b	12b	42b	-
	5	150000	2d	1c	0,8b	1,8c	-
Cebollín	1	150	53a	6a	5,8b	11,8b	-
	2	50000	55a	5a	13a	18a	-
	3	79457	29c	1,3b	0,8c	2,1c	-
	4	100000	39b	5a	7b	12b	-
	5	150000	0d <sup>∅</sup>	0b <sup>∅</sup>	0d <sup>∅</sup>	0c <sup>∅</sup>	-
Tulillo	1	150	76a	10a	9b	19a	-
	2	50000	63a	8a	16a	24a	-
	3	79457	7c	1,4b	0,8c	2,2b	-
	4	100000	33b	1,2b	5cb	6,2b	-
	5	150000	25b	0,4b	1,8c	2,2b	-
Zarza	1	150	149a	18a	42a	60a	40a
	2	50000	94b	5b	10b	15b	22b
	3	79457	9d	0,8d	0,3d	1,1d	0c <sup>∅∅</sup>
	4	100000	38c	3c	5c	8c	0c <sup>∅∅</sup>
	5	150000	0e <sup>∅</sup>	0d <sup>∅</sup>	0d <sup>∅</sup>	0,4d	0c <sup>∅∅</sup>

\* Petróleo nuevo. \*\* Medias con la misma letra dentro de cada especie vegetal no tienen diferencias estadísticas (Tukey, p<0,05). \*\*\* Petróleo intemperizado. <sup>∅</sup> Las plantas no sobrevivieron a esta concentración de petróleo nuevo. <sup>∅∅</sup>No hubo formación de nódulos.

la leguminosa zarza, y en consecuencia elimina la nodulación.

*Crecimiento, biomasa y nodulación en plantas en suelos con petróleos nuevo e intemperizado*

La altura de la planta, la biomasa de la raíz, la biomasa aérea, la biomasa total y el número de nódulos fueron estadísticamente diferentes (p<0,05) entre los tratamientos con diferentes concentraciones y edades de petróleos (Tabla V). La altura de la planta y la producción de biomasa total en

las cinco especies vegetales fue mayor en el suelo con menor concentración de HTP (150mg·kg<sup>-1</sup>). Las reducciones más severas se encontraron en los suelos con 79457mg·kg<sup>-1</sup> de HTP intemperizado y con 150000mg·kg<sup>-1</sup> de HTP de petróleo nuevo (Tabla V).

La especie vegetal más sensible a la exposición crónica del petróleo fue la leguminosa zarza. Los resultados obtenidos a los 150 días muestran que en el suelo control (150mg·kg<sup>-1</sup>) las plantas tuvieron mayor altura, la biomasa más grande y el mayor número de nódulos

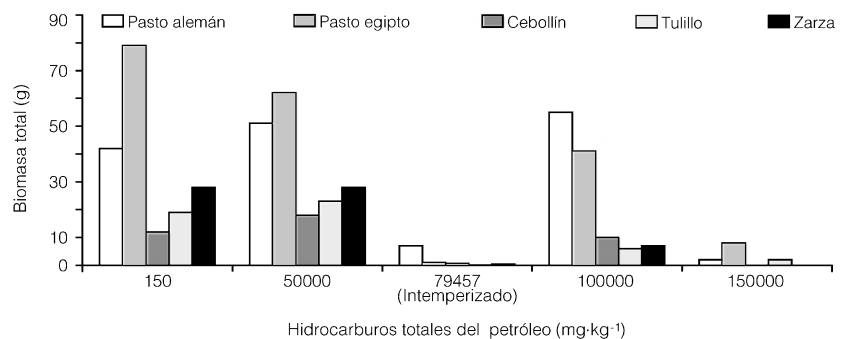


Figura 2. Producción de biomasa total en cinco especies vegetales en suelos con diferentes concentraciones de petróleos nuevo e intemperizado, durante 150 días de exposición.

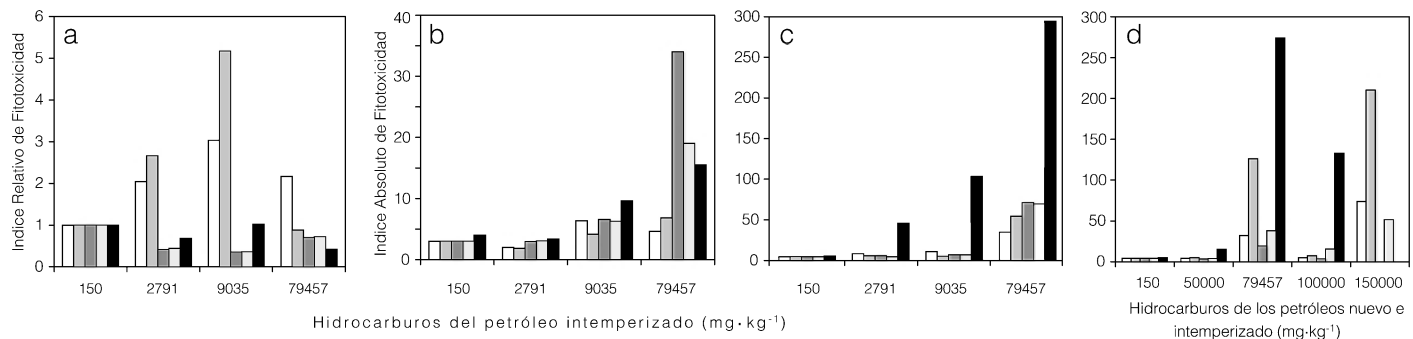


Figura 3. Índices relativos (a) y absolutos (b, c, d) de fitotoxicidad de cinco especies vegetales expuestas a petróleo, determinados por los valores de la germinación, altura, longitud de raíz, biomasa y número de nódulos. a: Índice relativo de fitotoxicidad de germinación, 32 días de exposición; b: Índice absoluto de fitotoxicidad, 32 días de exposición; c: Índice absoluto de fitotoxicidad, 150 días de exposición; d: Índice absoluto de fitotoxicidad, 150 días de exposición.

(Tabla V) y el efecto fitotóxico fue menor. A diferencia de los resultados de la zarza (Tabla IV) donde no hubo formación de nódulos a los 150 días en los suelos con petróleo intemperizado, en los suelos control y con 50000mg·kg<sup>-1</sup> se formaron nódulos, lo que sugiere que las propiedades físicas y químicas que requiere la rizobia para infectar la raíz y formar el nódulo son adecuadas en estos suelos contaminados.

Las plantas de cebollín y tulillo fueron tolerantes a 50000 mg·kg<sup>-1</sup>, lo que parece estar relacionado con una respuesta de supervivencia a condiciones de estrés originado por el petróleo en el suelo. Según Grime (1982) las ciperáceas son especies rústicas que toleran condiciones ambientales críticas. La especie tulillo toleró más el petróleo, aunque presentó menor biomasa aérea; la respuesta no mostró diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos con concentración basal (150mg·kg<sup>-1</sup>) y con 50000mg·kg<sup>-1</sup> (Tabla V). En investigaciones realizadas por Rivera (2001), quien evaluó la respuesta del pasto alemán a 50000 y 100000mg·kg<sup>-1</sup> de HTP de petróleo nuevo, se encontraron diferencias estadísticas significativas en la biomasa total del pasto alemán durante 120 días.

La Figura 2 muestra la variación de la biomasa total de las cinco especies vegetales a los 150 días por el efecto de

los hidrocarburos del petróleo. La disminución generalizada de la biomasa total fue severa por el efecto tóxico del petróleo intemperizado, lo que sugiere que una fracción no presente en el petróleo nuevo origina mayor disminución de la producción de biomasa de las cinco especies vegetales, aunque la concentración con 150000mg·kg<sup>-1</sup> también produjo efecto similar en el volumen de la biomasa.

#### *Índices relativos y absolutos de fitotoxicidad*

Los índices de fitotoxicidad se determinaron en plántula y en planta por el efecto de la exposición de las yemas, semillas, plántulas y plantas a los petróleos nuevo e intemperizado en el suelo. La germinación de las yemas de los pastos alemán y egipcio fue más afectada que las otras tres especies durante 32 días de exposición (Figura 3a). Los IRF de los pastos fueron mayores en los tres suelos más contaminados respecto al tratamiento control, y el mayor índice se presentó en la germinación del pasto egipcio en suelo con 9035mg·kg<sup>-1</sup> de HTP del petróleo intemperizado, en donde solamente germinó el 17% de las yemas sembradas (Tabla III). Otra respuesta fisiológica importante fue que las tres especies sembradas con semilla (cebollín, tulillo y zarza) tuvieron menores IRF que el control (150mg·kg<sup>-1</sup>). El efecto fitotóxico fue menor porque

el petróleo estimuló la germinación de la semilla (Tabla V y Figura 3a). Parece ser que ciertas fracciones del petróleo pueden funcionar como auxinas vegetales promotoras de la germinación de la semilla (Bossert y Bartha, 1985; Salanito *et al.*, 1997).

La germinación de las semillas y de las yemas en el suelo con 79457mg·kg<sup>-1</sup> de HTP fue mayor que en los suelos con 2791 y 9035mg·kg<sup>-1</sup> (Tabla III). Apparently el efecto fitotóxico fue menor, ya que se redujeron los valores de los IRF de los dos pastos. Los menores IRF (mayor germinación) en los dos pastos parece ser una respuesta de defensa para asegurar la reproducción; sin embargo el efecto positivo inicial de la mayor concentración de petróleo fue aparente porque a los 32 días se encontraron menor altura, menor biomasa total (Tabla III), raíces cortas y engrosadas, posiblemente originadas por daños físicos del petróleo. Se ha reportado menor retención y disponibilidad de agua en suelos contaminados por la formación de películas hidrofóbicas que rodean a los agregados del suelo, provocando menor absorción de agua (Li *et al.*, 1997; Sawatsky y Li, 1997).

Los IAF a los 32 días en plántulas de las cinco especies muestran una relación proporcional al incremento de la concentración de petróleo (Figura 3b). Los dos pastos fueron más tolerantes

a la toxicidad del petróleo intemperizado, en cambio, la planta de cebollín fue la más sensible en el suelo con 79457mg·kg<sup>-1</sup>, con un IAF de 34.7 originado por la reducción de 19 veces de la altura y 9 veces la longitud de la raíz (Tabla III).

Las cinco especies vegetales expuestas al petróleo intemperizado durante 150 días muestran IAF similares en los pastos y las ciperáceas en los tratamientos con HTP de 150, 2791 y 9035mg·kg<sup>-1</sup> (Figura 3c); en cambio en la planta de zarza los IAF fueron mayores conforme aumentó la cantidad de petróleo. La zarza establecida en suelo con 79457mg·kg<sup>-1</sup> alcanzó un IAF de 295, debido a la ausencia de formación de nódulos, menor cantidad de biomasa y menor altura de la planta (Tabla IV), fue la especie más sensible a la exposición al petróleo.

La comparación del suelo control con HTP basal (150mg·kg<sup>-1</sup>) con los suelos con tres concentraciones de petróleo nuevo (50000, 100000 y 150000mg·kg<sup>-1</sup>) y con la mayor concentración de petróleo intemperizado (79457mg·kg<sup>-1</sup>) evidencia interrelaciones interesantes (Figura 3d). Los IAF de las cinco especies evaluadas en los suelos control y con 50000mg·kg<sup>-1</sup> de petróleo nuevo fueron similares, con excepción del índice de la zarza que fue mayor (Tabla V). Los IAF de los dos pastos y del cebollín en

el suelo con 100000mg·kg<sup>-1</sup> muestran que son especies poco sensibles al efecto del petróleo. En cambio la leguminosa zarza evidenció que es la planta más sensible (Figura 3d). La concentración de 150000mg·kg<sup>-1</sup> originó una tendencia similar de IAF producida por la concentración con 100000mg·kg<sup>-1</sup>, aunque los índices de la zarza y cebollín no pudieron ser calculados porque las plantas no lograron sobrevivir a esta concentración (Tabla V). El efecto del petróleo intemperizado fue notorio en las plantas del pasto egipto y de la leguminosa zarza, siendo el mayor IAF registrado el de 274 en la leguminosa.

### Conclusiones

1. La diversidad vegetal fue mayor en los dos suelos más contaminados con petróleo intemperizado, debido a que existe menos competencia por espacio, y porque en los dos suelos menos contaminados las condiciones naturales e inducidas fueron propicias para la pradera cultivada. Las mayores cobertura y productividad se encontraron en los dos suelos menos contaminados.

2. La germinación de las semillas y yemas de las especies vegetales evaluadas fue promovida por las concentraciones altas de petróleos intemperizado y nuevo; sin embargo, éstas inhibieron el crecimiento, la longitud de la raíz, la biomasa y la nodulación. Concentraciones bajas de petróleo intemperizado estimularon el crecimiento, la longitud de la raíz y la biomasa aérea. Igualmente, concentraciones bajas de petróleo nuevo promovieron el crecimiento, la biomasa de la raíz, la biomasa aérea y la biomasa total. Las mayores concentraciones de los petróleos intemperizado y nuevo originaron mayores efectos fitotóxicos, aparentemente a nivel de alteración de las enzimas.

3. El pasto egipto (*Bracharia mutica*) y la leguminosa zarza (*Mimosa pigra*) fueron

las especies más sensibles a la exposición a los petróleos intemperizado y nuevo, indicando mejor la toxicidad del petróleo en el suelo, por lo que se pueden utilizar como especies fitoindicadoras de suelos contaminados con petróleo.

### AGRADECIMIENTOS

El primer autor agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACYT) por el financiamiento del proyecto I 139336-B, y a Mauricio Ortiz Ocampo por la información proporcionada.

### REFERENCIAS

Banks KM (1997) Phytoremediation of petroleum contaminated soils: Field assessment. En Alleman BC, Lesson A (Chairs). *In Situ and On-Situ Bioremediation*. Vol. 3. Battelle. Columbus, Ohio, EEUU. pp. 305-308.

Bossert I, Bartha R (1985) Plant growth in soils with a history of oily sludge disposal. *Soil Sci. 140*: 75-77.

Cunningham SD, Anderson TA, Schwab AP, Hsu FFC (1996) Phytoremediation of soil contaminated with organic pollutants. *Adv. Agron. 56*: 55-114.

Chaîneau HC, Morel LJ, Oudot J (1997) Phytotoxicity and uptake of fuel oil hydrocarbons. *J. Environ. Qual. 26*: 1478-1483.

Dorn PH, Salanitro J (2000) Temporal ecological assessment of oil contaminated soils before and after bioremediation. *Chemosphere 40*: 419-426.

Dorn PH, Vipon T, Salanitro J, Wisniewsky H (1998) Assessment of the acute toxicity of crude oils in soils using earthworms, microtox and plants. *Chemosphere 37*: 845-860.

Drevon JJ (1995) Importancia y posición de varios sistemas fijadores de nitrógeno atmosférico. En *Manual Técnico de la Fijación Simbiótica del Nitrógeno Leguminosa/Rhizobium*. FAO. Roma, Italia. pp. 9-13

EPA (1986) *Method 418.1 mod. Petroleum Hydrocarbons, Total Recoverable Spectrophotometric Infrared*. Environmental Protection Agency. Washington DC, EEUU. 8 pp.

FAO (1998) *World Reference Base for Soil Resources*. World Soil Resources Reports N°84.

ISSS-ISRIC-FAO. Rome, Italy. 91 pp.

Freedman B (1995) *Environmental Ecology. The Ecological Effects of Pollution, Disturbance, and Stresses*. 2nd ed. Academic Press. San Diego, Ca, USA. 606 pp.

Grime JH (1982) *Estrategias de adaptación de las plantas y procesos que controlan la vegetación*. Limusa. México. pp. 19-77.

Huang X, Dixon G, Greenberg B (1995) Increased polycyclic aromatic hydrocarbons toxicity following their photomodification in natural sunlight: impacts on the duckweed Lemna gibba L. G-3. *Ecotox. Environ. Saf. 32*: 194-200.

Huesemann HM (1994) Guidelines for land-treating petroleum hydrocarbon-contaminated soils. *J. Soil Contam. 3*: 299-318.

INEGI (2001) *Síntesis de Información Geográfica del Estado de Tabasco*. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. Aguascalientes, México. 89 pp.

Kulakow P (1998) Seed mix and plant density. En *Remediation Technologies Forum*. San Francisco, CA, EEUU. pp. 1-7.

Li X, Feng Y, Sawatsky N (1997) Importance of soil-water relations in assessing the endpoint of bioremediated soils. *Plant Soil 192*: 251-261.

Lin Q, Mendelsohn IA (1998) The combined effects of phytoremediation and biostimulation in enhancing habitat restoration and oil degradation of petroleum contaminated wetlands. *Ecol. Eng. 10*: 263-274.

Magaña AMA (1995) *Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas de Tabasco*. DACB. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Villahermosa, Tabasco, México. 205 pp.

NOM (2002) NOM-EM-138-ECOL-2002. Diario Oficial de la Federación. Tomo DLX XXVII N°14. pp. 44-53.

OECD (1984) *Terrestrial plant growth test Guidelines for Testing Chemicals N°208*. OECD. France. pp. 1-5.

Ortiz OM (2001) *Bioensayos con Cyperus elegans para la determinación del potencial fitotóxico de suelos contaminados con hidrocarburos en el pantano de Santa Alejandrina, Veracruz*. Tesis. UNAM. México. 112 pp.

Plice MJ (1946) Some effects of crude petroleum on soil fertility. *Proc. Soil Sci. Soc. Amer. 13*: 413-416.

Porta A, Filliat N, Plata N (1999) Phytotoxicity and phytoremediation studies in soils polluted by weathered oil. En Leeson

A, Alleman BC (Eds.) *Phytoremediation and Innovative Strategies for Specialized Remedial Applications*. Battelle. Columbus, Ohio, EEUU. pp. 51-56.

Pothuluri VJ, Cerniglia EC (1994) Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons. En Chaudry RG (Ed.). *Biological Degradation and Bioremediation of Toxic Chemicals*. Dioscorides. Portland, Oregon, EEUU. pp. 92-123.

Powell R (1997) The use of plants as "field" biomonitors. En Wang W, Gorsuch J, Hughes J (Eds.). *Plants for Environmental Studies*. Lewis. Boca Raton, FL, EEUU. pp. 47-61.

Ramanathan A, Burks S (1996) Hazard evaluation of soil contaminants with aquatic and plant toxicity tests. *Bull. Environ. Contam. Toxicol. 56*: 956-963.

Ren L, Zeiler Z, Dixon B, Greenberg B (1996) Photoinduced effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on *Brassica napus* (Canola) during germination and early seedling development. *Ecotox. Environ. Saf. 33*: 73-80.

Rivera CMC (2001) *Microorganismos rizosféricos de los pastos alemán [Echinochloa polystachya (H.B.K.) Hitchc.] y cabezón (Paspalum virgatum L.) en la degradación del petróleo crudo y el benzo(a)pireno*. Tesis. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, México. 348 pp.

Rivera-Cruz MC, Ferrera-Cerrato R, Volke HV, Rodríguez VR, Fernández LL (2002) Población microbiana en perfiles de suelos afectados por hidrocarburos del petróleo en el estado de Tabasco, México. *Agrociencia 36*: 149-160.

Salanitro J, Dorn P, Hueseman M, Moore K, Rhodes I, Rice L, Jackson T, Viponnd M, Western M, Wisniewsky H (1997) Crude oil hydrocarbon bioremediation and soil ecotoxicity assessment. *Environ. Sci. Technol. 31*: 1769-1776.

Salisbury FB, Ross CW (1999) *Fisiología vegetal*. Interamericana. México DF, México. 759 pp.

SAS (1989) *SAS/IML\* Software: usage and Reference, version 6 1<sup>st</sup> ed.* SAS Institute Inc. Cary, NC, EEUU. 501 pp.

Sawatsky N, Li X (1997) Importance of soil-water relations in assessing the endpoint of bioremediated soils. II. Water-repellency in hydrocarbon contaminated soils. *Plant Soil 192*: 227-236.

Stiling P (1999) *Ecology. Theories and Applications*. 3<sup>rd</sup> ed. Prentice-Hall. New Jersey, EEUU. 638 pp.