

Bioensayo de toxicidad aguda con plantas nativas para evaluar un derrame de petróleo

Acute toxicity bioassay with native plants to evaluate an oil spill

Bioensaio de toxicidade aguda com plantas nativas para avaliar um derrame de petróleo

Vivien Pentreath, Elena González, Mercedes Barquín, Stella Maris Ríos, Susana Perales

Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco. Argentina.

Cita: Pentreath V, González E, Barquín M, Ríos SM, Perales S. Rev. salud ambient. 2015;15(1):4-12.

Recibido: 13 de enero de 2014. **Aceptado:** 22 de enero de 2015. **Publicado:** 15 de junio de 2015.

Autor para correspondencia: Vivien Pentreath.

Correo e: vivienpentreath@yahoo.com.ar

Facultad de Ciencias Naturales. Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco. Ruta Prov. N° 1, km 4. Comodoro Rivadavia. Argentina.

Financiación: Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

Declaración de conflicto de intereses: Los autores declaran que no existen conflictos de intereses que hayan influido en la realización y la preparación de este trabajo.

Declaraciones de autoría: Todos los autores contribuyeron al diseño del estudio y la redacción del artículo. Asimismo, todos los autores aprobaron la versión final.

Resumen

Los bioensayos con plantas constituyen una excelente herramienta en la evaluación del riesgo ambiental y, en particular, la utilización de semillas de plantas vasculares es recomendada debido a su mayor sensibilidad. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el comportamiento de plantas nativas para ser utilizadas como indicador biológico de contaminación ambiental con petróleo en relación con un bioindicador estandarizado. Se analizó el Índice de Germinación (IG) de *Lactuca sativa* L., *Atriplex lampa* (Moq.) D. Dietri. y *Prosopis denudans* Benth. en treinta muestras de suelo extraídas de un yacimiento petrolero a fin de detectar efectos fitotóxicos. El IG es un método económico, rápido y reproducible para determinar toxicidad de suelo, ayudando a caracterizar áreas con suelos contaminados. La germinación de *Atriplex lampa* (Moq.) D. Dietri. y *Prosopis denudans* resultó más resistente en los suelos contaminados de un yacimiento petrolero que el bioindicador de referencia utilizado (*Lactuca sativa* L.).

Palabras clave: test germinación lechuga; ecotoxicología; contaminación; petróleo; *Atriplex lampa*; *Prosopis denudans*.

Abstract

Plant bioassays are excellent tools for the evaluation of environmental risks. In particular the use of seeds of vascular plants is recommended due to their higher sensitivity. The aim of this study was to evaluate the behavior of native plants in order for them to be used as biological indicators of environmental oil pollution in relation to a standardized bioindicator. We analyzed the germination index (GI) of *Lactuca sativa* L., *Atriplex lampa* (Moq.) D. Dietri. and *Prosopis denudans* in thirty soil samples taken from an oil field to detect phytotoxic effects. GI is a cheap, fast and reproducible biological method for determining the toxicity of the soil, thus helping to characterize areas with contaminated soils. The results show that, after germination, *Atriplex lampa* (Moq.) D. Dietri. and *Prosopis denudans* are more resistant in the contaminated soils of an oil field than the reference bioindicator (*Lactuca sativa* L.).

Key words: lettuce germination test; ecotoxicology; pollution; oil; *Atriplex lampa*; *Prosopis denudans*.

Resumo

Os bioensaios com plantas constituem uma excelente ferramenta para a avaliação do risco ambiental e, em particular, a utilização de sementes de plantas vasculares é recomendada devido à sua maior sensibilidade. O objetivo deste trabalho foi avaliar o

comportamento de plantas nativas para serem utilizadas como indicador biológico de contaminação ambiental com petróleo em comparação com um bioindicador estandardizado. Para detetar efeitos fitotóxicos, analisou-se o Índice de Germinação (IG) da *Lactuca sativa* L., *Atriplex lampa* (Moq.) D. Dietri. y *Prosopis denudans* Benth. em trinta amostras de solo extraídas de um campo petrolífero. O IG é um método económico, rápido e reproduzível para determinar a toxicidade do solo, ajudando a caracterizar áreas com solos contaminados. A Germinação de *Atriplex lampa* (Moq.) D. Dietri. y *Prosopis denudans* Benth. revelou-se mais resistente nos solos contaminados dum campo petrolífero do que o bioindicador de referência utilizado (*Lactuca sativa*).

Palavras-chave: teste de germinação de alface; ecotoxicologia; poluição; petróleo; *Atriplex lampa*; *Prosopis denudans*.

INTRODUCCIÓN

La exploración y explotación del petróleo genera diversos niveles de contaminación por su liberación accidental o intencionada en el ambiente, provocando efectos adversos sobre el hombre o sobre el medio, directa o indirectamente.

El petróleo está formado por hidrocarburos saturados y aromáticos, por una fracción polar, de asfaltenos y resinas y por concentraciones bajas de níquel (Ni), hierro (Fe) y vanadio (V)¹. Entre los hidrocarburos del petróleo se encuentra una mezcla de compuestos (alcanos lineales, alcanos ramificados, aromáticos de bajo peso molecular y policíclicos), de los cuales los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH) son los que han recibido mayor atención por su potente efecto mutagénico y carcinogénico. Por otra parte, los hidrocarburos alifáticos lineales son sumamente volátiles, en treinta días podrían desaparecer del medio las cadenas más cortas (nonano a dodecano) y a los sesenta días las cadenas de hasta 26-C (hexacosano)².

Los PAH exhiben fuertes propiedades tóxicas. Se estima que más del 90 % del total de la carga de PAH reside en la superficie del suelo, donde se acumulan la mayoría de estos compuestos³. Sin embargo, los suelos contaminados con PAH también presentan alto contenido de otros contaminantes, como metales pesados, que generalmente derivan de la misma fuente de PAH⁴.

Cabe señalar que los agentes contaminantes en caso de derrame no son solamente los hidrocarburos, sino también los productos orgánicos que provienen de su transformación. Los PAH y sus metabolitos pueden afectar estructuras y funciones a nivel celular y subcelular⁵. El primer blanco de estas sustancias lipofílicas en el nivel celular es la membrana plasmática, donde los lípidos de membrana pueden ser oxidados⁶.

Los derrames de petróleo y los desechos derivados de la industria del petróleo producen contaminación con compuestos inorgánicos (sulfatos y otras sales) y orgánicos (especialmente hidrocarburos), generando una alteración del sustrato original en que se implantan las especies vegetales, dejando suelos inutilizables durante años. Estos impactos repercuten en los sistemas agrícolas de las poblaciones locales, así como en el equilibrio ecológico de los ecosistemas naturales. Las comunidades de microorganismos del suelo son alteradas por la contaminación petrolera, seleccionándose las poblaciones resistentes a los contaminantes, y desapareciendo o disminuyendo las especies menos resistentes. La contaminación petrolera en el suelo puede producir además la asfixia de las raíces, restando vigor a la vegetación y en muchos casos, provoca su desaparición⁷.

El petróleo en el suelo puede eliminar la vegetación debido a sus propiedades fitotóxicas^{8,9}, aunque la intensidad del daño depende del tipo de petróleo. Freedman¹⁰ menciona que el contacto con el petróleo daña y mata el follaje y algunos tejidos leñosos expuestos. La exposición a concentraciones altas de petróleo inhibe el crecimiento vegetativo y reduce la biomasa vegetal de pastos (*Echinochloa polystachya* (Kunth) Hitchc. y *Brachiaria mutica* (Forssk.) Stapf y de ciperáceas (*Cyperus* spp.)¹¹.

Los bioensayos con plantas están siendo considerados, de manera creciente, para el diagnóstico ecotoxicológico, ya que constituyen una excelente herramienta en la evaluación del riesgo ambiental. Representan una metodología ventajosa al brindar información acerca de alguna sustancia que resulte tóxica en el medio, es decir, algún agente que pueda producir un efecto adverso en el sistema biológico, dañar su estructura o función, o producir la muerte. En la práctica estos métodos no pueden reemplazarse por los análisis químicos¹². La utilización de biomonitores propios de los ambientes evaluados favorece indirectamente la preservación

de la biodiversidad local, sin embargo la variabilidad en la aplicación de las técnicas experimentales para el mantenimiento de organismos silvestres afecta a la interpretación y comparación de los resultados entre laboratorios.

Dentro de las metodologías estandarizadas para establecer condiciones controladas, *Lactuca sativa* L. (lechuga) y *Solanum lycopersicum* L. (tomate) han sido recomendadas por la US EPA (Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos) y la FDA (Administración de Drogas y Alimentos de Estados Unidos) para ensayos de fitotoxicidad, encontrándose entre las especies más sensibles. Las plantas vasculares son recomendadas debido a su mayor sensibilidad, en comparación con otras especies^{13,14}. El ensayo ecotoxicológico con semillas presenta algunas ventajas sobre otros ensayos porque permite usar cuantitativamente el crecimiento de la raíz.

El ensayo de germinación y elongación de la radícula se realiza con los constituyentes solubles del agua (aguas superficiales, aguas subterráneas, suelos, sedimentos y lixiviados), teniendo en cuenta, para el resultado, la cantidad de semillas germinadas y la media del crecimiento de la raíz, para calcular la inhibición en un

50 % (CI_{50}) de los parámetros analizados en relación con el testigo^{15,16}.

En la estepa de la Patagonia se encuentran especies como *Atriplex lampa* (Moq.) D. Dietri. (Quenopodiaceae), perteneciente a un género de amplia distribución mundial y *Prosopis denudans* Benth. (Fabaceae) (figura 1), endémica de la provincia fitogeográfica Patagónica. Ambas especies habitan en ambientes alterados por la actividad petrolera, por ello se consideraron de importancia para ser utilizadas en ensayos de toxicidad.

Atriplex lampa (Moq.) D. Dietri, comúnmente conocido como Zampa (figura 1), es un subarbolito originario de Argentina y de amplia distribución en la provincia fitogeográfica del Monte¹⁷. Habita en suelos salados de las provincias de Córdoba y Mendoza hasta Chubut. Es una especie dioica, ramosa, de color amarillento o ceniciento. Tiene singular importancia económica y ecológica, en razón de que constituye un recurso forrajero permanente, de alto contenido proteico¹⁸. Es resistente a la sequía¹⁹ y presenta buena estabilidad frente a la presión de pastoreo. Contribuye a la instalación del estrato herbáceo, siendo reconocida su capacidad de rehabilitación en áreas degradadas²⁰.

Figura 1. Izquierda: *Atriplex lampa* (Moq.) D. Dietri. (Zampa) y derecha: *Prosopis denudans* Benth. (Algarrobo patagónico), con detalle de flor y fruto



Prosopis denudans Benth., comúnmente conocido como algarrobo patagónico (figura 1), es una especie endémica de la Patagonia, xerófita y perfectamente adaptada a la estepa semidesértica, formando poblaciones más o menos abundantes. Es un arbusto que alcanza una altura de uno a dos metros, espinoso, de follaje caedizo, ramitas flexuosas, más bien cortas,

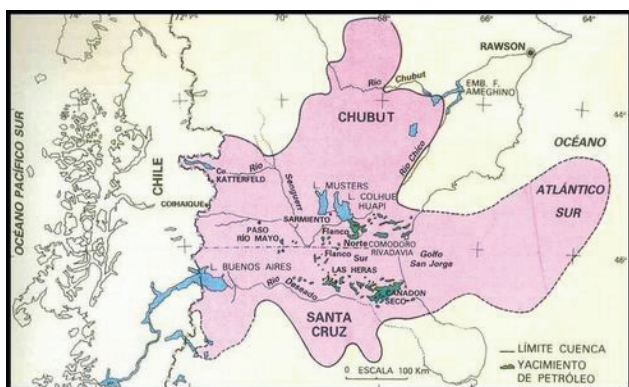
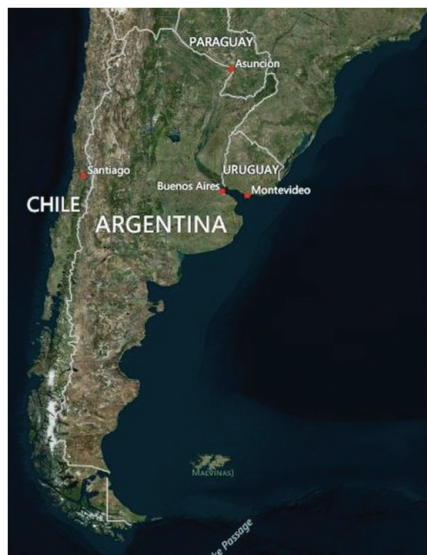
duras, grises con la edad²¹. En general, el género resulta adecuado para la reforestación de suelos afectados por la sequía y salinidad, debido a la alta tolerancia que presentan al déficit hídrico y salino. Esto es, por su característica freatofita, una respuesta adaptativa que permite a las especies producir alta biomasa en ambientes extremadamente áridos²².

El objetivo del presente trabajo fue comparar el comportamiento de plantas nativas como indicador biológico de contaminación ambiental con petróleo, en relación con un indicador biológico estandarizado (*Lactuca sativa* L.), en suelos afectados por la actividad petrolera.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se seleccionó como sitio de estudio un yacimiento petrolero de la cuenca del Golfo San Jorge (figura 2), cercano a la localidad de Comodoro Rivadavia, impactado por diversos eventos de contaminación.

Figura 2. Área de estudio- Detalle de la Cuenca Petrolera Golfo San Jorge



Se tomó de testigo una muestra de suelo considerada libre de contaminación (muestra 1), veintiocho muestras de suelo del yacimiento y dos muestras de las biopilas a fin de evaluar su toxicidad. Las biopilas constituyen un método de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos, basado en la formación de un apilamiento de suelo contaminado en el cual se estimula la actividad

microbiana por adición de nutrientes y humedad. El apilamiento se airea de forma activa, volteando el suelo con maquinaria pesada.

Las muestras se secaron al aire²³⁻²⁵, se disgregaron y tamizaron. Los protocolos de selección, obtención y preservación de las muestras de suelos, correspondieron a los recomendados por organismos internacionales, como US EPA^{26,27} y fueron utilizados por miembros del grupo de investigación en trabajos previos²⁸. La determinación de pH y conductividad eléctrica (EC) se realizó sobre extractos de suelo (1:1 p/p); la capacidad de retención (% SA) de agua se midió directamente sobre las muestras de suelo. Las determinaciones analíticas se llevaron a cabo siguiendo las técnicas descritas en la bibliografía²⁸⁻³⁰ y consistieron en: pH³¹; conductividad eléctrica (EC)³²; humedad³³ e Hidrocarburos Totales de Petróleo (HTP)^{26,34}.

Para los análisis de fitotoxicidad se realizó la prueba de inhibición de la germinación y elongación de raíz con lechuga (*L. sativa* L.) con las muestras de suelo, utilizando la metodología propuesta por Castillo Morales et ál³⁵. Se repitió el ensayo con semillas de especies nativas de la estepa patagónica: *Atriplex lampa* (Moq.) D. Dietri. (zampa) y *Prosopis denudans* Benth. (algarrobo patagónico).

En cápsulas de Petri, se colocaron 25 g de suelo de cada una de las treinta muestras obtenidas y un testigo, se sembraron luego veinte semillas por germinador, con tres repeticiones cada uno. Cada cápsula fue regada con agua destilada a fin de mantener la capacidad de campo del suelo. Diariamente, durante cinco días, se controló la germinación de las semillas. Al finalizar el ensayo se calculó el porcentaje final de germinación y la longitud de la radícula.

A fin de determinar la fitotoxicidad del suelo se obtuvo el IG (1) (Índice de Germinación)³⁶ que integra el % relativo de germinación (PGR) (2) y el crecimiento relativo de las raíces (CRR) (3). Este índice resulta más consistente al abordar dos etapas que pueden manifestar diferente comportamiento frente al contaminante.

$$(1) IG = \frac{PGR \times CRR}{100}$$

$$(2) PGR = \frac{\text{Número de semillas germinadas en la muestra}}{\text{Número de semillas germinadas en el testigo}} \times 100$$

$$(3) CRR = \frac{\text{elongación de radículas en la muestra}}{\text{elongación de radículas en el testigo}} \times 100$$

Los resultados obtenidos de IG se reunieron en tres categorías fitotóxicas: *severa*, *moderada* y *leve*³⁷. En ellas se establece el siguiente criterio de interpretación: *severa*: valores de IG ≤ 50 % indicarían que hay una fuerte presencia de sustancias fitotóxicas; si se obtiene un valor entre 50 y 80 % se interpretaría como la presencia *moderada* de estas sustancias y *leve* si el IG ≥ 80 %, lo que indicaría que no hay sustancias fitotóxicas o están en muy baja concentración.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los valores de HTP medidos en suelo fueron menores de 10 mg kg⁻¹ de MS (Masa Seca) para la muestra del sitio testigo y en las áreas afectadas por contaminación oscilaron entre 142,7 y 175 429,5 mg kg⁻¹ MS (tabla 1).

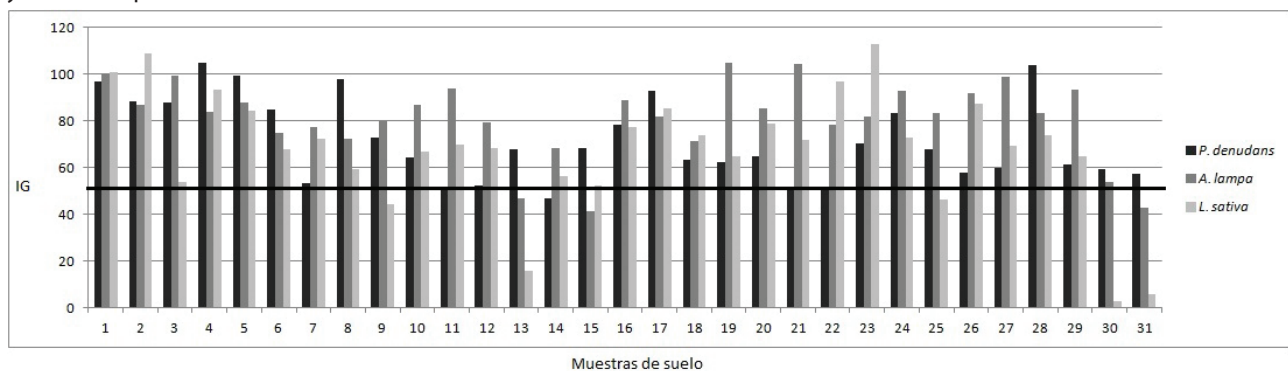
Diversos autores³⁷⁻⁴⁰ sostienen que el IG es un indicador robusto para describir el potencial fitotóxico de un material orgánico, ya que integra el porcentaje de germinación relativo y el crecimiento relativo de raíces. Es importante destacar que el proceso de germinación y los primeros días de desarrollo de la plántula constituyen etapas de gran sensibilidad frente a factores externos adversos⁴¹.

En este estudio, la especie *L. sativa* L., utilizada como bioindicador, resultó la más sensible a la presencia de contaminantes en el suelo. Como se muestra en la figura 3, cinco de las muestras analizadas se ubicaron en la categoría fitotóxica *severa*. Cuatro de ellas, que incluyen las muestras de suelo de las biopilas, coinciden con los sitios de mayor concentración de HTP (>10 000 mg kg⁻¹ MS) (tabla 1).

Tabla 1. Caracterización química de las muestras de suelo colectadas en el yacimiento petrolero. HTP: Hidrocarburos Totales de Petróleo

Muestras suelo	HTP mg kg ⁻¹ MS
Testigo	<10
13	100-1 000
4	1 001-10 000
13	>10 001

Figura 3. Índice de Germinación de *P. denudans* Benth., *A. lampa* (Moq.) D. Dietri. y *L. sativa* L. en muestras de suelo de un yacimiento petrolero. La línea de IG50 marca el límite de fitotoxicidad severa



La germinación de las especies nativas, *A. lampa* (Moq.) D. Dietri. y *P. denudans* Benth., resultó menos sensible que la de *L. sativa* L. en los ensayos realizados con suelo del yacimiento (figura 3). Los resultados obtenidos en este estudio, coinciden con los de Schnoor⁴² quien concluye, que las especies autóctonas tienen la capacidad de soportar altas concentraciones relativas de químicos orgánicos sin sufrir efectos adversos evidentes.

En la categoría de efectos fitotóxicos severos ante diferentes concentraciones de hidrocarburos totales

de petróleo, se incluye la respuesta de plantas nativas que no muestran coincidencia con los sitios de mayor concentración de HTP. Estos resultados podrían relacionarse con la presencia de otro tipo de contaminante. De acuerdo a Phillip et ál.⁴³, los ensayos de germinación de semillas en suelos inicialmente contaminados con HTP, en los que se redujo la presencia de hidrocarburos mediante tratamientos de biorremediación, mostraron un incremento en la toxicidad. Este fenómeno sugiere la presencia de metabolitos intermediarios formados durante el proceso de biodegradación. Sin embargo,

las concentraciones totales de productos químicos derivados pueden sobreestimar el riesgo real y los procesos de envejecimiento del suelo pueden reducir la biodisponibilidad y toxicidad de los contaminantes⁴⁴. Los análisis ecotoxicológicos son recomendados para estimar el posible riesgo ecológico asociado a diferentes contaminantes del suelo^{45,46}.

A pesar del limitado alcance de la información proveniente de los ensayos de toxicidad para su extrapolación a escala ambiental, los estudios con organismos en laboratorio, en condiciones controladas y estandarizadas, han venido siendo las fuentes de información predominantes para la evaluación ecológica de los efectos de los contaminantes tóxicos¹⁴. Las evaluaciones realizadas a escala de campo, muestran una serie de restricciones relacionadas, tanto con el elevado costo de su implementación y seguimiento, como con el tiempo de monitoreo requerido. Por otra parte, es limitado el registro de diseños estandarizados, e insuficiente la información sobre efectos tóxicos, necesaria para su parametrización³⁵.

CONCLUSIONES

Para avanzar en la restauración de áreas degradadas es necesario lograr el establecimiento de una cubierta vegetal compuesta de plantas autóctonas que, adaptadas a las condiciones climáticas, son capaces de ofrecer las condiciones adecuadas para establecer una sucesión ecológica estable.

A pesar del limitado alcance de la información proveniente de los ensayos de toxicidad para su extrapolación a escala ambiental, los estudios con organismos en laboratorio, en condiciones controladas y estandarizadas para la evaluación de respuestas, han sido las fuentes de información predominantes para la evaluación ecológica de los efectos de los contaminantes tóxicos.

Atriplex lampa (Moq.) D. Dietri. y *Prosopis denudans* Benth. se presentaron más resistentes que el bioindicador de referencia a la presencia de contaminantes de la actividad petrolera. Las especies nativas evaluadas no serían útiles como biomonitores de contaminación con HTP pero podrían ser consideradas en programas de restauración ecológica favoreciendo la preservación de la biodiversidad local y asegurando una optimización de los resultados al utilizar plantas adaptadas a las condiciones ambientales locales: bajas temperaturas, elevadas amplitudes térmicas, fuertes vientos y sequía primavera-verano. Para la comprensión de las estrategias de estas especies en relación a los factores ambientales,

queda por profundizar en aspectos de reclutamiento y de la propagación clonal cuya importancia ha sido señalada por diferentes autores.


AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a las instituciones: Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco (UNPSJB); Universidad de Buenos Aires (UBA); Secretaría de Ciencia y Técnica de la Nación, Fundación YPF (beca de posgrado Estenssoro) y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por su apoyo económico.

BIBLIOGRAFÍA

1. Freedman B. Environmental Ecology: The Ecological Effects of Pollution, Disturbance and Stresses. 2nd Ed. San Diego: Academic Press. 1995.
2. Palmroth MRT, Pichtel J, Puhakka JA. Phytoremediation of subarctic soil contaminated with diesel fuel. Bioresource Technol. 2002; 84:221-8.
3. Wild SR, Jones KC. Studies on the polynuclear aromatic hydrocarbon content of carrots (*Daucus carota*). Chemosphere 1991;23:243-51.
4. van de Leemkule MA, van Hesteren S, Pruiksma MA. Minimum soil quality: A use based approach from an ecological perspective. Part 2: Immobile organic micropollutants. TCB R09. 1999.
5. Kolb M, Harms H. Metabolisms of fluoranthene in different plant cell culture and intact plants. Environ. Toxicol. Chem. 2000;19:1304-10.
6. Chiang P, Li KP, Hseu TM. Spectrochemical behavior of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in biological systems. Part II: A theoretical rate model for BaP metabolism in living cells. Appl. Spectrosc. 1996;50:1352-59.
7. Bravo E. Impactos de la explotación petrolera en América Latina. Biodiversidad. 2005;43:1- 9.
8. Wetzel A, Werner D. Ecotoxicological evaluation of contaminated soil using the legume root nodule symbiosis as effect parameter. Environ. Toxic. Water 1995;10:127-33.
9. Chaineu HC, Morel LJ, Oudor J. Biodegradation of fuel oil hydrocarbons in the rhizosphere of maize (*Zea mays* L.). J. Envir. Qual. 2000;29:569-78.
10. Freedman B. The impacts of pollution and other stresses on ecosystem structure and function. Environmental Ecology. San Diego, USA: Academic Press;1989.
11. Rivera Cruz MC, Trujillo Narcía A. Estudio de toxicidad vegetal en suelos con petróleos nuevo e intemperizado. Interciencia 2004; 29(7):369-76.
12. Paggi J, de Paggi S. *Daphnia magna*: el "canario" de las aguas. 2000. [citado 20/04/2015] Disponible en: <http://www.santafe-conicet>.

- gov.ar/servicios/comunica/canario.htm.
13. Wang W. Literature review on higher plants for toxicity testing. *Water Air Soil Poll.* 1991;59:381-400.
 14. Young BJ, Riera NI, Beily ME et ál. Toxicity of the effluent from an anaerobic bioreactor treating cereal residues on *Lactuca sativa*. *Ecotox. Environ. Safe.* 2012;76:182-6.
 15. Dutka BJ, Kwan KK, Rao SS et ál. Use of bioassays to evaluate river water and sediment quality. *Environ. Toxic. Water* 1991;6:309-32.
 16. Robidoux PY, Choucri A, Bastien Ch et ál. Interlaboratory study for the validation of an ecotoxicological procedure to monitor the quality of septic sludge received at a wastewater treatment plant. *Environ. Toxicol.* 2001;16:158-71.
 17. Mulgura de Romero ME. Contribuciones al estudio del Género *Atriplex* (Chenopodiaceae) en la Argentina. *Darwiniana* 1981;23(1):119-50.
 18. Silva Colomer J, Passera CB. The nutricional value of *Atriplex* spp. as fodder for arid zones. *J. Arid Environ.* 1989;19:289-95.
 19. Passera CB. Efecto de la temperatura y del estrés hídrico en la germinación de *Atriplex lampa* Moq. (Chenopodiaceae). *Studia Oecologica* 1990;VII: 77-84.
 20. Franclet A, Le Houerou M. Les *Atriplex* en Tunisie et en Afrique du Nord. Institut de Reboisement. Tunisie. Rapport Technique 7. Roma: FAO SD/Tun11; 1971.
 21. Correa MN. Flora patagónica. Colección Científica. Tomo VIII Parte IV b. Buenos Aires: INTA; 1984.
 22. Cony MA, Trione SO. Inter and intraspecific variability in *Prosopis flexuosa* and *P. chilensis* seed germination under salt and moisture stress. *J. Arid Environ.* 1998; 40:307-17.
 23. Zhang Z, Qixing Z, Shengwei P, Zhang C. Remediation of petroleum contaminated soils by joint action of *Pharbitis nil* L. and its microbial community. *Sci. Total Environ.* 2010;408(22):5600-5.
 24. Ming N, Naixing X, Xiaohua F et ál. The interactive effects of petroleum-hydrocarbon spillage and plant rhizosphere on concentrations and distribution of heavy metals in sediments in the Yellow River Delta, China. *J. Hazard. Mater.* 2010;174:156-61.
 25. Cheema SA, Khan MI, Shen Ch et ál. Degradation of phenanthrene and pyrene in spiked soils by single and combined plants cultivation. *J. Hazard. Mater.* 2010;177(1-3):384-9.
 26. Environmental Protection Agency. EPA-SW 846. Test Methods for Evaluating Solid Waste Physical/Chemical Methods. Alexandria: U.S. EPA; 1996.
 27. EPA Method 2012. Standard Operating Procedures. Soil sampling. U.S. EPA ERT. U.S. EPA; 2000.
 28. Nudelman N, Ríos SM, Katusich O. Application of some physical organic chemistry models to the study of oil spills residuals in Patagonian soils. *Revista de Toxicología* 2008;21:329-37.
 29. American Society of Agronomy y Soil Science Society of America. Methods of Soil Analysis. Part 1 and 2. Madison: ASA y SSA; 1982.
 30. Nudelman N, Ríos SM, Katusich O. Interactions between Crude oil and Patagonian Soil as a function of clay-water content and time. *Environ. Technol.* 2000;21:437.
 31. Environmental Protection Agency Method 9045D. Soil and waste pH. U.S. EPA; 2004. [citado 25/08/08]. Disponible en: <http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/9045d.pdf>.
 32. Greenberg AE. Standard methods for the examination of water and wastewater. 18th edition Washington, DC: APHA. AWWA. WEF; 1992.
 33. Richards LA, Allison LE, Bernstein L et ál. Diagnóstico y Rehabilitación de Suelos Salinos y Sódicos. México: Ed. Limusa; 1993.
 34. Speight JG. The Chemistry and Technology of Petroleum. New York: Marcel Dekker Ed; 1991.
 35. Castillo Morales G (Ed). Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. México: Instituto Mexicanos de Tecnología del Agua; 2004.
 36. Varnero MT, Rojas C, Orellana R. Índices de fitotoxicidad en residuos orgánicos durante el compostaje. *J. Soil Sc. Nutr.* 2007;7(1):28-37.
 37. Zucconi F, Pera A, Forte M, De Bertoli M. Evaluating toxicity in immature compost. *Biocycle* 1981;22:54-7.
 38. Tiquia SM. Evaluating phytotoxicity of pig manure from the pig-on-litter system. En: Proceedings of the International Composting Symposium. Warman PR, Taylor BR Ed. Halifax: CBA Press Inc.; 2000. pp. 625-47.
 39. Emino E, Warman P. Biological assay for compost quality. *Compost Sci. Util.* 2004;12(4):342-8.
 40. Varnero MT, Orellana R, Rojas C, Santibañes C. Evaluación de especies sensibles a metabolitos fitotóxicos mediante bioensayos de germinación. *El Medioambiente en Iberoamérica: Visión desde la Física y la Química en los albores del Siglo XXI*. Gallardo Lancho JF Ed. Badajoz: Sociedad Iberoamericana de Física y Química Ambiental; 2006. Parte III. pp. 363-9.
 41. Baskin CC, Baskin JM. Seeds: Ecology, Biogeography and Evolution of Dormancy and Germination. San Diego, U.S.A.: Academic Press; 2001.
 42. Schnoor JL. Phytoremediation. Technology Evaluation Report GWRTAC E-Series. Pittsburgh, PA: Ground-Water Remediation Technologies Analysis Center. 1997. pp. 1-37.
 43. Phillips TM, Liu D, Seech AGet ál. Monitoring bioremediation in creosote-contaminated soils using chemical analysis and toxicity tests. *J. Ind. Microbiol. Biot.* 2000; 24:132-9.
 44. Fernández MD, Cagigal E, Vega MM et ál. Ecological risk assessment of contaminated soils through direct toxicity assessment. *Ecotox. Environ. Safe.* 2005;62:174-184.

- 
45. Loibner AP, Szolar OHJ, Braun R, Hirmann D. Ecological assessment and toxicity screening in contaminated land analysis. En: Chemical Analysis of Contaminated Land. Thompson KC, Nathanail CP Eds. Oxford. UK.: Blackwell Publishing Ltd.;2003. pp. 229-267.
 46. Stephenson GL, Kuperman RG, Linder GL, Visser S. Toxicity tests for assessing contaminated soils and ground water. En: Environmental Analysis of Contaminated Sites. Sunahara GI, Renoux AY, Thellen C, et ál Eds. New York: Wiley; 2002. pp. 25-43.