

Actividad microbiana durante la fitorremediación de un suelo contaminado con un crudo liviano

Microbial activity during the phytoremediation of a light crude contaminated soil

D. Mager¹ e I. Hernández-Valencia²

¹Centre for Invasion Biology. Stellenbosch University. Matieland, Sudáfrica.

²Instituto de Zoología y Ecología Tropical. Universidad Central de Venezuela. P.O. Box 47058, Caracas 1041-A, Venezuela.

Resumen

Se evaluó en condiciones de invernadero la capacidad de *Panicum maximum* y *Urochloa brizantha* para biorremediar un suelo contaminado con crudo liviano al 3% m/m, así como los cambios en el tiempo del contenido de carbono microbiano (CM) y la actividad de la enzima deshidrogenasa (ADH). Se establecieron tres réplicas de cada pasto sembrado en envases con 20 kg de suelo contaminado con un crudo liviano. El control estuvo constituido de suelo contaminado y sin plantas. Muestras de suelo superficial (0-15 cm) fueron obtenidas a los 0, 30, 60, 120 y 240 días para estimar CM, ADH y el contenido de aceites y grasas. En los tratamientos con pasturas hubo una mayor reducción del contenido de aceites y grasas, aunque la tasa de fitorremediación obtenida en este estudio fue más lenta respecto a los resultados que se presentan en la literatura para la biodegradación de hidrocarburos del petróleo en la capa arable del suelo. El CM y la ADH incrementaron en los primeros 60 días asociado a la degradación microbiana de compuestos biodisponibles; sin embargo, no se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos con y sin pastos y esto fue relacionado con la alta variabilidad de la data. Los resultados permiten concluir que pese al potencial de los pastos para disminuir la concentración de aceites y grasas en suelos contaminados, no hay evidencias claras de un mayor CM y ADH en los suelos contaminados con hidrocarburos livianos.

Palabras clave: Fitorremediación, *Panicum máximum*, *Urochloa brizantha*, C microbiano, actividad de la enzima deshidrogenasa

Abstract

It was assessed the ability of *Panicum máximum* and *Urochloa brizantha* to decontaminate a soil polluted with 3% w/w of a light crude oil under greenhouse conditions, as well as the changes in time in microbial C biomass (CM) and dehydrogenase activity (ADH). Three replicates were established for each pasture sowed in containers of 20 kg with contaminated soil. The control was constituted by contaminated soils without pastures. Superficial soil samples (0- 15 cm) were taken at 0, 30, 60, 120 and 240 days in order to estimate CM, ADH and oil and grease content. In treatments with pastures reduction in oil and grease content were higher; however, phytoremediation rates were lower when they are compared with the results obtained with landfarming. Microbial C biomass and dehydrogenase activity showed an increase during the first 60 days, and this was associated to microbial degradation of bioavailable compounds. Although pastures had the higher oil and grease reduction, it was not found significant differences in microbial C biomass and dehydrogenase activity between contaminated soils with and without pastures, and this was related to the high variability of the data. Despite the ability of pastures to reduce oil and grease content of the soil, there is no clear evidence of a higher CM and ADH in soils contaminated with light crude.

Key words: Phytoremediation, *Panicum máximum*, *Urochloa brizantha*, microbial C, dehydrogenase activity.

Introducción

Entre las técnicas de rehabilitación de suelos degradados por la contaminación con petróleo, la fitorremediación ha despertado un interés creciente, ya que es un procedimiento pasivo, útil para remediar simultáneamente una gran variedad de contaminantes, más económico respecto a las tecnologías basadas en procesos físicos y químicos y procura un paisaje más agradable (EPA, 1996; Frick *et al.*, 1999). Adicionalmente, la fitorremediación mejora la calidad de los suelos, ya que incrementa la agregación de las partículas minerales, el contenido de carbono, mejora el drenaje (Cunningham *et al.*, 1996; Pivetz, 2001) y favorece la actividad

Introduction

Phytoremediation is a technique, among all the rehabilitation techniques of degraded soils by oil pollution, with more interest nowadays, since; it is passive, useful to repair a huge variety of contaminants simultaneously, is cheaper regarding the other technologies based on physical and chemical processes and seeks for a better landscape (EPA, 1996; Frick *et al.*, 1999). Additionally, phytoremediation improves the quality of the soils, since it increases the aggregation of mineral particles, the carbon content, improves the drainage (Cunningham *et al.*, 1996; Pivetz, 2001) and favors the microbial activity (Jing *et al.*, 2008). In Venezuela, the

microbiana (Jing *et al.*, 2008). En Venezuela, la investigación sobre la fitorremediación de suelos contaminados con petróleo es escasa (Infante *et al.*, 2010b); sin embargo, de importancia en virtud de las grandes reservas de crudos y los riesgos de degradación de suelos por derrames y disposición inadecuada de crudos y sus derivados. Adicionalmente, la mayoría de los yacimientos del país se encuentran en tierras por debajo de los 250 m.s.n.m., con temperaturas cálidas y constantes que favorecen el desarrollo de las plantas durante todo el año, con un suministro adecuado de agua.

Las pasturas tropicales representan un material vegetal de interés para la fitorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo en el trópico, ya que muestran una rápida germinación y altas tasas de crecimiento. Además, sus raíces fasciculadas favorecen el desarrollo de una rizósfera extendida con potencial para catalizar la descontaminación de los suelos; sus requerimientos agronómicos están establecidos y sus propágulos son comercialmente disponibles, lo que facilita su uso en la fitorremediación de suelos a gran escala. La rizósfera juega un papel importante en la fitorremediación, ya que las raíces y sus microorganismos y enzimas asociadas pueden absorber, transformar, degradar o estabilizar los contaminantes del suelo (Cunningham *et al.*, 1996).

El impacto de los derrames de petróleo en el suelo, así como el papel de las plantas en la biorremediación de suelos contaminados con petróleo, pueden ser evaluados a través de indicadores de la actividad

research about phytoremediation in soils polluted with oil is limited (Infante *et al.*, 2010b); however, it is very important due to the huge crude oil reservoirs and the risks on the soils' degradation caused by spills and inadequate usage of the crude and the derivatives. Also, most of the reservoirs in the country are under 250 masl, with warm and constant temperatures that favor the development of the plants during the year, with an adequate water supply.

Tropical pastures represent a vegetal material of great interest for the phyoremediation of soils polluted with oil hydrocarbons in the Tropic, since these have a fast germination and high grow rates. Besides, their fasciculated roots favor the development of an extended rhizosphere with a potential to catalyze the decontamination of soils, their agronomical requirements are established and their propagules are commercially available, which facilitates their usage in the phytoremediation of soils at a great scale. The rhizosphere has an important role on the phytoremediation, since the roots and the microorganisms and enzymes related might absorb, transform, degrade or stabilize the soils contaminants (Cunningham *et al.*, 1996).

The impact of the oil spillage in the soil, as well as the role of the plants on the bioremediation of soils polluted with oil, might be evaluated using indicators of the microbiological and biochemical activity of the soil, as well as the activity of the dehydrogenase enzyme (ADH) (Gianfreda *et al.*, 2005; Trasar-Cepeda *et al.*, 2000) and the

microbiológica y bioquímica del suelo, como la actividad de la enzima deshidrogenasa (ADH) (Gianfreda *et al.*, 2005; Trasar-Cepeda *et al.*, 2000) y el contenido de carbono microbiano (CM) en el suelo (Timmerman *et al.*, 2003), ya que ambos parámetros están relacionados con: a) la oxidación de compuestos carbonados bajo condiciones aeróbicas y b) el uso y acumulación del carbono por parte de los microorganismos (Quilchano y Maranon, 2002; Stêpniewska y Wolińska, 2005, Timmerman *et al.*, 2003). En el caso de los hidrocarburos del petróleo, si su contenido en el suelo no es tóxico, los microorganismos pueden utilizar al petróleo como fuente de carbono para incrementar su biomasa y consecuentemente su actividad en el suelo (Baker, 1970; Xu y Johnson, 1995), razón que justifica su uso para monitorear la biorrecuperación de suelos degradados por contaminación con petróleo.

Con base a lo expuesto, en el presente trabajo se evaluaron los cambios producidos en la actividad microbiana, durante la fitorremediación con *Urochloa brizantha* y *Panicum máximum* de un suelo contaminado con un crudo liviano

Materiales y métodos

Se realizó un ensayo en condiciones de invernadero con los pastos *Panicum maximum* Jacq. Var. Tanzania y *Urochloa brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) R.D. Webster (anteriormente conocida como *Brachiaria brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) Stapf) con el fin de establecer su capacidad para reducir la concentración de acei-

content of microbial carbon (CM) in the soil (Timmerman *et al.*, 2003), since both parameters are related to: a) the oxidation of carbon compounds under aerobic conditions and b) the usage and accumulation of carbon by microorganisms (Quilchano and Maranon, 2002; Stêpniewska and Wolińska, 2005, Timmerman *et al.*, 2003).

In the case of the oil hydrocarbon, if its content in the soils is not toxic, the microorganisms might use the oil as a carbon source to increase its biomass and consequently, its activity in the soil (Baker, 1970; Xu and Johnson, 1995), reason that justifies its usage for monitoring the biorecovery of degraded soils by contamination with oil.

Because of the latter, on this research were evaluated the changes produced on the microbial activity during the phytoremediation with *Urochloa brizantha* and *Panicum máximum* of a soil polluted with a light crude.

Materials and methods

An essay was carried out under greenhouse conditions with grasses *Panicum maximum* Jacq. Var. Tanzania and *Urochloa brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) R.D. Webster (previously known as *Brachiaria brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) Stapf) with the aim of establishing their capacity for reducing the concentration of oil and grease of a polluted soil with light crude, as well as to see the changes in the time on the ADH activity and the CM content. The average microclimatic conditions in the

tes y grasas de un suelo contaminado con un crudo liviano, así como los cambios en el tiempo en la actividad de la ADH y el contenido de CM. Las condiciones microclimáticas promedio del invernadero durante el ensayo fueron 23,2°C de temperatura, 450 μEs^{-1} de radiación y 85% de HR.

Se utilizaron semillas comerciales (Semillas Magna, con 95% de germinación certificada) de las especies antes mencionadas. Los suelos usados correspondieron al horizonte A de un Typic haplustox, franco arenoso, fuertemente ácido y oligotrófico proveniente de la localidad de El Sombroero (9° 16' 33"N y 67° 2' 13" O), estado Guárico, Venezuela (Hernández-Valencia y Mager, 2003).

El crudo utilizado provino del campo Budare del estado Guárico y presentaba una gravedad de 27,2° API, con una composición de 50,7% de hidrocarburos saturados, 36,3% de aromáticos, 12,0% de resinas y 1,0% de asfaltenos (Hernández-Valencia y Mager, 2003). La selección de una concentración del 3% m/m de la mezcla suelo-crudo para los ensayos se debió a varios criterios, como fueron: a) que sea mayor al 1% m/m, ya que la legislación nacional establece que concentraciones menores al 1% m/m se consideran satisfactorias para la disposición de suelos contaminados en forma de esparcimiento sobre suelo limpio (Decreto 2.635, República de Venezuela, 1998), b) no ser lo suficientemente alta para generar efectos tóxicos para las plantas. A este respecto, la mayoría de las experiencias realizadas en Venezuela y el trópico no sobrepasan una concentración de petróleo en el suelo de 5% m/m (Infante *et al.*,

greenhouse during the essay were 23.2°C of temperature, 450 μEs^{-1} of radiation and 85% of HR.

Commercial seeds (Magna seeds, with 95% of certified germination) were used from the species previously mentioned. The soils used corresponded to the horizon A of a Typic haplustox, sandy-loamy, acid and oligotrophic, coming from "El Sombroero" (9° 16' 33"N y 67° 2' 13" O), Guárico state, Venezuela (Hernández-Valencia and Mager, 2003).

The crude used came from Budare, field Guárico state, and presented a gravity of 27.2° API, with a composition of 50.7% of saturated hydrocarbons, 36.3% of aromatics, 12.0% of resins and 1.0% of asphaltenes (Hernández-Valencia and Mager, 2003). The selection of a concentration of 3% m/m of soil-crude mix for the essays derived from different criteria, such as: a) should it be higher than 1% m/m, since the national legislation establishes that concentrations lower than 1% m/m are considered satisfactorily for the disposition of polluted soils on clean soils (Decreto 2.635, República de Venezuela, 1998), b) it should not be as higher as to generate toxic effects for the plants. On this matter, most of the experiences done in Venezuela and in the Tropic do not overpass a concentration of oil in the soil of 5% m/m (Infante *et al.*, 2010b), c) to design an essay with a concentration that be effective according to the latter information that justify the logistical and economical effort that implies the phytoremediation, on the contrary, it turns better to apply other physical, chemical or biological techniques.

2010b), y c) diseñar un ensayo con una concentración que sea efectiva de acuerdo a los puntos anteriores y que justifique el esfuerzo logístico y económico que implica la fitorremediación. De lo contrario, es más factible aplicar otras técnicas de tipo físico, químico o biológico.

El experimento fue realizado en envases de poliestireno de 44 cm de largo, 32 cm de ancho y 28 cm de alto. Tres réplicas fueron establecidas para cada pasto y en ellas se agregaron 20 kg de la mezcla suelo-crudo. Para la preparación de la mezcla suelo-crudo, el suelo seco fue previamente tamizado en un tamiz de 2 mm, de manera que se excluyeran las partículas mayores a este tamaño. Luego se humedeció el suelo con agua destilada hasta el 60% de su capacidad de campo y después se agregó lentamente el crudo liviano al suelo mientras se mezclaba con la ayuda de una paleta de acero inoxidable. Posteriormente se sembraron 26 semillas de cada pasto por envase, de acuerdo a las recomendaciones de la casa comercializadora. Con el transcurrir del ensayo, la competencia entre plantas y la eliminación manual permitió el establecimiento de dos plantas por envase. Con el fin de mejorar el desarrollo de las plantas, se adicionó al suelo cal agrícola para obtener un pH de 6,5 unidades (1:5-agua) adecuado para el desarrollo de los pastos. Además recibió fertilización con 0,23 g.kg⁻¹ suelo de fosfato diamónico y 2,4 g.kg⁻¹ suelo de urea, fraccionada en porciones equivalentes a los 0, 15, 30 y 45 días. La dosis de fertilización fue determinada con base a la relación C:N:P de 100:2:0,2, recomendada para la fitorremediación de hidrocarburos

The experiment was done in polystyrene containers of 44 cm of length, 32 cm of width and 28 cm of height. Three replicates were established for each pasture and on them, 20 kg of the soil-crude mix were added. For preparing the soil-crude mix, the dry soil was previously sieved in a 2-mm sieve to exclude bigger particles than this size. Later, the soil was wet with distilled water until reaching 60% of its field capacity, later, the light crude was slowly added to the soil while mixing, using a stainless steel paddle. Later, 26 seeds of each grass were sowed on a container, according to the recommendations of the sale company. With the time, the competence between the plants and the manual elimination allowed the establishment of two plants per container. With the aim of improving the development of the plants, agriculture lime was added to the soil to obtain a pH of 6.5 units (1:5-water) suitable for the development of pastures. It also received fertilization with 0.23 g.kg⁻¹ soil of diammonium phosphate and 2.4 g.kg⁻¹ soil of urea, fractioned in portions equal to 0, 15, 30 and 45 days. The fertilization doses were determined based on the C:N:P relation of 100:2:0.2 recommended for the phytoremediation of oil hydrocarbons (Hutchinson *et al.*, 2001). This dose is 45 times higher than the N requirement and twice higher than the P requirements estimated for these gramineae in non polluted soils.

The humidity content was kept on 60% of the field capacity through irrigations every three days. The field capacity in polluted soils was determined prior the phytoremediation

de petróleo (Hutchinson *et al.*, 2001). Esta dosis es 45 veces mayor al requerimiento de N y 2 veces mayor al requerimiento de P estimados para estas gramíneas en los suelos utilizados no contaminados.

El contenido de humedad se mantuvo al 60% de la capacidad de campo a través de riegos cada 3 días. La capacidad de campo en los suelos contaminados se determinó previamente a los ensayos de fitorremediación de acuerdo al método descrito por Anderson e Ingram (1992). Como control, se establecieron 3 envases sin semillas y en consecuencia sin plantas, pero con la misma concentración de crudo liviano, dosis de fertilización, cal agrícola y contenido de agua del tratamiento con plantas. En síntesis, todos los tratamientos constituyeron unidades experimentales en donde se trató de estimular la actividad microbiana (bioestimulación) con la adecuación del pH y el suministro de agua y fertilizantes.

Muestras duplicadas de suelos superficiales (0-15 cm) fueron tomados al azar en cada envase a los 0, 30, 60, 120 y 240 días de iniciado el ensayo. Las muestras fueron refrigeradas (4°C) hasta realizar los análisis de laboratorio. El contenido de aceites y grasas fue determinado de acuerdo al método gravimétrico EPA 3540, con el uso de diclorometano como extractante (Deuel y Holliday, 1997). El carbono microbiano (CM) fue determinado como la diferencia entre el contenido de C de muestras fumigadas con cloroformo y no fumigadas e incubadas por 24 h a 22°C, y en donde el valor obtenido fue corregido con un Kc de 0,45 (Vance *et al.*, 1987). La actividad

ensayos according to the method described by Anderson and Ingram (1992). As control, 3 containers without seeds were established, consequently without plants, but with the same concentration of light crude, fertilization dose, agriculture lime and water content of the treatment with plants. Therefore, all the treatments constituted experimental units where was intended to stimulate the microbial activity (bio-stimulation) with a pH adequacy and the water and fertilizers supply.

Duplicated samples of superficial soils (0-15 cm) were taken at random from each container at 0, 30, 60, 120 and 240 days of initiated the essay. The samples were refrigerated (4°C) until doing soil analysis. The oil and grease content were determined according to the gravimetric method EPA 3540, using dichloromethane as extractant (Deuel and Holliday, 1997). The microbial carbon (CM) was determined as the difference between the C content of samples fumigated with chloroform and unfumigated and incubated for 24 h at 22°C, and where the value obtained was corrected with a KC of 0.45 (Vance *et al.*, 1987). The activity of the dehydrogenase enzyme (ADH) was determined according to the method of Casida *et al.* (1964), which is based on the reduction of triphenyl tetrazolium chloride (TTC) to triphenyl formazan (TPF).

The duplicated data of the containers was averaged and the value that is reported for each treatment and day corresponds to the mean of the three replicates. The means obtained from the treatments were compared using ANOVA with a LSD test

de la enzima deshidrogenasa (ADH) fue determinada de acuerdo al método de Casida *et al.* (1964), que se basa en la reducción del cloruro de trifenil tetrazolio (TTC) a trifenil formazán (TPF).

Los datos duplicados por envase fueron promediados y el valor que se reporta para cada tratamiento y día corresponde a la media de las tres réplicas. Las medias obtenidas de los tratamientos se compararon a través de un ANOVA de una vía junto con una prueba LSD ($P < 0,05$). Adicionalmente se realizaron pruebas de correlación lineal para establecer la relación entre los parámetros estudiados. Para las pruebas estadísticas se uso del paquete Statistica 6.0. (Statsoft, 2001)

Para todos los tratamientos, la dinámica en el tiempo del contenido de aceites y grasas en el suelo se ajustó a una curva exponencial negativa del tipo:

$$P_t = P_o e^{-kt} \quad (1)$$

en donde P_t y P_o es la masa de aceites y grasas en el tiempo t y en el tiempo inicial respectivamente, t es el tiempo transcurrido y k la constante de pérdida. Esta expresión ha sido utilizada para describir la cinética de descomposición de la hojarasca en el suelo e indica que se pierde una fracción constante del material sujeto a degradación por unidad de tiempo (Olson, 1963). La ecuación anterior puede ser expresada también como:

$$\ln (P_t/P_o) = -kt \quad (2)$$

que describe una recta, cuya pendiente es en este caso la constante de pér-

($P < 0.05$). Additionally, lineal correlation tests were done to establish the relation between the studied parameters. For the statistical tests was used the software Statistica 6.0 (Statsoft, 2001).

For all treatments, the dynamic in the time oil and grease and fats content in the soil was adjusted to a negative exponential curve type:

$$P_t = P_o e^{-kt} \quad (1)$$

Where P_t and P_o is the mass of oil and grease in the time t and on the initial time respectively, t is the time passed and k is the constant of the lost. This expression has been used to describe the decomposition kinetic of the litterfall in the soil and indicates that a constant fraction of the material subjected to degradation is being lost per time unit (Olson, 1963). The previous equation might also be expressed as:

$$\ln (P_t/P_o) = -kt \quad (2)$$

That describes a straight line, which slope, on this case, is the constant lost of oil and grease. An advantage of adjusting the data to this model is that it allows calculating the mean life's time ($0.693/k$), as well as the recovery rate or the time required for it to degrade at 99% ($4.605/k$) the original content of oils and fats.

Results and discussion

The content of oil and grease from the sample taken at the beginning of the essay (day 0) was lower (2.7%) than the prepared mix (3.0%) (figure 1). The incomplete recovery of oil and

dida de los aceites y grasas. Una ventaja del ajuste de los datos a este modelo, es que permite calcular el tiempo de vida media (0,693/k), así como la tasa de recambio o el tiempo requerido para que se degrade el 99% (4,605/k) del contenido original de aceites y grasas.

Resultados y discusión

El contenido de aceites y grasas de la muestra correspondiente al inicio de los ensayos (día 0) fue menor (2,7%) al previsto para la mezcla preparada (3,0%) (figura 1). La recuperación incompleta de aceites y grasas se debe a la volatilización de compuestos de bajo peso molecular, especialmente durante la preparación de la mezcla y en los primeros días del ensayo. Adicionalmente, es probable que el diclorometano no haya extraído el total aceites grasas presentes en la

grease is due to the volatilization of low molecular weight compounds, especially during the preparation of the mix and within the first days of the essay. Additionally, it is probable that dichloromethane had not extracted the total of oil and grease presented on the sample. In any case, the 88.3% recovery of oil and grease can be considered satisfactorily, and it is similar to the one reported by Tarache (2011) for the extraction of total petroleum hydrocarbon with dichloromethane in a soil contaminated with light crude. Regarding the homogeneity of the soil-crude mix prepared on the lab, the results show that the variation coefficient of the oil and grease content was lower to 10% for all the evaluated times (figure 1), which indicates the scarce variability of this parameter.

The content of oil and grease showed a fast reduction during the first

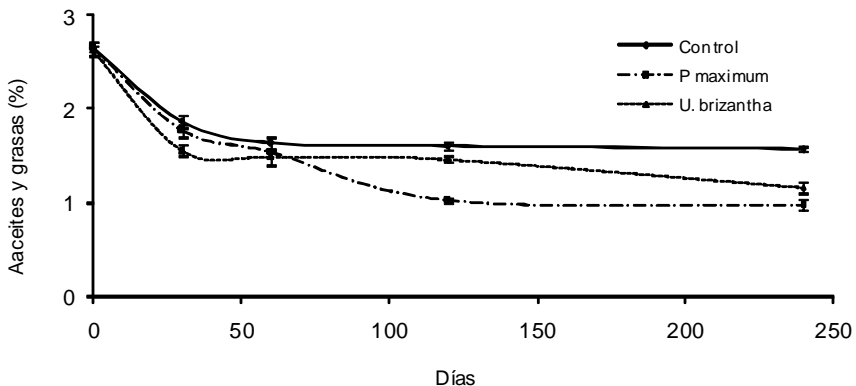


Figura 1. Cambios en el contenido de aceites y grasas en suelos contaminados con y sin gramíneas. Las barras corresponden al error estándar.

Figure 1. Changes in the content of oil and grease in soils contaminated with and without gramineae. The bars correspond to standard error.

muestra. En todo caso, la recuperación de 88,3% de aceites y grasas se puede considerar satisfactorio, y es similar al reportado por Tarache (2011) para la extracción con diclorometano de hidrocarburos totales de petróleo en un suelo contaminado con crudo liviano. En lo que respecta a la homogeneidad de la mezcla suelo-crudo que se preparó en el laboratorio, los resultados muestran que el coeficiente de variación del contenido de aceites y grasas fue menor al 10% para todos los tiempos evaluados (figura 1), lo que es un indicador de la poca variabilidad de este parámetro.

El contenido de aceites y grasas mostró una rápida disminución durante los primeros 30 días y posteriormente la tasa de pérdida se redujo progresivamente en el tiempo (figura 1). La concentración de aceites y grasas fue significativamente menor en presencia de las plantas a los 120 y 240 días de iniciado el experimento. Al término del mismo, bajo la cobertura de *P. maximum* el contenido de aceites y grasas se redujo en un 63%, para *U. brizantha* en 55%, mientras que el control mostró una reducción del 40%. El tiempo de vida media y el tiempo de recambio siguen el orden *P. maximum* > *U. brizantha* > Control y confirman que bajo los tratamientos con gramíneas, es mayor la degradación del hidrocarburo utilizado y su persistencia en el suelo es menor (cuadro 1).

La cinética del contenido de aceites y grasas en el tiempo mostró una rápida disminución en las etapas iniciales y posteriormente los cambios fueron menores hasta registrar pocas variaciones en el tiempo. Para todos los tratamientos, la rápida disminu-

30 days, later, the rate was reduced progressively in the time (figure 1). The concentration of oil and grease was significantly lower in presence of plants within 120 to 240 days of initiated the experiment. Once it finished, the content of oil and grease on *P. maximum* reduced in 63%, and on *U. brizantha* 55%, while, control showed a reduction of 40%. The mean life time and the recovery time follow the order *P. maximum* > *U. brizantha* > Control and confirm that under the treatments with gramineae, the degradation of the hydrocarbon used is higher and its persistence in the soil is lower (table 1).

The kinetic of the content of oil and grease in the time showed a fast reduction in the initial phases, consequently, the changes were lower until registering few variations in the time. For all the treatments, the fast initial reduction might be related to the degradation caused by microorganisms of the most labile compounds, as well as the volatilization of low molecular weight compounds. In more advanced phases, the reduction on the degradation rate of the crude might be related to the persistence of compounds with the most difficult biodegradation due to their chemical characteristics or low bioavailability (McMillen, 1995; Madsen, 1997). Minai-Tehrani *et al.*, (2007) found that the use of *Festuca arundinacea* reduced the content of oil and grease in 60% during 120 days in a soil polluted with light crude at 3% m/m, while, in the soil without plants the reduction was of 40%. This result is similar to the one found on this research when compared the reduction percentage of oil and grease at 120

Cuadro 1. Parámetros de degradación de los aceites y grasas en suelos con y sin gramíneas (n=15).**Table 1. Degradation parameters of oil and grease in soils with and without gramineae (n=15).**

Tratamiento	Constante de degradación (k)	Coefficiente de correlación (r)	Tiempo de vida media (años) ^a	Tiempo de recambio (años) ^a
Control	-0,57	0,67*	1,2	8,2
<i>Urochloa brizantha</i>	-0,75	0,70*	0,9	6,1
<i>Panicum maximum</i>	-1,48	0,85**	0,5	3,1

a: El tiempo de vida media y la tasa de recambio se calcularon cuando se obtuvo una correlación significativa ($P < 0,05$) entre el $\ln(Pt/Po)$ y t.

* $P < 0,05$ ** $P < 0,01$

ción inicial estaría relacionada con la degradación mediada por microorganismos de los compuestos más lábiles, así como la volatilización de compuestos del crudo de bajo peso molecular. En estadios más avanzados, la reducción en la tasa de degradación del crudo estaría vinculada con la persistencia de compuestos de más difícil biodegradación debido a sus características químicas o baja biodisponibilidad (McMillen, 1995; Madsen, 1997). Minai-Tehrani *et al.*, (2007) encontraron que el uso de *Festuca arundinacea* redujo el contenido de aceites y grasas en un 60% durante 120 días en un suelo contaminado con un crudo liviano al 3% m/m, mientras que en el suelo sin plantas la reducción fue de un 40%. Este resultado es similar al encontrado en este estudio cuando se compara el porcentaje de reducción de aceites y grasas a los 120 días, el cual fue de 39% para el control y de 61 y 46% para *P. maximum* y *U. brizantha* respectivamente.

days, which was of 39% for the control and 61% and 46% for *P. maximum* and *U. brizantha* respectively.

The CM showed the same tendency in all the treatments, with an increment until 60 days of initiated the essay, later, it showed a reduction until 240 days when it ended (figure 2). For the same date, none significant differences were detected among the treatments due to the high variability of the data. In the case of ADH, the maximum for all the treatments was observed within 30 days for the treatments with pastures and 60 days for treatments without pastures (figure 3). Significant differences among treatments were found only for days 120 and 240, being the highest the ADH for *U. Brizantha* regarding the control and *P. maximum*, meanwhile, the last treatments did not show any significant difference among them. Lineal correlation tests were done between the content of oil and grease, CM and ADH, and was only found a positive correlation for the control treatment

El CM mostró la misma tendencia para todos los tratamientos, con un incremento hasta los 60 días de iniciado el ensayo y luego una disminución hasta los 240 días cuando finaliza el mismo (figura 2). Para una misma fecha no se detectaron diferencias significativas entre tratamientos debido a la alta variabilidad de los datos. En el caso de la ADH, el máximo para todos los tratamientos se observó a los 30 días para los tratamientos con pastos y a los 60 días para el tratamiento sin pastos (figura 3). Sólo para los días 120 y 240 se encontraron diferencias significativas entre tratamientos, siendo mas alta la ADH para *U. Brizantha* respecto el control y *P. máximo*, mientras que estos dos últimos tratamientos no mostraron diferencias significativas entre si. Se realizaron pruebas de correlación lineal entre el contenido de aceites y grasas, CM y ADH, y solo se encontró una correlación positiva para el tratamiento control en

between the content of CM and ADH ($r= 0.52$, $n= 15$, $P<0.05$).

The roots might stimulate the microbial activity and favor the degradation of the crude, since it has been used as an alternative source of carbon and energy. However, for the different times evaluates, any consistent increment was found between CM and ADH with the presence of pastures. This fact is mainly justified by the high variability that showed both of the evaluated parameters, especially in the first 60 days of the essay. On this matter, it must be considered that the samples might have been constituted by rhizospheric and non rhizospheric soil, especially when the roots do not have an uniform distribution in the soil. This might happen mainly on the initial phases of the essay, when the roots of the seedlings do not cover homogenously the soil and generates a marked heterogeneity in the microbial activity.

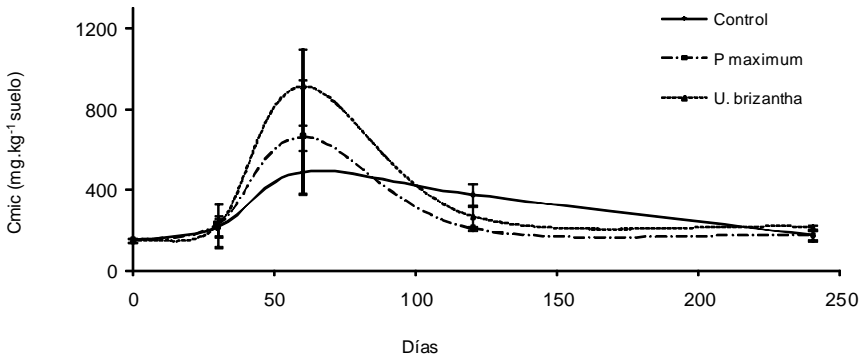


Figura 2. Cambios en la biomasa de carbono microbiano en suelos contaminados con y sin gramíneas. Las barras corresponden al error estándar.

Figure 2. Changes in the biomass of microbial carbon in soils contaminated with and without gramineae. The bars correspond to standard error.

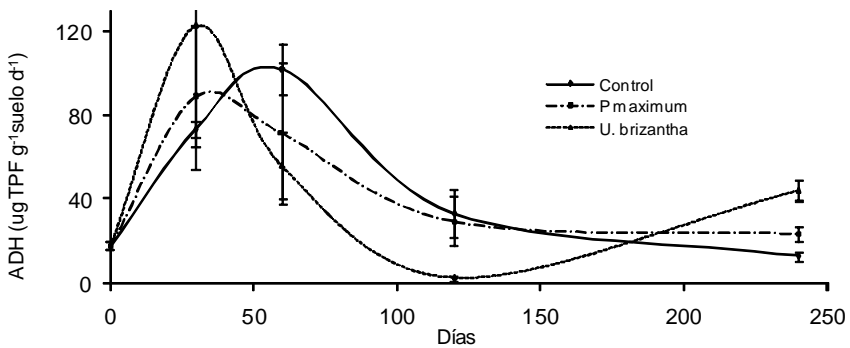


Figura 3. Cambios en la ADH en suelos contaminados con y sin gramíneas. Las barras corresponden al error estándar.

Figure 3. Changes in the ADH in soils contaminated with and without gramineae. The bars correspond to standard error.

tre el contenido de CM y la ADH ($r=0,52$, $n=15$, $P<0,05$).

Las raíces pueden estimular la actividad microbiana y favorecer la degradación del crudo, ya que el mismo es utilizado como una fuente alternativa de carbono y energía. Sin embargo, no se encontró para los diferentes tiempos evaluados, un incremento consistente en el CM y la ADH con la presencia de los pastos. Este hecho se justifica en parte por la alta variabilidad que mostraron ambos parámetros evaluados, especialmente en los primeros 60 días del ensayo. A este respecto, se debe considerar que las muestras pudieron estar constituidas por suelo rizosférico y no rizosférico, especialmente cuando las raíces no tienen una distribución uniforme en el suelo. Ello ocurriría principalmente en las fases iniciales del ensayo, cuando las raíces de las plántulas no cubren homogéneamente el suelo y se genera una heterogeneidad más marcada en la actividad microbiana.

Los resultado obtenidos contrastan con el obtenido por Jing *et al.*,

The obtained results contrast to those of Jing *et al.*, (2008), who found that ADH in soils contaminated with oil at 0.8% and with gramineae *Panicum* sp., *Eleusine indica* and *Festuca* sp., was of 1.6 to 2.2 times superior regarding the soils without plants, while Johnson *et al.*, (2005) observed that the soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons, and where were sowed plants of *Lolium repens* and *Trifolium repens* presented CM contents superior to the contaminated soils without plants. On the other hand, Liu, *et al.*, (2010) pointed out that the CM measures are normally variable in relation to other properties of the soil, such as the texture, organic carbon and total N, while Broos *et al.*, (2007) found the variability of the CM determination with the fertilization-extraction method, which might vary until 4 times due to the spatial variability to small scale of the physic-chemical conditions of the soil.

(2008), quienes encontraron que la ADH en suelos contaminados con petróleo al 0,8% y con las gramíneas *Panicum* sp., *Eleusine indica* y *Festuca* sp., fue de 1,6 a 2,2 veces superior respecto a los suelos sin plantas, mientras que Johnson *et al.* (2005) observaron que suelos contaminados con hidrocarburos aromáticos policíclicos y en donde se habían sembrado plantas de *Lolium repens* y *Trifolium repens* presentaban contenidos de CM superiores a los suelos contaminados que no tenían plantas. Por su parte, Liu *et al.* (2010) señalaron que las mediciones de CM suelen ser muy variables en relación a otras propiedades del suelo, como al textura, carbono orgánico y N total, mientras que Broos *et al.* (2007) encontraron la variabilidad de la determinación de CM con el método de fumigación-extracción puede variar hasta 4 veces debido a la variabilidad espacial a pequeña escala de las condiciones físicoquímicas del suelo.

Otra posibilidad es que existan factores diferentes a la rizodegradación que ejerzan una mayor influencia en la fitorremediación. Sobre este último supuesto, estudios con pesticidas y otros xenobióticos han demostrado que las plantas pueden absorber, secuestrar o metabolizar compuestos orgánicos (Cunningham *et al.*, 1996), y en consecuencia estos procesos se presentan como alternativas que pueden explicar cómo las gramíneas seleccionadas tienen una mayor capacidad para reducir la contaminación del suelo. Sin embargo, la investigación sobre estos mecanismos es escasa y los resultados a la fecha respaldan que el principal mecanismo asociado a la

Another possibility is that there are different factors to the rhizosphere that exert a higher influence in the phytoremediation. On this matter, researches with pesticides and others xenobiotics have showed that plants might absorb, sequester or metabolize organic compounds (Cunningham *et al.*, 1996), consequently, these processes are presented as an alternative which might explain how the selected gramineae have a higher capacity to reduce the soil pollution. However, the research about these mechanisms is little and the results support that rhizodegradation is the main mechanism associated to the phytoremediation of light and medium hydrocarbons (Anderson *et al.*, 1993).

The type, quantity of the crude and other agronomic managements (fertilization, irrigation and whitewash) favored the microbial activity, since it was observed an increment in the CM content and in the ADH for all the treatments at the beginning of the essay (figures 2 and 3). Similar results were obtained by Xu and Johnson (1995), who worked with soils contaminated with 0.5 to 5.5% of oil with unspecified characteristics. The kinetic of the CM and ADH show a similar behavior with an initial peak among 30-60 days of the essay, related to an increment on the microbial activity by the use of bioavailable carbon substrates, later, the microbial activity decreases at the time that reduce the bioavailable substrates and increase the proportion of more recalcitrant compounds (Alexander 1999).

When the content of oil and grease is compared at the end of the

fitorremediación de hidrocarburos livianos y medianos es la rizodegradación (Anderson *et al.*, 1993).

El tipo, cantidad de crudo y otros manejos agronómicos (fertilización, riego y encalado) favoreció la actividad microbiana, ya que se observó un incremento en el contenido de CM y en la ADH para todos los tratamientos al inicio del ensayo (figuras 2 y 3). Resultados similares fueron obtenidos por Xu y Johnson (1995), quienes trabajaron con suelos contaminados entre 0,5 a 5,5% de petróleo de características no especificadas. La cinética del CM y la ADH muestran una conducta muy similar con un pico inicial entre los 30-60 días del ensayo que se asocia con un aumento de la actividad microbiana por el aprovechamiento de sustratos carbonados biodisponibles, posteriormente decae la actividad microbiana en la medida que se reducen los sustratos biodisponibles y aumentan la proporción de compuestos más recalcitrantes (Alexander 1999).

Cuando se compara el contenido de aceites y grasas al término del ensayo (240 días), ellos corresponden 1,0, 1,2 y 1,6% para *P. maximum*, *U. brizantha* y el control respectivamente, siendo estadísticamente diferentes entre si estos valores (ANOVA, $P < 0,05$), lo cual indica que *P. máximo* procura la descontaminación más rápida. Adicionalmente, sólo en el caso de *P. maximum* se alcanzó el límite de limpieza establecido por las regulaciones gubernamentales venezolanas del 1% m/m de aceites y grasas (Decreto 2.635, República de Venezuela, 1998). Cabe destacar que esto es un período de tiempo bastante mayor que el re-

essay (240 days), these correspond to 1.0, 1.2 and 1.6% for *P. maximum*, *U. brizantha* and the control respectively, being these values statistical different among them (ANOVA, $P < 0.05$), which indicates that *P. maximum* tends to decontaminate faster. Additionally, only in the case of *P. maximum*, was reached the cleaning limit, established by Venezuelan Governmental Regulations of 1% m/m of oil and grease (Decreto 2.635, República de Venezuela, 1998). It must be pointed out that this is a period of time a lot higher than the required to decontaminate soils with light crudes with concentrations between 3-5% m/m with the biodegradation treatment in the arable surface of the soil, where are reached concentrations of oil and grease or total hydrocarbons of oil of 1% from 120 to 150 days (Deuel y Holliday, 1997; Infante 2003, Infante *et al.*, 2010).

If the negative exponential model is used, the time required to reach a value lower than 1% of the oil and grease content establish by the Venezuelan law would be of approximately 701 days for the control treatment, 548 days for *U. brizantha* and 240 days for *P. maximum* as mentioned before. The highest biodegradation efficiency of the arable surface regarding the phytoremediation is because this technique enhance soil aeration by ploughing, situation that facilitates a higher oxygenation of the substrate and the aerobic degradation of the crude, which is more efficient than the anaerobic (Okoh, 2006). In contrast, the phytoremediation is a passive method, and once the plants are

querido para descontaminar suelos con crudo liviano con concentraciones entre 3-5% m/m con el tratamiento de biodegradación en la capa arable del suelo, en donde se alcanza una concentración de aceites y grasas o de hidrocarburos totales de petróleo del 1% entre 120 a 150 días (Deuel y Holliday, 1997; Infante 2003, Infante *et al.*, 2010).

Si se utiliza el modelo exponencial negativo, el tiempo requerido para alcanzar un valor menor del 1% del contenido de aceites y grasas establecidos por la legislación venezolana sería aproximadamente de 701 días para el tratamiento control, 548 días para *U. brizantha* y 240 días para *P. máxima* como se mencionó previamente. La mayor eficiencia de la biodegradación de la capa arable respecto a la fitorremediación se debe a que con esta técnica mejora la aireación del suelo a través del arado, situación que facilita una mayor oxigenación del sustrato y la degradación aeróbica del crudo que es más eficiente que la anaeróbica (Okoh, 2006). En contraste, la fitorremediación es un método pasivo y una vez que las plantas se han establecido, por lo general hay poca o ninguna remoción del suelo y su oxigenación es más limitada, ya que depende de la difusión de oxígeno atmosférico por los poros del suelo y a través de las raíces.

No se estudió el impacto de la contaminación del suelo sobre la biomasa de los pastos al término del ensayo, ya que no era el objetivo del estudio. Sin embargo, Hernández-Valencia y Mager (2003) encontraron que después de 45 días de establecidas las semillas de *P. máxima* y *U. brizantha* en suelos de

establecidos, normalmente there is little or none movement of the soil and its oxygenation is more limited, since it depends on the diffusion of atmospheric oxygen by the soil's pores and through the roots.

The impact of the contamination of the soil in the biomass of the pastures was not studied on this essay, since it was not the objective. However, Hernández-Valencia and Mager (2003) found that 45 days after of established the *P. maximum* and *U. brizantha* seeds in savannah soils polluted at 3% with light crude, the total production of the biomass (shoots + roots) reduced in 86% in *U. brizantha*, and 99% in *P. maximum*. On the other hand, the biomass production of roots reduced in 81% and 99% for *U. brizantha* and *P. maximum* respectively. If the mass and volume of the roots reduced drastically with the contamination, this would affect the potential of the pastures to decontaminate the soil. In relation to this, Merkl *et al.*, (2005) found that in soils contaminated with heavy crude at 5%, the roots of the species *Cyperus aggregatus*, *Eleusine indica* and *Brachiaria brizantha* became thicker and shorter in relation to those which grew in non contaminated soils.

In relation to the highest persistence of the crude in the soil and on the environment in phytoremediation treatments regarding landfarming, it is very important to consider that the oil has compounds with toxic potential, such as toluene, benzene, xylene, ethylbenzene, meanwhile, the polycyclic aromatic hydrocarbons are known by having mutagenic and carcinogenic

sábanas contaminados al 3% con crudo liviano, la producción total de biomasa total (vástago + raíces) se redujo en un 86% para *U. brizantha*, mientras que para *P. maximum* fue de 99%. Por su parte, la producción de la biomasa de raíces se redujo en 81% y 99% para *U. brizantha* y *P. maximum* respectivamente. Si la masa y el volumen de raíces se reducen drásticamente con la contaminación, ello afectará el potencial de los pastos para descontaminar el suelo. En relación a esto, Merkl *et al.* (2005) encontraron que en suelos contaminados con un crudo pesado al 5%, las raíces de las especies *Cyperus aggregatus*, *Eleusine indica* y *Brachiaria brizantha* se hicieron más gruesas y cortas, respecto a aquellas que crecían en suelos no contaminados.

En cuanto a la mayor persistencia del crudo en el suelo y en el ambiente en los tratamientos de fitorremediación respecto a la biodegradación en la capa arable de suelo (landfarming), es de suma importancia considerar que el petróleo posee compuestos con potencial tóxico, como son el tolueno, benceno, xileno, etilbenceno, mientras que los hidrocarburos aromáticos policíclicos se les adjudica potencial mutagénico y carcinógeno (Mancera-López *et al.*, 2008). Sin embargo, si los riesgos al ambiente por la presencia de sustancias tóxicas es reducido (p.e. concentraciones por debajo de las dosis que generan efectos adversos o exposición reducida), la fitorremediación puede ser un método alternativo que además de descontaminar reduce los riesgos de erosión, procura una mejor calidad microbiológica respecto a los suelos que

potential (Mancera-López *et al.*, 2008). However, phytoremediation can be an alternative method to use if risks of the environment by the presence of toxic substances are reduced (i.e., concentrations under the doses that generate adverse effects or reduced exposition), this method besides decontaminating also reduces the risks for erosion, aims to a better microbiological quality in relation to the soils that lack of plants and ensure a nicer landscape favoring the development of the vegetal cover.

Conclusion

The results showed that pastures *Urochloa brizantha* and *Panicum maximum* produced a more effective decontamination of the soil.

The CM and ADH indicated an increment in the first 60 days, associated to a microbial degradation of bioavailable compounds, with a posterior drop until the end of the essay.

Even though in treatments with pastures occurred the highest reduction of the content of oil and grease, none significant differences were detected for CM and ADH.

End of english version

carecen de plantas y procura un paisaje mas agradable al favorecer el desarrollo de cobertura vegetal.

Conclusión

Los resultados mostraron que los pastos *Urochloa brizantha* y *Panicum maximum* produjeron una desconta-

minación más efectiva del suelo.

El CM y la ADH mostraron un incremento en los primeros 60 días que está asociado con la degradación microbiana de compuestos biodisponibles y posteriormente decaen hasta el término del ensayo.

Aunque en los tratamientos con pasturas hubo la mayor reducción del contenido de aceites y grasas, no se detectaron diferencias significativas para el CM y la ADH.

Literatura citada

- Alexander, M. 1999. Biodegradation and bioremediation. Segunda Edición. Academic Press Inc. San Diego. USA. 453p.
- Anderson, T.A., E.A. Guthrie y B.T. Walton. 1993. Bioremediation in the rhizosphere: Plant roots and associated microbes clean contaminated soil. Environ. Sci. Tech. 27(13): 2630-2636.
- Anderson, J. y J. Ingram. 1992. Tropical Soil Biology and Fertility: A handbook of methods. C.A.B. International. Oxford. 221 p.
- Baker, J.M. 1970. The effects of oils on plants. Environ. Poll. 1:27-44.
- Broos, K., L.M. McDonald, M. St. J. Warne, D.A. Heemsberger, M.B. Barnes, M. Bell y M.J. McLaughling. 2007. Limitations of soil microbial biomass carbon as an indicator of soil pollution in the field. Soil Biol. Biochem. 39: 2693-2695.
- Casida, L.E., Jr. Klein, D.A. y T. Santoro. 1964. Soil dehydrogenase activity. Soil Sci. 98: 371-376.
- Cunningham, S.D., Anderson, T.A., Schwab, A.P. y F.C. Hsu. 1996. Phytoremediation of soils contaminated with organic pollutants. Adv. Agron. 56: 55-114.
- Deuel, L. Jr. y G.H. Holliday. 1997. Soil remediation for the petroleum extraction industry. 2da. Edición. Penn Well. Tulsa. USA. 242p.
- EPA (Environmental Protection Agency). 1996. Guía del Ciudadano: Medidas fitocorrectivas. Office of solid waste and emergency response. 20460. EPA 542-F-96-025. Washington, DC. 50p.
- Frick, C.M., R.E. Farrelly y J.J. Germida. 1999. Assessment of phytoremediation as an *in situ* technique for cleaning oil-contaminated sites. Petroleum Technology Alliance of Canada. Calgary, Alberta. 82p.
- Gianfreda L., Ma. A. Rao, A. Piotrowska, G. Palumbo y C. Colombo. 2005. Soil enzyme activities as affected by anthropogenic alterations: intensive agricultural practices and organic pollution. Sci. Total Environ. 341: 265-279.
- Hernández-Valencia, I. y D. Mager. 2003. El uso de *Panicum maximum* y *Brachiaria brizantha* para fitorremediar un suelo contaminado con crudo de petróleo liviano. Bioagro 15(3): 149-155.
- Hutchinson, S.L., M.K. Banks y A. P. Schwab. 2001. Phytoremediation of aged petroleum sludge: Effect of inorganic fertilizer. J. Environ. Qual. 30: 395-403.
- Infante, C. 2003. Contaminación de suelos y biorremediación en Venezuela. Venesuelos 11(1-2): 25-30.
- Infante, C., C. Ortega, F. Morales, U. Ehrmann, I. Hernández-Valencia y R. Pérez. 2010a. Efecto del potasio en la biorremediación de un suelo contaminado con crudo liviano. Bioagro 22(2): 145-152.
- Infante, C., F. Morales, U. Ehrmann, I. Hernández-Valencia y N. León. 2010b. Hydrocarbon bioremediation and phytoremediation in tropical soils: Venezuela Case of Study. pp. 429-451. En: G. Plaza (Ed.). Trends in Bioremediation and Phytoremediation. Research Signpost. Kerala, India.
- Jing, W., Z. Zhongzhi, Z. Youming, H. Wei, H. Fenh y Z. Hongguang. 2008. Phytoremediation of petroleum

- polluted soil. *Pet. Sci.* 5:167-171.
- Johnson, D.L., D.R. Anderson y S. P. McGrath. 2005. Soil microbial response during the phytoremediation of a PAH contaminated soil. *Soil Biol. Biochem.* 37: 2334-2336.
- Liu, S., Y. Li, J. Wu, D. Huang, Y. Su y W. Wei. 2010. Spatial variability of soil microbial biomass carbon, nitrogen and phosphorus in a hilly red soil landscape in subtropical China. *Soil Sci. Plant Nut.* 56: 693-704.
- Madsen, E.L. 1997. Methods for determining biodegradability. pp. 709-720. En: J. Hurst (Ed.) *Manual of Environmental Microbiology*. American Society for Microbiology. Washington D.C.
- McMillen, S., A.G. Requejo, G.N. Young, P.S. Davis, P.D. Cook, J.M. Kerr y N.R. Gray 1995. *Bioremediation Potential of Crude Oil Spilled on Soil*. pp. 91-100. Hinchey R. E., R. N. Miller y P. C. Johnson (Eds.). *Microbial processes for bioremediation*. Batelle Press. Columbus, Ohio.
- Mancera-López, M.E., F. Esparza, B. Chávez, R. Rodríguez, G. Saucedo. y J. Barrera. 2008. Bioremediation of an aged hydrocarbon-contaminated soil by a combined system of biostimulation-bioaugmentation with filamentous fungi. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 61:151-160.
- Merkel, N., R. Schultze-Kraft y C. Infante, C. 2005. Phytoremediation in the tropics-influence of heavy crude oil on root morphological characteristics of graminoids. *Environ. Poll.* 138: 86-91.
- Minai-Tehrani, D., M.H. Shahriari y G. Savaghebi-Firoozabadi. 2007. Effect of light crude oil-contaminated soil on growth and germination of *Festuca arundinacea*. *J. Applied Sci.*, 7: 2623-2628.
- Nedunuri, K.V., C. Lowell, W. Meade, A. P. Vonderheide, y Shann, J. R. 2010. Management practices and phytoremediation by native grasses, *Int. J. Phytorem.* 12: 200-214
- Okoh, H. 2006. Biodegradation alternative in the cleanup of petroleum hydrocarbon pollutants. *Biotech. Mol. Biol.* 1: 38-50.
- Olson, J.S. 1963. Energy storage and balance of producers and decomposers in ecological systems. *Ecology* 44: 322-331.
- Pivetz, B.E. 2001. Phytoremediation of contaminated soil and ground water at hazardous waste sites. *Ground Water Issue. EPA/540/S-01/500*. United States Environmental Protection Agency. Office of Solid Waste and Emergency Response. Washington D.C. 36p.
- Quilchano, C. y T. Maranon. 2002. Dehydrogenase activity in Mediterranean forest soils. *Biol. Fert. Soils* 35: 102-107.
- República de Venezuela. 1998. *Gaceta Oficial de la República de Venezuela*. Año CXXV – Mes X. N° 5245.
- Statsoft. 2001. *Statistica*. Version 6.0. for Window. Tulsa, OK, USA.
- Stępniowska Z. y A. Wolińska 2005. Soil dehydrogenase activity in the presence of chromium (III) and (VI). *Int. Agrophys.* 19: 79-83.
- Rowell, M.J. y L.Z. Florence. 1993. Characteristics associated with differences between undisturbed and industrially-disturbed soils. *Soil Biol. Biochem.* 25: 1499-1511.
- Tarache, A. 2011. Estudio de la evolución de la toxicidad de suelos petrolizados durante un proceso de biorremediación. Trabajo de Grado Maestría en Química. USB. Valle de Sartenejas. 160p.
- Trasar-Cepeda C., M.C. Leiros, S. Seoane y F. Gil-Sotres. 2000. Limitations of soil enzymes as indicators of soil pollution. *Soil Biol. Biochem.* 32: 1867-1875.
- Timmerman, M.D., L.G. Fuller. y D.L. Burton. 2003. The effects of a crude oil spill on microbiological indices of soil biological quality. *Can. J. Soil Sci.*

83: 173-181.

Soil Biol. Biochem. 19: 703-707.

Vance, E.D., P.C. Brookes y D.S. Jenkinson. 1987. An extraction method for measuring soil microbial biomass C.

Xu, J.G. y R.L. Johnson. 1995. Root growth, microbial activity and phosphatase activity in oil-contaminated, remediated and uncontaminated soils planted to barley and field pea. *Plant Soil* 173: 3-10.