

# EFECTO DEL AGREGADO DE DIÉSEL-OIL SOBRE ALGUNOS PARÁMETROS MICROBIOLÓGICOS DEL SUELO CON Y SIN PRESENCIA DE PLANTAS

Effect of Diesel-Oil Addition on Soil Microbiological Parameters in Systems with and without Plants

María Cristina Petenello<sup>1‡</sup>, Celina Beltrán<sup>2</sup> y Susana Raquel Feldman<sup>3</sup>

## RESUMEN

La actividad industrial, el transporte de combustibles y las fugas de tanques y cañerías provocan frecuentemente derrames de hidrocarburos durante la manipulación y el uso de los mismos, que contaminan el suelo con el riesgo de alcanzar las capas freáticas. Dentro de los métodos de remediación de suelos contaminados, la fitorremediación es una de las técnicas de remoción de contaminantes para recuperar la salud del suelo que combina la acción de las plantas con los microorganismos asociados a ellas. En el presente trabajo se utilizó el proceso de remediación menos costoso, no se emplearon fertilizantes, ni se incorporaron bacterias seleccionadas por su capacidad remediadora, sino que se aprovechó la propia actividad de los microorganismos (atenuación natural). Ciertas propiedades biológicas del suelo pueden emplearse para monitorear la marcha de un proceso fitorremediador. En el experimento se emplearon dos concentraciones de diésel-oil en suelo (1 y 2%), con la presencia de plantas de *Spartina argentinensis* y *Melilotus alba*, se evaluaron la respiración, la biomasa microbiana y el cociente respiratorio en dos momentos. Hacia el final del experimento, la producción de CO<sub>2</sub> se vio incrementada por la presencia de diésel-oil. La biomasa microbiana aumentó con la menor concentración de diésel-oil pero la mayor concentración provocó probablemente un efecto tóxico sobre los microorganismos, en consecuencia, el mayor estrés causado por la concentración de contaminante (2% de diésel-oil) quedó demostrado con el qCO<sub>2</sub>. La importancia de los parámetros evaluados radica en que

permiten conocer la respuesta de las comunidades microbianas del suelo ante la presencia del diésel-oil.

**Palabras clave:** biomasa microbiana, cociente metabólico, fitorremediación, respirometría.

## SUMMARY

Soils become frequently contaminated by industrial activity, fuel transport or leaking pipes and fuel storage tanks. Consequently, when these accidents occur there is a great risk that pollutants reach the water table. Among other techniques recommended to remediate contaminated soils, phytoremediation, a technique that includes the action of plants together with its associated microbes, is much recommended because of its low cost. In this particular experiment neither specially selected bacteria nor fertilizers were used, but only natural properties of plant-soil conditions. There are a series of biological properties of soils that can be employed to monitor a phytoremediation process. In this experiment soil respiration, soil microbial biomass and metabolic quotient were measured at two moments of the experiment (30 and 75 days). Seeds of *Spartina argentinensis* and *Melilotus alba* were sown in pots with soil previously contaminated with 1 and 2% diésel-oil, and the plants were maintained under greenhouse conditions. CO<sub>2</sub> production increased in all diesel-oil treatments by the end of the experiment. Microbial biomass also increased only in the 1% diesel-oil treatment but not in the higher concentration, probably due to some toxic effect of 2% diesel-oil on microorganisms. Consequently, stress caused by the higher contaminant concentration resulted in a greater qCO<sub>2</sub>. The importance of the evaluated parameters is that they allow knowledge of how soil microbial communities respond to the presence of diesel-oil.

**Index words:** metabolic quotient, microbial biomass, phytoremediation, respirometry.

<sup>1</sup> Cátedra de Microbiología, <sup>2</sup> Cátedra de Estadística, <sup>3</sup> Cátedra de Biología y Consejo de Investigaciones. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Rosario. Campo Experimental Villarino. C.C. 14 (S2125ZAA) Zavalla - Santa Fe, Argentina.

<sup>‡</sup> Autor responsable (petenello@arnet.com.ar)

## INTRODUCCIÓN

El suelo es uno de los ambientes más impactados por la contaminación ambiental como resultado de las diversas actividades humanas, ya que recibe sustancias químicas que afectan negativamente su funcionalidad.

La operación diaria de industrias o zonas de abastecimiento, el transporte de crudo y derivados, así como las fugas en tanques y tuberías, provocan frecuentemente derrames de combustibles, contaminando la zona superficial del suelo y aún zonas más profundas, con el riesgo consecuente que, a través de su migración, alcancen las capas freáticas de las cuales puede abastecerse la población. Los hidrocarburos presentes en el suelo, además de impedir o dificultar el intercambio gaseoso con la atmósfera, pueden provocar una serie de procesos físico-químicos que podrían ocasionar toxicidad y llevar a la muerte a muchos microorganismos del suelo, principales intermediarios del ciclaje de los materiales (Benavides *et al.*, 2006), además de tener efectos negativos sobre la salud humana por su acción genotóxica (Miranda-Martínez *et al.*, 2007), ya que, al incorporarse a las redes tróficas, alcanzan a todos los niveles de la misma (Galán *et al.*, 2003).

Es importante encontrar soluciones adecuadas para la remoción o el control de estos contaminantes. En este sentido, se han desarrollado en las décadas pasadas tecnologías de remediación físicas, químicas y biológicas. Los métodos físicos y químicos suelen ser adecuados para descontaminar áreas relativamente pequeñas (Escalante Espinosa *et al.*, 2005) pero son costosos, requieren un elevado consumo de energía e impactan negativamente sobre la integridad y funcionalidad del suelo (Garbisu *et al.*, 2007). La biorremediación, implica el empleo de sistemas biológicos para llevar a cabo la detoxificación de contaminantes de origen industrial, utilizando los principios de la ecología microbiana (Miranda-Martínez *et al.*, 2007), siendo estas tecnologías más sustentables.

Dentro de estos procesos de biorremediación se incluyen aquellos que combinan la acción de los microorganismos con las plantas. Este proceso, fitorremediación, incrementa la tasa general de remediación de hidrocarburos totales en distintos tipos de suelos (Huang *et al.*, 2005). El objetivo último de un proceso fitorremediador es la recuperación de la salud del suelo, más allá de eliminar al contaminante o disminuir

su concentración hasta alcanzar los límites de la normativa vigente para el caso.

Una serie de propiedades del suelo pueden ser consideradas como indicadores de su calidad. Es así que tanto la respiración del suelo como el contenido de carbono en la biomasa microbiana son considerados buenos indicadores biológicos de calidad de suelo, dado que los métodos moleculares resultan complejos y caros.

El diésel-oil es una mezcla de hidrocarburos parafínicos, cicloparafínicos, aromáticos y olefínicos, en la que predominan los compuestos con un número de átomos de carbono de entre 10 y 22. En Argentina, el sector agropecuario consumió durante el 2011 1 575 810 000 L (Donato, 2011), lo cual justifica la preocupación por la contaminación del suelo que puede producirse como consecuencia de accidentes, derrames o fugas en tanques de almacenamiento.

El objetivo de este trabajo fue establecer el efecto del agregado de diésel-oil sobre determinados parámetros biológicos del suelo relativamente sencillos, como son respirometría, biomasa microbiana y cociente metabólico. Algunos autores sostienen que dichos parámetros podrían considerarse indicadores para monitorear la biorremediación de suelos (Dawson *et al.*, 2007), ya sea en presencia o ausencia de plantas. Dado que el progreso de la remediación de suelos contaminados con hidrocarburos habitualmente se monitorea a través de análisis químicos convencionales, lo cual es bastante caro (Maila y Cloete, 2005), nuestra hipótesis fue que el empleo de algunas herramientas biológicas resultaría adecuado para evaluar el proceso biorremediador.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizó suelo procedente del Parque José Villarino de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Rosario, ubicada en Zavalla (provincia de Santa Fe, Argentina), recolectado del horizonte A (0-20 cm), originalmente libre de hidrocarburos y que fue artificialmente contaminado con una cantidad de diésel-oil equivalente al 1 y 2% (p/p). El suelo, un Argiudol vértico (Serie Roldán) tenía un contenido de arcilla de 24.1%, limo 71.4% y arena 4.4%, se caracterizó física y químicamente, presentando los siguientes valores: carbono orgánico 3.68% (técnica semi micro Walkley y Black); nitrógeno total, 0.28% (LPE 0112- Kjeldahl semiautomático); fósforo asimilable 44.1 ppm (LPE. 0048- espectrofotometría), Capacidad de Intercambio

Catiónico (CIC) de 17.67 cmol kg<sup>-1</sup> (LPE. 0036-titulometría) y pH de 6.65 (LPE. 0034- método potenciométrico 1:2.5) (Gomez *et al.*, 2001).

Se utilizaron macetas plásticas donde se colocaron 650 g de suelo sin contaminar (tratamiento testigo) y contaminado con diésel-oil (1 y 2%; n = 10). En cada maceta se sembraron 40 semillas de *Spartina argentinensis* ó 25 semillas de *Melilotus alba*. En este caso, y por tratarse de una especie perteneciente a la familia de las Fabaceas que presenta simbiosis mutualistas con Rhizobiáceas fijadoras de nitrógeno y considerando que la presencia del simbiote favorecería el proceso de fitorremediación, se inocularon con un inoculante que contenía bacterias (*Synorhizobium melilotii*). El suelo se mantuvo cercano a su capacidad de campo por subirrigación con agua potable, ya que las macetas estaban colocadas dentro de bandejas especiales que recogían el lixiviado, que era nuevamente empleado para regar. El experimento se realizó bajo condiciones de invernadero, con temperaturas entre 10 y 15°C y 11-12 h de luz natural. A los 30 y a los 75 días (finalización del experimento), se tomó suelo de 5 macetas para efectuar análisis microbiológicos.

### Respirometría

Se midió la producción de CO<sub>2</sub> utilizando frascos de 300 ml de cierre hermético, dentro de los cuales se colocaron 50 g de suelo, con una humedad equivalente al 60% de su capacidad de campo. El CO<sub>2</sub> producido se atrapó en una solución de NaOH 0.5 N contenida en un recipiente ubicado en el interior de cada frasco. Los ensayos se realizaron por triplicado en todos los casos (tratamientos contaminados y suelo control sin contaminar, además de “blancos”). La producción de CO<sub>2</sub> se evaluó por titulación con CIH 0.5 N, tras añadir 1 ml de solución 0.5 M de BaCl<sub>2</sub>, empleando fenolftaleína como indicador (Morelli *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2007).

### Biomasa Microbiana (BM)

Se estimó como los microgramos de C de biomasa por gramo de peso seco (Anderson y Domsch, 1978) empleando un factor de conversión de 0.45, que caracteriza la abundancia de microorganismos en el suelo. Siguiendo a Jenkinson y Powlson (1976) se cuantificó el C-CO<sub>2</sub> producido por muestras de 10 g de suelo fumigadas con cloroformo en un recipiente

hermético durante 24 horas, posteriormente defumigadas convenientemente, inoculadas con 0.2 g de suelo húmedo sin fumigar e incubadas a 28 °C, durante 10 días. Se trabajó con triplicados de cada una de las situaciones y blancos. El contenido de humedad se mantuvo equivalente al 60% de la capacidad de campo durante este período. Se determinó el “Carbono de biomasa microbiana PLUS” (De Polli *et al.*, 2007).

### Cociente Metabólico (qCO<sub>2</sub>)

Se calculó como el cociente entre la respiración basal y el carbono de biomasa microbiana e indica el estado fisiológico (eficiencia energética y de utilización del carbono) de la comunidad microbiana de suelo (Anderson y Domsch, 1993). Este valor es un indicador de la eficiencia de los microorganismos del suelo para descomponer la materia orgánica y, en consecuencia, es un importante parámetro para el funcionamiento del ciclo de los nutrientes en el ecosistema (Anderson y Domsch, 1989, 1990, 1993).

Se realizó un análisis de la variancia para un diseño completamente aleatorizado en arreglo factorial. En los casos en que la interacción resultó significativa se compararon mediante Tukey todas las combinaciones de tratamiento por concentración. Por el contrario, cuando la interacción no resultó significativa se compararon separadamente, mediante Tukey las medias de los niveles de cada factor (Di Rienzo, 2011).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Respirometría

El agregado de diésel-oil no incrementó significativamente la producción de CO<sub>2</sub> en suelo sin plantas 30 días después de iniciado el experimento, mientras que sí lo hizo cuando tenía *M. alba*, sin diferencias significativas entre las diferentes concentraciones de diésel-oil en el suelo (1 y 2% p/p). En cambio, suelos con *S. argentinensis* con la concentración más baja de contaminante promovieron la respiración. A los 75 días, se produjo un incremento notable en el CO<sub>2</sub> producido, siendo todos los valores de suelos contaminados (baja y alta concentración, con y sin plantas) significativamente superiores a los medidos en el momento inicial del experimento, pero con diferencias entre tratamientos. El suelo sin plantas

respondió linealmente a la concentración, mientras que los suelos con *M. alba* y *S. argentinensis* no presentaron diferencias entre las que contenían 1 y 2% de diésel-oil. En suelo sin plantas, las diferencias entre CO<sub>2</sub> liberado a los 75 y 30 días solo fueron significativos para el suelo con mayor concentración del contaminante, mientras que con *M. alba* no hubo diferencias bajo ninguna condición y con *S. argentinensis*, el suelo con mayor concentración de diésel-oil presentó mayor diferencia entre las diferentes fechas de muestreo (Figura 1). En el caso del suelo con mayor concentración del contaminante se evidenció un efecto perturbador de éste sobre los microorganismos (Pinto Mariano *et al.*, 2007; de la Garza *et al.*, 2008), para luego producirse una adaptación de la microflora autóctona al diésel-oil al utilizar este hidrocarburo como una fuente de carbono adicional. La presencia de *M. alba* tendería a producir una más temprana mineralización del diésel-oil en comparación a *S. argentinensis*, probablemente por aportar una mayor cantidad de nitrógeno al suelo, a través de sus exudados y descamación de células de raíz incorporados al suelo, de allí que no presentara

diferencias significativas en la producción de CO<sub>2</sub> entre el primer y segundo muestreo.

Estos resultados coinciden con lo hallado por otros investigadores, como Xu y Johnson (1995), quienes también midieron incrementos en la actividad respiratoria en suelos contaminados con 5% de hidrocarburos y sometidos a diversas situaciones. Cofield *et al.* (2007) y Serrano Silva *et al.* (2009), encontraron un incremento de la respiración en suelos contaminados con hidrocarburos policíclicos. Pérez *et al.* (2008), halló igual tendencia en suelos contaminados con querosene y sin fertilizar y Margesin *et al.* (2000), en suelos contaminados con diésel, al igual que Tong *et al.* (2007), quienes demostraron que los suelos tratados con niveles subtóxicos de hidrocarburos provocaron siempre un incremento en la producción de CO<sub>2</sub>.

De acuerdo a Margesin y Schinner (1997), Kuperman y Carreiro (1997), Insam *et al.* (1996), Van der Waarde *et al.* (1995) y Song y Bartha (1990), la medición de la actividad microbiana parece ser un buen indicador del grado de polución en los suelos contaminados. En general el incremento en la respiración,

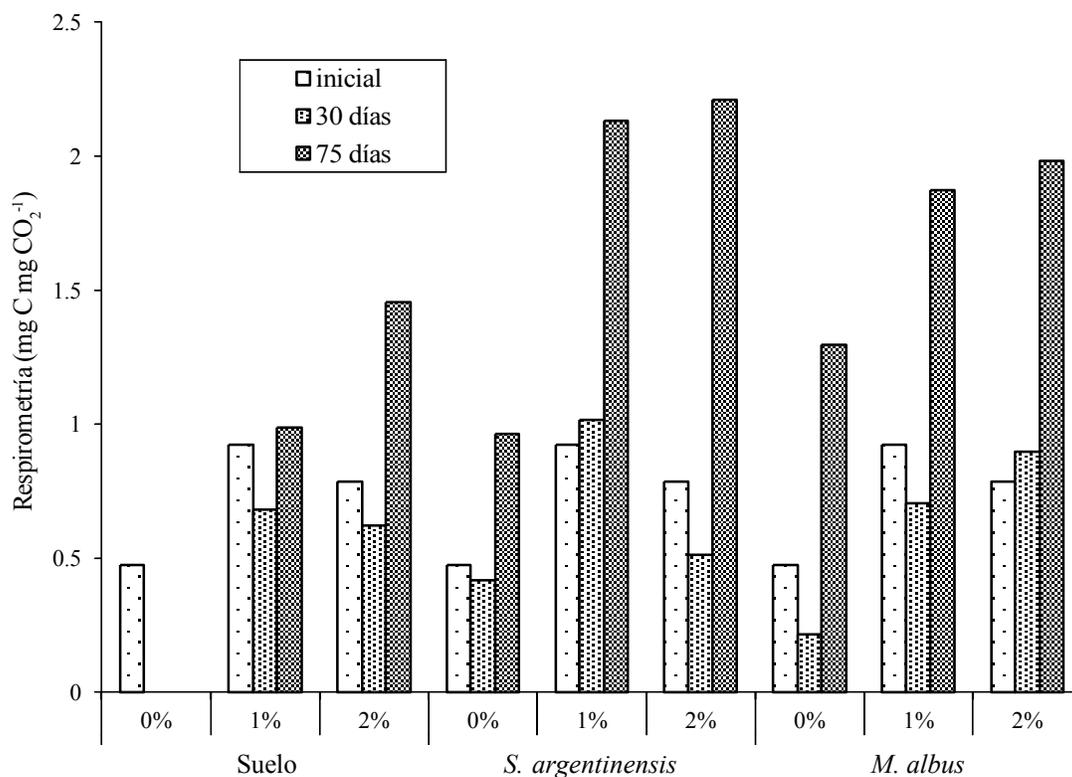


Figura 1: Actividad respiratoria (mg C- CO<sub>2</sub> g<sup>-1</sup>, en base seca) de la microflora edáfica del suelo en macetas con *M. alba*, *S. argentinensis* o sin plantas (suelo) con los siguientes tratamientos: agregado de 0, 1 y 2% de diésel-oil.

cuando el suelo está contaminado con hidrocarburos, podría indicar una mineralización del contaminante (Margesin *et al.*, 2003; Labud *et al.*, 2007).

### Biomasa Microbiana

A los 30 días de establecido el experimento, la biomasa microbiana del suelo sin plantas y del suelo con *S. argentinensis* tuvieron comportamiento similar, se incrementó en el suelo con mayor concentración de diésel-oil, mientras que en el suelo con *M. alba*, el agregado de contaminante produjo incremento en la biomasa, aunque no hubo diferencias significativas entre las concentraciones de contaminante empleadas. En el segundo muestreo, a los 75 días, se repitió el comportamiento. En suelo sin vegetación, las diferencias de biomasa microbiana entre 75 y 30 días fueron significativas solo con el agregado de 1% de diésel-oil, mientras que en *S. argentinensis* el agregado de diésel-oil determinó un incremento de la biomasa sin diferencias entre los suelos con disímiles concentraciones y en *M. alba*, la concentración más alta de diésel-oil fue

probablemente inhibitoria para los microorganismos (Figura 2). Estos resultados coinciden con Serrano Silva *et al.* (2009) quienes obtuvieron un incremento en la biomasa microbiana en un suelo con 1% de fuel oil y con Mühlbachová (2008), que trabajó en suelos contaminados con PAHs. Franco *et al.* (2004), hallaron una disminución del carbono de la biomasa microbiana luego del agregado de diésel, más marcado con las mayores dosis.

Muchos autores, evaluando estos parámetros en suelos contaminados, obtuvieron resultados diversos, Margesin *et al.* (2000) demostraron que la contaminación con 10 mg g<sup>-1</sup> (0.1%) produjo un incremento significativo de todos los parámetros biológicos del suelo del suelo evaluados en presencia de PAH's: biomasa, respiración, actividad proteásica y recuento de heterótrofos. Sin embargo, en ciertos casos, la presencia de diésel-oil (2% o más) produjo una disminución en la biomasa microbiana, aunque la respiración resultó incrementada (Peña *et al.*, 2007). Para estos autores, los microorganismos supervivientes en un suelo contaminado presentaron un incremento de la actividad metabólica, resultado del uso

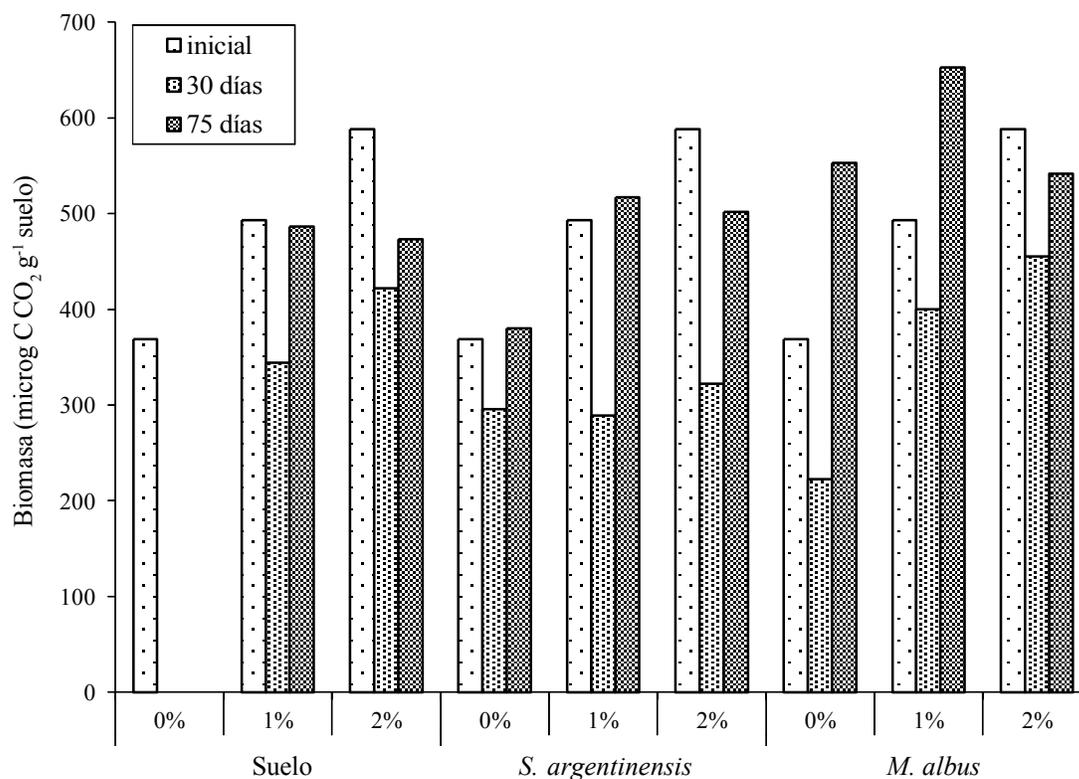


Figura 2: Biomasa microbiana de la microflora edáfica (C-BM:  $\mu\text{g C de biomasa- CO}_2 \text{ g}^{-1}$  de suelo, en base seca) en suelo testigo sin plantas (suelo) o con *S. argentinensis*; *M. alba*, con los siguientes tratamientos: agregado de 0, 1 y 2% de diésel-oil.

de microorganismos muertos como sustrato y de la falta de competencia. Los resultados obtenidos por Franco *et al.* (2004) son interesantes puesto que demostraron que la presencia de crudo producía incremento o disminución de la biomasa microbiana de acuerdo al tipo de suelo que hubiera sido contaminado: en el caso de los Molisoles, este autor encontró un incremento en la biomasa microbiana, posiblemente porque en este tipo de suelo los microorganismos están mejor protegidos frente a los efectos adversos de los derrames de hidrocarburo. Similares fueron los resultados de Labud *et al.* (2007), para quienes los más desfavorables se encontraron en suelos arcillosos.

La actividad respiratoria y la biomasa microbiana constituyen buenos métodos de ecología microbiana que deberían estar incluidos en el estudio de la calidad del suelo y también cuando se evalúa un proceso biorremediador (Mikkonen, 2012), aunque muchas veces aparecen inconsistencias entre los diversos ensayos (Paton *et al.*, 2005).

### Cociente Metabólico

El agregado de diésel-oil incrementó significativamente el cociente respiratorio en todos los casos (suelo con y sin vegetación) y las diferencias fueron proporcionales a la concentración del contaminante (Figura 3). A los 30 días de establecido el experimento no hubo diferencias entre suelo sin vegetación y suelo con *M. alba*, con cualquier concentración del contaminante. En suelo con *S. argentinensis*, solo el agregado de 1% de diésel provocó una diferencia inicial significativa en relación al suelo sin contaminar en comparación al suelo sin vegetar.

La menor biomasa microbiana, asociada con una mayor emisión de dióxido de carbono implica menor conversión del residuo en biomasa y refleja una mayor demanda de energía por parte de los microorganismos del suelo cuando se incorporan contaminantes tóxicos. En consecuencia, el sistema indica cierto grado de estrés

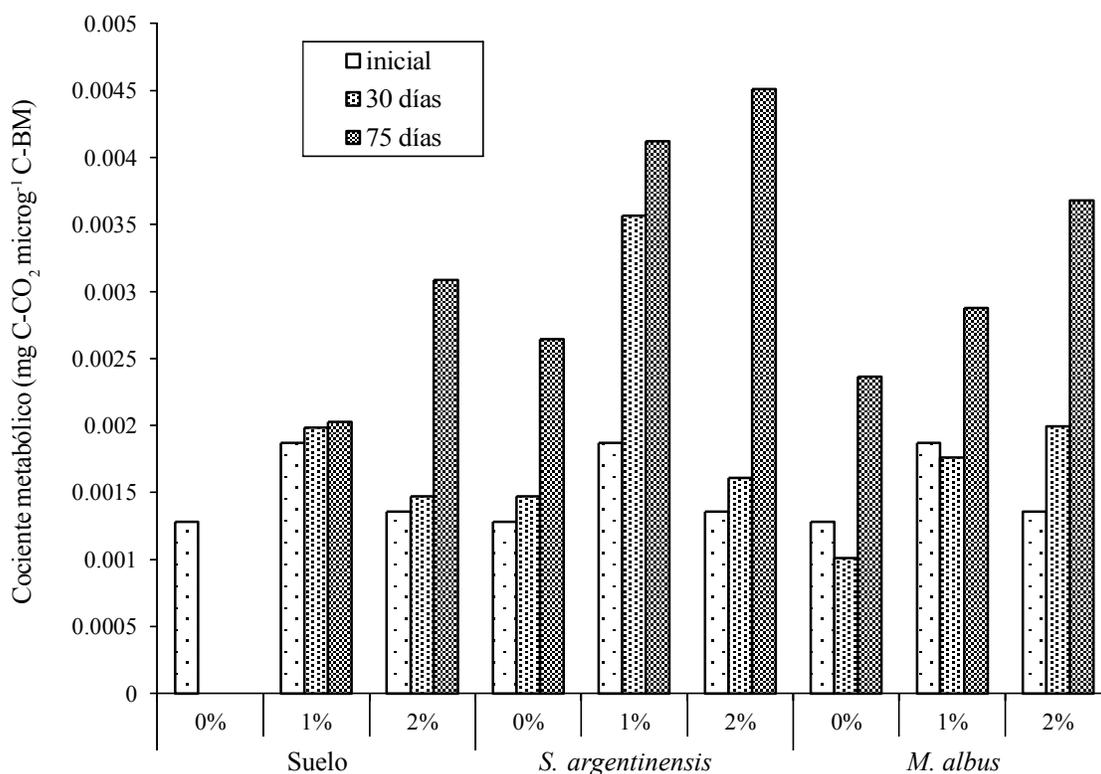


Figura 3: Cociente metabólico (mg C-CO<sub>2</sub> μg<sup>-1</sup> C-BM) de la microflora edáfica en suelo en macetas con *M. alba*, *S. argentinensis* o sin plantas (suelo) con los siguientes tratamientos: agregado de 0, 1 y 2% de diésel-oil.

frente al contaminante y esto se ve reflejado en su coeficiente respiratorio. El cociente metabólico es un indicador de estrés ambiental, ya que se calcula a partir de parámetros sensibles a los cambios ambientales. Cuando la población microbiana sufre estrés metabólico, pone en marcha mecanismos de defensa, aumentando su respiración por unidad de biomasa. También podría indicar que la microbiota es poco activa por deficiencia en el aporte de sustrato (Anderson, 1994) o por la protección física de éste en los agregados (Van Veen, 1985; Gabos *et al.*, 2011), lo que podría estar sucediendo en los casos de “suelo sin plantas” (en ambas concentraciones), donde no recibe el aporte de materia orgánica fácilmente degradable que proveen las plantas en el caso de los suelos vegetados. El cociente metabólico ( $qCO_2$ ) disminuye a medida que el sistema alcanza su estabilidad (Ebhin *et al.*, 2006).

A medida que se incorpora el contaminante al suelo, los microorganismos demandan mayor energía, presentando una mayor actividad metabólica. En el 2do. muestreo, el cociente metabólico aumentó en todos los casos al incrementarse la concentración de diésel-oil en el suelo, tanto en suelo con como sin vegetación, aunque el efecto de la incorporación de diésel-oil sobre este parámetro es más notorio en suelo con plantas.

### CONCLUSIONES

- La estabilidad general de los ecosistemas está relacionada con el estado general de salud de la comunidad microbiana del suelo. Una alteración en la actividad de los microorganismos del suelo, tal como se puso de manifiesto en este experimento a través de los cambios en la actividad respiratoria, la biomasa y, consecuentemente, el cociente metabólico, puede ser indicadora de una alteración en el ecosistema, lo cual sucede claramente cuando el suelo está contaminado con hidrocarburos. La incorporación de diésel-oil al suelo provee de sustrato carbonado que podría ser utilizado por los microorganismos cuando las concentraciones son menores, pero no cuando las concentraciones son altas, debido a la naturaleza altamente recalcitrante de este hidrocarburo. Sin embargo, el incremento en la actividad biológica de un suelo contaminado con compuestos orgánicos también predice la capacidad que tienen las poblaciones nativas para lograr que el suelo retorne a las condiciones previas.

- Dado que la contaminación modificó las propiedades bioquímicas del suelo evaluadas (producción de  $CO_2$

y biomasa microbiana), algunas en relación directa con la dosis y otras no, una sola de estas mediciones, puede no reflejar la gran complejidad del sistema suelo-plantas-microorganismos. Los resultados del presente trabajo tienen el carácter de experimental ya que las pruebas *ex-situ* llevan intrínsecamente el problema del efecto magnificador (*priming*) de la manipulación impuesta para reducir la variabilidad (secado al aire, tamizado, mezclado) sobre los parámetros bioquímicos estudiados. No obstante y dado que un suelo contaminado es un ambiente muy heterogéneo por la desigual distribución del contaminante, la realización de baterías de ensayos de ecotoxicidad también debería ser una práctica necesariamente incorporada a los análisis químicos y microbiológicos básicos que un proceso fitorremediador requiere para confirmar su éxito.

- A pesar de los aspectos a mejorar que aun presenta, el estudio de la respuesta de las comunidades microbianas a la contaminación del suelo ayuda a comprender cuál es la función que cumplen los microorganismos en relación con la factibilidad de la biorremediación y su efectividad, particularmente en situaciones en las que los recursos técnicos y financieros son limitados.

### LITERATURA CITADA

- Anderson, T. H. 1994. Physiological analysis of microbial communities in soil: Applications and limitations. pp. 67-76. *In*: K. Ritz, J. Gighton, and K. E. Giller (eds.). Beyond the biomass. John Wiley and Sons. New York, NY, USA.
- Anderson, J. P. E. and K. H. Domsch. 1978. A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. *Soil Biol. Biochem.* 10: 215-221.
- Anderson, T. H. and K. H. Domsch. 1989. Ratios of microbial biomass carbon total organic carbon in arable soils. *Soil Biol. Biochem.* 21: 471-479.
- Anderson, T. H. and K. H. Domsch. 1990. Application of eco-physiological quotients ( $qCO_2$  and  $qD$ ) on microbial biomasses from soils of different cropping histories. *Soil Biol. Biochem.* 22: 251-255.
- Anderson, T. H. and K. H. Domsch, 1993. The metabolic quotient for  $CO_2$  ( $qCO_2$ ) as a specific activity parameter to assess the effects of environmental conditions, such as pH, on the microbial biomass of forest soils. *Soil Biol. Biochem.* 25: 393-395.
- Benavides López de Mesa, J., G. Quintero, A. Guevara, D. Jaimes Cáceres, S. Gutiérrez Riaño y J. Miranda-García. 2006. Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. *Nova* 4: 82-90.
- Cofield, N., A. P. Schwab, P. Williams, and M. K. Banks. 2007. Phytoremediation of polycyclic hydrocarbon contaminated soil: Part II. Impact on ecotoxicity. *Int. J. Phytoremediat.* 9: 371-384.
- Galán H., E. J. L. Gómez A., N. Bellinfante C. y P. A. Fernández. 2003. Contaminación de suelos por compuestos orgánicos.

- Informe final. Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía. Andalucía, España.
- Dawson, J. J. C., E. Godsiffe, I. P. Thompson, T. Ralebitso-Senior, K. S. Killham, and G. I. Paton. 2007. Biological indicators: An assessment of remediation success in hydrocarbon impacted soils. *Soil Biol. Biochem.* 39: 164-177.
- De la Garza, F. D., Y. P. Ortiz, B. A. Macías, C. García y D. Coll. 2008. Actividad biótica del suelo y la contaminación por hidrocarburos. *Rev. Latinoame. Rec. Nat.* 4: 49-54.
- De-Polli, H., A. Costantini, R. Romaniuk, and M. Sampaio Pimentel. 2007. Chloroform fumigation-extraction labile C pool (microbial biomass C plus) shows high correlation to microbial biomass C in Argentinian and Brazilian soils. *Cienc. Suelo* 25: 15-22.
- Di Rienzo, J. A., F. Casanoves, M. G. Balzarini, L. Gonzalez, M. Tablada y C. W. Robledo. 2011. InfoStat, versión 2011, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina.
- Donato, L. B. 2011. Estimación del consumo potencial de gasoil para las tareas agrícolas, transporte y secado de granos en el sector agropecuario. <http://inta.gov.ar/documentos/estimacion-del-consumo-potencial-de-gasoil-para-las-tareas-agricolas-transporte-y-secado-de-granos-en-el-sector-agropecuario/> (Consulta: noviembre 19, 2014).
- Ebhin Masto, R., P. K. Chhonkar, D. Singh, and A. K. Patra. 2006. Changes in soil biological and biochemical characteristics in a long-term field trial on a sub-tropical inceptisol. *Soil Biol. Biochem.* 38: 1577-1582.
- Escalante Espinosa, E., M. E. Gallegos Martínez, E. Favela Torres, and M. Gutierrez-Rojas. 2005. Improvement of the hydrocarbon phytoremediation rate by *Cyperus laxus* Lam. inoculated with a microbial consortium in a model system. *Chemosphere* 59: 405-413.
- Franco, I., M. Contin, G. Bragato, and M. Nobili. 2004. Microbial resilience of soils contaminated with crude oil. *Geoderma* 121: 17-30.
- Gabos, M. B., G. Casagrande, C. A. Abreu e J. Paz Fereiro. 2011. Uso da matéria orgânica como mitigadora de solo multicontaminado e do girassol como fitoextratora. *Rev. Bras. Eng. Agric. Ambient.* 15: 1298-1306.
- Garbisu C., C., J. M. Becerril S., L. Epelde e I. Alkorta. 2007. Bioindicadores de la calidad del suelo: Herramienta metodológica para la evaluación de la eficacia de un proceso fitorremediador. *Ecosistemas* 16: 44-49.
- Gomez, E., L. Ferreras, S. Toresani, A. Ausilio, and V. Bisaro. 2001. Changes in some soil properties in a vertic soil under short-term conservation tillage. *Soil Tillage Res.* 61: 179-186.
- Huang, X. D., Y. El-Alawi, J. Gurska, B. R. Glick, and B. M. Greenberg. 2005. A multiprocess phytoremediation system for decontamination of persistent total petroleum hydrocarbons (TPHs) from soils. *Microchem. J.* 81: 139-147.
- Insam, H., T. Hutchinson, and H. H. Reber. 1996. Effects of heavy metal stress on the metabolic quotient of the soil microflora. *Soil Biol. Biochem.* 28: 691-694.
- Jenkinson, D. S. and D. S. Powlson. 1976. The effects of biocidal treatments on metabolism in soil-V: A method for measuring soil biomass. *Soil Biol. Biochem.* 8: 209-213.
- Kuperman, R. and M. M. Carreiro. 1997. Soils heavy metals concentrations: microbial biomass and enzyme activities in a contaminated grassland ecosystem. *Soil Biol. Biochem.* 29: 179-190.
- Labud, V., C. García, and T. Hernández. 2007. Effect of hydrocarbon pollution on the microbiological properties of a sandy and a clay soil. *Chemosphere* 66: 1863-1871.
- Maila, M. and T. E. Cloete. 2005. The use of biological activities to monitor the removal of fuel contaminants-perspective for monitoring hydrocarbon contamination: A review. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 55: 1-8.
- Margesin, R. and F. Schinner. 1997. Laboratory bioremediation experiments with soil from a diesel-oil contaminated site-significant role of cold-adapted microorganisms and fertilizers. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 70: 92-98.
- Margesin, R., G. Walder, and F. Schinner. 2000. The impact of hydrocarbon remediation (diesel and polycyclic hydrocarbons) on enzyme activities and microbial properties of soil. *Acta Biotechnol.* 20: 313-333.
- Margesin, R., D. Labbé, F. Schinner, C. W. Greer, and L. C. Whyte. 2003. Characterization of hydrocarbon-degrading microbial populations in contaminated and pristine alpine soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 3085-3092.
- Mikkonen, A. 2012. The potential of microbial ecological indicators to guide ecologically sophisticated management of hydrocarbon contaminated soils. Faculty of Agriculture and Forestry of the University of Helsinki. Academic Dissertation. Helsinki, Finland.
- Miranda-Martínez, M. R., J. Delgadillo-Martínez, A. Alarcón y R. Ferrera-Cerrato. 2007. Degradación de fenantreno por microorganismos en la rizosfera del pasto alemán. *Terra Latinoamericana* 25: 25-33.
- Morelli, I., M. Del Panno, O. Costanza, G. Vecchioli y M. Paineira. 2000. Técnicas de bio-remediación: Ensayos de tratabilidad-Nivel 1-. XXVII Congreso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental. Porto Alegre, Brasil.
- Mühlbachová, G. 2008. Potential of the soil microbial biomass C to tolerate and degrade persistent organic pollutants. *Soil Water Res. J.* 3: 12-20.
- Paton, G. J., K. Killham, H. J. Weitz, and K. T. Semple. 2005. Biological tools for the assessment of contaminated land, applied soil ecotoxicology. *Soil Use Manage.* 21: 487-499.
- Peña, W., C. Trasar-Cepeda, F. Gil-Sotres, and M. C. Leirós. 2007. Modification of the degradative capacity of a soil artificially contaminated with diesel. *Chemosphere* 67: 1057-1063.
- Pérez, E., P. Garrido, and M. Laca. 2008. Indicadores microbiológicos como marcadores de la contaminación y recuperación de suelos contaminados con queroseno. *Ecosistemas* 17: 133-138.
- Pinto Mariano, A., A. de Arruda Galdes Kataoka, D. de Franceschi de Angelis, and D. Bonotto. 2007. Laboratory studies on the bioremediation of diesel contaminated soil from a petrol station. *Braz. J. Microbiol.* 38: 346-353.
- Serrano Silva, I., E. Da Costa Dos Santos, C. Ragagnin De Menezes, A. Fonseca De Faria, E. Francison, M. Grossman, and L. R. Durrant. 2009. Bioremediation of a polyaromatic hydrocarbon contaminated soil by native soil microbiota and bioaugmentation with isolated microbial consortia. *Bioresour. Technol.* 100: 4669-4675.

- Silva, E. E. Da, P. H. S. Azevedo, and H. De-Polli. 2007. Determinação da respiração basal (RBS) e quociente metabólico do solo ( $qCO_2$ ). Comunicado Técnico 99 (INFOTECA-E). Embrapa. Rio de Janeiro, Brazil.
- Song, H. C. and R. Bartha. 1990. Effects of jet fuel spill on the microbial community of soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 646-651.
- Tong, Z., M. Bischoff, L. Nies, B. Applegate, and R. F. Turco. 2007. Impact of fullerene (C60) on a soil microbial community. *Environ. Sci. Technol.* 41: 2985-2991.
- Van der Waarde, J., E. Dijkhuis, M. Henssen, and S. Keuning. 1995. pp. 59-63. *In:* R. Hinchee, G. Douglas, and S. Onk (eds.). Monitoring and verification of bioremediation. Battelle Press, Columbus, OH, USA.
- Van Veen, J. A., J. N. Ladd, and M. Amato. 1985. Turnover of carbon and nitrogen through microbial biomass in a sandy loam and a clay soil incubated with ( $^{14}C(U)$ ) Glucose and ( $^{15}N$ )  $(NH_4)_2SO_4$  under different moisture regimes. *Soil Biol. Biochem.* 17: 747-756.
- Xu, J. G. and 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.