

Test de toxicidad sobre la especie *Atriplex lampa*, su aplicación para la evaluación de riesgo asociado a derrames de petróleo en suelos de la Patagonia

Barquín M¹, Ríos SM*¹ y Nudelman N²

¹Departamento de Química. Facultad Ciencias Naturales. Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco. Ciudad Universitaria km 4. Comodoro Rivadavia. (9004) Chubut. Argentina.

²Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. Pab II. Ciudad Universitaria. 1428 Buenos Aires. Argentina.

Resumen: Se estudiaron suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo, en cercanías de la ciudad de Comodoro Rivadavia (Chubut, Argentina). Además de cuantificar el contenido de hidrocarburos totales en suelo (TPH), se realizaron bioensayos, utilizando especies vegetales como organismos de prueba. Los índices utilizados fueron: el porcentaje de germinación (G), la elongación de la radícula (R) y del hipocotilo (H) en *Lactuca sativa* L y dos especies autóctonas de la región patagónica, *Atriplex lampa* y *Prosopis denudans*. Se consideró, además, el efecto de la salinidad sobre los bioensayos, en base a la medición de la conductividad eléctrica del suelo (CE). Los resultados obtenidos del análisis por componentes principales, muestran que la primera componente explica el 58,3 % de la variabilidad total con un gradiente de toxicidad al cual contribuyen, principalmente, el porcentaje de germinación de *Lactuca sativa* L (GL) y *Atriplex lampa* (GA), en este orden de significancia. La segunda componente explica el 16,9 % y la misma está caracterizada por TPH y CE. Además, no se ha encontrado una correlación simple y directa entre TPH y toxicidad, lo cual sugiere que TPH, en conjunción con ensayos ecotóxicos, parece ser una herramienta más adecuada para definir el punto final de una remediación. La especie autóctona *Atriplex lampa* mostró tener una sensibilidad similar a la especie *Lactuca sativa* L por lo que podría considerarse su utilidad como una especie fitoindicadora en las evaluaciones de riesgo ambiental.

Palabras claves: hidrocarburos del petróleo, ecotoxicidad, análisis por componente principal, *Atriplex lampa*.

Abstract: The application of toxicity test on the specie *Atriplex lampa* in the risk assessment of oil spills in Patagonian soils. Oil spills near of the Comodoro Rivadavia city (Chubut, Argentina) were studied. Total petroleum hydrocarbon (TPH) is used to characterize the samples and bioassays were carried out using plants as test organisms. The percentage germination (G), the root elongation (R) and the hypocotyls elongation (H) in *Lactuca sativa* L and two native species to Patagonian region, *Atriplex lampa* and *Prosopis denudans* were used as toxicological indexes. It was considered the effect of salinity on the bioassays, based on the measurement of the electrical conductivity of soil (EC). Application of principal component analysis to experimental data showed that the first component accounted for more than 58.3 % of variance. The 1st PC is largely influenced by the germination percentage of *Lactuca sativa* L (GL) and *Atriplex lampa* (GA), in that order of significance. The second component accounted 16.9 % of variance. The 2nd PC is largely influenced by TPH and EC. A simple and direct correlation between TPH and toxicity was not found suggesting that TPH in conjunction with ecotoxicity test would be more successfully tool to define the end point of a remediation. The native specie *Atriplex lampa* showed

to have a similar sensibility to the *Lactuca sativa* L suggesting that it could be used as a phytoindicator in assesment of environmental risk.

Keywords: Petroleum hydrocarbons, ecotoxicity, Principal Component Analysis, *Atriplex lampa*.

Introducción

Una de las principales actividades industriales en la Patagonia Central extraandina es la del petróleo, la cual favoreció el crecimiento económico-social de la región. Sin embargo, la explotación de este recurso no renovable ha originado un impacto negativo en el ambiente debido a los derrames ocasionales de petróleo y/o sus subproductos. En este sentido, se sabe que la presencia de hidrocarburos del petróleo modifica las propiedades físicas y químicas de los suelos [1] por lo que pueden verse favorecidos los procesos de salinización, fototoxicidad [2], y alteración en las comunidades microbianas [3], entre otros.

El petróleo es una mezcla compleja constituida por compuestos que poseen puntos de ebullición y masas moleculares que difieren en un amplio rango. Contiene principalmente hidrocarburos, compuestos con heteroátomos (tales como azufre, oxígeno y nitrógeno), y bajas concentraciones de compuestos organometálicos [4]. De estos constituyentes, los hidrocarburos comprenden la mayoría de los componentes en casi todos los petróleos y la naturaleza química de los mismos depende del origen y del tiempo de permanencia en el ambiente, por lo que la composición química de los hidrocarburos es muy variable. Por este motivo se encuentran como mezclas de diferentes especies y, en conjunto, se determinan como hidrocarburos totales del petróleo (TPH). Al presentar los TPH una composición no definida, poseen en general, diferentes propiedades químicas y toxicológicas ya que algunos de sus componentes figuran en la lista de contaminantes prioritarios de los organismos internacionales, tales como la Agencia de Protección Ambiental de USA (EPA) [5].

El estudio ambiental de un sitio contaminado con petróleo se basa, generalmente en la obtención de muestras de suelo, seguida de la extracción, fraccionamiento y cuantificación por diferentes métodos analíticos y/o espectroscópicos de los hidrocarburos. En los casos que se requiera, además, se lleva a cabo la identificación y cuantificación de los componentes de algún grupo de riesgo en particular (ej. Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos, HAP). De esta manera se logra caracterizar al sitio contaminado desde el punto de vista químico, considerándose estos resultados en las evaluaciones de riesgo ambiental, para establecer criterios de punto final de una remediación [6].

*e-mail: riossm@unp.edu.ar

Desde el punto de vista ambiental, sin embargo, esta caracterización no resulta ser completa, debido a que cualquier sustancia expuesta en el ambiente es capaz de modificar su comportamiento debido a la interacción con el suelo, el agua, el aire y con los componentes bióticos del mismo. Esto puede ocasionar, una sub o sobre estimación del riesgo real [7]. Es por ello que, hoy en día se estudia la implementación de bioensayos como una herramienta complementaria al análisis químico [8]. En este sentido, los bioensayos o ensayos ecotoxicológicos permiten determinar el efecto de agentes físicos y químicos sobre organismos de prueba bajo condiciones experimentales específicas y controladas [9]. Además poseen las siguientes ventajas: mayor sensibilidad al estrés ambiental que otros sistemas de ensayos disponibles, fácil manipulación, obtención y mantenimiento, bajo costo y buena correlación con otros sistemas de pruebas [10]. En particular, los ensayos con plantas terrestres sirven para reflejar en forma directa (contacto directo con la matriz) e indirecta (extractos acuosos) los efectos del suelo [11]. Estudios previos sobre la toxicidad de hidrocarburos puros como el fluoranteno y el fluoranteno fotomodificado en plantas superiores como: *Lactuca sativa* L, *Allium cepa* L y *Lycopersicon esculentum* L [12], muestran que la elongación de la raíz junto con la germinación pueden ser utilizadas como indicador de toxicidad ambiental y que la especie *Lactuca sativa* L resultó ser la más sensible. Eom *et al.* [13], en un trabajo reciente, estudiaron el efecto de muestras de suelo contaminadas con hidrocarburos aromáticos policíclicos en la germinación y crecimiento de *Lactuca sativa* L (lechuga) y *Brassica chinensis* L (repollo chino). En este caso *Brassica chinensis* resultó ser más sensible que *Lactuca sativa* la cual no mostró inhibición en la germinación, encontrando además, que el crecimiento de las plantas es un parámetro más sensible que la germinación. Otros autores [14] mostraron que la germinación en *Lepidium sativum* (berro de agua) disminuye con el incremento de la concentración de hidrocarburos aromáticos policíclicos en un suelo contaminado artificialmente, no observándose germinación cuando se utiliza un suelo que proviene de un área contaminada. En relación a la región patagónica se evaluó la toxicidad de derrames de petróleos en suelos con *Grindella chilensis* (botón de oro) [15] encontrándose valores de EC_{50} , respecto a la etapa de germinación o más precisamente de emergencia de la planta, del orden del 10% p/p y de 18 mg L^{-1} , para contacto directo con la matriz mineral y con extracto acuoso, respectivamente.

De acuerdo a los antecedentes y a estudios preliminares de nuestro grupo, se han propuesto dos objetivos. El primero consiste en evaluar si existe una relación entre TPH y toxicidad del suelo para tres especies vegetales. Y el segundo, en evaluar la posibilidad de utilizar dos de ellas, que son especies autóctonas, como fitoindicadoras de contaminación. Para esto se propone contrastar los resultados obtenidos utilizando como herramienta de evaluación, el Análisis por Componentes Principales (PCA).

Material y Métodos

Área de estudio

El sitio de estudio se localiza en cercanías de la ciudad de Comodoro Rivadavia (Chubut, Argentina). Se tomaron muestras de suelos (31 en total), 30 muestras provenientes de un área afectada por un derrame de petróleo, la cual fue sometida a tareas de limpieza y remediación y 1 muestra de suelo sin contaminación (background). Los protocolos de selección, obtención y preservación de las muestras de suelos, correspondieron a los recomendados por organismos internacionales

[16,17] y fueron utilizados por nuestro grupo de investigación en trabajos previos [18].

Determinación de parámetros fisicoquímicos

En las muestras de suelos se determinó: pH [19], conductividad eléctrica (CE) [20], humedad [21] y TPH [22].

Ensayos de toxicidad

Se utilizaron las especies autóctonas *Prosopis denudans* y *Atriplex lampa*. *Prosopis denudans* es una especie xerófila y perfectamente adaptada a la estepa arbustiva semidesértica, con una buena tolerancia a la salinidad [23] que es frecuente encontrarla en yacimientos locales asociada a otra especie denominada vulgarmente "malaspina". La otra especie autóctona es *Atriplex lampa*, que es una especie arbustiva utilizada en la revegetación de áreas disturbadas por la actividad petrolera [24]. Ambas especies son halotolerantes y adaptadas a las condiciones locales. Como especie de control se utilizó *Lactuca sativa* L. Los ensayos de toxicidad aguda se llevaron a cabo de acuerdo a la metodología propuesta por OECD y EPA [25,26]. Los mismos se realizaron por triplicado ajustando la humedad de cada uno de los suelos al 80 % de su capacidad de campo. Como punto final para la evaluación del efecto fitotóxico, se determinaron el porcentaje de germinación (G), longitud de la radícula (R) y longitud del hipocotilo (H).

Análisis de resultados

La evaluación de resultados se realizó en base al análisis por componentes principales (PCA). El análisis por componente principal (PCA) pertenece a una técnica de análisis multivariado que permite estudiar relaciones entre variables cuantitativas, y se fundamenta en la transformación de un conjunto de variables en otro conjunto nuevo de variables no correlacionadas entre sí. Este nuevo conjunto se llama "componentes principales" (PC), que son función lineal de las variables originales y de las que se puede hacer una representación gráfica. La distancia Euclidiana entre las muestras en esta representación es proporcional a las diferencias en los índices.

Resultados y discusión

En la Tabla 1 se muestran algunas de las características fisicoquímicas de las muestras. En base al contenido de TPH se realizó una clasificación en tres categorías: 1) muestras con un contenido de hidrocarburos leve, si el valor de TPH era inferior a 1000 mg/kg, 2) muestras con un contenido de hidrocarburos moderado, si el valor de TPH estaba comprendido entre 1000 y 10000 mg/kg y 3) muestras con un contenido de hidrocarburos elevado, si el valor de TPH era superior a 10000 mg/kg. En base a este criterio las 30 muestras con las que se trabajó se denominaron con la letra L (leve),

Tabla 1. Caracterización de las muestras de suelos contaminados

Muestras ^a	Nº	CE ^b	TPH ^c
		$\mu\text{S cm}^{-1}$	$\text{mg kg}^{-1} \text{MS}^d$
Background	1	159	4,7
L1-L13	13	234 – 662	143 – 634
M1-M4	4	431 – 578	1200 – 2811
E1-E13	13	247 – 3590	10148 – 175430

^a L1 a L13: muestras con $TPH < 1000 \text{ mg/kg MS}$; M1 a M4: muestras con $1000 \text{ mg/kg MS} < TPH < 10000 \text{ mg/kg MS}$ y E1 a E13: muestras con $TPH > 10000 \text{ mg/kg MS}$. ^b CE: conductividad eléctrica, ^c TPH: hidrocarburos totales del petróleo, ^d MS: Muestra seca

M (moderado) y E (elevado) seguida de un número, el cual indica el orden de TPH creciente. De acuerdo a esta clasificación, 13 muestras poseen una concentración de TPH inferior a 1000 mg/kg MS (Muestra Seca), 4 tienen un TPH comprendido entre 1000 y 10000 mg/kg MS y 13 poseen concentraciones de TPH superiores a 10000 mg/kg MS. El background posee un valor de TPH de 4,7 mg/kg MS. Todas las muestras de suelo presentaron valores de pH y humedad comprendidos entre 7,6 - 8,9; y 1,4% - 9,9%, respectivamente.

En la Tabla 1 también se muestran los valores de CE. Dicha determinación resulta ser una medida indirecta de la salinidad, debido a que la misma refleja la cantidad de sales solubles. Según la clasificación americana de suelos, solamente una de las muestras presenta un valor superior a 2dS/m (2000 $\mu\text{S cm}^{-1}$) y se clasifica como un suelo ligeramente salino, las restantes se clasifican como suelos normales.

Un trabajo preliminar realizado por nuestro grupo con los datos biológicos mostró que no existía relación entre toxicidad y TPH [28], por lo que en el presente trabajo se incluyeron TPH y CE en el análisis por componentes principales, además de G, R y H de las especies *Lactuca sativa* L y *Atriplex lampa*. Respecto a la inclusión en el análisis de la CE, se debió a que la presencia de sales puede afectar el desarrollo vegetal por efectos osmóticos, nutricionales y tóxicos. Como hipótesis de trabajo, se consideró que las especies regionales deberían evidenciar una menor sensibilidad a los cambios de salinidad ya que son halotolerantes, por lo que esta posibilidad debería reflejarse en los resultados a obtener en este estudio. La especie *Prosopis demudas* no fue utilizada en el análisis por PCA debido a que los datos experimentales obtenidos no permiten realizar una buena discriminación entre las muestras estudiadas.

Tabla 2. Análisis PCA: autovalores de PC1 y PC2

Variable ^a	Autovalores	
	PC1	PC2
GA	-0,845	-0,156
RA	-0,612	0,210
HA	-0,818	0,210
GL	-0,880	-0,356
RL	-0,652	-0,280
HL	-0,751	-0,278
TPH	0,663	-0,692
CE	0,703	-0,232

^a GA: porcentaje de germinación de *Atriplex lampa*, RA: elongación de raícula para *Atriplex lampa*, HA: elongación de hipocotilo para *Atriplex lampa*, GL: porcentaje de germinación de *Lactuca sativa* L, RL: elongación de radícula para *Lactuca sativa* L, HL: elongación de hipocotilo para *Lactuca sativa* L, TPH: hidrocarburos totales del petróleo.

La Tabla 2 muestra que la PC1 presenta una correlación negativa con los datos biológicos, principalmente con el porcentaje de germinación de *Lactuca sativa* L (GL) y *Atriplex lampa* (GA) y con la elongación del hipocotilo de *Atriplex lampa* (HA), y una correlación positiva con CE y TPH. Además, la PC2 muestra, principalmente, una correlación negativa con TPH. De estas observaciones surge que existe una relación inversa entre los índices biológicos, por un lado, y el TPH y CE, por el otro. Esto implica que los efectos tóxicos, sobre las especies estudiadas, aumentan en función del aumento de TPH y CE lo cual implica la existencia de un gradiente de toxicidad en este

sentido.

En relación a la PC1, los parámetros biológicos más sensibles resultaron ser GL, seguido de GA y HA. Estos resultados sugieren que *Atriplex lampa* parece tener una sensibilidad al contaminante similar a *Lactuca sativa* L, la cual ha sido recomendada por la USDEPA para ensayos de fitotoxicidad debido, precisamente, a su elevada sensibilidad a la presencia de contaminantes.

En la Figura 1 se muestran las dos primeras componentes principales calculadas (PC1 y PC2), las cuales explican el 74,4% de variabilidad total. La primer componente principal (PC1) explica el 57,9%, mientras que la segunda componente principal (PC2) explica el 16,5%.

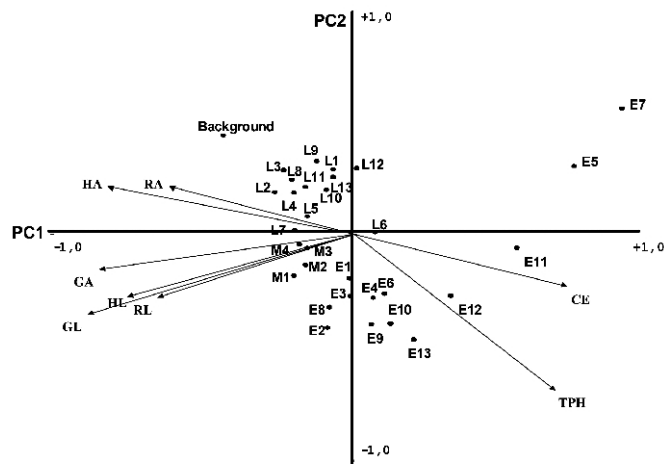


Figura 1. 1^{ra} Componente Principal (PC1) versus 2^{da} Componente Principal (PC2), GA: porcentaje de germinación de *Atriplex lampa* y GL: porcentaje de germinación de *Lactuca sativa* L; RA: elongación de radícula para *Atriplex lampa* y RL: elongación de radícula para *Lactuca sativa* L; HA: elongación de hipocotilo para *Atriplex lampa* y HL: elongación de hipocotilo para *Lactuca sativa* L.

En la Figura 1, la distancia Euclidiana entre el background y cada muestra representa una medida cuantitativa de la toxicidad. De esta forma, las muestras de la derecha en la figura corresponderían a muestras con una toxicidad alta a media, las ubicadas en el centro tendrían una toxicidad media a baja, mientras que las ubicadas hacia la izquierda, tendrían una toxicidad baja a nula. La muestra rotulada “background” es la que se encuentra más a la izquierda, lo cual indica que posee los mejores índices biológicos y esto concuerda con el hecho que esta muestra es “no contaminada”. Por otro lado, las muestras E5 y E7, se encuentra en la posición opuesta más extrema (mayor distancia Euclidiana), por lo tanto, son las más afectadas por la toxicidad. Cabe mencionar que, según la Tabla 1, estas muestras no son las que presentan mayor concentración de TPH, ni son tampoco las de mayor CE. Sin embargo, estas dos muestras contienen componentes aromáticos residuales (en base a estudios de resonancia magnética nuclear protónica que no se muestran en esta publicación) que aún permanecen en el suelo tras de una remediación mediante la técnica de biopilas. Esta técnica, que se utiliza para reducir el TPH [29], se define como un proceso biológico controlado donde los contaminantes orgánicos (en este caso hidrocarburos) son biodegradados y mineralizados, por medio de microorganismos. Algunos trabajos previos han tratado de mostrar qué relación existe entre la aplicación de una tecnología de remediación y la toxicidad.

Por ejemplo, Plaza y cols. [30] estudiaron biopilas sometidas a diferentes condiciones, determinándose el efecto tóxico sobre diversos organismos de prueba, entre ellos seis especies vegetales: *Lactuca sativa* L (lechuga), *Lepidium sativum* L (berro de agua), *Zea mays* L (maíz), *Triticum vulgare* L (trigo), *Secale cereale* L (centeno) y *Brassica oleracea* L (col). Encontraron que si bien el tratamiento reducía la toxicidad en relación a la inicial, las biopilas, luego del tratamiento, poseían aún sustancias fitotóxicas. En otro trabajo se demostró que, a pesar de una reducción en el contenido en suelo de TPH después de una biorremediación, el test de germinación muestra un incremento en la toxicidad, lo cual es atribuido por los autores a la formación de metabolitos (productos de degradación) que resultan ser tóxicos. Estos resultados obtenidos por diferentes investigadores están de acuerdo con las observaciones realizadas en este estudio.

En el centro de la Figura 1 se encuentran la gran mayoría de las muestras y puede observarse que éstas no se distribuyen estrictamente en función del contenido de TPH, según surge de ordenar las muestras de acuerdo a la toxicidad creciente, o sea la distancia Euclidiana al background.

Como se dijo anteriormente, algunos autores mostraron que existe una relación entre la concentración de HAP y el porcentaje de germinación [14]. Los HAP forman parte de la mezcla compleja llamada TPH y la toxicidad no solo es función de la concentración total en suelos, sino de su biodisponibilidad, la cual depende de características tales como, del tipo de hidrocarburos, del suelo, y de las posibles interacciones ("weathering") que aquellos pueden sufrir en el ambiente [8]. Es por ello que la principal ventaja de los bioensayos es la de favorecer el contacto directo, a través de la interacción suelo - organismos de prueba, de manera que la movilidad, la biodisponibilidad de los contaminantes y las características del suelo se incluyen en el resultado, logrando evaluar de esta manera la toxicidad de todos los constituyentes en una mezcla compleja considerando el total de efectos aditivos, sinérgicos y antagónicos [11].

Tabla 3. Comparación del PCA por especie

Variable	<i>Atriplex lampa</i>		<i>Lactuca sativa</i> L	
	PC1	PC2	PC1	PC2
Germinación	0,670	-0,303	-0,876	-0,353
Longitud de raíz	0,713	-0,573	-0,684	-0,207
Longitud del hipocótilo	0,867	-0,441	-0,833	-0,131
TPH	-0,877	-0,478	0,650	-0,755
Conductividad	-0,724	-0,012	0,677	-0,240
Varianza explicada	69 %	21 %	60 %	21 %
Varianza Total explicada	90 %		81 %	

En la Tabla 3 se presenta una comparación del PCA de los datos de TPH, CE y toxicidad para cada una de las especies por separado. En este caso, se realizaron dos PCA uno con los datos biológicos de *Atriplex lampa* y el otro con los datos de *Lactuca sativa* L.

Del análisis de la Tabla 3, puede observarse que ambas PC1 discriminan a las variables TPH y CE en sentido contrario al de las variables biológicas. Para *Atriplex lampa* la variable de mayor peso es la longitud del hipocótilo (0,877), seguida de longitud de la raíz (0,713) y germinación (0,670); mientras que para *Lactuca sativa* L., la longitud del hipocótilo (0,833) tiene un peso similar a la

germinación (0,876), seguida de la longitud de la raíz (0,684). Si se consideran las tres variables biológicas propuestas, el PCA de *Atriplex lampa* explica el 90% de la variabilidad total de los datos contra el 81% que explica *Lactuca sativa* L. Esto sugiere que la especie *Atriplex lampa* resultaría ser una especie con potencialidad ecotoxicológica comparable a la especie de referencia *Lactuca sativa* L., según que parámetro se utilice para evaluar la toxicidad.

Por otro lado, si bien la CE contribuye a la PC1 con un peso comparable tanto para *Lactuca sativa* L. (18%) como para *Atriplex lampa* (19%), el peso en la PC2 de la variable CE es sensiblemente inferior para *Atriplex lampa* (1%) que para *Lactuca sativa* L. (14%), lo cual podría relacionarse con las características halotolerantes de la primera especie.

Conclusión

Los resultados obtenidos muestran que no parece existir una relación simple y directa entre TPH y los índices biológicos utilizados. El valor de TPH no indica necesariamente que la muestra es tóxica y la toxicidad de una muestra no siempre indica un elevado contenido de TPH. De allí la necesidad de incorporar bioensayos en las evaluaciones de riesgo, en su carácter de pruebas diagnósticas, como herramienta complementaria del análisis químico. Por otro lado, es necesario considerar, además de TPH, el contenido de sales del suelo ya que dicho factor afecta los ensayos biológicos. Esto permitiría reforzar los criterios de selección, seguimiento y determinación del punto de final de una remediación, basado fundamentalmente en criterios ecotóxicos y no simplemente químicos. En este sentido, la especie *Atriplex lampa* parece ser adecuada como una especie fitoindicadora de la toxicidad del petróleo en suelo, ya que los resultados obtenidos indican una buena correlación entre *Atriplex lampa* y *Lactuca sativa* L., siendo esta última una especie reconocida por su sensibilidad al estrés tóxico producido por los contaminantes ambientales.

Agradecimientos

Los autores agradecen a M. Más (UNPSJB) por la asistencia en el cálculo e interpretación de datos estadístico, a V. Pentreath (UNPSJB) y C. Gurín (alumna de UNPSJB) por la colaboración técnica y 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 (CONICET), por su apoyo económico.

Bibliografía

- Martínez MVE, López FS (2001) Efecto de hidrocarburos en las propiedades físicas y químicas de suelo arcilloso. *TERRA* 19:9-17.
- Meudec A, Dussauze J, Deslandes E, Poupart N (2006) Evidence for bioaccumulation of PAHs within internal shoot tissues by a halophytic plant artificially exposed to petroleum polluted sediments. *Chemosphere* 65:474-481.
- Maila MP, Randima P, Dronen K, Cloete TE (2006) Soil microbial communities: Influence of geographic location and hydrocarbon pollutants. *Soil Biol Biochem* 38:303-310.

4. Speight JG (1991) The Chemistry and Technology of Petroleum, 2nd Edition Marcel Dekker Inc, New York, pp. 760.
5. Bojes HK, Pope PG (2007) Characterization of EPA's 16 priority pollutant polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in tank bottom solids and associated contaminated soils at oil exploration and production sites in Texas. Regul Toxicol Pharmacol 47:288-295.
6. Salinas-Martínez A, de los Santos-Córdova M, Soto-Cruz O, Delgado E, Pérez-Andrade H, Háuad-Marroquín LA, Medrano-Roldán H (2008) Development of a bioremediation process by biostimulation of native microbial consortium through the heap leaching technique. J Environ Manage 88:115-119.
7. Fernández MD, Cagigal E, Vega MM, Urzelai A, Babin M, Pro J, Tarazona JV (2005) Ecological risk assessment of contaminated soil through direct toxicity assessment. Ecotoxicol Environ Saf 62:174-184.
8. Leitgib L, Kálmán J, Gruiz K (2007) Comparison of bioassays by testing whole soil and their water extract from contaminated sites. Chemosphere 66:428-434.
9. Ronco A, Díaz Báez MC, Pica Granados Y (2004) Conceptos Generales. En: Castillo Morales G, Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de agua. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo, México: IMTA. 17-23.
10. Valerio ME, García JF, Peinado FM (2007) Determination of phytotoxicity of soluble elements in soils, based on a bioassay with lettuce (*Lactuca sativa* L.). Sci Total Environ 378:63-66.
11. Maila MP, Cloete TE (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.
12. Kummerová M, Kmentová E (2004) Photoinduced toxicity of fluoranthene on germination and early development of plant seedling. Chemosphere 56:387-393.
13. Eom IC, Rast C, Veber AM, Vasseur P (2007) Ecotoxicity of a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-contaminated soil. Ecotoxicol Environ Saf 67:190-205.
14. Maila MP, Cloete TE (2002) Germination of *Lepidium sativum* as a method to evaluate polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) removal from contaminated soil. Int Biodeterior Biodegrad 50:107-113.
15. Ríos SM, Nudelman N (2000) Contaminación de suelos por la explotación petrolera. Fitotoxicidad en etapa de germinación. Rev Ing Sanit y Amb (AIDIS) 49:53-58.
16. EPA (1996) SW 846 Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods.
17. Standard Operating Procedures (2000) Method 1012: Soil sampling EPA846-1012.
18. Nudelman N, Ríos SM, Katusich O (2008) Application of some physical organic chemistry models to the study of oil spills residuals in Patagonian soils. JOPC 21:329-337.
19. EPA (2004) Methods 9045D: Soil and waste pH. En SW 846 Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical methods.
20. Greenberg AE, Clesceri LS, Eaton AD (1992) Standard methods for the examination of water and wastewater. 18th edition, APHA, Washington DC.
21. Allison LE, Brown JW, Hayward HE, Richards LA, Bernstein L, Fireman M, Pearson GA, Wilcox LV, Bower CA, Hatcher JT, Reeve RC (1993) Diagnóstico y Rehabilitación de Suelos Salinos y Sódicos, Ed. Limusa, México.
22. EPA (1996) Method 3540C: Soxhlet Extraction Organics. En SW 846. Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical methods.
23. Pentreath V, González E, Stronati M (2005) Germinación de *Prosopis denudans* (Leguminosae). Boletín SAB 40:105-106.
24. Ciano N, Nakamatsu V, Luque J, Amari M, Owen M, Lisoni C (2000) Revegetación de áreas disturbadas por la actividad petrolera en la Patagonia Extranjera (Argentina). Acta de la 11^o Conferencia de la Organización Internacional de la Conservación del Suelo.
25. OECD (2003) Test 2008: Seedling Emergence and Seedling Growth Test. En OECD Guidelines for the testing of chemicals.
26. EPA (1996) Test 4200: Seed Germination/ Root Elongation Toxicity Test. En: Ecological Effects Test Guidelines.
27. Soil Survey Staff (1999) Soil Taxonomy. A Basic System of Soil Classification for Making and Interpreting Soil Surveys. USDA/NRCS, Agriculture Handbook 436, U.S. Government Printing Office, Washington, pp. 869.
28. Barquín M, Ríos SM, Nudelman N (2008) Derrames de petróleo en suelos: ¿existe relación entre toxicidad y la concentración total de hidrocarburos (TPH)? Rev Ing Sanit Amb (AIDIS) 99:125-129.
29. López de Mesa JB, Quintero G, Guevara Vizcaíno AL, Jaimes Cáceres CD, Gutiérrez Riaño SM, Miranda García J (2006) Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. NOVA 4:82-90.
30. Plaza G, Nalecz-Jawecki G, Ulfig K, Brigmon RL (2005) The application of bioassays as indicators of petroleum-contaminated soil remediation. Chemosphere 59:289-296.
31. Phillips TM, Liu D, Seech AG, Lee H, Trevors JT (2000) Monitoring bioremediation in creosote-contaminated soils using chemical analysis and toxicity tests. J Ind Microbiol Biotechnol 24:132-139.