

USO DE *Panicum maximum* Y *Brachiaria brizantha* PARA FITORREMEDIAN SUELOS CONTAMINADOS CON UN CRUDO DE PETRÓLEO LIVIANO

Ismael Hernández-Valencia¹ y Denise Mager¹

RESUMEN

Se evaluó la capacidad de las gramíneas *Panicum maximum* y *Brachiaria brizantha* para fitorremediar un suelo contaminado levemente (3%) con un hidrocarburo de petróleo (HCP) liviano en ensayos de invernadero, tomando en cuenta los efectos de la contaminación sobre la germinación de las semillas y la sobrevivencia y producción de materia seca por las plántulas, así como el tiempo y magnitud de la reducción de la carga del contaminante. Luego de 45 días no se encontraron diferencias significativas en la germinación de semillas en suelos contaminados y no contaminados. Sin embargo, la sobrevivencia de plántulas de *P. maximum* fue significativamente menor en los suelos contaminados (64%) respecto al control (93%), mientras que para *B. brizantha* no se obtuvieron diferencias (82 vs. 100%). La presencia de HCP causó también una fuerte reducción en la producción total de materia seca (aérea y subterránea), siendo en el caso de *B. brizantha* un 11,4% de la producción obtenida sin contaminación, mientras que para *P. maximum* apenas el 1,2%. Pese a la fuerte reducción de la producción en los primeros 45 días del ensayo, los suelos con las gramíneas presentaron una disminución del contenido de aceites y grasas a los 240 días respecto a los suelos contaminados, sin vegetación, hecho que demuestra el potencial que tienen las especies utilizadas para descontaminar suelos con concentraciones de crudo liviano inferiores o iguales al 3%.

Palabras clave adicionales: Biorremediación, germinación, hidrocarburos de petróleo

ABSTRACT

Use of *Panicum maximum* and *Brachiaria brizantha* to phytoremediate polluted soils with light crude oil

The ability of *Panicum maximum* and *Brachiaria brizantha* to phytoremediate a slightly polluted soil with light crude oil (3 %) was tested in greenhouse assays taking into account: a) effects of pollution on seed germination, b) survival and dry matter production of seedlings, and c) time and magnitude in the pollution load reduction. After 45 days, there were not differences in seed germination between polluted and unpolluted soils. However, seedling survival of *P. maximum* was lower in polluted (64%) than unpolluted soils (93%), while for *B. brizantha* were similar (82 vs. 100%). The presence of petroleum hydrocarbons caused a strong reduction on total dry matter production (roots and shoots), being for *B. brizantha* and *P. maximum* only 11.4 and 1.2 % of the total production obtained in unpolluted soils. In spite of the strong impact of pollution on dry matter production of seedlings at day 45, soils with the plants reached at day 240 a significant reduction of oil content respect to the control. Results showed that both species have potential to decontaminate soils with oil light crude concentrations equal or lower than 3 %.

Additional key words: Bioremediation, germination, petroleum hydrocarbons

INTRODUCCIÓN

La fitorremediación consiste en el uso de plantas, sus microorganismos o enzimas asociadas, así como de la aplicación de técnicas agronómicas para degradar, retener o reducir a niveles inofensivos los contaminantes ambientales a través de procesos que logran recuperar la matriz o estabilizar al contaminante (Cunningham et al., 1996; Frick et al., 1999). Dentro de las técnicas de restauración de suelos

afectados por la contaminación, la fitorremediación ha adquirido auge por ser un procedimiento pasivo, estéticamente agradable, útil para remediar simultáneamente una gran variedad de contaminantes (USEPA, 1996; Frick et al., 1999) y que procura una mejora de la calidad del suelo, ya que aumenta el contenido de carbono orgánico, mejora su estructura, incrementa la porosidad, la infiltración del agua (Cunningham et al., 1996) y reduce la erosión (Pivetz, 2001).

Recibido: Marzo 27, 2003

Aceptado: Septiembre 29, 2003

¹ Instituto de Zoología Tropical, IZT. Universidad Central de Venezuela (UCV). Apdo. 47058. Caracas 1041-A.
email: ihernand@strix.ciens.ucv.ve

Para el desarrollo de un sistema efectivo de remediación de suelos se deben cumplir con ciertos requisitos como ser técnicamente factible, económicamente viable y socialmente responsable (Cunningham et al., 1996). Como primer paso, deben evaluarse las especies con potencial fitorremediador con base en las concentraciones del contaminante que son capaces de tolerar y posteriormente su capacidad para promover una descontaminación efectiva del suelo. No todas las plantas exhiben la misma tolerancia a contaminantes específicos, por lo que se seleccionan aquellas que puedan tolerar altas concentraciones. Una vez escogidas las especies tolerantes se prueba su capacidad para descontaminar el suelo, que se basa en la eficiencia del proceso, tanto en términos de la reducción de la carga a niveles deseables así como el tiempo requerido para dicho propósito.

Entre las sustancias objetivos para el desarrollo de tecnologías de remediación *in situ* se encuentran los hidrocarburos del petróleo (HCP), ya que son productos de amplio uso y por lo tanto presentan una alta probabilidad de ser dispuestos en los suelos y causar daños severos en los ecosistemas. En Venezuela, la investigación sobre fitorremediación de suelos contaminados con HCP es escasa, pero de interés, ya que por la condición de país petrolero requiere implementar técnicas que permitan recuperar suelos contaminados por el petróleo y sus derivados.

Como una contribución al estudio del potencial fitorremediador de las plantas adaptadas al trópico, en el presente trabajo se evaluó la capacidad de remediar suelos contaminados con un crudo petróleo liviano con dos gramíneas tropicales: *Panicum maximum* cv. Tanzania y *Brachiaria brizantha*. La selección de estas especies se basó en a) su rápida germinación y crecimiento, b) baja relación vástago/raíz y un sistema radical fasciculado que favorece la creación de una rizósfera extendida con potencial para catalizar la descontaminación del suelo, c) sus requerimientos agronómicos son ampliamente conocidos y d) los propágulos se expenden comercialmente, lo cual facilita la aplicación de esta práctica a gran escala.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizaron dos ensayos en invernadero utilizando semillas certificadas de las dos especies de gramíneas. El primero para determinar el efecto de la adición de HCP en el suelo, sobre la germinación de semillas y la sobrevivencia y producción de materia orgánica de plántulas de las especies seleccionadas en virtud que estas fases del desarrollo de las plántulas son unas de las más críticas en el establecimiento de un pastizal, especialmente si éste se desea implementar a gran escala. El segundo experimento consistió en determinar el efecto de la presencia de estas especies sobre la reducción de la carga de HCP en el suelo.

Los suelos para los ensayos provinieron del horizonte superficial (horizonte A) de un Typic haplustox, de textura franco arenosa, fuertemente ácido y pobre en nutrimentos, de la localidad del Sombrero, estado Guárico, Venezuela (Cuadro 1) mientras que el HCP utilizado fue un crudo liviano de 27,2° API (50,7 % saturados; 36,3 % aromáticos; 12 % resinas y 1,0 % afactenos) extraído del Campo Budare del referido estado. Las condiciones microclimáticas promedio en el invernadero fueron temperatura de 23,2 °C, luminosidad de 450 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y humedad relativa de 85%.

Efecto de la contaminación con HCP sobre la germinación y producción de biomasa

Para el logro de este objetivo se realizaron pruebas de germinación con las dos especies escogidas. Las semillas fueron sembradas a 1 cm de profundidad en envases de 10,5 cm de alto por 10,5 cm de diámetro con capacidad 600 g de suelo y con una concentración del crudo del 3% (p/p), la cual se logró a través de la mezcla homogénea del HCP con el suelo. Como control se sembró igual número de semillas en suelos en donde no se adicionó el HCP. Para cada especie y tratamiento (con HCP y control) se establecieron 15 repeticiones. De esta forma, el experimento se desarrolló bajo un diseño factorial completamente aleatorizado, de efectos fijos y con repetición, donde los factores fueron las especies de gramínea y la presencia o ausencia de contaminación con HCP. Todos los tratamientos recibieron encalado para corregir el pH (aprox. 6,5

unidades) y fertilización al inicio del ensayo de 230 mg kg⁻¹ de fosfato di-amonio y 2.400 mg kg⁻¹ de urea, dosis que permitieron obtener una relación C:N:P de 100:2:0,2, recomendada para el proceso de degradación (Hutchinson et al., 2001a). El contenido de humedad se mantuvo al 60% de la capacidad de campo mediante el suministro de agua cada 3 días.

Cuadro 1. Características físicas y químicas del suelo utilizado para los ensayos

pH - H ₂ O (1:5)	4,9
Cap. intercambio catiónico (cmol/kg)	1,53
Porcentaje de saturación de bases	67,9
Fósforo disponible-Olsen (mg/kg)	1,5
Nitrógeno total (mg/kg)	590
Contenido de materia orgánica (%)	1,65
Capacidad de campo (%)	32
Textura	Franco arenoso
Acidez intercambiable (cmol/kg)	0,59
Calcio intercambiable (cmol/kg)	0,19
Magnesio intercambiable (cmol/kg)	0,16
Potasio intercambiable (cmol/kg)	0,10
Σ Bases intercambiable (cmol/kg)	1,04
Aceites y grasas (%)	n.d.

n.d.: no detectable

Diariamente y por un período de 45 días se determinó la emergencia de las plántulas y al finalizar el ensayo se contaron aquellas que sobrevivieron. Luego se cosecharon en forma íntegra (vástago y raíces) y se midió la longitud radical máxima. Posteriormente las plántulas se secaron en una estufa por dos días a 70 °C para la estimación del peso total y de cada fracción.

Capacidad de fitorremediación de las especies seleccionadas

Esta experiencia se realizó bajo el esquema de ensayos en microcosmos, para lo cual se colocaron 20 kg de suelo contaminado con HCP (3%) en contenedores de 44 cm de largo, 32 cm de ancho y 28 cm de alto. El espesor final del suelo en los contenedores fue de 17 cm. Los ensayos se realizaron por triplicado para cada especie a una densidad de siembra de 26 semillas por envase, de acuerdo a las recomendaciones de la casa comercializadora.

El suelo recibió fertilización con la dosis antes descritas, pero fraccionada en porciones equivalentes al inicio, 15, 30 y 45 días. De igual forma, el nivel de humedad se mantuvo en un 60%

a través de riegos periódicos cada 3 días.

Como control se establecieron tres envases similares, en el cual no se sembraron plantas, pero con HCP, nutrientes y agua de la misma manera que el tratamiento con las gramíneas. De esta forma, el diseño experimental fue de un factor aleatorizado y con repetición.

Se tomaron por triplicado muestras de suelo superficial (0-15 cm) de cada envase en los días 0, 30, 60, 120 y 240. Las muestras fueron refrigeradas hasta su análisis en el laboratorio. Como indicador de los cambios en el contenido de HCP en el suelo se determinó el contenido de aceites y grasas según el método gravimétrico de la EPA 3540, utilizando como extractante diclorometano, el cual ha mostrado ser el extractor más eficiente de aceites y grasas en el suelo (Deuel y Holliday, 1997). Para esto se realizó la extracción de los aceites y grasas del suelo en un extractor Soxhlet para luego lograr la recuperación de la mezcla diclorometano-aceites y grasas en un balón de destilación. Posteriormente el extractante era evaporado de la mezcla en un rotaevaporador y la masa de aceites y grasas se determinaba por la diferencia con el de peso del balón de destilación.

Análisis estadístico

Para las pruebas de germinación y sobrevivencia las diferencias entre tratamientos para una misma especie fueron evaluadas con la prueba de Ji cuadrado mientras que los efectos sobre la germinación y producción de biomasa fueron evaluados con la prueba no paramétrica de Wilcoxon-Mann-Whitney (Siegel y Castellan, 1995). Se utilizó análisis de varianza para establecer diferencias entre tratamientos en la reducción de la carga de contaminante.

RESULTADOS

Germinación de semillas y sobrevivencia de las plántulas

No se observaron diferencias significativas entre la cantidad de semillas que germinaron y el tiempo promedio de emergencia de las plántulas en los suelos con adición de HCP, respecto al control (Cuadro 2). Ello sugiere que la contaminación con HCP a una concentración del 3% no afectó la capacidad germinativa de las semillas. En contraste, la sobrevivencia de las

plántulas fue mayor en los suelos no contaminados, siendo de un 100 % para *B. brizantha*, mientras que en el caso de *P. maximum* fue de un 93 %. En condiciones de

suelo contaminado, *B. brizantha* tendió a ser más tolerante, lo cual se refleja en una sobrevivencia del 82 % respecto al 64 % que presentó *P. maximum* (Cuadro 2).

Cuadro 2. Germinación de semillas, tiempo promedio de germinación y sobrevivencia de plántulas en suelos contaminados (C) y no contaminados (NC)

Parámetro evaluado	<i>Brachiaria brizantha</i>		<i>Panicum maximum</i>	
	C	NC	C	NC
Número de semillas germinadas	11 a	7 a	11 a	14 a
Tiempo promedio de germinación (días)	10,1 a	12,1 a	7,3 a	6,8 a
Porcentaje de plántulas sobrevivientes	82 a	100 a	64 b	93 a

Medias comparadas dentro de una misma especie seguidas de la misma letra no son significativamente diferentes

Número de semillas germinadas y sobrevivencia de plántulas: X^2 test ($P \leq 0,05$)

Tiempo promedio de germinación: Wilcoxon-Mann-Whitney ($P \leq 0,05$)

Producción de biomasa total, biomasa del vástago y biomasa radical

La adición de HCP produjo un fuerte impacto sobre la producción de materia orgánica de las plántulas, que se verifica cuando se analizan los datos de biomasa total, de vástago y de raíces (Cuadro 3). En *B. brizantha*, la producción total de biomasa apenas fue el 11,4% de la biomasa obtenida respecto al control, mientras que en *P. maximum* tan sólo el 1,2%. Por su parte, la biomasa del vástago alcanzó aproximadamente un 7,7% para *B. brizantha* y 1,1% para *P. maximum* de la biomasa obtenida con suelo sin contaminación.

La biomasa radical también se redujo en presencia de HCP. Al hacer el cálculo con respecto al control, *B. brizantha* alcanzó un 18,6%

de la biomasa radical, mientras que *P. maximum* apenas un 1,4%. La contaminación con HCP también incidió fuertemente sobre la longitud radical máxima, el cual puede tomarse como un indicador de la profundidad máxima efectiva del efecto rizosférico asociado a la fitorremediación. Respecto al control, *B. brizantha* alcanzó una longitud radical máxima que correspondió al 24,3 % y *P. maximum* al 12,3 %.

Para evaluar en cual órgano de la planta hubo un mayor efecto de la adición de HCP en el suelo, se estimó la relación vástago/raíz (Cuadro 3). Esta mostró una reducción más marcada para *B. brizantha*. El resultado también indica que en presencia de HCP opera una reducción más pronunciada sobre la producción de biomasa aérea que en la radical.

Cuadro 3. Producción de biomasa y máxima longitud radical de plántulas en suelos contaminados (C) y no contaminados (NC)

Parámetro evaluado por planta	<i>Brachiaria brizantha</i>		<i>Panicum maximum</i>	
	C	NC	C	NC
Biomasa total (mg)	13,9 a	122,4 b	3,0 a	250,1 b
Biomasa del vástago (mg)	6,3 a	81,6 b	1,8 a	164,6 b
Biomasa radical (mg)	7,6 a	40,8 b	1,2 a	85,5 b
Relación vástago/raíz	0,8 a	2,0 b	1,5 a	1,9 b
Máxima longitud radical (cm)	3,8 a	15,6 b	3,9 a	31,7 b

Medias dentro de la misma fila seguidas por letras iguales indican que no hay diferencias significativas. Wilcoxon-Mann-Whitney ($P \leq 0,05$)

Potencial para fitorremediar hidrocarburos de petróleo

La Figura 1 presenta los resultados de las variaciones en la concentración de aceites y grasas durante con las dos especies seleccionadas. Se observa que la cinética del contenido de

aceites y grasas presentó una rápida disminución en las fases iniciales y posteriormente disminuyó. La concentración de aceites y grasas fue inferior en los tratamientos con las gramíneas excepto al comienzo del ensayo, lo que muestra la capacidad de estas especies para

fitorremediar suelos contaminados con HCP. Al término del ensayo (240 días), *P. maximum* redujo el contenido inicial de aceites y grasas en un 63%, *B. brizantha* en un 55 %, mientras que el control presentó una reducción del 40 %. Cuando se compara en valores absolutos la concentración final de aceites y grasas fue de

1,0, 1,2 y 1,6 % para *P. maximum*, *B. brizantha* y el control respectivamente, siendo estadísticamente diferentes todos los tratamientos ($P \leq 0,05$). Sólo para el caso de *P. maximum* se alcanzó el límite del 1 % previsto en la normativa ambiental venezolana (República de Venezuela, 1998).

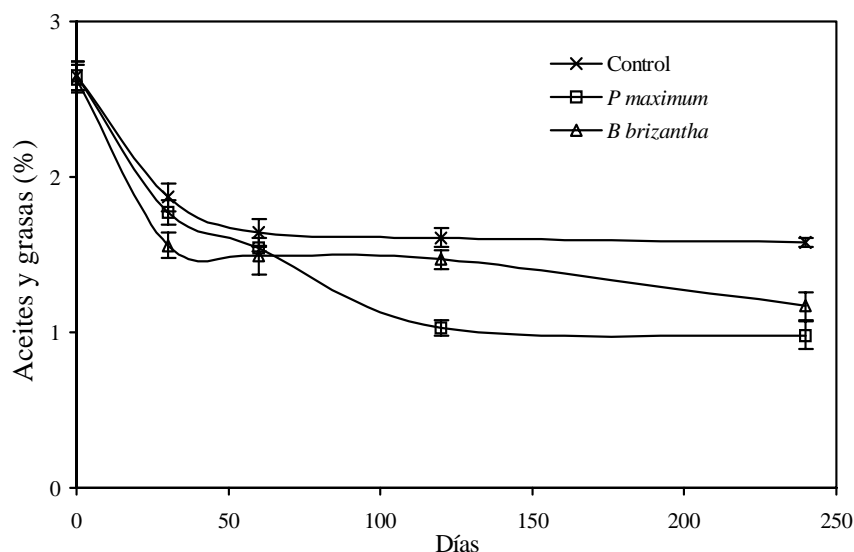


Figura 1. Cambios en el contenido de aceites y grasas en suelos contaminados con y sin gramíneas

DISCUSIÓN

Es conocido que la contaminación por HCP afecta el desarrollo de las plantas debido a diferentes efectos físicos y químicos. Por una parte, las películas de aceite pueden cubrir las raíces alterando la absorción de agua y nutrientes. Adicionalmente, si el HCP logra penetrar el tejido de las plantas puede dañar la membrana de las células causando pérdida del contenido celular, bloqueo de los espacios intercelulares y reducción del transporte de metabolitos, así como de las tasas de respiración y fotosíntesis (Xu y Johnson, 1995; Pezeshki et al., 2000).

En el presente trabajo no se observó que la contaminación del suelo al 3% con HCP liviano, afectara la germinación de *P. maximum* y *B. brizantha*, lo cual sugiere que a esta concentración no ocurre un efecto tóxico importante sobre el desarrollo del embrión. Sin embargo, la contaminación afectó el desarrollo de las plántulas, tal como se observó para la sobrevivencia y producción de biomasa. La

reducción en la producción de biomasa del vástago pudo haber incidido en la cantidad de asimilados que fueron transportados a las raíces para su crecimiento, hecho que destaca en los datos, en donde se observa que la contaminación redujo fuertemente la biomasa y longitud radical máxima de las gramíneas evaluadas y en consecuencia el volumen de suelo y profundidad donde efectivamente ocurre la fitorremediación. Es por esto que aún cuando las plantas pueden fitorremediar suelos con altas concentraciones del contaminante, la baja producción de biomasa puede limitar el proceso de degradación (USEPA, 2001). Por el contrario, aquellas especies que produzcan una biomasa relativamente alta, pueden mejorar su efectividad, no sólo por el mayor volumen de suelo que es explorado por las raíces, sino también por la mayor producción de exudados que favorece la actividad microbológica en la rizósfera (Cuninham et al., 1996). No obstante, se debe tener en cuenta que los resultados sobre la sobrevivencia y producción de biomasa en este ensayo corresponden a una

fase inicial de 45 días y permiten determinar el efecto de los HCP sobre el establecimiento de las plántulas, la cual es una fase crítica en el desarrollo de cualquier planta, especialmente si se desea desarrollar cualquier cultivo o práctica de fitorremediación a gran escala.

Pese al marcado efecto adverso del HCP en las fases iniciales del desarrollo de las gramíneas evaluadas se confirmó, luego de 240 días, el efecto positivo de su establecimiento en la recuperación de suelos levemente contaminados con crudos livianos. Ello puede estar relacionado con diversos mecanismos como la absorción y metabolización de HCP por la planta, especialmente aquellos solubles en la fase acuosa (Cunningham et al., 1996; Banks et al., 1999) y la estimulación de la actividad microbiológica en la rizósfera o efecto rizosférico (Frick et al., 1999; Hutchinson et al., 2001b). Otros mecanismos que operan, tanto en los tratamientos con o sin plantas, son la volatilización de HCP con bajo punto de ebullición (Deuel y Holliday, 1997) y la estimulación de la actividad microbiana por la adición del fertilizante, lo cual facilita el uso del carbono de los HCP por los microorganismos como sustrato para su crecimiento (Hutchinson et al., 2001a). Por otra parte, la adición de fertilizantes reduce la competencia no sólo entre las plantas sino entre los microorganismos por la limitación de nutrientes que ocurre en los suelos contaminados (Frick et al., 1999). En fases más tardías, pese a la disponibilidad de agua y presencia de plantas, la reducción en la tasa de degradación de los HCP está ligado con la naturaleza recalcitrante del material remanente, los cuales son de más lenta degradación por parte de los microorganismos debido a su composición química (Deuel y Holliday, 1997) o bien a un agotamiento de los nutrientes en el suelo.

Durante los primeros 60 días, la reducción en el contenido de aceites y grasas fue mayor con *B. brizantha*, hecho que se correlaciona con la mayor sobrevivencia y producción biomasa en esta especie en la fase inicial, tal como se observó en el primer experimento. A partir del día 60 el suelo con *P. maximum* mostró una reducción mayor respecto a *B. brizantha* y el control, lo cual pudiera asociarse con una mejora de la producción vegetal por esta especie una vez que la carga de contaminación ha disminuido en el suelo. Ello

también sugiere que *P. maximum* es más sensible en las etapas iniciales del desarrollo respecto a *B. brizantha*.

Los resultados y conclusiones que se generan de este estudio tienen un marco limitado de aplicación, ya que las especies fueron probadas en condiciones constantes con un HCP (27,2° API) y ambientes particulares (suelos franco arenosos, humedad constante al 60% de la capacidad de campo y alto contenido de nutrimentos en el suelo), por lo que su extrapolación debe ser cuidadosa. En este sentido, sería de gran utilidad ampliar los estudios con otros tipos y concentraciones de HCP y en otras condiciones de suelo, régimen hídrico y estatus nutricional.

CONCLUSIONES

La contaminación de suelos con HCP liviano a una concentración del 3 % produjo un fuerte impacto en la producción de biomasa radical y foliar de las plántulas de *P. maximum* y *B. brizantha*. Sin embargo, a los 240 días, estas gramíneas lograron una reducción de la contaminación respecto a los suelos carentes de vegetación. Esto demuestra la capacidad de *P. maximum* y *B. brizantha* para fitorremediar suelos contaminados con HCP livianos (menor o igual al 3%) donde estas especies pueden procurar una recuperación efectiva, pasiva y estéticamente agradable del terreno.

AGRADECIMIENTO

A Carmen Infante de Intevp, Nancy Hernández, Argenis Delfín, Elizabeth Gordon, Jesús Ramos, Nora Malaver, Marcia Toro, Juan Carlos López y Carmen Hernández del IZT-UCV por su colaboración en los análisis de laboratorio y sus valiosos comentarios.

LITERATURA CITADA

1. Banks, M. K., E. Lee y A. P. Schwab. 1999. Evaluation of dissipation mechanisms for benzo[a]pyrene in the rhizosphere of tall fescue. *J. Environ. Qual.* 28: 294-298.
2. Cunningham, S. D., T. A. Anderson, A. P. Schwab y F. C. Hsu. 1996. Phytoremediation

- of soils contaminated with organic pollutants. *Adv. Agron.* 56: 55-114.
3. Deuel, L. Jr. y G. H. Holliday. 1997. *Soil Remediation for the Petroleum Extraction Industry*. Penn Well. Tulsa, Oklahoma.
 4. Frick, C. M., R. E. Farrell y J. J. Germida. 1999. Assessment of phytoremediation as an *in situ* technique for cleaning oil-contaminated sites. *Petroleum Technology Alliance of Canada*. Vancouver, British Columbia.
 5. Hutchinson, S. L., M. K. Banks y A. P. Schwab. 2001a. Phytoremediation of aged petroleum sludge: Effect of inorganic fertilizer. *J. Environ. Qual.* 30: 395-403.
 6. Hutchinson, S. L., M. K. Banks y A. P. Schwab. 2001b. Phytoremediation of aged petroleum sludge: Effect of irrigation techniques and scheduling. *J. Env. Qual.* 30: 1516-1522.
 7. Pezeshki, S. R, M. W. Hester, Q. Lin y J. A. Nyman. 2000. The effects of oil spill and clean up on dominant US Gulf coast marsh macrophytes: A review. *Environ. Pollut.* 108: 129-139.
 8. Pivetz, B. E. 2001. Phytoremediation of contaminated soil and ground water at hazardous waste sites. Office of Solid Waste and Emergency Response. United States Environmental Pollution Agency, USEPA Washington, D. C.
 9. República de Venezuela. 1998. Normas para el control de la recuperación de materiales peligrosos y el manejo de desechos peligrosos. *Gaceta N° 5245*. Caracas.
 10. Siegel, S. y N. J. Castellan. 1995. *Estadística no Paramétrica Aplicada a las Ciencias de la Conducta*. Editorial Trillas. México.
 11. USEPA. 1996. *Guía del Ciudadano: Medidas Fitocorrectivas*. Office of Solid Waste and Emergency Response. United States Environmental Pollution Agency. Washington, D.C.
 12. USEPA. 2001. *Brownfields Technology Primer: Selecting and using phytoremediation for site cleanup*. Office of Solid Waste and Emergency Response. United States Environmental Pollution Agency. Washington, D.C.
 13. 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: 3-1.