

# Efecto de la contaminación con petróleo sobre los caracteres de la nodulación en el cultivo de frijol (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) en dos suelos del estado Monagas

Effect of the contamination with fuel oil on nodulation characters in the culture of frijol (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) in two soils of the state of Monagas, Venezuela

Jesús Rafael Méndez Natera<sup>1</sup>; Carmen Felicita Mujica Blanco<sup>1\*</sup> y Fernando B. Pino Morales<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Agronomía. Escuela de Ingeniería Agronómica y <sup>2</sup>Escuela de Petróleo. Núcleo de Monagas. Universidad de Oriente. Maturín. Venezuela. jmendezn@cantv.net y carmenmujica2002@yahoo.com

\* Autor para correspondencia

## RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la contaminación con petróleo en dos suelos del estado Monagas sobre los caracteres de la nodulación en el cultivo de frijol (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). Se utilizaron los suelos de El Tejero (Tipyc-kandiustults) y Caripito (Tipyc-haplustepts). Se utilizó un diseño de parcelas divididas con cuatro repeticiones. Las parcelas principales fueron los niveles de contaminación con petróleo (0, 3, 6 y 9%) y las subparcelas, los dos suelos. No se realizó la inoculación artificial con rizobia. La cosecha se realizó a los 32 días después de la siembra. Se realizó el análisis de varianza y las diferencias se detectaron mediante la prueba de Duncan. El nivel de significación fue 5 %. Hubo mayor peso de nódulos en el control (0 %) seguido por 3% de contaminación y este superó a los pesos obtenidos en 6 y 9%, siendo estos últimos similares entre si. Se produjeron más nódulos en el suelo Caripito que en El Tejero a 0 y 3%, siendo similar en ambos suelos a 6 y 9%. En el suelo El Tejero hubo mayor cantidad de nódulos en el control y menor en 3, 6 y 9%. En el suelo Caripito hubo mayor producción de nódulos en el control, seguido por 3% y este superó a los tratamiento de 6 y 9%, siendo estos últimos similares entre si. Se inhibió la producción de nódulos a partir de una contaminación con petróleo de 6% indicando que esta impide la fijación de nitrógeno atmosférico, por lo tanto la asociación rizobia:leguminosa es inefectiva en suelos altamente contaminados con petróleo.

**Palabras claves:** Contaminación petrolera, fijación de nitrógeno, frijol, *Vigna unguiculata*

## ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the effect of contamination with oil of two soils of the Monagas state on the nodulation characters in the bean crop (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). The soils, viz, El Tejero (Tipyc-kandiustults) and Caripito (Tipyc-haplustepts) were used. A split-plot design was used with four replications. The four levels of oil contamination (0, 3, 6 and 9 %) were the main plots and the two soils were the subplots. The commercial inoculation with rizobia were not carried out. Harvest was made at 32 days after sowing. An analysis of variance was performed and the differences between treatments were detected by the Duncan's multiple range test. A 5 % level was considered significant. The biggest nodule weight was obtained in the control (0 % of oil contamination) followed by 3 % oil contamination and these two treatment overcame the nodule weight obtained at 6 and 9 % oil contamination being the two latter similar among them. At 0 and 3 % oil contamination, more nodules were produced in the Caripito soil than El Tejero one, having similar number of nodules both soils at 6 and 9 % oil contamination. At the El Tejero soil, there was more nodules in the control (0 % ) than at 3, 6 and 9 % oil contamination and at the Caripito soil there was more nodules in the control followed by 3 % oil contamination and this latter have more nodules than 6 and 9 % oil contamination, having the two latter similar numbers of nodules. In conclusion, the nodule production was inhibited from 6 % oil contamination indicating that oil impedes the fixation of atmospheric nitrogen, therefore the association rizobia:legume is ineffective in highly polluted soils with oil.

**Key words:** Oil contamination, nitrogen fixation, frijol, *Vigna unguiculata*

## INTRODUCCIÓN

El frijol (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) es la principal leguminosa de granos de Venezuela. La

producción de frijol para los años 2003 y 2004 fue de 15.504 y 24.167 t, respectivamente; representando el 49,96 y 52,22 % de la producción total de las leguminosas de grano en Venezuela (arveja, caraota, frijol y quinchoncho), para un valor de la producción

de 3.516 y 5.481 millones de bolívares, respectivamente y una superficie de cosechada de 19.268 y 30.113 ha, respectivamente, representando el 50,39 y 53,92 %, respectivamente con rendimientos muy similares de 805 y 803 kg/ha, respectivamente (FEDEAGRO, 2005).

La red de oleoductos troncales del Oriente de Venezuela, transporta diariamente un millón 550 mil barriles de crudo y 60 mil barriles de Orimulsión. Dichos volúmenes son recibidos en los terminales de embarque Jose y Puerto La Cruz, para ser colocados en los mercados internacionales. El sistema de transmisión de hidrocarburos a través del cual se transporta crudo, Orimulsión y productos de refinería tiene una extensión de 1320 kilómetros en sus ramales principales cubriendo los estados Guárico, Monagas y Anzoátegui. El sistema de transmisión de hidrocarburos en su recorrido, atraviesa ríos, morichales, bosques, centros poblados y unidades de producción agrícolas y pecuarias que pueden verse afectadas en caso de ocurrencia de accidentes, especialmente derrames petroleros (Figuera *et al* 1999). La preocupación por los posibles derrames de crudo y la recuperación de los suelos afectados no sólo es considerada en Venezuela sino también a nivel mundial. Al respecto, Rhykerd y Smiciklas (2004) realizaron un estudio que examinó los efectos de los hidrocarburos de petróleo en lugar de los pesticidas porque existen más de 32.000 pozos de petróleo y gas en Illinois, Estados Unidos en los cuales se produce y embarca petróleo haciendo este proceso una amenaza prominente para contaminar tierras usadas para la agricultura.

La actividad petrolera puede influir notoriamente en las características físicas y químicas de los suelos. La utilización del suelo con fines de explotación petrolera significa cambios de usos que en muchos casos, por razones de seguridad, restringen o limitan usos alternos. La idea de usar plantas para limpiar sistemas contaminados no es nueva. A finales del siglo 19 se propuso el uso de plantas en el tratamiento de aguas residuales. La fitorremediación no es la panacea que algunos defensores han esperado, pero es una tecnología útil con muchas aplicaciones prácticas para la eliminación de varios contaminantes orgánicos e hidrocarburos del petróleo (Schnoor, 1997).

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la contaminación con petróleo de dos suelos del estado Monagas sobre los caracteres de la nodulación en el cultivo de frijol

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Ubicación del experimento

El ensayo se realizó en el Invernadero de la Universidad de Oriente, Núcleo Monagas, en el *Campus* de Juanico, Maturín a una altitud 90 msnm. Los suelos seleccionados fueron: uno de la localidad El Tejero del Municipio Zamora específicamente en la finca Santa Emilia, clasificado como un Tipyc Kandistults y uno de la localidad Caripito del Municipio Bolívar, específicamente de las parcelas hacia el sector de montaña, clasificado como un Tipyc haplustepts.

### Diseño del experimento

Para la instalación del experimento se usó un diseño de bloques al azar con un diseño de tratamientos de parcelas divididas con cuatro repeticiones. Las parcelas principales estuvieron constituidas por los niveles de contaminación con petróleo (0, 3, 6 y 9 %) y las subparcelas estuvieron constituidas por los dos suelos (El Tejero y Caripito), para un total de 8 tratamientos. El cultivo de frijol fue sembrado en 16 cajas de anime divididas en cuatro (parcelas principales), dos tratamientos (los dos suelos) y cuatro repeticiones para un total de 32 unidades experimentales y en cada una de ellas se colocaron 10 kg de suelo. Se realizó el análisis de varianza convencional y la prueba de comparación de medias de los tratamientos se realizó mediante la prueba de rangos múltiples de Duncan. El nivel de significación fue del 5 % para todos los análisis estadísticos.

### Preparación de los suelos

En cada suelo se simuló una contaminación de petróleo liviano de 0, 3, 6, y 9 %, Para evitar deficiencias nutritivas se fertilizó con el equivalente de 500 kg/ha de 12-24-12. En ambos suelos se mantuvieron las mismas condiciones de humedad, control de malezas, de plagas y enfermedades. Se determinaron el número de nódulos y el peso seco total de nódulos.

**RESULTADOS****Peso seco total de nódulos (g)**

En el cuadro 1 se observa el análisis de varianza para el peso seco total de nódulos. El mismo indicó que existieron diferencias significativas sólo para la contaminación con petróleo no así para los suelos, repeticiones y la interacción contaminación con petróleo x suelos.

La prueba de Duncan indicó un mayor peso seco de nódulos en el tratamiento control seguido por el tratamiento de 3 % y este superó a los pesos obtenidos en 6 y 9 %, de contaminación con petróleo, siendo estos últimos similares entre si (cuadro 2).

**Número de nódulos**

En el cuadro 3 se observa el análisis de varianza para el número de nódulos por planta. El mismo muestra diferencias significativas para la

contaminación con petróleo, los suelos y su interacción, no así para las repeticiones.

La prueba de Duncan (cuadro 4) indicó que se produjeron más nódulos en el suelo Caripito que en el suelo El Tejero a 0 y 3 %, siendo similar en ambos suelos a 6 y 9 %, por otra parte en el suelo El Tejero hubo mayor cantidad de nódulos en el control y menor en los tratamientos de 3, 6 y 9 %. En el suelo Caripito hubo una mayor producción de nódulos en el tratamiento control, seguido por el tratamiento de 3 % y este superó a los tratamiento de 6 y 9 %, siendo estos últimos similares entre si.

**DISCUSIÓN**

Los resultados indican que la contaminación con petróleo en ambos suelos afectó severamente tanto la producción de nódulos como el crecimiento de los pocos que se produjeron medidos en base al peso de los mismos. El peso de los nódulos se redujo en un 77,44 % a una contaminación de 3% en

Cuadro 1. Análisis de varianza para el peso seco total de nódulos (g) en el cultivo de frijol (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), bajo cuatro niveles de contaminación con petróleo de dos suelos del estado Monagas, Venezuela.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F
Repeticiones	3	0,297	0,099	1,80 ns
Petróleo (P)	3	7,045	2,348	42,69 *
Error (a)	9	0,495	0,055	
Suelos (S)	1	0,086	0,086	1,52 ns
P * S	3	0,467	0,156	2,77 ns
Error (b)	12	0,675	0,056	
Total	31	9,064		

C. V. (a) = 21,43 %      C. V. (b) = 21,71 %

\* : Significativo ( $p \leq 0,05$ )    ns : No Significativo ( $p > 0,05$ )

Cuadro 2. Prueba de promedio para el peso seco total de nódulos (g) en el cultivo de frijol (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), bajo cuatro niveles de contaminación con petróleo de dos suelos del estado Monagas, Venezuela.

Concentración de petróleo (%)	Peso seco total de nódulos (g) 1/
0	2,97 A
3	0,67 B
6	0,01 C
9	0,00 C

1/ Prueba de rangos múltiples de Duncan ( $p < 0,05$ )

Promedios con letras distintas son estadísticamente diferentes

comparación con el control en un 100 % para los niveles de 6 y 9 %, mientras que el número de nódulos se redujo en el suelo Caripito por 99,15 y 99,85 % a 3 y 6 % de contaminación, respectivamente, mientras que en el suelo El Tejero estas reducciones fueron de 78,00 y 100,00 % respectivamente. En ambos suelos, la reducción fue del 100 % para la mayor concentración de petróleo, es decir, no se produjeron nódulos. Al respecto, Sims (1990) indicó que los derrames de petróleo en regiones frías causan un daño a largo plazo de la microbiología del suelo, incluyendo efectos adversos en el ciclo del carbono (por ejemplo, degradación de celulosa) y en el ciclo del nitrógeno (especialmente la nitrificación y la fijación de nitrógeno) y la adición de bacterias degradadoras de petróleo mostraron pocas promesas y la aplicación de aceites de esquistos (aquel del cual el aceite ha sido extraído) puede reducir el crecimiento de hongos del suelo y la diversidad de especies de bacterias. Méndez-Natera *et al.* (2000) encontraron resultados similares para la

longitud y peso seco de las raíces en el frijol al compararlos con un suelo no contaminado con petróleo al utilizar un remediador quince días después de la contaminación y efectuar la siembra treinta días después de la misma.

En este ensayo hubo producción de nódulos a una contaminación de 3 %, Sims (1990) indicó que la revegetación disminuyó el efecto del aceite de esquistos, aparentemente porque las bacterias son aisladas en la rizósfera de las plantas hospederas empleadas. Rhykerd y Smiciklas (2004) indicaron que la fijación de nitrógeno es severamente inhibida en suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo, sin embargo, los suelos contaminados con biocombustibles o combustibles son para la soya mucho menos peligrosos para la fijación de nitrógeno y que los biocombustibles son más ambientalmente amigables que los hidrocarburos de petróleo. Lindström *et al.* (2003) indicaron que las tasas de germinación de las semillas de *Galega orientalis*

Cuadro 3. Análisis de varianza para el número de nódulos/planta en el cultivo de frijol (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), bajo cuatro niveles de contaminación con petróleo de dos suelos del estado Monagas, Venezuela.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F
Repeticiones	3	16,912	5,637	1,58 ns
Petróleo (P)	3	1319,665	439,888	123,02 *
Error (a)	9	32,182	3,576	
Suelos (S)	1	30,084	30,084	33,89 *
P * S	3	58,493	19,498	21,97 *
Error (b)	12	10,652	0,888	
Total	31	1467,988		

C. V. (a) = 62,69 %      C. V. (b) = 16,52 %

\* : Significativo ( $p \leq 0,05$ )    ns : No Significativo ( $p > 0,05$ )

Cuadro 4. Prueba de promedio para el número de nódulos por planta en el cultivo frijol (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), bajo cuatro niveles de contaminación con petróleo de dos suelos del estado Monagas, Venezuela.

Suelos	Número de nódulos por planta							
	Concentraciones de petróleo (%)							
	0		3		6		9	
El Tejero	245,93	Ba	2,08	Bb	0,36	Ab	0,00	Ab
Caripito	295,06	Aa	64,90	Ab	0,00	Ac	0,00	Ac

1/ Prueba de rangos múltiples de Duncan ( $p \leq 0,05$ )

Promedios con letras distintas son estadísticamente diferentes

Letras mayúsculas para comparaciones entre suelos a una misma concentración de petróleo.

Letras minúsculas para comparaciones entre concentraciones de petróleo en un mismo suelo

disminuyeron con incrementos en las concentraciones de *m*-toluato, la fracción de *m*-toluato más alta de 500 ppm inhibieron el crecimiento de las plantas y el desarrollo de las raíces, así como la nodulación, pero la presencia del inoculante de *Pseudomonas putida* incrementó el nivel de tolerancia hasta 1000 ppm, aunque las raíces fueron pequeñas y ramificadas cuando se desarrollaban en *m*-toluato, la mayoría de las plantas fueron viables y cuando se transfirieron dentro de medios no contaminados, la mitad de las plantas comenzaron a desarrollarse normalmente y los nódulos se desarrollaron sobre las nuevas raíces laterales a las tres semanas y en cocultivos con la raza de *P. putida*, el *m*-toluato fue removido por la actividad metabólica de la raza y la planta y la simbiosis funcionaron bien y en el suelo *G. orientalis* noduló y mostró un buen desarrollo a 2000 ppm de *m*-toluato así como en el suelo contaminado con diesel en el campo, donde la planta fue estimulada por el crecimiento bacteriano en la rizósfera.

Rosa *et al.* (2005) realizaron un experimento para comparar las tasas de reducción de acetileno de soya cultivada en un suelo contaminado con diesel de petróleo con aquella cultivada en una mezcla de 80 % de diesel de petróleo y 20 % de biodiesel o 100 % de biodiesel, el experimento se condujo en un invernadero y las unidades experimentales consistieron de macetas de un litro, un suelo limoso se contaminó con 19 g de diesel.kg<sup>-1</sup> y se colocó en las macetas, las semillas de soya se inocularon antes de la siembra y cinco semillas se sembraron por maceta. Las macetas se regaron diariamente a aproximadamente la capacidad de campo, las plantas se cosecharon de manera destructiva a las 4, 6 y 8 semanas después de la siembra para medir la tasa de reducción de acetileno de los diferentes tratamientos del diesel, las raíces se colocaron en contenedores sellados al vacío que contenían 10 % de acetileno por volumen y la concentración de etileno se midió después de una hora usando un GC FID, los resultados mostraron que la mayor biomasa de raíces, número de nódulos y biomasa de los nódulos fue medida de la soya creciendo en el suelo contaminado con 100 % de biodiesel, la mayor tasas de reducción de acetileno también se observó en el tratamiento de 100 % de biodiesel, los datos indicaron que las leguminosas pueden ser capaces de fijar nitrógeno a mayores tasas en suelos contaminados con 100 % de biodiesel que en suelos contaminados con 100 % de diesel de petróleo o 20 % de biodiesel 80 % de diesel de petróleo e indicaron que una investigación adicional se requiere para determinar si la cantidad de nitrógeno fijada

influye sobre las tasas de biodegradación o si la biodegradación se beneficiaría del nitrógeno suplementario.

Suominen *et al.* (2000), realizaron un experimento en el invernadero con 2000 ppm de *m*-tolueno o suelo contaminado con petróleo y un suelo sin petróleo como control y aplicaron los siguientes tratamientos para todos los tipos de suelos: (i) *Galega orientalis* con rizobia; (ii) *G. orientalis* sin rizobia; (iii) *G. orientalis* con rizobia y *Pseudomonas putida* PaW85 y (iv) suelos mezclados sin inoculante, después de las primeras reacciones las raíces crecieron normalmente produciendo un sistema radical fuerte y ramificado alcanzando la capa de suelo contaminado, la estructura de las raíces varió en los diferentes tipos de suelos, en el suelo con petróleo, las raíces se dispersaron primero mayormente de forma lateral en un modo de crecimiento normal, mientras el *m*-toluato causó una ramificación grande de las raíces, la nodulación ocurrió normalmente en todos los tipos de suelos en las macetas inoculadas con rizobia y el ensayo de reducción de acetileno mostró que todas las plantas en cada tratamiento fueron capaces de fijar nitrógeno.

Otros tipos de estrés pueden afectar la nodulación, Obbard y Jones (1993) condujeron una investigación para determinar si razas efectivas de *Rhizobium leguminosarum* biovar. *trifolii* capaces de la fijación simbiótica de nitrógeno con trébol blanco (*Trifolium repens*) estuvieron presentes en un rango de suelos contaminados con metales y encontraron que cuando la planta hospedera fue nativa al césped, los rizobios se encontraron en los nódulos y en la rizósfera del suelo en todos los sitios evaluados, ellos fueron capaces de realizar una simbiosis efectiva y la fijación de nitrógeno, incluso cuando las concentraciones de metales excedieron grandemente los límites de metales del suelo en algunos casos. Sin embargo, la nodulación no ocurrió en algunos casos donde *T. repens* no fue nativa en los suelos contaminados con metales y esto indicó que una población rizobiana no efectiva estuvo presente o que las células efectivas estuvieron ausentes del suelo. Obbard y Jones (2001), indicaron que las tasas de la fijación de nitrógeno por *Rhizobium* en simbiosis con plantas hospederas leguminosas incluyendo trébol blanco, haba y guisantes se establecieron en suelos que han sido corregidos experimentalmente con aguas cloacales contaminadas con metales pesados, los resultados mostraron que los efectos adversos de los metales pesados son aparentes sobre las tasas de

fijación de nitrógeno simbiótico para el trébol blanco cultivado en competencia interespecífica con ryegrass baja condiciones mezcladas del césped, comparado con el trébol blanco cultivado en el césped sin ryegrass, experimentos adicionales en haba y guisantes indicaron un efecto significativo pero menor relacionado con la inhibición por los metales sobre la tasa de fijación de nitrógeno comparado con suelos no tratado y suelos corregidos con un lodo relativamente no contaminado.

El peso de los nódulos y el número de nódulos se redujeron drásticamente a una contaminación del 3 % y prácticamente los niveles de 6 y 9 % inhibieron completamente la producción de nódulos, similares resultados fueron obtenidos por Merkl *et al.* (2004), así como por Orta *et al.* (1999) quienes evaluaron en El Tigre, Venezuela, las características de crecimiento y nodulación en plantas de frijol y encontraron que el mayor peso seco del vástago y de la raíz lo presentaron los tratamientos 0,00001 %; 0,0001 % y 0,1 % de suelo contaminado por petróleo, no siendo así para el número total de nódulos ni para el peso seco de los nódulos, donde el mayor rendimiento lo presentó el tratamiento 1 % de suelo contaminado, mientras que el número de nódulos por planta en la raíces secundarias fue mayor en el tratamiento 0,00001 % de suelo contaminado y concluyeron que hay un efecto deletéreo de la contaminación por petróleo sobre la simbiosis rizobia-leguminosa. Werner *et al.* (1998), indicaron que la nodulación es inhibida por los aromáticos derivados de los hidrocarburos de petróleo, posiblemente, ellos reducen el desarrollo de los rizobia y/o la actividad rizobiana o disturban el intercambio químico de las moléculas mensajeras entre el simbionte y el hospedero el cual es esencial para la localización del huésped por el simbionte y el proceso de infección

### CONCLUSIONES

Se inhibió la producción de nódulos a partir de un nivel de contaminación con petróleo de 6 % indicando que la contaminación con hidrocarburos en los suelos impide la fijación del nitrógeno atmosférico, por lo tanto la asociación rizobia:leguminosa es inefectiva en suelos altamente contaminados con petróleo.

### LITERATURA CITADA

- FEDEAGRO. 2005. Producción Agropecuaria. <http://www.fedeagro.org/produccion/default.asp>. Última visita 8 de octubre de 2005.
- Figuera, F.; A. Aguilera.; M. Martínez y D. Machado.1999. Estudio de sensibilidad ambiental y plan de contingencia contra derrames de hidrocarburos SAPCO. In I Jornadas Venezolanas de Impacto Ambiental realizado en Maturín, Venezuela entre el 2 al 5 de marzo de 1999.
- Lindström, K.; M. M. Jussila; H. Hintsa; A. Kaksonen; L. Mokolke; K. Mäkeläinen; J. Pitkäläinen and L. Suominen. 2003. Potential of the *Galega-Rhizobium galegae* system for bioremediation of oil-contaminated soil. Food Technology and Biotechnology 41 (1): 11-16.
- Méndez-Natera, J. R.; R. Salazar-Garantón y A. Velásquez. 2000. Efecto del derrame petrolero simulado y la aplicación de un remediador sobre la germinación y el crecimiento de girasol (*Helianthus annuus* L.), frijol (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) y patilla (*Citrullus lannatus* (Thum.) Mansf.). Revista de Agricultura y Biología de Suelos, RABSU 1 (2): 71-78.
- Merkel, N.; R. Schultze-Kraft and C. Infante. 2004. Phytoremediation in the tropics - The effect of crude oil on the growth of tropical plants. Bioremediation Journal 8 (3-4): 177-184.
- Obbard, J. P. and K. C. Jones. 1993. The effect of heavy metals on dinitrogen fixation by *Rhizobium*-white clover in a range of long-term sewage sludge amended and metal-contaminated soils. Environmental Pollution 79 (2): 105-112.
- Obbard, J. P. and K. C. Jones. 2001. Measurement of symbiotic nitrogen-fixation in leguminous host-plants grown in heavy metal-contaminated soils amended with sewage sludge. Environmental Pollution 111 (2): 311-320.
- Orta, A.; A. Leal y V. A. Michelena. 1999. Evaluación ecotoxicológica de suelos contaminados con petróleo mediante la simbiosis rizobia-frijol. Revista de Agricultura y Biología de Suelos, RABSU 1 (1): 34-36.

- Rhykerd, R. and K. Smiciklas. 2004. Impact of crude oil contamination in soil on nitrogen fixation rates of three legumes. Illinois Council on Food and Agricultural Research. [http://www.ilcfar.org/research/display.cfm?project\\_id=392](http://www.ilcfar.org/research/display.cfm?project_id=392). Última visita: 15 de marzo de 2005.
- Rosa, I.; R. Rhykerd and K. Smiciklas. 2005. Impact of petroleum diesel and biodiesel fuels on acetylene reduction in *Glycine max*. Resumen a ser presentado en The ASA-CSSA-SSSA International Annual Meetings (November 6-10, 2005). <http://crops.confex.com/crops/2005am/techprogram/P6649.HTM>. Última visita 15 de septiembre de 2005.
- Schnoor, J. L. 1997. Phytoremediation. Ground-water remediation technologies Analysis Center. Pittsburgh. U. S. A. <http://www.gwrtac.org> (Última visita: 12 de marzo de 2005).
- Sims, G. K. 1990. Biological degradation of soil. *Advances in Soil Science* 11: 289-330.
- Suominen, L.; M. M. Jussilaa; K. Mäkeläinen; M. Romantschukb and K. Lindströma. 2000. Evaluation of the *Galega-Rhizobium galegae* system for the bioremediation of oil-contaminated soil. *Environmental Pollution* 107 (2): 239-244.
- Werner, D.; A. Neumann; Y. Bode-Kirchhoff and A. Watzel. 1998. Bioassays for soil contamination using the legumes root nodule symbiosis. 16<sup>th</sup> North American Conference on Symbiotic Nitrogen Fixation, February, 1-6, Cancun, México.