

BIOENSAYOS DE TOXICIDAD AGUDA CON *Lactuca sativa* EN SEDIMENTOS CONTAMINADOS DEL RÍO RECONQUISTA EN DISPOSICIÓN FINAL

S.E. RATTO; M. VANIER; V. PIERINI y L. GIUFFRÉ

Recibido: 18/11/10

Aceptado: 10/12/10

RESUMEN

Se realizaron dos ensayos de toxicidad aguda con semillas de *Lactuca sativa* para evaluar la biotoxicidad en sedimentos contaminados y dispuestos del río Reconquista. Se aplicaron tres tratamientos: testigo arena (A); sustrato compuesto por arena-sedimento al 50% (AS) y sustrato 100% sedimento (S). Se midió número de plántulas, longitud radical y se observaron indicadores de fitotoxicidad. Hubo diferencia entre tratamientos en el número de plantas que emergieron ($P < 0,02$). Se observó necrosis en los cotiledones en AS y S. En el segundo bioensayo, a partir del extracto sedimento:agua 1:2,5 se trabajó con cuatro diluciones (1:1, 1:5, 1:10 y 1:25) y testigo de agua destilada. La longitud radical entre los tratamientos y el testigo fue significativa ($P < 0,05$): \bar{X} : 7,24 mm para el extracto más concentrado, 11,91 mm para el más diluido y 13,79 mm para el control. Se estimó CE_{20} para una dilución de 1:13. La solución más concentrada se aproxima a la CE_{50} , con crecimiento anormal de pelos radicales y radículas delgadas. Los efectos de fitotoxicidad identificados pueden ser atribuibles a la gran acidez del sedimento, alto contenido de aluminio, presencia de metales pesados y de hidrocarburos. Se vincula la necrosis observada en ambos bioensayos con un estrés oxidativo inducido por la deficiencia de calcio y el exceso de cadmio.

Palabras claves. Bioensayos, sedimentos contaminados, Concentración Efectiva₂₀.

ACUTE TOXICITY BIOASSAYS IN DISPOSED CONTAMINATED RIVER SEDIMENTS

SUMMARY

Two acute toxicity tests were performed with seeds of *Lactuca sativa* to assess biotoxicity in disposed contaminated Reconquista River sediments. Three treatments were applied: sand as control (A); substrate composed of sand and sediment 50% (AS) and 100% of sediment substrate (S). Number of seedlings and root length were measured and indicators of phytotoxicity were observed. There was a difference between treatments in the number of plants emerged ($P < 0.02$). Necrosis was observed in the cotyledons at AS and S. In the second bioassay, four dilutions of the extract sediment:water 1:2.5 were tested with distilled water as control. Root length between treatments and the control was significant ($P < 0.05$): 7.24 mm for the most concentrated extract, 11.91 mm for the most diluted and 13.79 mm for the control. EC_{20} was estimated at a 1:13 dilution. The most concentrated solution was close to EC_{50} , with abnormal growth of root hairs and thin rootlets. Phytotoxicity effects identified can be attributed to the high acidity of the sediment, high aluminum content, presence of heavy metals and of hydrocarbons. Necrosis observed in both bioassays could be attributed to oxidative stress induced by calcium deficiency and cadmium excess.

Key words. Bioassays, contaminated sediment, Effective Concentration₂₀.

INTRODUCCIÓN

Para poder dar solución a necesidades específicas sobre el manejo adecuado de residuos, sustancias tóxicas y remediación de suelos contaminados, es necesario desarrollar investigación científica y tecno-

lógica que permita contar con información confiable y oportuna, que permita respaldar la toma de decisiones de funcionarios de gobierno mediante una participación comprometida con la prevención del deterioro del ambiente y la mejora de la calidad de vida

Cátedra de Edafología- Facultad de Agronomía. UBA. Av- San Martín 4453. 1417. Buenos Aires-Argentina. sratto@agro.uba.ar

REV. FACULTAD DE AGRONOMÍA UBA, 30(3): 179-185, 2010

de la población (Salomons *et al.*, 1995). Los ensayos ecotoxicológicos permiten conocer la respuesta de seres vivos a sustancias potencialmente tóxicas para los mismos y brindan información de gran utilidad para evaluar situaciones de contaminación en la que pueda involucrarse a población sensible o se permita la entrada de compuestos tóxicos a la cadena alimentaria (Dutka, 1989).

Un tema que preocupa a la sociedad en su conjunto es el de los sedimentos que son removidos respondiendo a distintas motivaciones: navegación, limpieza de canales, de contaminación de cursos de agua, tal el caso de los ríos Matanza y Reconquista en los alrededores de la ciudad de Buenos Aires, y que son depositados con diferente grado de cuidados preventivos para la salud de la población (Salibián, 2006). Es de suma importancia tener en cuenta que muchas sustancias que se encuentran en concentraciones trazas en el agua del Río pueden acumularse en los sedimentos en concentraciones elevadas a través del tiempo, como es el caso de los metales pesados que tienden a acumularse en los barros del fondo (Defensor del Pueblo, 2007). La remoción de sedimentos contaminados puede producir efectos adversos en el ambiente, debido a que se puede favorecer la liberación de contaminantes. Es importante conocer la calidad de los sedimentos definiendo parámetros como la granulometría, composición, pH, presencia de metales pesados y otros contaminantes. En la cuenca del río Reconquista se han realizado trabajos de disposición final de los sedimentos contaminados en áreas pobladas y ésta es una cuestión que debe ser tratada cuidadosamente para atender a los riesgos que puedan generar para la población más sensible. La Unidad Coordinadora del Proyecto de Saneamiento Ambiental y Control de las inundaciones de la Cuenca del río Reconquista, (UNIREC), fue un organismo dependiente del Ministerio de Obras y Servicios Públicos de la provincia de Buenos Aires que funcionó durante algunos años y se dedicó al dragado de sedimentos contaminados del río Reconquista ubicado en la provincia de Buenos Aires. De acuerdo a la información brindada por este organismo, el volumen total removido durante la gestión (años 1997-2001) fue de 800.000 m³ pero sólo se caracterizaron como contaminados 200.000 m³ de sedimentos. Los atributos que se tuvieron en cuenta para la califica-

ción de los sedimentos como contaminados o no, fueron contenido de Cadmio (Cd), Cromo (Cr), Plomo (Pb), Cinc (Zn), Mercurio (Hg) e Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos (HPA) Las operaciones de disposición tuvieron en cuenta las concentraciones finales de los contaminantes en cada una de las áreas de disposición, de tal forma que permitieran verificar los criterios de uso de la tierra (UNIREC; 2000). El material dragado fue bombeado a las áreas de disposición final. El Cr y el Zn fueron los contaminantes más abundantes (UNIREC, 1997) medidos en esa instancia.

En la zona norte del Área Metropolitana de la Ciudad de Buenos Aires existen sitios de disposición final con sedimentos contaminados resultantes de las actividades de la UNIREC. De acuerdo con Saltiel y Romano (1997) los sitios de relleno se destinarían a instalaciones recreativas y parqueadas o hábitat para la conservación de las especies, luego de ser cubiertas con un metro de sedimento limpio para impedir la exposición de las personas y de la fauna silvestre a componentes químicos eventualmente presentes en el material dragado. Este último paso no se ha cumplido permitiendo la exposición de los sedimentos a la fauna, flora y población local con el consiguiente riesgo para la salud. Se consideró de importancia el efectuar ensayos ecotoxicológicos a estos sedimentos en uno de estos sitios de disposición final en donde los sedimentos han sufrido, luego de varios años de exposición a las condiciones atmosféricas, un proceso de edafización incipiente.

La disposición final de sedimentos contaminados requiere de un control para no constituirse en un problema ambiental. El bioensayo de toxicidad con semillas de *Lactuca sativa* es una prueba estática de toxicidad aguda (120 horas de exposición) en la que se pueden evaluar los efectos fitotóxicos de compuestos puros o de mezclas complejas en el proceso de germinación de las semillas y en el desarrollo de las plántulas durante los primeros días de crecimiento. Como puntos finales para la evaluación de los efectos fitotóxicos, se determina la inhibición en la germinación y la inhibición en la elongación de radícula e hipocótilo (Sobrero y Ronco, 2004). Este bioensayo es el más utilizado en la actualidad y ha sido recomendado y aplicado por diferentes organismos de protección ambiental (OECD, 1984; USEPA,

1989) para la evaluación ecotoxicológica de muestras ambientales, cultivos puros, evaluación del efecto fitotóxico de pesticidas, control de efluentes, evaluación de lodos, lixiviados, calidad de aguas, toxicidad de sustancias químicas en suelos contaminados y otros. Se trata de un método de bajo costo y de corta duración, que no requiere equipos sofisticados para realizar mediciones.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la toxicidad de sedimentos contaminados y dispuestos del Río Reconquista, aplicando dos bioensayos con *Lactuca sativa* como especie sensible a la presencia de sustancias tóxicas que pueden interferir alterando la supervivencia y el desarrollo normal de la planta.

MATERIALES Y MÉTODOS

En sedimentos dragados al río Reconquista y depositados sobre geomembrana, en un área que limita zona residencial con barrio industrial, se tomaron muestras para caracterizar la toxicidad potencial de los mismos. Se recorrió el terreno, se efectuó un reconocimiento de la vegetación y se tomaron muestras simples y compuestas. La descripción completa de los sedimentos fue presentada previamente (Ratto *et al.*, 2008). Se resumen algunas de las principales características: textura medida por Bouyoucos: arcillosa, densidad de partícula por el método del picnómetro ($2,16 \text{ g cm}^{-3}$); densidad aparente por el método del cilindro ($1,01 \text{ g cm}^{-3}$); carbono total por el método de Walkley y Black (9 g^{-1}); conductividad eléctrica ($0,6 \text{ dS m}^{-1}$); pH en agua 1:2,5 (3,76-4,29) y fósforo disponible ($13,3 \text{ mg kg}^{-1}$). Se determinó en solución el contenido de aluminio (Al) $10 \mu\text{g L}^{-1}$, cadmio (Cd) $0,2 \mu\text{g L}^{-1}$, níquel (Ni) $0,45 \mu\text{g L}^{-1}$ y cinc (Zn) $1,17 \mu\text{g L}^{-1}$ en solución. La saturación de bases fue inferior al 50% y el contenido de calcio (Ca) $0,3 \text{ cmol kg}^{-1}$.

Bioensayos de fitotoxicidad

Se aplicaron dos bioensayos de toxicidad aguda con semillas de *Lactuca sativa*. En el primer bioensayo se utilizó como testigo arena lavada (A), un sustrato compuesto por un 50% de arena y 50% de sedimento contaminado del río Reconquista en disposición final (AS) y un sustrato compuesto 100% por el sedimento mencionado (S). Los tratamientos se efectuaron por triplicado. Se colocaron 20 semillas de *Lactuca sativa* en cada recipiente y se las cubrió con una delgada capa del sustrato. Luego los reci-

pientes fueron tapados. Se trabajó con recipientes plásticos sobre bandejas con un diseño completamente aleatorio (DCA). Durante las primeras 48 horas se mantuvieron los recipientes en oscuridad. Luego se continuó el ensayo con horas de luz y horas de oscuridad. Al cumplirse las 120 h de ensayo (5 días) se procedió a extraer, con ayuda de una pinza, las plántulas y semillas germinadas. Se determinó el número de plántulas emergidas para cada uno de los tratamientos. Se procedió a congelar las plántulas extraídas, para facilitar la medición de la radícula e hipocótilo. Este procedimiento reduce la variabilidad en las medidas, principalmente cuando el crecimiento de las radículas es ensortijado o no es parejo (Sobrero y Ronco, 2004).

El segundo bioensayo se realizó utilizando un extracto acuoso 1:2,5 de los sedimentos contaminados (concentración que mejor representa la solución del suelo), a partir del cual se prepararon cuatro diluciones con agua destilada según las siguientes concentraciones: 1:1, 1:5, 1:10, 1:25 en alícuotas de 20 ml. El testigo fue agua destilada. Se utilizaron bandejas con iguales características a las del primer bioensayo colocando un papel de filtro y 4 ml de cada dilución. Al concluir las 120 horas, se procedió a observar los indicadores de fitotoxicidad detallados para el primer ensayo, luego se contabilizó el número de semillas germinadas y se midió la elongación radical de las plántulas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las mediciones y observaciones del bioensayo fueron: número de plántulas emergidas, longitud de la radícula, longitud del hipocótilo (Cuadro 1); presencia de cotiledones, desarrollo de hongos, necrosis de cotiledones y presencia de pelos absorbentes (Cuadro 2).

Hubo diferencia estadísticamente significativa en el número de plantas que emergieron ($P < 0,02$) en el sustrato A con respecto a los tratamientos AS y S, siendo menor y semejante en los dos últimos casos (Cuadro 1). La elongación de la radícula fue semejante para los tres tratamientos, mostrando tendencia decreciente. El hipocótilo no mostró diferencias entre tratamientos. Se observó necrosis en los cotiledones del tratamiento arena-sedimento. Al finalizar el ensayo se observaron los siguientes indicadores de fitotoxicidad: pelos absorbentes poco desarrollados, radículas con crecimiento ensortijado, necrosis en los cotiledones y desarrollo de hongos sobre el material.

CUADRO 1. Número de plántulas emergidas, longitud de la radícula (mm) y elongación del hipocótilo en el bioensayo sobre sedimento.

Características medidas	Tratamientos					
	A	DE	AS	DE	S	DE
Número de plántulas emergidas	17,7 a	3,2	8,7 b	3	9,7 b	3
Elongación de la radícula (mm)	8,41 a	1,14	7,47 a	0,8	6,81 a	0,71
Elongación del hipocótilo (mm)	2,48 a	1,58	3,72 a	0,75	3,56 a	0,75

Letras diferentes en sentido horizontal indican diferencias estadísticamente significativas $P < 0,05$.

A: arena, AS: arena y sedimento 50%, S: sedimento 100%, DE: desvío estándar.

CUADRO 2. Indicadores de fitotoxicidad.

Indicadores observados	A	AS	S
Necrosis en los cotiledones	no	si	si
Desarrollo de hongos en el sustrato	no	no	si
Pelos absorbentes poco desarrollados	no	no	no

A: arena, AS: arena y sedimento 50%, S: sedimento 100% .

En los tratamientos S y AS, en la mayoría de las plántulas que emergieron, se observó necrosis en los cotiledones y presencia de hongos en el sustrato tanto en S como en AS. Con referencia a las observaciones en las anomalías radicales se tuvo en cuenta que los efectos de toxicidad que el Al^{3+} produce en las raíces son conocidos y se estudia las estrategias de la raíz para protegerse (Uren, 2007). Algunos de los efectos observados son un acortamiento y engrosamiento de las raíces. El Al^{3+} absorbido por las plantas tiende a acumularse en las raíces y no se transloca fácilmente a la parte aérea (Wild; Russell y Wild, 1992) Esto coincide con las mediciones realizadas en el presente trabajo donde la elongación de la radícula disminuye en los tratamientos (AS) y (S). Aún no se comprende bien el mecanismo a través del cual actúa negativamente el Al^{3+} en las plantas pero parece que el mayor daño ocurre en las puntas de las raíces. El Al^{3+} reduce tanto la división celular de la raíz como su crecimiento, lo que resulta en raíces cortas y gruesas (Berkelaar, 2001). Asimismo, el Al^{3+} puede influir negativamente sobre el crecimiento de la planta interfiriendo en la absorción de los macronutrientes necesarios como Calcio (Ca) y magnesio (Mg). Con referencia a las observaciones de necrosis y falta de crecimiento, son causales posibles las medidas de gran acidez y la pequeña dotación de Ca. Las raíces dañadas por la deficiencia de Ca son más susceptibles a la infección de bacterias y hongos. La presencia del Cd y otros me-

tales pesados inducen estrés oxidativo por estar involucrado en diferentes tipos de mecanismos de generación de especies reactivas del oxígeno y contribuyen a explicar la observación de necrosis en los tratamientos AS y S (Stohs y Bagchi, 1995).

En los días subsiguientes a la duración estándar del ensayo emergieron algunas plántulas en los tratamientos AS y S, sin alcanzar el número obtenido en el tratamiento A. Esto se puede vincular no sólo a un problema de toxicidad, sino también a la gran acidez del sedimento que puede haber dilatado la germinación de las semillas ya que el sedimento presenta un pH 3,8 y el pH óptimo para el crecimiento de la lechuga está entre 6,8 y 7,2. Este desfase entre las semillas que germinaron durante el ensayo de toxicidad realizado en 120 horas, y las que germinaron varios días después, también pudo haberse debido a la falta de nitrato (NO_3) en el sustrato. Se conoce que la presencia de nitratos en el suelo es un estimulante para la germinación. Su ausencia en el sedimento bajo estudio, pudo haber contribuido a prolongar la dormición secundaria de las semillas. Este tipo de dormición está fundamentalmente asociada con las condiciones medioambientales (Azcón-Bieto, 2000). De todas formas, cabe aclarar que el efecto de inhibición en la germinación al finalizar las 120 horas del bioensayo se considera fitotoxicidad, aunque el efecto en la germinación sea reversible (Sobrero y Ronco, 2004).

Interpretación de los datos obtenidos

Para la evaluación de los datos se calculó el porcentaje de germinación de los tratamientos (AS y S) en relación al testigo (A). Se consideraron no tóxicos los valores entre 90 y 100%, tóxicos los valores que estaban entre 75% y 90% y muy tóxicos por debajo del 75% (Poi de Neiff y Ramos, 2001). Los resultados para las muestras del tratamiento AS dieron un valor de 50% ($P < 0,05$) y las del tratamiento S un valor de 55% ($P < 0,05$), de donde se infiere que en ambos casos el sedimento se comportó como un sustrato muy tóxico traduciéndose en un bajo porcentaje de germinación.

Para evaluar la inhibición de elongación de raíz se calcula la elongación promedio en las muestras, se le descuenta el valor del testigo y se divide por el valor del testigo. Cuando la diferencia tiene signo negativo se entiende que hay inhibición a la elongación. En el caso de estudio los valores fueron: AS -0,11 y S -0,19, indicando una inhibición creciente que se adjudica a los factores acidez y presencia de Al soluble principalmente.

En el segundo bioensayo donde se trabajó con diluciones del extracto del sedimento, al finalizar las 120 horas de exposición se realizaron las mediciones obteniéndose los resultados (Cuadro 3).

En las replicas de cada tratamiento se observó la misma tendencia en cuanto a los resultados.

Para calcular la desviación estándar se utilizó la siguiente fórmula:

$$S = \sqrt{\frac{\sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{n}}{n - 1}} \quad \text{Dutka, 1989}$$

Como las desviaciones estándar calculadas son menores a 2 veces la desviación estándar del control, se consideran válidos los resultados y no es necesario la repetición del test para confirmar la variabilidad.

En la Figura 1 se muestran los resultados obtenidos con el bioensayo aplicado al extracto obtenido a partir de los sedimentos contaminados (Dutka, 1989).

La Figura 1 permite conocer la concentración efectiva que genera una disminución de la elongación radical del 20% ($EC_{20}=1:13$), acercándose a la disminución del 50% (EC_{50}), para la relación de dilución 1:1 (IRAM, 2007). Estos resultados indican que hay efecto de fitotoxicidad, cuya magnitud puede afectar de manera variable a las especies vegetales, generando cambios en la flora de la zona, favoreciendo a aquellas especies más tolerantes a los contaminantes presentes.

En el Cuadro 4 se señalan efectos cualitativos de fitotoxicidad sobre la germinación y el desarrollo que fueron identificados en las diluciones más concentradas.

Con una concentración de 100% del extracto se observó escaso desarrollo de pelos radicales y una raíz delgada, y se considera que esto puede ser un indicador de crecimiento anormal. En las soluciones más concentradas se observó un gran número de raíces con crecimiento ensortijado. En el tratamiento control se observó un buen desarrollo de pelos radicales, mientras que en los otros tratamientos el desarrollo fue más escaso. Estas observaciones pueden ser consideradas como un indicador de crecimiento anormal.

CUADRO 3. Elongación radical medida en cada una de las diluciones a partir del extracto acuoso.

Dilución	Concentración	Elongación media	DE
1:1	20 ml de extracto	7,24 a	2,73
1:5	4 ml extracto	8,82 ab	1,98
1:10	2 ml extracto	10,47 bc	2,1
1:25	0,8 ml de extracto	11,91 c	2,2
Control	20 ml de agua destilada	13,79 c	1,49

Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas $P < 0,05$.

DE: desvío estándar.

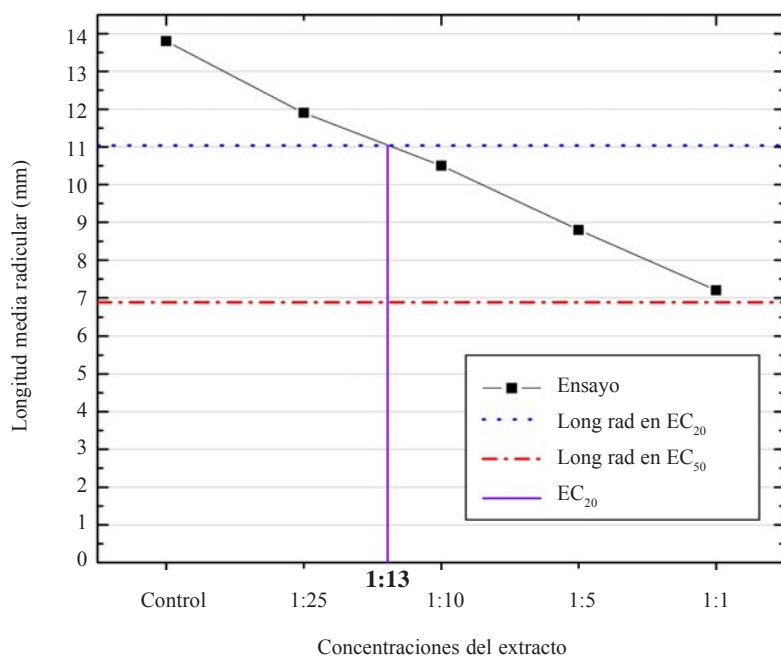


FIGURA 1.
Longitud media radicular (mm) en función de la concentración del extracto.

CUADRO 4. Indicadores de fitotoxicidad en el ensayo realizado con el extracto de los sedimentos.

	1:1	1:5	1:10	1:25	control
Ápices radiculares con necrosis	Si	Si	No	No	No
Necrosis en hipocótilo	Si	No	No	No	No
Necrosis en los cotiledones	Si	Si	Si	Si	No
Cotiledones visibles	26 %	28 %	29 %	46%	90 %

CONCLUSIONES

Los resultados del primer bioensayo permiten presumir que las diferencias en la tasa de germinación se pueden vincular a una multiplicidad de factores: la gran acidez del sedimento que puede haber dilatado la germinación de las semillas, la falta de Ca en el sedimento y el contenido de metales como el Cd, explicando estos dos últimos factores la necrosis a través del estrés oxidativo.

Los resultados del segundo ensayo permiten identificar la concentración efectiva en la cual la elongación de radícula disminuye en un 20% y muestran cómo el extracto control se acerca a la concentración efectiva donde la elongación disminuye en un 50%. A esto se suman las observaciones realizadas sobre las plántulas, que dan cuenta de un desarrollo anormal. Los resultados de ensayos confirman el riesgo ecotoxicológico del sedimento.

BIBLIOGRAFÍA

- AZCON-BIETO J. y M. TALÓN. 2000. Fundamentos de Fisiología Vegetal. McGraw-Hill/Interamericana. p 444.
- BERKELAAR, E. 2001. The effect of aluminum in acidic soils on plant growth. *ECHO Development*. Notes 71: 1-3.
- DEFENSOR DEL PUEBLO-ombudsman nacional. 2007. Informe especial Cuenca del Río Reconquista Primera parte. Marzo. <http://www.dpn.gob.ar/areas.php?id=25&ms=area3>. p 294.
- DUTKA, B. 1989. Short-Term Root Elongation Toxicity Bioassay. Methods for Toxicological Analysis of Waters, Wastewaters and Sediments, National Water Research Institute (NWRI), Environment Canada. p 370.
- IRAM 29117. 2007. Determinación de los efectos de los contaminantes sobre la flora del suelo. «Screening Test» para la emergencia de plántulas de *Lactuca sativa* (L.).
- OECD. 1984. Organization for Economic Cooperation and Development. «Terrestrial Plants: Growth Test. Guideline for Testing of Chemicals» N° 208, OECD Publications Service, Paris.
- POI DE NEIFF, A. and A.O. RAMOS. 2001. Utilización de bioensayos para el estudio ecotoxicológico de los ríos Salado y Negro (Chaco, Argentina). Disponible en URL: <http://UNNE.edu.ar/cyt/2001/6-Biológicas/B-019.pdf>. Citado enero 2005.
- RATTO, S.; N. KIRSANOV; L. MARBÁN y L. GIUFFRÉ. 2009. XXI Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo. 13 al 16 de mayo de 2008. San Luis Argentina. p 507.
- RATTO S.E; V. PIERINI; M. VANIER y L.GIUFFRÉ. 2010. Indicadores Edáficos Aplicados a Sedimentos Dragados Contaminados del Río Reconquista en Disposición Final, (Pcia. Buenos Aires). *Ciencia*, Vol. 5, N° 13, Abril Página 35-45- ISSN 1668-2009.
- SALIBIÁN A. 2006. Ecotoxicological assessment of the highly polluted Reconquista River of Argentina. *In: Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. Ware GW (ed.). Volume 185: 35-65 (ISBN 0-387-25526-5 / Springer).
- SALTIEL, G. y L. ROMANO. 1997. Situación ambiental de la cuenca hídrica del río Reconquista (2ª parte): Plan de gestión de sedimentos. *Ingeniería Sanitaria y Ambiental* (32): 29-36.
- SANITÁ DI TOPPI, L.; R GABBRIELLI. 1999. Response to cadmium in higher plants. *Environ. Exp. Bot.* 41:105-130.
- SALOMONS, W.; U. FÖRSTNER and P. MADER. 1995. Heavy Metals Problems and Solutions, Springer-Verlag. Berlin. p 412.
- SOBRERO, M.C. y A. RONCO. 2004. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. Capítulo 4.4 Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L.) México: IMTA, 2004. Canadá: IDRC, Castillo Morales, G. (ed.).
- STOHS, S.J. and D. BAGCHI D. 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Rad. Biol. Med.* 18: 321-336.
- UNIREC. 2000. Dragado de sedimentos contaminados del río Reconquista y programa de monitoreo ambiental. *AIDIS*. mayo-junio. N° 50: 60-66.
- UREN, N.C. 2007. Types, amounts and possible function of compounds released into the rhizosphere by soil-grown plants. *In: The Rhizosphere*. Ed. R. Pinton; Z. Varanini and P. Nannipieri. CRC Press. Boca Raton. FL. USA.
- WILD, A. 1992. Condiciones del suelo y desarrollo de las plantas. Mundi-Prensa. Madrid. p 907-908.