

Comunicación breve

Detección de glifosato en el percolado de muestras de suelo de un lote agrícola a través de bioensayos de germinación con semillas de *Lactuca sativa* L.

RECIBIDO: 23/07/2014

REVISIÓN: 15/08/2014

ACEPTADO: 03/11/2014

Foti, M. N. • Lallana, V. H.

Docentes Investigadores. Cátedra de Fisiología Vegetal. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Entre Ríos. Oro Verde. Entre Ríos. Argentina. Ruta Provincial 11, Km 10,5 (3101). Tel: 54-343-4975075. E-mail: nfoti@fca.uner.edu.ar

RESUMEN: Las muestras de suelo se extrajeron de un lote agrícola a dos profundidades (4 y 8 cm) y se colocaron en macetas. Las mismas, a capacidad de campo, fueron tratadas con glifosato (1,5 kg/ha). Se probaron 4 tratamientos de suelo: testigo (T0), tratado (T1), homogeneizado tratado (T2) y esterilizado tratado (T3). A las 24 y 96 horas desde la aplicación se obtuvo de cada muestra el lixiviado mediante el agregado de agua destilada. Se montó un bioensayo de germinación con semillas de *Lactuca sativa* var. mantecosa, utilizando cajas Petri con papel de filtro en la base humedecido con el lixiviado obtenido en cada tratamiento y un testigo con agua destilada. Se realizaron 5 repeticiones de 20 semillas cada una para cada tratamiento y se colocaron en cámara a 23°C. A los 4 días desde la siembra se midió la longitud radical con calibre digital. Se realizó el análisis de la variancia (ANOVA) y se utilizó la prueba de Duncan (α 0,05). Los ensayos indirectos fueron efectivos para detectar glifosato en muestras de suelo mediante bioensayos de germinación. En T3 se registró

el menor crecimiento radical. Se observó que el factor profundidad de extracción de la muestra no fue significativo.

PALABRAS CLAVE: glifosato, muestras de suelo, lixiviado, bioensayos de germinación.

SUMMARY: *Detection of glyphosate through trickling of soil samples from an agricultural lot with Lactuca sativa L. seed germination bioassays.* Soil samples were firstly extracted from an agricultural lot at 4 and 8 cm depth and were placed in pots. The same, at field capacity, were treated with glyphosate (1.5 kg / ha). Four soil treatments were tried: control (T0), treated (T1), homogenized treated (T2) and sterilized treated (T3) treatment. After 24 and 96 hours of application, the lixiviated liquid was obtained adding distilled water. A germination bioassay with lettuce seeds was carried out using Petri boxes with filter paper wet in lixiviated liquid, obtained from every treatment, in the bottom and a control treatment with distilled water. Five repetitions of 20 seeds each for every treatment were done and they were put in growth chamber

at 23°C. Four days after sowing, root length was measured with digital caliper. ANOVA was done and Duncan test was applied (α 0.05). Indirect assays were effective to detect glyphosate in soil samples using germination bioassays. T3

showed the least root growth. Depth factor of sample extraction was not significant.

KEYWORDS: glyphosate, soil samples, lixiviated liquid, germination assays.

1. Introducción

Es conocida la importancia del glifosato en los sistemas agrícolas y los beneficios que ha producido y produce en el sector agropecuario. Pero también ha crecido en importancia la alarma y expresiones contrarias a su uso, basadas en su supuesta toxicidad y persistencia en los ecosistemas.

El riesgo de lixiviación de glifosato es generalmente considerado muy bajo, principalmente porque varios estudios han demostrado que es biodegradable, fuertemente adsorbido en suelos y degradado por microorganismos (1, 2). Esto determina una escasa movilidad tanto del glifosato como de su principal metabolito, el ácido amino metil fosónico (AMPA). Sin embargo, otras investigaciones realizadas en suelos con distintas características muestran que el glifosato no es tan inmóvil ni se degrada tan rápidamente (3).

Estudios de lixiviación y escurrimiento indican que el glifosato puede ser transportado hacia las capas profundas del suelo debido al flujo preferencial por macroporos o hacia cursos de agua superficiales cuando su aplicación se realiza en momentos anteriores a lluvias intensas (4, 5, 6, 7, 8). Investigadores de la Universidad Nacional de La Plata sostuvieron que las lluvias disminuyen la concentración de glifosato en el suelo pero al mismo tiempo lo transportan a los arroyos aguas abajo (3).

Por ello, la permanencia del glifosato en el suelo es relativa, y depende además de las características físicas y químicas del mismo. Diversas investigaciones han comprobado además un porcentaje de desorción de glifosato, lo cual es importante ya que si es lixiviado existiría menor posibilidad de que sea degradado y aumentaría el riesgo de contaminación (9).

Existen métodos analíticos por cromatografía, que permiten detectar residuos de glifosato y su metabolito (AMPA), pero esta técnica resulta costosa, por lo cual se hace necesario identificar y validar técnicas alternativas, más económicas y sencillas que resulten igualmente sensibles para la detección de residuos de glifosato en suelos y aguas (10).

La Ecotoxicología es un término usado para describir el estudio de los efectos adversos, sobre los organismos de un ecosistema, que las sustancias químicas pueden ocasionar cuando son liberadas en el ambiente. Dentro de los estudios de ecotoxicidad se realizan las pruebas de toxicidad biológica o bioensayos, en las cuales se exponen los organismos a diferentes matrices ambientales conteniendo la sustancia a probar y se evalúan los efectos del medio sobre la sobrevivencia, crecimiento, reproducción, comportamiento y otros atributos del organismo ensayado (11). Los

bioensayos con plantas indicadoras para la detección de residuos de herbicidas son por lo tanto una posibilidad (12).

Según Forero *et al.* en 2004 (10), mediante detecciones por cromatografía (HPLC) se puede determinar la cantidad total del herbicida en una muestra (fracción biodisponible y no disponible) y mediante los bioensayos se puede detectar la disponibilidad del compuesto que puede ser tomado por el organismo indicador (fracción biodisponible). De allí la importancia de utilizar los bioensayos como método económico y práctico para la detección del herbicida.

Aunque se ha avanzado mucho en el estudio de la acción del glifosato sobre las malezas y su inocuidad para el cultivo transgénico, la comprensión de sus vías de degradación ambientales (persistencia y destino después de cumplir con su efecto fitotóxico) permanece incompleta.

Este trabajo tuvo como objetivos detec-

tar toxicidad por glifosato en el lixiviado de muestras de suelo mediante bioensayos de germinación y evaluar el efecto de la profundidad de extracción de muestras de suelo en la biodisponibilidad de glifosato en el líquido lixiviado.

2. Materiales y métodos

2.1. Muestras de suelo y lixiviado

Cincuenta muestras de suelo de un lote agrícola del Dpto. Diamante (Entre Ríos) fueron extraídas luego de la cosecha de trigo y previo a la aplicación de glifosato para la siembra de soja (Fig. 1). Las mismas se tomaron en la media loma a dos profundidades (4 y 8 cm) con muestreador manual de 7 cm de diámetro y 12 cm de altura, con dispositivo retráctil expulsor de la muestra y se colocaron inmediatamente en macetas plásticas sopladas n° 8 (7 cm de diámetro y 9 de profundidad), cuidando de no modificar el perfil.

Figura 1. Lote agrícola de donde se obtuvieron las muestras de suelo luego de la cosecha de trigo.



En laboratorio 20 muestras de cada profundidad se mantuvieron húmedas con agua destilada hasta su procesamiento. Las 5 muestras restantes de cada profundidad se apartaron para que se sequen totalmente en forma natural. Cuando estas macetas estuvieron totalmente secas se utilizaron para obtener el volumen neces-

ario de agua para llevar este suelo a Capacidad de Campo (CC). Para esto se pesaron individualmente en seco y se registró el dato. Se agregó en cada una un volumen de agua destilada conocido y se midió el volumen percolado. Una vez que las macetas no percolaron más se pesaron nuevamente (Tabla 1).

Tabla 1. Determinación de la capacidad de campo (CC) en muestras de suelo en contenedor, a 4 y 8 cm de profundidad. El agua retenida indica la CC.

	PS (g)	PCC (g)	ΔP (g)	Va (ml)	Vp (ml)	Agua retenida (ml)
4 cm	117,3	175,0	57,7	69,0	11,4	57,6
8 cm	234,6	328,5	93,9	104,0	10,0	94,0

PS: peso suelo seco. PCC: Peso suelo a CC.

Va: volumen de agua destilada agregada. Vp: volumen de agua destilada percolada.

A partir de este ensayo preliminar (Tabla 1) se pudo establecer que las muestras secas a 4 cm de profundidad se llevan a CC con aproximadamente 60 ml de agua destilada y para el caso de 8 cm de profundidad se requieren aproximadamente 95 ml.

Una vez obtenido este dato, sobre las mismas macetas se aplicó un método de extracción o percolado *Pour Thru* (13) con el cual se recolectan 50 ml de lixiviado de un suelo o sustrato saturado. A las macetas con muestras de suelo saturado a 4 cm de profundidad fue necesario agregarles aproximadamente 60 ml de agua destilada para que percole un volumen de 50 ml. A las muestras a 8 cm hubo que incorporarles aproximadamente 65–70 ml de agua destilada para obtener el volumen de lixiviado requerido por la técnica.

Las macetas que se mantuvieron húmedas desde su extracción en el campo se rotularon de la siguiente manera: 4T0, 4T1, 4T2, 4T3 para las muestras de 4 cm de profundidad y 8T0, 8T1, 8T2, 8T3 para las muestras de 8 cm. Para cada tratamiento (Tabla 2) se realizaron cinco repeticiones (1 repetición = 1 maceta).

Tabla 2. Detalle de los tratamientos realizados.

Nomenclatura	Tratamientos
T0	Suelo testigo
T1	Suelo tratado
T2	Suelo homogeneizado tratado
T3	Suelo esterilizado tratado

Para homogeneizar el suelo del tratamiento 2 (T2) se vació el contenido de cada maceta por separado en un mortero. Se desintegraron los terrones, se mezcló con ayuda de una cuchara para homogeneizar y se volvió a colocar el contenido en cada maceta.

En el tratamiento T3 se esterilizó el suelo en autoclave a 1,1 atm durante 20 minutos. Para esto se utilizaron frascos de vidrio de diferentes tamaños tapados con papel aluminio. Antes de colocar el suelo en los frascos se regó a CC con agua destilada (pH corregido en 7).

Una vez esterilizadas y frías, las muestras fueron colocadas en macetas limpias debidamente rotuladas.

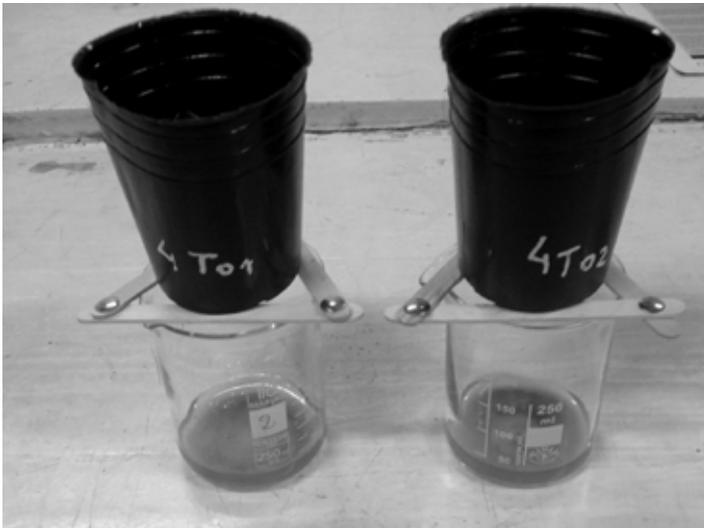
Las macetas con muestras de suelo a CC (de 4 y 8 cm) de los tratamientos T1, T2 y T3 fueron distribuidas al azar en una bandeja plástica para realizar la aplicación del herbicida con pulverizador manual. El pro-

ducto utilizado fue un formulado granulado de Sal monoamónica de N-fosfonometil glicina (glifosato): 78 g (Equivalente ácido glifosato: 71,2 g/100 g). La dosis utilizada fue la que más comúnmente se utiliza a campo: 1,5 kg/ha.

A las 24 horas desde la aplicación (HDA) se realizó el riego de cada maceta para obtener el volumen percolado mediante el método de extracción explicado anteriormente. Para esto se confeccionó un dispositivo para poder apoyar las macetas y así conseguir los 50 ml de lixiviado (Fig. 2). A las 96 horas desde la aplicación se realizó el mismo procedimiento que a las 24 HDA, utilizándose las mismas macetas para obtener los lixiviados.

Al lixiviado de cada maceta se le midió pH y conductividad eléctrica, datos que se utilizaron luego para hacer un promedio de cada tratamiento a las 24 y 96 HDA.

Figura 2. Dispositivo experimental para obtener el percolado.



2.2. Bioensayos de germinación

La germinación en placa de petri está muy generalizada, si bien otros métodos también son utilizados como el ensayo en arena impregnada con los extractos (14) y el ensayo directo sobre el sustrato previamente humectado (15, 16, 17). Los ensayos indirectos consisten en germinar semillas en papel de filtro impregnado con los extractos acuosos del material objeto de estudio (18, 19, 20).

El bioensayo de germinación fue realizado con semillas de lechuga pregerminadas en papel humedecido con agua destilada durante 24 horas en cámara de crecimiento a 23 °C.

Del percolado obtenido de cada maceta se extrajo una alícuota de 3 ml que se utilizó para humedecer el papel de filtro colocado en la base de cada caja de Petri de 9 cm de diámetro correspondiente a cada tratamiento y repetición.

Se montó también un testigo con agua destilada con 10 repeticiones para utilizarlo como control negativo.

Luego se procedió a la siembra colocando 20 semillas pregerminadas por caja. Se taparon y llevaron a cámara de crecimiento a 23 °C. A los 4 días desde la siembra se midió la longitud radical con un calibre digital ($\pm 0,01$).

3. Análisis de datos

Se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo factorial $2 \times 2 \times 4$, siendo los factores: Profundidad (Prof) con dos niveles; 4 y 8 cm. Horas desde la aplicación (HDA) con dos niveles; 24 y 96 y Tratamientos realizados sobre las muestras de suelo (Trat) con cuatro niveles; T0, T1, T2 y T3.

Se realizó ANOVA y prueba de supuestos para verificar la normalidad de los datos (Shapiro Wilks) y homogeneidad de varianzas. Se utilizó la prueba de intervalos múltiples de Duncan con un nivel de confianza del 95 % mediante el software estadístico InfoStat (21).

4. Resultados

Los valores de pH estuvieron en un rango de 5,90 y 6,72 en los momentos y profundidades evaluadas. No se observaron cambios significativos de pH en los tratamientos a las 24 y 96 HDA (Tabla 3).

Con respecto a la conductividad eléctrica (CE), se observó una disminución importante en los tratamientos T2 y T3 a los 4 y 8 cm de profundidad y en ambos momentos evaluados (Tabla 3). Esta diferencia podría deberse a que en ambos casos el agua destilada agregada en las muestras para obtener el lixiviado percoló a mayor velocidad, razón por la cual no se realizó un arrastre uniforme y por ello se produjo la disminución de CE.

En los ensayos con lixiviados extraídos a las 24 horas desde la aplicación se puede observar la diferencia de longitud radical que existe entre tratamientos. No se advierte diferencia entre las profundidades evaluadas, dentro de un mismo tratamiento (Figuras 3a y 4).

A las 96 HDA se ve un mayor crecimiento de la raíz en todos los tratamientos al compararlos con el ensayo de 24 HDA. Las longitudes radicales tienden a equipararse entre tratamientos (Figuras 3b y 5).

La longitud radical del testigo agua destilada fue mayor (32,99 mm) que en los tratamientos con lixiviados.

Tabla 3. Valores promedios de pH y conductividad eléctrica (CE) para cada tratamiento y profundidad de suelo a las 24 horas después de la aplicación del producto herbicida.

Profundidad	Tratamientos	24 HDA		96 HDA	
		pH	CE ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	pH	CE ($\mu\text{S}/\text{cm}$)
4 cm	T0	5,90	234	5,90	234
	T1	6,08	318	6,20	298
	T2	5,96	176	6,04	68
	T3	6,38	168	6,72	65
8cm	T0	5,92	239	5,92	239
	T1	5,92	306	5,94	215
	T2	6,05	546	5,95	228
	T3	6,42	230	6,51	138

Figura 3. Longitud radical (mm) de plántulas de lechuga creciendo en lixiviados de muestras de suelo de 4 y 8 cm de profundidad: a) a las 24 horas después de la aplicación del herbicida y b) a las 96 horas después de la aplicación. El testigo agua destilada registró un valor promedio de 32,99 mm, superior a los tratamientos.

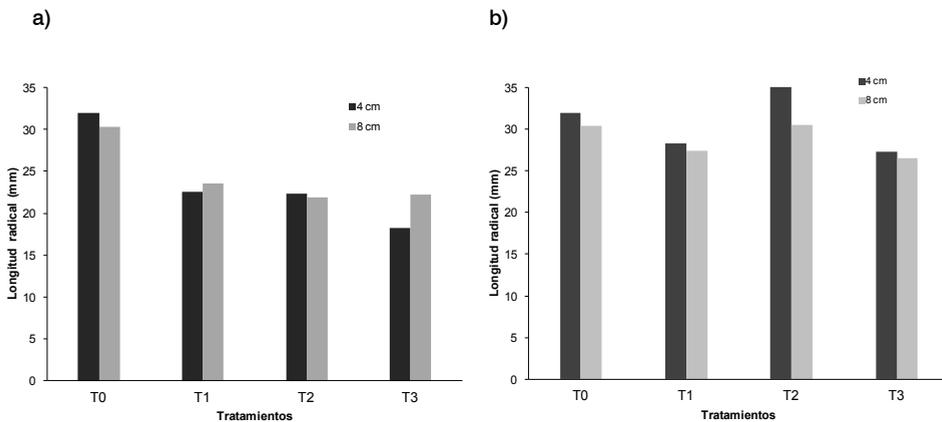


Figura 4. Plántulas de lechuga luego de la exposición a lixiviados de muestras de suelo de 4 cm de profundidad a las 24 horas después de la aplicación, en los cuatro tratamientos (T).

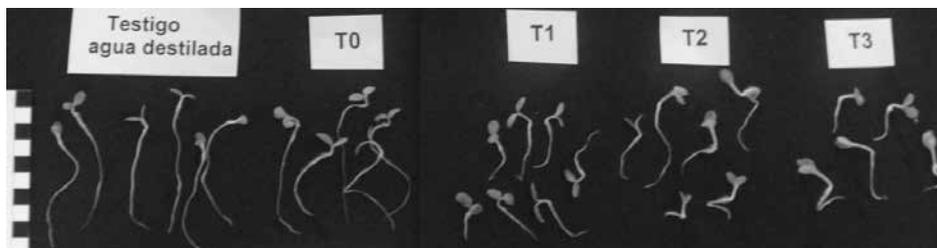
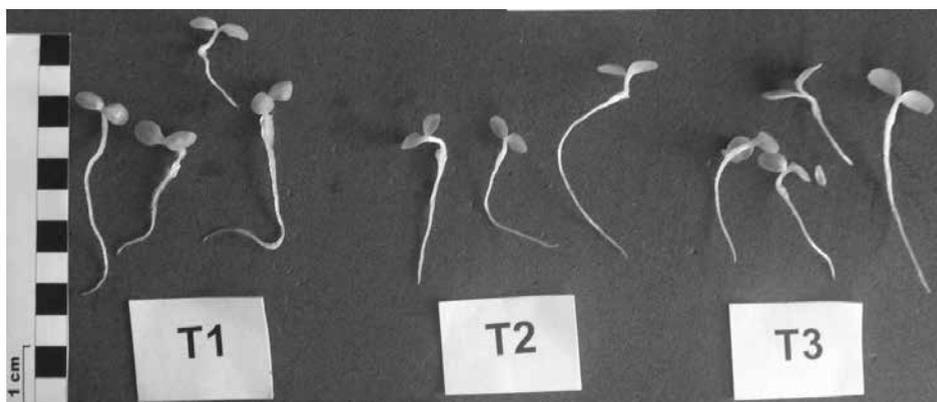


Figura 5. Plántulas de lechuga luego de la exposición a lixiviados de muestras de suelo de 4 cm de profundidad a las 96 horas después de la aplicación, en los cuatro tratamientos (T).



Respecto a la longitud radical (Tabla 4), se observa que no es significativa la interacción entre la profundidad a la que se extraiga la muestra y las horas desde la aplicación (Prof*HDA). Tampoco es significativa la interacción entre la profundidad a la que se extraiga la muestra y los tratamientos que se le apliquen a las mismas (Prof*Trat).

En cuanto a la interacción HDA*Trat se observa que es estadísticamente sig-

nificativa. Es decir que la longitud radical depende de la combinación HDA y Trat, por lo que es conveniente realizar pruebas de diferencias de medias entre horas desde la aplicación para un mismo tratamiento de suelo (o diferencia de medias entre tratamientos a 24 HDA y luego a 96 HDA).

La interacción triple Prof*HDA*Trat no muestra diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 4. Cuadro de análisis de variancia para la variable longitud radical y las interacciones del modelo. Estadísticos del modelo: N= 76; r^2 0,50; CV (%) 18,83; F (4,0) y p (0,0001).

FV	SC	gl	CM	F	Valor-p
Modelo	1523,03	15	101,54	4,00	0,0001
Prof	7,70	1	7,70	0,30	0,5838
HDA	583,33	1	583,33	22,99	<0,0001
Trat	576,31	3	192,10	7,57	0,0002
Prof*HDA	35,72	1	35,72	1,41	0,2401
Prof*Trat	47,27	3	15,76	0,62	0,6041
HDA*Trat	277,56	3	92,52	3,65	0,0175
Prof*HDA*Trat	17,28	3	5,76	0,23	0,8772
Error	1522,16	60	25,37		
Total	3045,18	75			

Referencias: Prof, profundidad; HDA, horas desde la aplicación; Trat, tratamientos.

Si se examina la significación de los efectos principales (Tabla 4) no resulta significativa la profundidad a la que se extraiga la muestra. Si fue significativo el efecto de

las horas transcurridas desde la aplicación (HDA) y de los tratamientos empleados (Trat) sobre la longitud radical.

Tabla 5. Pruebas de comparaciones múltiples de Duncan ($\alpha=0,05$) para la interacción tratamientos (Trat) x horas desde la aplicación del producto herbicida (HDA).

HDA	Trat	Medias	n	E.E.				
24	T3	20,25	9	1,69	A			
24	T2	22,09	10	1,59	A	B		
24	T1	23,09	10	1,59	A	B	C	
96	T3	26,90	10	1,59		B	C	D
96	T1	27,86	10	1,59			C	D
24	T0	31,15	9	1,69				D E
96	T0	31,15	9	1,69				D E
96	T2	32,93	9	1,69				E

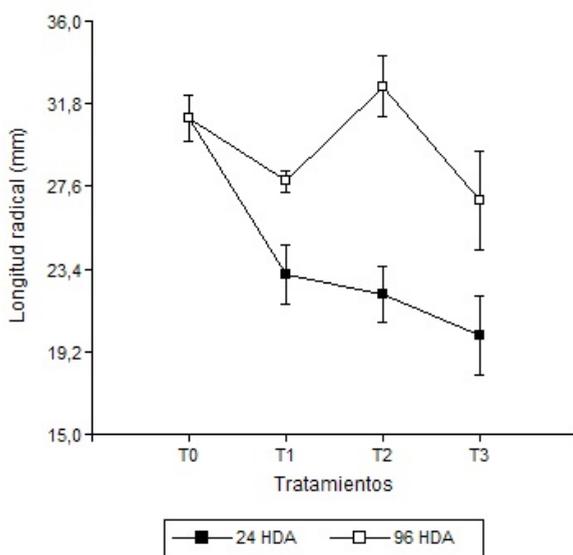
Medias con una letra común no son significativamente diferente ($p < 0,05$)

Analizando la información de la Tabla 5 y sus valores medios (Figura 6) se puede decir que T0 y T1 no presentan diferencias estadísticamente significativas en la longitud radicular entre 24 y 96 HDA. El T2 presenta diferencias significativas entre los dos momentos de observación y a las 96

HDA creció más, y el T3 presenta diferencias estadísticamente significativas entre 24 y 96 HDA.

Para 24 HDA (Fig. 7), el T0 difiere significativamente de T1, T2 y T3. Para 96 HDA T2 difiere significativamente de los demás tratamientos.

Figura 6. Promedios de longitud radical, según tratamientos (T) para 24 y 96 horas después de la aplicación.



El tratamiento T0 es el suelo testigo sin aplicación de herbicida por lo que no varía su crecimiento entre los momentos evaluados después de la aplicación. El tratamiento control, realizado con papel de filtro y agua destilada (sin suelo), tuvo un crecimiento similar al T0 (32,99 vs 31,14 mm, respectivamente) no presentando diferencias significativas, lo cual indicaría que el extracto de suelo no tuvo aportes significativos de nutrientes que mejoraran el crecimiento radical como podría esperarse.

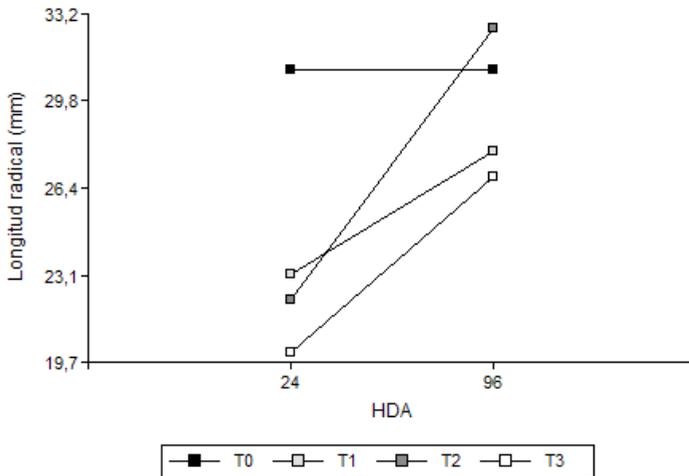
En el tratamiento T1 (suelo tratado con glifosato sin modificación de su perfil) y T2 (suelo homogeneizado tratado) se ven crecimientos radicales diferentes al comparar 24 y 96 horas desde la aplicación. En el caso de T1 la diferencia en crecimiento fue del 17 % pero no fue estadísticamente significativo. En T2 hubo diferencias significativas entre los dos momentos ensayados y a las 96 HDA creció un 33 % más. El mayor crecimiento registrado en T2 a las 96 HDA pudo deberse a que en el tiempo transcurrido,

hubo degradación del producto, por lo cual se colectó menos cantidad en el lixiviado y la respuesta al crecimiento fue mayor.

De todos los tratamientos evaluados se observó que en el que menos crecieron las raíces de lechuga fue en el T3. Las muestras en este tratamiento fueron esterilizadas antes de la aplicación. Con esto se pretendía eliminar los microorganismos de suelo

que, según la bibliografía (1, 2), son uno de los principales agentes que inmovilizan y degradan el glifosato y su metabolito. Las diferencias en el crecimiento de la raíz entre los momentos ensayados fueron estadísticamente significativas y de menor valor respecto al resto de los tratamientos, lo cual indicaría que en el suelo quedó más producto herbicida sin degradar.

Figura 7. Promedios de longitud radical, según horas de aplicación (HDA) para cada tratamiento (T).



5. Conclusiones

Los ensayos indirectos, como método extractivo de lixiviado, fueron efectivos para detectar toxicidad por glifosato en muestras de suelo mediante la técnica de bioensayos de germinación.

Como las interacciones que incluyen el factor profundidad de extracción de la muestra no fueron significativas, se podría eliminar este factor en futuros ensayos ya que no tiene influencia estadísticamente significativa en los resultados.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por la Universidad Nacional de Entre Ríos a través del PID–Novel 2151 y constituye resultados parciales de la Tesis Doctoral en realización de la primera autora.

Referencias bibliográficas

1. De Jonge, H., 1999. Influence of pH and solution composition on the sorption of glyphosate and prochloraz to a sandy loam soil. *Chemosphere* **39**:753–763.
2. Aamand, J.; Jacobsen, O. S., 2001. Sorption

- and degradation of glyphosate and dichlobenil in fractured clay. En: A. Walker (Ed.) "Pesticide behaviour in soils and water" pp. 205–210. Proceedings of a Symposium organized by the British Crop Protection Council, Brighton, UK, 13–15 November 2001.
3. UNL, Universidad Nacional del Litoral. 2010. Glifosato: lo que hay que saber. *Rev. Conciencia*, Nº 20. Diciembre 2010, 23 pp.
 4. Petersen, C. T.; Holm, J.; Koch, C. B.; Jensen, H. E.; Hansen, S., 2002. Movement of pendimethalin, ioxynil and soil particles to field drainage tiles. *Pest Manag. Sci.*, **59**:85–96.
 5. Jaynes, D. B., Ahmed, S. I., Kung, J. S.; Kanwar, R. S., 2001. Temporal dynamics for preferential flow to a subsurface drain. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **65**:1368–1376.
 6. Elliott, J. A.; Cesna, A. J.; Best, K. B.; Nicholaichuk, W.; Tollefson, L. C., 2000. Leaching rates and preferential flow of selected herbicides through tilled and untilled soil. *J. Environ. Qual.*, **29**:1650–1656.
 7. Villholth, K. G.; Jarvis, N. J., Jacobson, O. H.; De Jonge, H., 2000. Field investigations and modelling of particle-facilitated pesticide transport in macroporous soil. *J. Environ. Qual.*, **29**:1298–1309.
 8. Flury, M., 1996. Experimental evidence of transport of pesticides through field soils a review. *J. Environ. Qual.*, **25**:25–45.
 9. Maitre, M.; Lorenzatti, E.; Lenardon, M.; Enrique, S., 2010. Análisis de residuos de glifosato en muestras ambientales y alimentos. Taller aspectos ambientales del uso de glifosato: pp. 27–30.
 10. Forero, C. V.; Rodríguez, P. E.; Fuentes, C. L., 2004. Detección de residuos biodisponibles de glifosato en aguas y suelos: Optimización de una técnica de bioensayo con plantas indicadoras. *Agronomía Colombiana*, **22**(1):63–73.
 11. Holloway, G.; Croker, H.; Callaghan, A., 1997. The effects of novel and stressful environments on trait distribution, *Functional Ecology*, **11**:579–584.
 12. Günther, P.; Rahman, A.; Pestemer, W., 1989. Quantitative bioassay for determining residues and availability to plants of sulphonylurea herbicides. *Weed Research*, **29**:141–146.
 13. Torres, P. A.; Camberato, D.; Lopez, R. G.; Mickelbart, M., 2012. Medición de pH y Conductividad Eléctrica en Sustratos. Purdue Extension HO-237-SW. Purdue University. Indiana, USA. 10 pp.
 14. Haugland E.; Brandsaeter, L. O., 1996. Experiments on bioassays sensitivity in the study of allelopathy. *Journal of Chemical Ecology*, **22**:1845–1859.
 15. Handreck, K.; Black, N. D., 1994. "Growing media for ornamental plants and turf". Ed. Randwick, N. S. W.: New South Wales University Press, Sydney. 448 pp.
 16. Murillo, J. M.; Cabrera, F.; López, R.; Martín Olmedo, P., 1995. Testing low-quality urban composts for agriculture: germination and seedling performance of plants. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, **54**, (1–2):127–135.
 17. Warman, P. R., 1999. Evaluation of seed germination and growth test for assessing compost maturity. *Compost Science & Utilization*, **7**(3):33–37.
 18. Zucconi, F.; Forte, M.; Mónaco, A.; De Bertoldi, M., 1981 Biological evaluation of compost maturity. *BioCycle* **22**:27–29.
 19. Zucconi, F.; Pera, A.; Forte, M.; De Bertoldi, M., 1981 Evaluating toxicity of immature compost. *BioCycle* **22**:54–57.
 20. Ortega, M. C.; Aguado, M. T.; Ordovas J.; Moreno, M. T.; Carmona, E., 2000. Propuesta de bioensayos para detectar factores fitotóxicos em sustratos y enmiendas. *Actas de Horticultura*, **32**:363–376.
 21. Di Rienzo, J. A.; Casanoves, F.; Balzarini, M. G.; Gonzalez, L.; Tablada, M.; Robledo, C. W., 2008. InfoStat, versión 2012, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba. Argentina.