

BIODISPONIBILIDAD DE PLOMO Y CADMIO EN SEDIMENTOS DRAGADOS DEL RÍO MATANZA Y EVALUACIÓN DE MÉTODOS GEOQUÍMICOS PARA SU ESTIMACIÓN

A. RENDINA; A.F. DE IORIO; M.J. BARROS; M. BARGIELA; J.P. BRICHTA;
A. DE LOS RÍOS y Z. PREMUZIC¹

Recibido: 17/02/04

Aceptado: 29/03/04

RESUMEN

En este trabajo se determinó la biodisponibilidad de cadmio y plomo en sedimentos dragados del río Matanza midiendo la acumulación de estos metales en los tejidos de la lombriz *Eisenia fetida*. Se evaluó la aplicación de métodos simples de extracción de cadmio y plomo, como medidas indirectas de su biodisponibilidad. La concentración de ambos metales aumentó en los tejidos de *Eisenia fetida* acorde con las mayores concentraciones en el sedimento; sin embargo, los coeficientes de bioacumulación sólo fueron mayores que la unidad para los tratamientos con adición de 5, 10 y 25 mg de Cd/kg de sedimento. El fraccionamiento de los metales por el método de Tessier mostró que la principal forma de cadmio presente en el sedimento fue la intercambiable para todos los tratamientos, mientras que las formas de plomo, variaron según la dosis del metal agregada. Las concentraciones de los metales extractados del sedimento con MgCl₂, EDTA y DTPA se relacionaron con la bioacumulación en los tejidos de *Eisenia fetida*, indicando que pueden utilizarse como indicadores de la fracción biodisponible de Cd y Pb en los sedimentos.

Palabras clave. *Eisenia fetida*, cadmio, plomo, bioacumulación, sedimentos dragados, métodos extractantes.

BIOAVAILABILITY OF CADMIUM AND LEAD IN DREDGED SEDIMENTS OF THE MATANZA RIVER AND EVALUATION OF GEOCHEMICAL METHODS FOR ITS ESTIMATION

SUMMARY

In this work the bioavailability of cadmium and lead in dredged sediments of the Matanza river was determined by measuring the bioaccumulation of these metals in the earthworm *Eisenia fetida*. The application of extraction methods for cadmium and lead was evaluated as indirect measures of their bioavailability. The concentration of both metals in tissues of *Eisenia fetida* increased with the augmentation of their concentrations in the sediments, nevertheless the bioaccumulation coefficients were greater than the unit only for the treatments with addition of 5, 10 and 25 mg of Cd/kg of sediment. The metal fractionation according to Tessier method showed that for all treatments the main form of cadmium present in the sediment was the exchangeable one, while the forms of lead depended on the dose of the added metal. The metal concentrations extracted from the sediment with MgCl₂, EDTA and DTPA were related with the bioaccumulation in tissues of *Eisenia fetida*, suggesting that they can be used as indicators of the bioavailable fraction of Cd and Pb in the sediments.

Key words. *Eisenia fetida*, bioaccumulation, cadmium, lead, dredged sediments, extracting methods.

INTRODUCCIÓN

Hay dos procedimientos para estudiar efectos no letales en organismos por metales pesados presentes en suelos o sedimentos: (i) técnicas geoquímicas, las cuales proporcionan evidencia indirecta de la dispo-

nibilidad de los metales para los organismos y (ii) métodos de campo o laboratorio utilizando bioindicadores (Ej.: plantas, invertebrados) en los cuales, los resultados de la biodisponibilidad, están basados en la concentración del metal en el tejido por exposición

¹Cátedra de Química Analítica, Departamento de Recursos Naturales y Ambiente, FAUBA. Av. San Martín 4453 (1417) Buenos Aires - Argentina

de los organismos a suelos contaminados, sedimentos o efluentes por un período de tiempo establecido.

Las lombrices están entre los principales componentes de la biomasa del suelo y tienen un importante rol al mantener su estructura y fertilidad (Edwards y Lofty, 1977; Barber *et al.*, 1998). Debido a estas características han sido adoptadas como organismos indicadores para determinar impactos potenciales de muchos metales pesados (Gish y Christensen, 1973; Ireland, 1983; Abdul Rida, 1997). Se han desarrollado tests estandarizados para cuantificar los efectos letales y subletales sobre las lombrices (OECD, 2000). Sin embargo, debido a la estandarización, se ha dado poca atención a los factores que modulan la disponibilidad de los metales (Peijnenburg *et al.*, 1999). Se ha demostrado que las formas, más que la concentración total del metal, ejercen control sobre la biodisponibilidad y toxicidad de plomo a las lombrices (Davies *et al.*, 2002).

Debido a que los efectos ecológicos de los metales pesados en suelos y sedimentos están estrechamente relacionados con su concentración y distribución de especies en las fases sólida y líquida (Singh *et al.*, 1996), un método químico, mediante el cual se determine la disponibilidad del metal, sin involucrar organismos y bien relacionado con la biodisponibilidad puede ser extremadamente útil, al ser de bajo costo e insumir menos tiempo que los bioensayos.

Los métodos geoquímicos, tales como las extracciones químicas simples con soluciones acuosas de sales, ácidos o agentes quelantes sintéticos (McLaren y Crawford, 1973; Conder y Lanno, 2000) pueden proveer una indicación indirecta de la biodisponibilidad. Dado que las formas de los metales en suelos y sedimentos influyen en la extensión en la cual ellos son biodisponibles, la especiación puede proveer información que ayuda a explicar los resultados de los estudios de biodisponibilidad de metales a receptores ecológicos. Las formas de los metales traza en suelos y sedimentos se pueden conocer mediante la aplicación de métodos de extracción química secuencial, entre los cuales el más utilizado es el de Tessier *et al.* (1979).

Como la biodisponibilidad de metales en sistemas acuáticos y terrestres es dependiente, tanto de factores geoquímicos como biológicos, el uso de medidas indirectas de la biodisponibilidad requiere estudios previos, en los cuales se correlacione la acumulación de metales en los tejidos con las con-

centraciones de metales extractados por los diversos métodos de extracción selectivos (Cook y Hendershot, 1996).

El curso medio del río Matanza presenta un creciente deterioro en la calidad del agua y afecta los humedales por las periódicas inundaciones. Esta situación plantea la necesidad de implementar alternativas de remediación entre las que, el dragado de los sedimentos y su deposición sobre los suelos aledaños, constituye una posibilidad, tal como se ha realizado en otras cuencas (Ej.: del río Reconquista), pero cuyos efectos deben valorarse sobre el ecosistema y la salud humana.

Los objetivos de este trabajo fueron: 1) evaluar la biodisponibilidad de Cd (cadmio) y Pb (plomo) en sedimentos dragados contaminados artificialmente con estos metales, utilizando la lombriz *Eisenia fetida* como organismo indicador, 2) determinar las formas de los metales en el sedimento mediante la extracción secuencial de Tessier *et al.* (1979) y 3) evaluar si la fracción de los metales pesados en sedimentos extractada con $MgCl_2$, DTPA y EDTA pueden ser utilizadas como medidas indirectas de la biodisponibilidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Una muestra de sedimento dragado del curso medio del río Matanza fue usada para la realización de este trabajo. Las principales características físicas y químicas del material dragado se muestran en el Cuadro N° 1.

CUADRO N° 1. Características físicas y químicas del material dragado

pH	6,5
CIC (cmolc kg ⁻¹)	55,0
COT %	5,8
Arena %	31,0
Limo %	40,1
Arcilla %	28,9
Plomo (mg kg ⁻¹)	42,0
Cadmio (mg kg ⁻¹)	1,5
Carbonato de Calcio %	9,7

Ensayos de bioacumulación

El ensayo se llevó a cabo según el protocolo establecido por la OECD (2000), reemplazando el sustrato

artificial OECD (70% de arena, 20% de arcilla y 10% de materia orgánica) por sedimento dragado del río Matanza. El mismo se secó a 40 °C y tamizado por malla plástica de 2 mm. Una solución de nitrato de plomo fue agregada a submuestras de 500 g de sedimento para obtener concentraciones de 100, 200 y 300 mg Pb/kg sedimento (T1, T2, T3, respectivamente). El mismo procedimiento se utilizó con solución de nitrato de cadmio para obtener concentraciones de 5, 10 y 25 mg Cd/kg sedimento (T1, T2 y T3, respectivamente). Se utilizaron 4 replicados de cada concentración y 4 controles (To) preparados de igual manera que los anteriores pero sin agregado de plomo ni cadmio.

El sedimento adicionado con plomo o cadmio, se dejó equilibrar durante 7 días antes de agregar las lombrices (10 lombrices por replicado). Se utilizaron lombrices adultas (*Eisenia fetida*) que pesaron $0,320 \pm 0,100$ g en promedio. Antes de su incorporación, las lombrices se lavaron previamente con agua destilada y se colocaron sobre papel hasta eliminar el exceso de agua.

Durante el ensayo que duró 28 días, la humedad se mantuvo a 70% por adición de agua destilada, y la temperatura fue de 20 ± 5 °C. Los recipientes se taparon con una red de nylon, para prevenir el escape de las lombrices. La mortalidad de los organismos se verificó semanalmente. Al término del período de exposición, las lombrices se separaron del material, se lavaron con agua destilada, se purgaron sobre papel y finalmente se pesaron.

Análisis del sedimento

Muestras de sedimento (3 submuestras por replicado) fueron tomadas a los 7 días de la incorporación del metal y en los controles antes de la incorporación de las lombrices, y a los 28 días después de la incorporación de las lombrices. Se tomaron tres submuestras de cada tratamiento para determinar plomo y cadmio extractable con: $MgCl_2$ (Tessier *et al.*, 1979), ácido dietilentetraaminopentaacético (DTPA) (Lindsay y Norwell, 1968) y ácido etilendiamintetraacético (EDTA) (Lindsay y Norwell, 1968).

Las formas de los metales en el sedimento se determinaron por la extracción química secuencial de Tessier *et al.*, (1979) (Cuadro N° 2).

La concentración de Pb y Cd en los extractos se determinaron por espectrometría de absorción atómica (AAS) con llama aire/acetileno (Perkin Elmer 1100B).

Análisis de las lombrices

Las concentraciones de plomo y cadmio en las lombrices fueron medidas al término del experimento. En cada replicado se tomaron cuatro lombrices, las que se sacrificaron y se trataron con ácido nítrico 69% (Singh *et al.*, 1996). El digesto se diluyó con agua destilada y las concentraciones de Pb y Cd fueron medidas por AAS.

CUADRO N° 2. Condiciones experimentales de las extracciones químicas simples y secuencial utilizadas.

Extracciones simples	
$MgCl_2$	1 g de sedimento + 16 ml de $MgCl_2$ 1M (pH=7), 1 h agitación continua a temperatura ambiente.
EDTA	10 g de sedimento + 20 ml de: EDTA disódico 0,05 M + $CaCl_2$ 0,01M + TEA 0,1M (pH=7), 30 minutos agitación continua a temperatura ambiente.
DTPA	20 g de sedimento + 40 ml de: DTPA 0,005M + $CaCl_2$ 0,01 M + TEA 0,1M (pH=7,3), 2 h agitación continua a temperatura ambiente.
Extracción secuencial	
Intercambiable (INT)	1 g de sedimento + 16 ml de $MgCl_2$ 1M (pH=7), 1 h agitación continua a temperatura ambiente.
Unido a carbonato (CARB)	16 ml de NaAcO 1M en HAcO (pH=5), 5 h agitación continua a temperatura ambiente.
Unido a óxidos amorfos de Fe y Mn (OX)	40 ml de $NH_2OH.HCl$ en HAcO 25%, 6 h a 95 °C agitación intermitente.
Unido a Materia Orgánica (MO)	HNO_3 0,02 M + 2 ml H_2O_2 30% (pH=2), 2 h 85 °C, agitación intermitente; 3 ml de H_2O_2 (pH=2), 3 h a 85 °C, agitación intermitente; 5 ml de NH_4AcO 3,2 M en HNO_3 20% + 7 ml de H_2O , 30 minutos, temperatura ambiente.
Residual (RES)	Digestión del residuo de la 4ª extracción con $HClO_4$ - HF

Análisis estadístico de los resultados

La comparación de la concentración de cada metal para los diferentes tratamientos se realizó mediante un ANOVA (análisis de varianza) a un criterio de clasificación. Las comparaciones a posteriori del ANOVA se realizaron usando el test de Tukey, a un nivel de significación de 0.05. Se calcularon los coeficientes de correlación para determinar relaciones significativas entre el nivel de los metales en el sustrato y la concentración de los metales en el tejido de *Eisenia fetida*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Acumulación de Cd y Pb en lombriz

En ningún tratamiento se observó mortalidad de lombrices durante el período de exposición. Al término del experimento (28 días) la biomasa promedio de los grupos expuestos a los tratamientos con Pb y Cd no difirió significativamente ($p > 0.05$) del control (sin adición de metales), indicando que en las condiciones del ensayo la presencia de Pb y Cd en el sedimento no tuvo efecto letal sobre los organismos. Similares resultados fueron encontrados por Reinecke *et al.* (1997). En cambio, Maboeta *et al.* (1999) encontraron que la exposición de *P. excavatus* al nitrato de plomo afectó negativamente su crecimiento en especímenes jóvenes.

Los coeficientes de bioacumulación (CBA) (cociente entre la concentración de metal en lombriz y la concentración del metal en el sustrato en el cual residen) fueron mayores que la unidad para el Cd en los tratamientos 1, 2 y 3, mientras que no hubo acumulación de plomo en *Eisenia fetida* en ninguno de los tratamientos (Figura 1).

La concentración de Pb y Cd en *Eisenia fetida* aumentó con el incremento de la concentración de Pb en el sedimento (Cuadro N° 3). Sin embargo, los bajos CBA calculados (menores que 1) sugieren que no hay un gran potencial de bioacumulación de Pb a ningún nivel de concentración ensayado, a pesar de la cantidad acumulada en tejidos.

Formas de Cd y Pb en el sedimento

La distribución de los metales pesados entre las fases del sedimento o suelo está relacionada con la movilidad y su biodisponibilidad. Por lo tanto la acumulación de metales en los tejidos de los organismos indicadores debería ser diferente entre suelos

CUADRO N° 3. Concentración de Pb y Cd en *Eisenia fetida*.

Tratamientos	mg Cd/kg lombriz*	mg Pb/kg lombriz*
To	0,09 ± 0,03 d	1,6 ± 0,3 c
T1	15,7 ± 2,1 c	5,0 ± 0,7 b
T2	21,0 ± 1,8 b	6,6 ± 1,0 b
T3	45,8 ± 3,2 a	14,4 ± 1,2 a

*base peso húmedo

Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$.)

o se-dimentos con distinta capacidad y fuerza de unir metales a su matriz.

Las únicas formas presentes de Cd en el sedimento original (To) son intercambiables y residual (Figura 2). Estos resultados coinciden con los encontrados en sedimentos del fondo del cauce de este río y arroyos de la cuenca, en los cuales no se encontró Cd unido a óxidos de Fe y Mn (Cd-OX) ni ligado a materia orgánica (Cd-MO) (Rendina, 2002). Resultados similares fueron obtenidos por Abrameto *et al.* (2000) en sedimentos del río Negro (Argentina).

El Cd agregado al sedimento fue retenido principalmente en forma intercambiable (Cd-INT), el porcentaje unido a esta fracción se incrementó con el aumento de la dosis de Cd agregada. El resto se distribuyó entre las fases carbonato (CARB), óxidos de Fe y Mn (OX) y materia orgánica (MO) en una proporción menor. En los tres tratamientos el patrón de distribución del Cd fue similar entre las fases no residuales, INT > OX > CARB > MO.

La fracción de Pb intercambiable (Pb-INT) disminuyó con el aumento de la dosis de Pb agregada (Figura 3), indicando que este metal fue retenido a bajas concentraciones (To y T1), principalmente, en formas intercambiables, mientras que a altas concentraciones (T2 y T3) aumentó significativamente la proporción de Pb en las fases carbonato, óxidos y materia orgánica. Estos resultados indican que, a diferencia del Cd, el patrón de distribución en el sedimento cambió drásticamente al variar la concentración de Pb.

Cadmio y Pb extractados con MgCl₂, EDTA y DTPA

La Figura 4 muestra la concentración de Cd extractado por MgCl₂, DTPA y EDTA. Los tres métodos extraen mayor concentración de Cd al

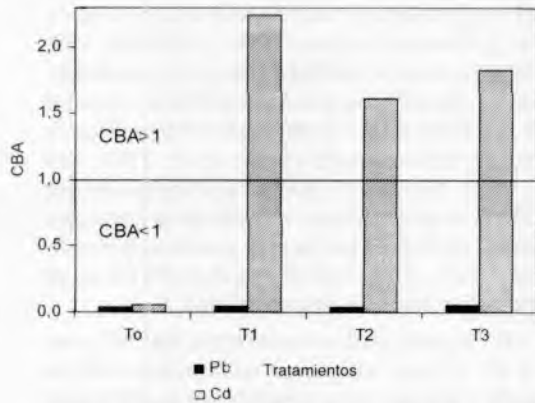


FIGURA 1. Coeficientes de bioacumulación (CBA) de Cd y Pb en *Eisenia fetida*.

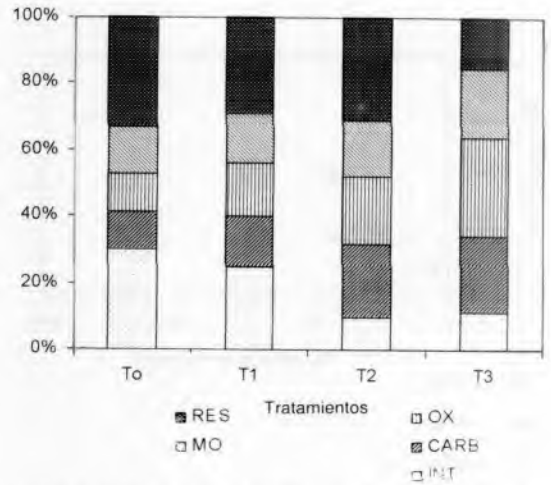


FIGURA 3. Distribución de las formas de Pb en el sedimento para los distintos tratamientos.

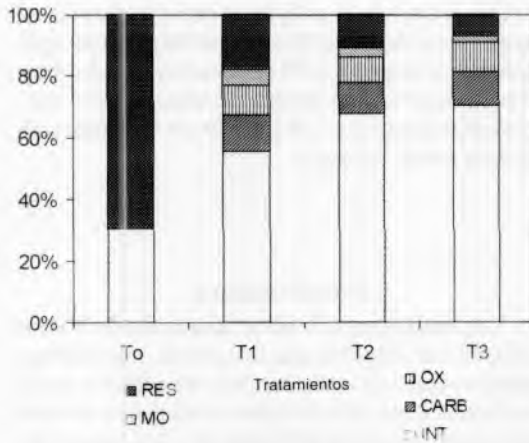


FIGURA 2. Patrón de distribución de las formas de Cd para los distintos tratamientos.

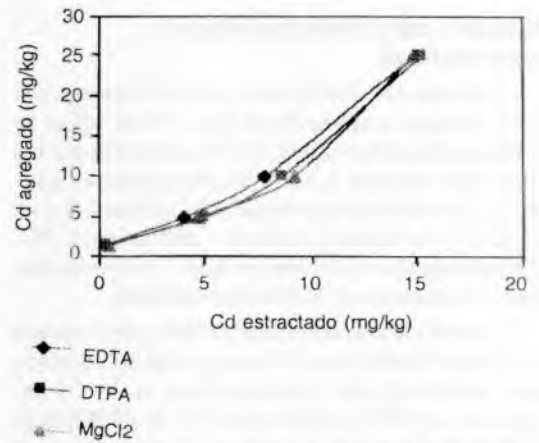


FIGURA 4. Cadmio extractado con MgCl₂, DTPA y EDTA.

aumentar la cantidad de Cd agregada, y no hay diferencias significativas ($p > 0,05$) entre métodos. Estos resultados son consistentes con las formas no residuales de Cd presentes en el suelo (Figura 2) determinadas por el fraccionamiento realizado, las que para todos los tratamientos y el control son principalmente las intercambiables. La poca abundancia de Cd unido a las fases carbonatos, óxidos y materia orgánica, indicaría que un gran porcentaje de Cd extractado con EDTA y DTPA sea proveniente de formas solubles e intercambiables.

La Figura 5 muestra la concentración de Pb extractada. Por los tres métodos la cantidad de Pb extractada incrementó con la cantidad de Pb agregado. Las concentraciones de Pb obtenidas con EDTA y DTPA son significativamente mayores ($p < 0,05$) que el Pb extractado con MgCl₂. Estos resultados difieren de los obtenidos con el Cd, debido a que el Pb se encuentra en el sedimento en formas potencialmente móviles (carbonatos, óxidos y materia orgánica), que son extractadas con EDTA y DTPA y no con el MgCl₂.

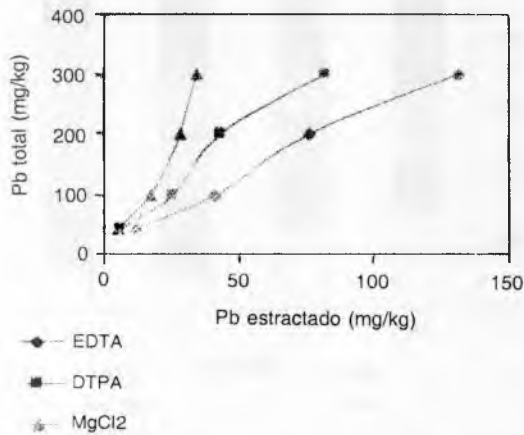


FIGURA 5. Plomo extraído con $MgCl_2$, DTPA y EDTA.

Relación entre biodisponibilidad y disponibilidad

El Cuadro N° 4 muestra la matriz de correlación entre la bioconcentración de Cd y Pb en tejido de lombriz y la cantidad de Cd y Pb extraída por los diferentes métodos. La correlación significativa entre el Cd en forma intercambiable (extracción con $MgCl_2$) y su concentración en lombriz ($r = 0,98$), indicaría que la extracción con $MgCl_2$ es una medida química indirecta de la biodisponibilidad.

Entre el Cd extraído con DTPA y el contenido de Cd en los tejidos de *Eisenia fetida* se encontró una correlación positiva significativa. El Cd extraído con DTPA explicó un 96% ($r = 0,99$) de la variabilidad de Cd en *Eisenia fetida*, mientras que el Cd extraído con EDTA explicó el 96% ($r = 0,99$) de la variabilidad de Cd en *Eisenia fetida*.

CUADRO N° 4. Matriz de correlación entre Cd y Pb en lombriz y Cd y Pb extraído por los diferentes métodos.

	Cd- $MgCl_2$	Cd-EDTA	Cd-DTPA
Cd lombriz	0,98*	0,99**	0,99**
	Pb- $MgCl_2$	Pb-EDTA	Pb-DTPA
Pb lombriz	0,91*	0,98*	0,99**

(*) $p < 0,05$ (**) $p < 0,01$ NS= no significativa

Entre la concentración de Pb intercambiable (extraído con $MgCl_2$) en el sedimento y su contenido en *Eisenia fetida* se observó una correlación lineal. El Pb extraído con DTPA explicó un 99% ($r = 0,99$) de la variabilidad de Pb en *Eisenia fetida*, mientras que el Pb extraído con EDTA explicó el 96% ($r = 0,98$) de la variabilidad de Pb en *Eisenia fetida*. Diversos autores (Singh *et al.*, 1996; van Raij, 1998; Maiz *et al.*, 2000) han encontrado que el DTPA es una eficiente medida de la biodisponibilidad de Pb para las plantas, mientras que otros (Merry *et al.*, 1986) indicaron que el DTPA es un pobre indicador de la disponibilidad.

Las diferencias observadas entre los CBA para Cd y Pb (Figura 1) pueden relacionarse con las diferentes formas de estos metales en el sedimento. Mediante la aplicación del fraccionamiento de Tessier se determinó que el Cd no residual se encuentra en el sedimento débilmente unido a la matriz por fuerzas electrostáticas (forma intercambiable), el cual se considera muy biodisponible para los organismos. En cambio, el Pb se encuentra unido al sedimento bajo formas menos biodisponibles y, consecuentemente, su acumulación en los tejidos de *Eisenia fetida* fue bajo.

CONCLUSIONES

Los coeficientes de bioacumulación del Cd resultaron ser mayores que la unidad, coincidentemente con una abundancia de formas lábiles de Cd en el sedimento. Este resultado indica una elevada movilidad y biodisponibilidad de Cd a *Eisenia fetida* y una potencial transferencia de este metal en la cadena trófica en las condiciones experimentales estudiadas. Para el Pb, los coeficientes de bioacumulación fueron bajos, lo cual podría relacionarse con la formación de complejos de esfera interna entre este metal y las fases óxidos y materia orgánica altamente estables.

El estudio de las relaciones entre los metales extraídos con electrolitos débiles o agentes quelantes sintéticos y la biodisponibilidad es necesaria para poder utilizar extracciones químicas como medidas de la disponibilidad de metales pesados en suelos o sedimentos. Los datos obtenidos en este trabajo indicaron que las extracciones simples de Pb y Cd con $MgCl_2$, DTPA y EDTA son buenos estimadores de la fracción disponible para el organismo indicador

utilizado. Para validar el uso de extracciones químicas y predecir así la acumulación o toxicidad de metales pesados en otros organismos que puedan colonizar sitios de disposición de materiales dragados, son necesarias investigaciones posteriores.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Tec. Agr. Mirabelli de la Cátedra de Zootología Agrícola (FAUBA) por proporcionar los bioindicadores utilizados en este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

- ABDUL RIDA A.M. and M.B. BOUCHÉ. 1997. Heavy metal linkages with mineral, organic and living soil compartments. *Soil Biol. Biochem.* 29(3/4): 649-655.
- BARBER I.; J. BEMBRIDGE; P. DOHMEN; P. EDWARDS; F. HEIMBACH; R. HEUSEL; R.K. ROMIJN and H. RUFFI. 1998. Development and evaluation of triggers for earthworm toxicity testing with plant protection products. *In Advances in Earthworm Ecotoxicology* (S. Sheppard; J. Bembridge; M. Holmstrup and L. Posthuma, Eds.), pp. 269-278. SETAC Press, Pensacola, FL.
- CONDER J.M. and R. LANNO. 2000. Evaluation of surrogate measures of cadmium, lead, and zinc bioavailability to *Eisenia fetida*. *Chemosphere* 41: 1659-1668.
- DAVIES N.A.; M.E. HODSONB and S. BLACK. 2003. The influence of time on lead toxicity and bioaccumulation determined by the OECD earthworm toxicity test. *Environmental Pollution* 121: 55-61
- EDWARDS C.A. and J.R. LOFTY. 1977. *Biology of Earthworms*. Chapman & Hall, London. 2nd ed., pp. 333.
- GISH, C.D. and R.E. CHRISTENSEN. 1973. Cadmium, Nickel, Lead and Zinc in Earthworms from Roadside Soil. *Environmental Science Technology* 7:1060-1062.
- IRELAND M.P. 1983. Heavy Metal Uptake and Tissue Distribution in Earthworms. *In Earthworm Ecology: From Darwin to Vermiculture*. Chapman and Hall, New York. (Satchell, J.E. Ed.), pp. 247-265.
- LINDSAY W.L. and W.A. NORVELL. 1978. Development of a DPTA Soil Test for Zinc, Iron, Manganese and Copper. *American Journal of Soil Science Society*. 42: 421-428.
- MABOETA M.S.; A.J. REINECKE and S.A. REINECKE. 1999. Effects of Low Levels of Lead on Growth and Reproduction of the Asian Earthworm *Perionyx excavatus* (Oligochaeta). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 44: 236-240.
- MAIZ, I.; I. ARAMBARRI; R. GARCIA and E. MILLAN. 2000. Evaluation of heavy metal availability in polluted sites by two sequential extraction procedures using factor analysis. *Environ. Poll.* 110: 3-9.
- McLAREN R.G. and D.W. CRAWFORD. 1973. Studies on Soil Copper: I. The fractionation of Copper in Soils. *J. Soil.* 92-98.
- MERRY R.H.; K.G. TILLER and A.M. ALSTON. 1986. The effects of soil contamination with copper, lead and arsenic on the growth and composition of plants. II. Effects of source of contamination, varying soil pH, and prior waterlogging. *Plant Soil.* 95: 255-269.
- OECD. 2000. Draft Guideline for the Testing of Chemicals. Earthworm Reproduction Tests (*Eisenia fetida/andrei*).
- PEIJNENBURG W.J.G.M.; R. BAERSELMAN; A.C. DE GROOT; T. JAGER; L.P.M. POSTHUMA and VAN VEEN. 1999. Relating Environmental Availability to Bioavailability: Soil-Type-Dependent Metal Accumulation in the Oligochaete *Eisenia andrei*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 44: 294-310.
- QUEVAUVILLER P. 1998. Operationally extraction procedures for soil and sediment analysis. 1. Standardisation. *Trends in Analytical Chemistry* 17: 289-298.
- REINECKE A.J.; M.S. MABOETA and S.A. REINECKE. 1997. Stimulating effects of low lead concentrations on growth and cocoon production of *Eisenia fetida* (Oligochaeta). *S. Afr. J. Zool.* 32: 72-75.
- SINGH, S.P.; F.M.G. TACK and M.G. VERLOO. 1996. Extractability and bioavailability of heavy metals in surface soils derived from dredged sediments. *Chemical Speciation and Bioavailability* 8: 105-110.
- TESSIER A.; P.G.C. CAMPBELL and M. BISSON. 1979. Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals. *Analytical Chemistry* 51 (7): 844-851.
- van RAIJ, B. 1998. Bioavailable tests: alternatives to standard soil extractions. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 29, 1553-1570.