

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE PREGRADO

Memoria de Título

**EVALUACIÓN DE PLANTAS FITOACUMULADORAS EN SUELOS ALUVIALES
CON ALTO NIVEL DE COBRE DISPONIBLE**

GASTÓN ANÍBAL SILVA CARIS

Santiago - Chile
2013

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE PREGRADO

Memoria de Título

**EVALUACIÓN DE PLANTAS FITOACUMULADORAS EN SUELOS ALUVIALES
CON ALTO NIVEL DE COBRE DISPONIBLE**

**PHYTOACCUMULATOR PLANTS ASSESSMENT IN ALLUVIAL SOILS WITH
A HIGH AVAILABLE COPPER LEVEL**

GASTÓN ANÍBAL SILVA CARIS

Santiago - Chile
2013

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE PREGRADO

Memoria de Título

**EVALUACIÓN DE PLANTAS FITOACUMULADORAS EN SUELOS ALUVIALES
CON ALTO NIVEL DE COBRE DISPONIBLE**

Memoria para optar al título profesional de:
Ingeniero Agrónomo

GASTÓN ANÍBAL SILVA CARIS

PROFESORES GUÍAS

Calificaciones

Sr. Manuel Casanova P.
Ingeniero Agrónomo, M.S.

7,0

Sr. Osvaldo Salazar G.
Ingeniero Agrónomo, M.S. Ph.D.

7,0

PROFESORES EVALUADORES

Sr. Oscar Seguel S.
Ingeniero Agrónomo, Dr.

6,8

Sr. Tomislav Curkovic S.
Ingeniero Agrónomo, Ph.D.

6,6

Santiago - Chile
2013

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a todas las personas que de una u otra forma cooperaron para poder desarrollar esta memoria de la mejor manera posible.

A mi familia por su apoyo incondicional, que a pesar de todo lo que hemos vividos en este último tiempo, siempre han estado presentes.

A mis profesores guías don Manuel Casanova y don Osvaldo Salazar, por toda la paciencia, apoyo y voluntad para guiarme en todo momento.

A don Cristián Lepe por su disposición para poder desarrollar parte de este proyecto en su campo.

Al laboratorio de Química de Suelos y el departamento en general, profesores, funcionarios, tesisistas, memoristas, etc., gracias por los buenos momentos, por el conocimiento brindado y por el apoyo durante todo este proceso.

A Nataly por su apoyo incondicional, amor y contención, a mis amigos de la 2008 y de la vida por darme ánimo y motivación cuando lo requería, y por alegrarme el día en los minutos de estrés.

Y finalmente gracias a todos los que en algún momento de la carrera se cruzaron en mi camino y me ayudaron tanto profesional como personalmente, todos aportaron su granito de arena para poder cumplir este objetivo.

ÍNDICE

	Página
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
MATERIALES Y MÉTODO.....	10
Diseño experimental y análisis estadístico.....	13
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	15
Análisis de cobre previo a la fitorremediación.....	17
Análisis post fitorremediación.....	17
CONCLUSIONES.....	29
BIBLIOGRAFÍA.....	30
ANEXO I.....	38
APÉNDICE I.....	39

RESUMEN

Se evaluó el potencial fitoacumulador de ballica (*Lolium perenne* L.) y/o trébol blanco (*Trifolium repens* L.) para ofrecer una alternativa de limpieza de sitios contaminados con cobre. Se realizó un ensayo con suelos de la V Región (Valparaíso) de Chile cultivados con vid de mesa (*Vitis vinifera* L.) que mostraban un alto (TB: bajos rendimientos de *V. vinifera*), bajo (TA: altos rendimientos de *V. vinifera*) e intermedio (TM: rendimientos medios de *V. vinifera*) nivel de Cu (DTPA) disponible (140, 40 y 90 mg kg⁻¹, respectivamente). Durante el año 2013 y en invernadero, cada suelo (cinco repeticiones) fue sembrado con *L. perenne* y/o *T. repens* en macetas. Después de ocho meses las plantas fueron cosechadas para obtener la masa de materia seca y los contenidos de Cu tanto en los tejidos aéreos como radicales de las plantas. Así también, se determinaron los contenidos de Cu disponible, intercambiable y total de los suelos. Para las condiciones iniciales de Cu_{DTPA} intermedio y alto (TM y TB), el metal fue acumulado principalmente a nivel de raíces en los cultivos individuales y la combinación de ellos, pero ballica y ballica+trébol fueron más eficientes en cuanto a la absorción de Cu. Si bien las especies vegetales son capaces de remover el metal de los suelos, los contenidos de Cu al final del ensayo permanecieron altos (hasta 50 mg kg⁻¹ de Cu disponible), denotando la necesidad de realizar estudios de más largo plazo y de verificar que estos resultados se repitan a nivel de campo.

Palabras clave: Fitoacumulación, ballica (*Lolium perenne* L.), trébol blanco (*Trifolium repens* L.), cobre disponible.

ABSTRACT

To assess their potential as copper phytoaccumulators in soils and to offer a cleanup alternative of contaminated sites, ryegrass (*Lolium perenne* L.) and/or white clover (*Trifolium repens* L.) were used. The study was conducted with soil from the 5th Region (Valparaíso) of Chile cultivated with table grapes (*Vitis vinifera* L.) and showing a high (TB: low yields of *V. vinifera*), low (TA: high yields of *V. vinifera*) and intermediate (TM: medium yields of *V. vinifera*) levels of available Cu (DTPA). During 2013 and in a greenhouse assay, each soil (five replications) was sowed with *L. perenne* and/or *T. repens* in pots. After eight months plants were harvested to obtain dry matter and Cu contents in plant aerial and root tissues. Available, exchangeable and total Cu were measured also in soils. Under initial high and intermediate levels of Cu_{DTPA} conditions (TB and TM), metal was accumulated mainly at roots level in single and combined crops, but single ryegrass and ryegrass+clover were more efficient in the Cu uptake. Although species are able to remove metal from soils, the Cu contents at the end remained high (up to 50 mg kg⁻¹ of available Cu), indicating that long-term trials are necessary and confirm these results at field level.

Key words: Phytoaccumulation, ryegrass (*Lolium perenne* L.), white clover (*Trifolium repens* L.), available copper.

INTRODUCCIÓN

El cobre (Cu) es un elemento esencial para el hombre y el crecimiento de los vegetales (Vamerali *et al.*, 2010), de manera que su ausencia o déficit determina la muerte prematura de estos últimos, antes de completar su ciclo normal de vida. En la vid (*Vitis vinifera*), influye en casi todas las actividades metabólicas y actúa directamente en la síntesis de lignina y fenoles simples, además sobre los procesos reproductivos (Fageria *et al.*, 2008). También parece indispensable para la resistencia a enfermedades y síntesis de clorofila, proteínas y vitaminas tanto A como C (Bavaresco *et al.*, 2010).

Adiciones sustanciales de Cu a los suelos pueden ocurrir como consecuencia de las prácticas agrícolas normales, cuando compuestos cúpricos son empleados como fungicidas, bactericidas, fertilizantes y estimuladores del crecimiento de animales (Tiller y Merry, 1981). La principal consecuencia es una acumulación de Cu asimilable en los horizontes superiores del suelo (Pietrzak y McPhail, 2004; Rieder y Schwertmann, 1972; Cairney, 1987; Lepp *et al.*, 1984) pero también en profundidad (Rusjan *et al.*, 2007), particularmente en aquellos con pH ácido, pobres en materia orgánica, carbonatos y coloides minerales. Es el caso de aplicaciones de caldo bordelés ($\text{CuSO}_4 \cdot 3\text{Cu}(\text{OH})_2 \cdot 3\text{CaSO}_4$) a fines del siglo XIX y, más recientemente, otros productos ($\text{CuCl}_2 \cdot 3\text{Cu}(\text{OH})_2$ y $\text{Cu}(\text{OH})_2$) que pueden incrementar hasta en 10 veces las concentraciones de Cu en el suelo.

Al respecto, la dinámica y biodisponibilidad del Cu y otros metales en los suelos son altamente dependientes de sus propiedades, en particular del estado de oxidación del suelo y el pH (Figura 1). Una vez en el suelo el Cu interactúa con la fase sólida a través de numerosos procesos químicos, físicos y biológicos (sorción/desorción, precipitación/disolución, inmovilización microbiana). El pH, el potencial redox y la materia orgánica disuelta juegan un rol fundamental en el control del destino y biodisponibilidad de contaminantes inorgánicos (Kabata-Pendias, 2011).


Condición	redox		pH	
	bajo reducción	alto oxidación	bajo ácido	medio-alto neutro-alkalino
 movilidad incrementada	As	Zn	Zn, Cu, Co, Ni, Hg	
		Cu, Co, Cd, Ni	Cd	Cd
		Pb	Pb	Pb
	Cu, Co, Ni, Zn, Hg, Cd, Pb	Fe, Mn, Al, Sn, Cr		Cu, Co, Ni, Zn, Hg

Figura 1. Biodisponibilidad de metales bajo diferentes condiciones de suelo (Andreoni y Zaccheo, 2010).

Los rangos de Cu disponible en los suelos pueden ir de 2 a 100 ppm, con un valor medio de alrededor de 30 ppm (Kabata-Pendias, 2011). Una síntesis de valores umbrales se incluyen en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Valores umbrales de cobre en suelo y tejidos.

Forma	Unidad	Muy bajo	Bajo	Medio	Alto	Muy Alto	Referencia
Cu _{DTPA}		<0,2	0,3-2,5	2,6-5,0	5,1-10,0	> 10,0	Jones (2003)
	mg kg ⁻¹		Deficiente	Normal	Fitotóxico		
Cu _{TEJIDO}			< 1 a 5	5-25 (3-30)	20-100		Pugh <i>et al.</i> (2002); Reeves y Baker (2000)

Por otra parte, Vamerali *et al.* (2010) informan concentraciones de toxicidad general en tejidos de vegetales del orden de 15-20 mg Cu kg⁻¹ MS, mientras que Terry y Bañuelos (2000) indican que la parte aérea de especies hiperacumuladoras alcanzan valores >1.000 mg Cu kg⁻¹ MS.

La vid, en particular, elude los altos niveles de Cu en el suelo a través de un sistema radical distribuido entre 20-30 cm y 70-100 cm de profundidad, a la cual dichos niveles son generalmente bajos. Los excesos de este elemento inhiben la elongación de raíces y estimulan el crecimiento lateral (Yruela, 2009). Sus toxicidades son extrañas en viñas establecidas debido a su sistema de raíces, no así en viñas jóvenes donde pueden llegar a presentar crecimiento atrofiado debido a que sus raíces se concentran en la superficie del suelo (Toselli *et al.*, 2009). En casos extremos, las plantas jóvenes pueden morir cuando se hacen replantes en sitios con viñas antiguas o en viveros contaminados.

El Cu constituye un antagonista del hierro, bloqueando su absorción y uso por la planta; además, dosis elevadas de fósforo asociadas a un exceso de Cu incrementan el riesgo de clorosis férrica (Toselli *et al.*, 2009). También puede conducir a toxicidades, especialmente en viñas plantadas en suelos arenosos y ácidos (aplicaciones frecuentes de fungicidas basados en azufre, también incrementan la acidez del suelo). Más aún, la actividad fungicida del Cu puede tener otros efectos indeseables, tales como la inhibición del crecimiento de levaduras en viñas viníferas, generando fermentación lenta o detenida y, algunas veces, mala calidad de vinos (Tromp y de Klerk, 1988).

Las deficiencias de Cu, aunque bastante extrañas en viñas, causan esterilidad de polen y se manifiestan con necrosis en los márgenes de las hojas, caída precoz de hojas apicales y puntas secas. De acuerdo a Kabata-Pendias (2011) comúnmente ocurren en suelos: (a) de textura gruesa y pH elevado, (b) formados a partir de materiales parentales calcáreos y (c) ricos en materia orgánica. Los autores estiman que la deficiencia puede ser una consecuencia de bajos contenidos totales de Cu en el suelo, o en condiciones edáficas que reducen la movilidad y entonces la disponibilidad del elemento.

Numeroso autores (De Gregori *et al.*, 2003; Neaman *et al.*, 2005; González *et al.*, 2008; Ávila *et al.*, 2009; Neaman *et al.*, 2009) han informado que el Cu en la Región de Valparaíso se encuentra en niveles elevados en los suelos, particularmente en sectores cercanos a zonas con actividad minera. Sin embargo, estos niveles se manifiestan también en otras zonas no mineras, causando problemas en el crecimiento y rendimiento de

parronales de uva de mesa de exportación (González e Ite, 1992; González *et al.*, 2008; Neaman *et al.*, 2009). Esta reducción se puede deber a una toxicidad específica para la planta, antagonismo con otros nutrientes o inhibición de la penetración radicular en el suelo.

En consecuencia, existe cierta incertidumbre en cuanto a si los excesos observados obedecen a una característica propia de los suelos de la zona, a una probable contaminación del lugar o a un efecto acumulativo de fungicidas cúpricos aplicados como práctica normal en gran parte de la agricultura chilena, considerando que solamente en la Región de Valparaíso en la temporada 2004, se utilizaron 1,7 millones de kg o L de plaguicidas, correspondiente al 8% del total país (ADIAC, 2007), y que además ODEPA (2013) informó que Chile importó 4.626 Mg de fungicidas en el año 2012, lo que ya demuestra una evidencia significativa de las cantidades utilizadas en la agricultura chilena.

En general, los excesos de Cu pueden ser enfrentados con el uso de materia orgánica, considerando que los ácidos húmicos son capaces de retenerlo, dejándolo menos disponible. No obstante, existen diversas formas de remediación para afrontar el problema; entre las más convencionales, se informa aquellas de naturaleza físico-químicas como la vitrificación, el lavado de suelo y la electrocinética, entre otras (EPA, 2006). Pietrzak y Uren (2011), en tanto, se refieren a opciones como mezclas activas (suelos contaminados con no contaminados) como las más económicas en viñas; otras estrategias paliativas con potencial recuperación, para niveles bajos y medios de Cu en suelos, incluyen la atenuación (encalado y adición de materia orgánica) y la fitorremediación.

Así entonces, debido a la apremiante preocupación global por el ambiente, es que han tomado más fuerza técnicas amigables con el planeta. La fitorremediación, basada en la utilización de especies vegetales que pueden metabolizar, extraer, degradar y contener contaminantes (Schnoor, 1997), resulta ser una técnica ventajosa (Cuadro 2) al involucrar una reducción de costos y ser menos invasiva en las características propias de cada suelo (Lone *et al.*, 2008).

Aggarwal y Goyal (2007), en una extensa revisión, precisan que la fitorremediación de metales ocurre debido a fitoextracción (las plantas acumulan el metal en su parte cosechable y lo remueven desde el suelo), rizofiltración (eliminación de contaminantes desde los sistemas acuáticos por medio de la absorción de las raíces de las plantas), fitoestabilización (inmovilización o prevención de la migración de los contaminantes en el ambiente por exudados de las plantas, lo que lleva a la reducción en la movilidad y la biodisponibilidad de los contaminantes), fitovolatilización (vía de escape a la atmósfera de formas gaseosas de contaminantes a través de las plantas) y fitominería (capacidad de las plantas de extraer una gran cantidad de metales desde el suelo, que puede ser explotada para recuperar metales de gran valor económico desde depósitos de mineral y suelos).

Cuadro 2. Ventajas y desventajas generales de la fitorremediación (Shao *et al.*, 2010; Marmioli y McCutcheon, 2003).

VENTAJAS	DESVENTAJAS
Amigable con el ambiente, rentable y agradable estéticamente.	Basado en el ciclo natural de las plantas, por lo cual toma su tiempo.
Los metales absorbidos por las plantas, pueden ser extraídos desde la biomasa de la planta cosechada y luego reciclada.	La fitorremediación funciona mejor cuando la contaminación se encuentra dentro del alcance de las raíces de las plantas, por lo general 1 a 2 m bajo tierra para las plantas herbáceas y de 3 a 4,5 m para árboles
La fitorremediación, puede ser usada para limpiar gran variedad de contaminantes.	Algunas plantas absorben una alta cantidad de metales tóxicos, generando un riesgo potencial en la cadena alimenticia, si los animales se alimentan de estas.
Puede reducir la entrada de contaminantes al ambiente, al evitar que se desvíen hacia los sistemas de aguas subterráneas.	
Capacidad para hacer frente a múltiples objetivos (control de erosión, restauración ecológica, mantención de sitio y producción secundaria de biomasa, energía y materia prima industrial).	Dependencia del proceso: tanto del clima como de la temporada.
Tratamiento <i>in situ</i> de la naturaleza.	
Aplicabilidad a extensas áreas de limitada contaminación.	

Dentro de los componentes de la fitorremediación se identifica la fitoacumulación, donde las plantas son utilizadas para que, a través de sus raíces, absorban el contaminante desde el sustrato y así concentren los metales pesados en su parte aérea, ya sea en los frutos, en el tallo o en las hojas (Brooks, 1998). El mismo autor identifica hasta entonces alrededor de 400 especies de plantas fitoacumuladoras, perteneciente a 45 familias botánicas; de éstas, unas veinte acumulan Cu. Más recientemente, Ginocchio *et al.* (2004) señala que la cantidad de especies identificadas y que fitoacumulan metales han ido aumentando en Chile producto de la mayor investigación e interés por este rubro; particularmente en el caso del Cu se han duplicado, abarcando alrededor de 40 especies de 15 familias distintas. El Cuadro 3 incluye otros autores que han trabajado con diferentes especies fitorremediadoras de Cu, reafirmando el potencial que posee esta técnica.

En Chile, donde la minería del Cu es una de las principales actividades económicas, han surgido problemáticas ambientales asociadas, como la contaminación de suelos (enriquecimiento por metales pesados) (Montenegro *et al.*, 2009); por esta razón, diversos investigadores han usado la fitoacumulación como medida de mitigación de esta degradación de suelos. González *et al.* (2010) comprobaron que *Juncus scheuchzeroides* y *Galega officinalis* pueden absorber Cu, aunque no se les considera plantas acumuladoras. Por otro lado, Muenza (2006) al utilizar mostaza oriental (*Brassica juncea*), dedal de oro (*Eschscholtzia californica*) y mostacilla (*Hirschfeldia incana*) en suelos contaminados de la Comuna de Puchuncaví, destaca el gran potencial de estas especies como fitorremediadoras.

En el extranjero, han sido diversos los casos en que se ha trabajado con plantas que pudiesen tener características de acumuladoras de Cu (Cuadro 3). Calace *et al.* (2002) emplearon cebada (*Hordeum distichum*) con resultados positivos; Meers *et al.* (2005) emplean especies como cáñamo (*Cannabis sativa*), maravilla (*Helianthus annuus*) y maíz (*Zea mays*), que si bien absorben Cu y otros metales, no llegan al nivel de plantas hiperacumuladoras, es decir, capaces de acumular sobre 1.000 mg kg⁻¹ del metal (Schnoor, 1997). Por otra parte, Wei *et al.* (2008) utilizaron sorgo (*Sorghum sudanense*) observando en esta especie un buen potencial de extracción.

Cuadro 3. Fitorremediación de suelos con cobre.

Especies	Referencia
<i>Aeollanthus biformifolius</i> , <i>Thlapsi alpestre</i> , <i>Potamogeton richardsonii</i>	Pichtel y Salt (1998).
<i>Armeria maritima</i> , <i>Becium homblei</i> , <i>Silene vulgaris</i> , <i>S. cobalticola</i>	Pandolfini <i>et al.</i> (1997), Ernst (1996).
<i>Elodea canadensis</i> <i>Equisetum arvense</i> y <i>Haumaniastrum robertii</i>	Brooks (1998).
<i>Festuca arundinacea</i> , <i>F. ovina</i>	Ernst (1996), McGrath (1998), Pichtel y Salt (1998).
<i>Ipomea alpina</i> , <i>I. carnea</i>	Mhatre y Pankhurst (1997), Brooks (1998).
<i>Lemna minor</i>	Mhatre y Pankhurst (1997), Zayed <i>et al.</i> (1998).
<i>Lolium perenne</i>	Pichtel y Salt (1998).
<i>Minuartia verna</i>	Pandolfini <i>et al.</i> (1997), Ernst (1996), Brooks (1998).
<i>Myriophyllum verticillatum</i>	Brooks (1998).
<i>Plantago lanceolata</i>	Zupan <i>et al.</i> (1995).
<i>Populus nigra</i>	Wagner (1993).
<i>Taraxacum officinale</i>	Bini <i>et al.</i> (2000).
<i>Viscaria alpina</i>	Pandolfini <i>et al.</i> (1997).
<i>Agrostis tenuis</i> (Fitoestabilización)	Smith y Bradshaw (1992).
<i>Brassica juncea</i> (Fitoextracción)	Kumar <i>et al.</i> (1995), Ebbs <i>et al.</i> (1997).
<i>Brassica juncea</i> (Rizofiltración)	Dushenkov <i>et al.</i> (1995).
<i>Cucurbita pepo</i> (Fitoextracción)	Ciura <i>et al.</i> (2005).
<i>Festuca rubra</i> (Fitoestabilización)	Smith y Bradshaw (1992).
<i>Medicago sativa</i> (Fitoextracción)	Peralta-Videa <i>et al.</i> (2002).

Varios autores emplean, asociadas a las plantas extractoras, diferentes medidas de mejoramiento de su capacidad o eficiencia fitorremediadora en suelos con Cu. Gunawardana *et al.* (2010) utilizaron enmiendas químicas y orgánicas con ballica (*Lolium perenne*), mientras que Bidar *et al.* (2007) asociaron trébol blanco (*Trifolium repens*) a esta misma especie. Otros resultados exitosos en este sentido, han sido obtenidos empleando plantas de maravilla (Rojas-Tapia *et al.*, 2011; Wilson-Corral *et al.*, 2011). Chen *et al.* (2006) encuentran que comunidades microbianas de *Elsholtzia splendens* y *T. repens* en suelos contaminados con Cu, enmendados con glucosa y ácido cítrico, facilitaron la solubilización del Cu sin inhibir la comunidad microbiana.

Existe evidencia que muchas especies leguminosas, familia *Fabaceae*, pueden ser usadas eficientemente en fitorremediación de suelos contaminados con metales pesado. Si bien muchas de ellas son menos tolerantes a estos metales que las crucíferas (*Brassicaceae*) y

cereales (*Poaceae*), son capaces de producir una biomasa elevada y poseen un crecimiento acelerado, lo que les otorga una excelente capacidad para acumular metales (Safronova *et al.*, 2011).

Los pastos perennes son reconocidos como tolerantes a metales pesados, crecen en sitios contaminados (Rosselli *et al.*, 2003) y dada su capacidad de absorberlos constituyen una alternativa de remediación de suelos (Bidar *et al.*, 2007; Caggiano *et al.*, 2005; Jankaitė y Vasarevičius, 2007) al generar también altos rendimientos con elevada biomasa (Pichtel y Salt, 1998). Es así como Santibáñez *et al.* (2008) en Chile, aunque a nivel de invernadero, emplean con éxito ballica en la remediación de relaves de Cu. En este sentido, varios otros autores (Duquène *et al.*, 2009; Alvarenga *et al.*, 2008) han estudiado la capacidad de esta especie como fitorremediadora.

Si se considera el potencial fitorremediador de la asociación *poácea* - *fabácea*, como es el caso de la ballica y trébol blanco, en donde tiene la capacidad de asociarse con bacterias del suelo para fijar nitrógeno atmosférico (Figura 2), ambas especies se complementan. Esta asociación fue estudiada por Dong *et al.* (2008) para extraer arsénico de suelos. Así mismo, Marques *et al.* (2013) y Khan *et al.* (2013), logran concluir que la utilización de bacterias permite contrarrestar los efectos negativos de los contaminantes en el suelo y permiten aumentar la disponibilidad o estabilizar el contaminante. Por lo mismo, si se toma en cuenta esta interacción, el potencial fitoacumulador de éstas podría verse favorecido y ser una buena opción.

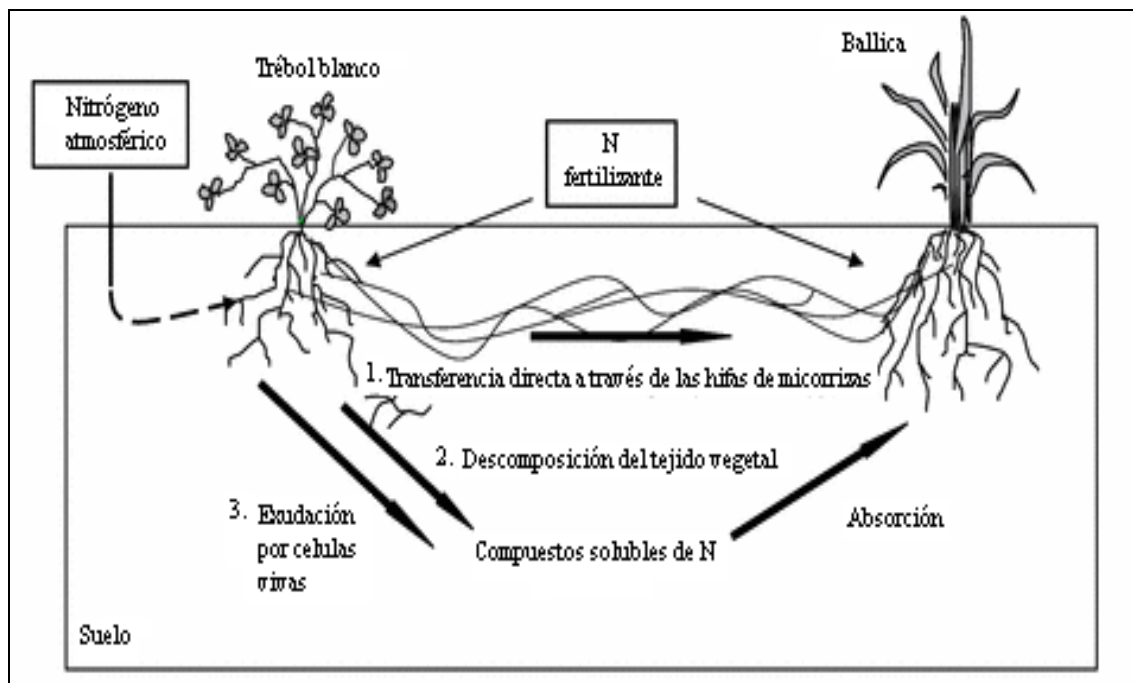


Figura 2. Asociación trébol-ballica (Paynel *et al.*, 2008).

En consecuencia, la fitoacumulación constituye una medida práctica para la remediación de suelos afectados por Cu, existiendo una gran cantidad de especies vegetales disponibles que pudiesen tener un buen potencial fitorremediador.

La hipótesis que se plantea en esta investigación es que para suelos con niveles altos de Cu disponible, la fitorremediación es una opción técnicamente factible cuando se utiliza una especie reconocidamente acumuladora de Cu en conjunto con una fabácea en el corto plazo.

Así, el objetivo general de esta memoria es evaluar cuantitativamente el potencial fitoacumulador de las especies ballica (*Lolium perenne* L.) y trébol blanco (*Trifolium repens* L.) en suelos con niveles altos de Cu disponible.

Los objetivos específicos son, a nivel de invernadero:

- Evaluar los niveles de cobre en la parte aérea y radical de las plantas fitoacumuladoras, al cabo de una temporada.
- Evaluar los niveles de cobre en el suelo de las plantas fitoacumuladoras, al inicio y al final del ensayo.

MATERIALES Y MÉTODO

El estudio se realizó en tres sitios cercanos (a 100 m de distancia) correspondientes a tres cuarteles cultivados con uva de mesa (*Vitis vinifera* L.) variedad Superior con patrón franco, de la Comuna de Santa María, provincia de San Felipe de Aconcagua, Región de Valparaíso (32°44'S – 70°39'O, ver figuras 3 y 4).

Desde el punto de vista geográfico, la Comuna de Santa María es un valle que se caracteriza por poseer una forma cerrada por cordones montañosos, extendiéndose a sus pies una llanura de forma irregular, donde se ubican las rinconadas y cerros islas. Con relación al clima, esta comuna posee un clima templado, con estacionalidades bien marcadas, un verano seco con radiación solar alta y temperaturas muy altas, inviernos nubosos y fríos, con estaciones transicionales de otoño y primavera. El período de lluvias está concentrado entre los meses de mayo y agosto, con magnitudes entre los 250 y 450 mm anuales. Las temperaturas medias invernales varían entre los 2,5 y 17 °C, mientras que en verano varían entre los 14 y 32 °C. Se considera que el valle pertenece al agroclima Pumanque (Santibáñez y Uribe, 1990).



Figura 3. Emplazamiento comuna a escala regional y nivel país (Municipalidad de Santa María, 2010).

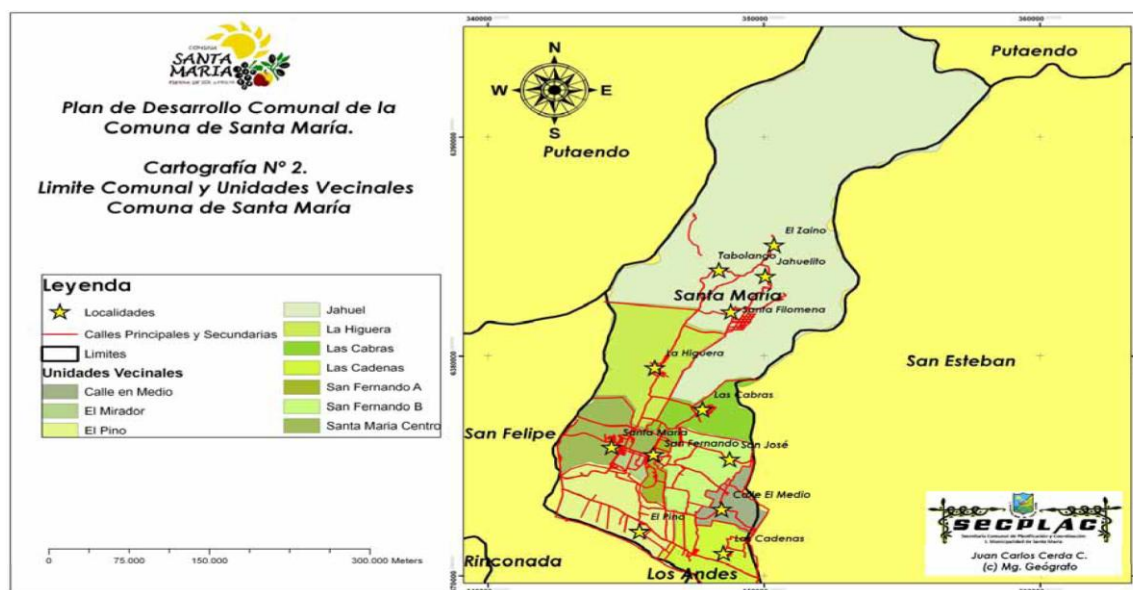


Figura 4. Límite comunal y unidades vecinales Comuna de Santa María (Municipalidad de Santa María, 2010).

Las formaciones vegetacionales naturales existentes, se asocian a la topografía bajo el esquema de la ecoregión de las estepas de arbustos espinosos, con presencia de bosquetes esclerófilos en los sectores más protegidos.

La topografía se caracteriza por un sector montañoso y una llanura aluvial. En esta última formación se concentra la infiltración de aguas subterráneas y se desarrolla la mayor parte de la actividad agrícola, tanto de riego como de secano. Los suelos agrícolas del sector regado presentan una buena capacidad de uso agrícola, con mayores limitaciones en los sectores de laderas, lo que permite el desarrollo de una fruticultura de exportación directamente asociada a la disponibilidad de agua para riego, cuyos recursos se obtienen fundamentalmente del río Aconcagua y de los esteros El Cobre y San Francisco, los que son tributarios del río Putaendo (Municipalidad de Santa María, 2010).

Las presiones sobre la contaminación del aire, suelo y agua están dadas fundamentalmente por las actividades económicas que se desarrollan en la cuenca, principalmente agricultura y minería.

El suelo empleado en este estudio proviene de tres cuarteles plantados con vid (*Vitis vinifera*), es de origen aluvial y se clasifica como franca fina, mixta, térmica de los Typic Haploxerolls. De acuerdo a CIREN (1997) se incluye en la Serie de suelo Santa María, cuya descripción se presenta en el Anexo I.

Considerando que los tres cuarteles presentaban un aspecto y un historial de rendimiento diferente (alto, medio y bajo) asociado, se definieron visualmente 3 condiciones que se relacionan preliminarmente a distintos niveles de Cu disponible (DTPA) en el suelo, informados por el agricultor a partir de un análisis de suelo. Así, se definió como nivel alto de Cu (120 mg kg^{-1}) un cuartel con notorio crecimiento reducido y carga de racimos

relativamente baja (TB, rendimiento bajo de 1.000 cajas de 8,2 kg de uva por ha), si se compara con un cuartel cercano (100 m) que no muestra estas características (TA, rendimiento alto de 3.000 cajas de 8,2 kg de uva por ha). La tercera condición quedó definida por otro cuartel con características intermedias (TM, rendimiento de 1.500 cajas de 8,2 kg de uva por ha).

De acuerdo a la información disponible proporcionada por los propietarios, el cultivo previo a la plantación de vid de los cuarteles TM y TB correspondió por muchos años a hortalizas diversas, de manera que el uso de largo plazo de fungicidas cúpricos explica (Pietrzak y McPhail, 2004; Rusjan *et al.*, 2007) los niveles elevados (120 mg kg^{-1}) de Cu disponible en los suelos. El uso previo del TA, en cambio, fue un huerto de durazneros.

Se procedió a tomar una muestra compuesta superficial (0-20 cm) de cada uno de los 3 sitios, las que fueron sometidas a un proceso de limpieza de maleza y fragmentos gruesos, y posterior homogeneización (tamizado a 9,5 mm). En invernaderos de vidrio de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile, durante el período comprendido entre los meses de marzo y noviembre del año 2012, se procedió a realizar un ensayo en macetas.

La sala del invernadero, de 3,12 m de ancho, 3,97 m de largo y 3,00 m de alto, no cuenta con ventilación automática, pero sí con ventanas semi-móviles que cumplen esta función. Dentro de ella, sobre un mesón de madera (3,90 m largo, 1,56 m ancho y 0,75 m de alto) se dispuso un total de 45 macetas plásticas (unidades experimentales) de 2 L de capacidad (18 cm de diámetro y 15 cm de altura). Las macetas fueron cubiertas en su interior por bolsas plásticas, para luego depositar en su interior el suelo ya tamizado, y dejar 3 cm libres desde su superficie.

Las macetas se sembraron, durante abril del año 2012, con ballica (*Lolium perenne* L.) variedad Nui y/o trébol blanco (*Trifolium repens* L.) variedad Blanco Huía, ambas con semilla certificada. Se estructuraron de esta forma los tratamientos del ensayo (Cuadro 4), considerando 5 repeticiones.

Cuadro 4. Tratamientos considerados en el ensayo de invernadero.

Tratamientos	Componentes	Nivel de cobre *	Dosis de semilla (g/macetas)	
			Ballica	Trébol blanco
TA1	Ballica	Bajo	5,10	-
TA2	Trébol	Bajo	-	3,82
TA3	Ballica + Trébol	Bajo	3,05	2,41
TM1	Ballica	Medio	5,10	-
TM2	Trébol	Medio	-	3,82
TM3	Ballica + Trébol	Medio	3,05	2,41
TB1	Ballica	Alto**	5,10	-
TB2	Trébol	Alto	-	3,82
TB3	Ballica + Trébol	Alto	3,05	2,41

TA: rendimiento alto, TM: rendimiento medio, TB: rendimiento bajo (de *V. vinifera* en distintos cuarteles)

*Nivel de Cu asumido y asociado a rendimiento de *V. vinifera* informado por el agricultor. ** (120 mg kg^{-1})

Durante la temporada el riego, con agua destilada, se realizó por diferencia de masas manteniendo el suelo cercano a capacidad de campo.

Los análisis de muestras de suelos y de tejidos de las plantas se realizaron en el Laboratorio de Química de Suelos y Aguas, y en el Laboratorio de Física de Suelos, pertenecientes al Departamento de Ingeniería y Suelos, de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile.

En cada sitio se realizó una caracterización morfológica en terreno del perfil de suelo en calicatas. Se procedió a tomar muestras de los dos horizontes genéticos superiores que, en triplicado, fueron analizadas en términos de propiedades físicas y químicas. La textura se determinó mediante el método del hidrómetro de Bouyoucos, la retención de agua con el método de olla y plato a presión, la densidad real con picnómetro y la densidad aparente con cilindro, según las metodologías propuestas para los suelos de Chile por Sandoval *et al.* (2012). Además se evaluó el contenido de materia orgánica mediante el método de Walkley y Black, pH en agua (relación 1:2,5) y conductividad eléctrica en el extracto de saturación, métodos descritos por Sadzawka *et al.* (2006); la capacidad de intercambio catiónico se determinó con acetato de sodio 1N a pH 8,2, de acuerdo a Dewis y Freitas (1970).

Tanto al inicio como al final del ensayo se determinó en los suelos con 4 repeticiones, dispuestos en macetas, las distintas formas de Cu. El Cu disponible se analizó a partir de su extracción con DTPA, el Cu total mediante digestión ácida (Sparks, 1996) y el Cu intercambiable por extracción con acetato de amonio 1 mol L⁻¹ a pH 7,0 (Tan, 1996).

Al cabo de 8 meses (final de temporada), se extrajeron las plantas, separando parte radical de la aérea, midiendo materia seca y Cu total en sus tejidos (Sadzawka *et al.*, 2007).

Diseño experimental y análisis estadístico

Los 9 tratamientos fueron dispuestos en un diseño completamente aleatorizado, con estructura factorial (Figura 5), siendo los factores a tener en consideración las plantas y su combinación (trébol, ballica y ballica+trébol) y el nivel de Cu de los 3 suelos seleccionados (TA, TM, TB). Es decir, el análisis estadístico a realizar consideró los factores planta y nivel de Cu inicial en el suelo asociado a rendimiento. Las 3 combinaciones de especies establecidas en los distintos suelos y las 5 repeticiones, dan un total de 45 unidades experimentales (macetas).

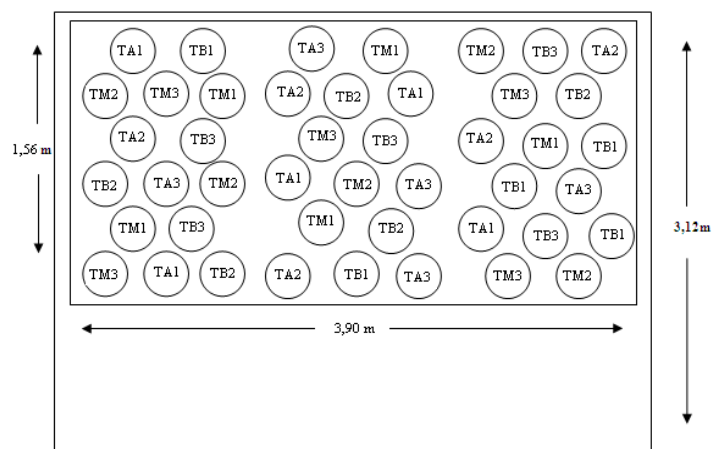


Figura 5. Dimensiones de la sala de invernadero y del mesón, con la distribución espacial de las unidades experimentales para cada tratamiento.

Las propiedades de los suelos, en triplicado, son informadas en términos de sus valores promedios y la desviación estándar observada para cada tratamiento. A los resultados obtenidos de la materia seca tanto aérea como radical, y a los niveles de Cu en la planta y en el suelo, se les realizó un análisis de varianza (ANDEVA, $\alpha \leq 0,05$) para poder determinar diferencias significativas y, en los casos que fue necesario, se utilizó la prueba de rangos múltiples SNK con un nivel de confianza del 95% ($p \leq 0,05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el Anexo I se incluye la descripción del pedón característico de la Serie Santa María, que corresponde al suelo en la zona en estudio. Al comparar con éste los tres pedones descritos en cada sitio estudiado (TA, TM y TB), se encontró que las características no difieren demasiado, salvo por pequeñas diferencias que se incluyen en el rango de variaciones de la Serie. Más aún, los sectores escogidos no se encuentran separados a una distancia superior a 100 m, por lo tanto sus diferencias se pueden atribuir al manejo e intervención por parte de los agricultores. La clase textural varía de franca a franco arcillo limosa, la estructura siempre en bloques angulares pero variando su tamaño y grado estructural. La abundancia de raíces varía según cada sitio, debido principalmente a la actividad agrícola del lugar y a los problemas de desarrollo vegetal, mencionados con anterioridad.

En el Cuadro 5 se muestran los resultados de la caracterización de los dos primeros horizontes genéticos de los pedones considerados. Con relación a la densidad aparente, se tiene que los valores son 1,40, 1,54 y 1,59 Mg m^{-3} en el primer horizonte y 1,49, 1,70 y 1,58 en el segundo horizonte, para TA, TM y TB, respectivamente. Según Richards (1983) los valores ideales de densidad aparente para un buen desarrollo de raíces en las vides debiesen andar entre los 1,1 a 1,2 Mg m^{-3} , por lo que en esta situación en particular se estarían sobrepasando estos límites. Por otro lado, Skopp (2002) estima que los valores presentados se encuentran dentro de los rangos normales para texturas francas a franco arenosa, por lo que su variación respecto a cada sitio y horizonte, se debe principalmente a otros factores, como lo son el contenido de agua que posee el suelo en el momento de tomar la medición, la distribución del tamaño de partículas, los niveles de materia orgánica y el manejo agronómico que recibe cada sitio.

Respecto a la densidad real, sus valores fluctúan entre los 2,50 y 2,70 Mg m^{-3} , dependiendo del sitio y del horizonte; de todas formas estos resultados se encuentran dentro de los valores normales para suelos minerales (Flint y Flint, 2002), obedeciendo básicamente al mineral predominante del suelo, que en este caso es la andesita (2,5 a 2,8 Mg m^{-3}).

La materia orgánica, presentó valores más altos (< 2 %) en los primeros horizontes, debido principalmente a la mayor actividad microbiana que normalmente se presenta en esta zona del suelo, lo que hace que estos contenidos se mantengan en un rango mayor a los horizontes inferiores. Si bien estos valores son más altos, se presentan dentro de los rangos normal bajo, y esto se puede explicar principalmente debido al escaso aporte de material orgánico, y al constante laboreo que implica una elevada oxidación de ésta.

En cuanto al pH, se observó que los valores obtenidos fluctuaron aproximadamente en el rango 6,3 a 7,3 (débilmente ácidos a neutro). Resulta importante este aspecto ya que el Cu, en su forma asimilable para las plantas (Cu^{+2}), tiene una mayor disponibilidad entre pH 5 y 7, lo que incide en la absorción por parte de las plantas (Havlin *et al.*, 2013).

Cuadro 5. Caracterización de los dos primeros horizontes genéticos de los pedones considerados, Región de Valparaíso.

Trat.	Prof.	arena	limo	arcilla	Da	Dp	W ₃₃	W _{1.500}	MO	pH _{agua}	CE _e	CIC
	cm	-----%-----			--- Mg m ⁻³ ---		-----%-----				dS m ⁻¹	cmol _c kg ⁻¹
TA	0-50	33,21±0,40	42,60±0,50	24,20±1,45	1,40±0,08	2,70±0,06	24,98±1,09	13,38±0,12	1,96±0,02	7,28±0,09	0,59±0,01	12,54±0,19
	50-100	39,13±0,23	37,30±0,59	23,60±1,17	1,49±0,21	2,60±0,09	26,92±0,07	13,45±1,90	0,60±0,02	6,83±0,03	0,41±0,03	13,87±0,09
TM	0-50	44,52±0,86	38,19±2,48	17,29±1,62	1,54±0,19	2,50±0,04	23,69±1,99	10,56±1,14	1,59±0,03	6,82±0,08	0,39±0,03	11,62±0,79
	50-100	46,20±3,31	35,90±2,50	17,90±0,81	1,70±0,38	2,53±0,10	22,31±1,25	12,00±1,47	0,47±0,06	6,76±0,04	0,51±0,20	12,57±0,55
TB	0-50	29,28±0,72	38,52±1,11	32,20±0,95	1,59±0,11	2,63±0,03	26,65±0,16	14,87±0,34	1,67±0,03	6,84±0,04	0,46±0,02	13,13±0,14
	50-100	42,26±1,13	32,97±1,26	24,78±0,77	1,58±0,35	2,64±0,6	27,88±0,24	14,13±0,34	0,70±0,02	6,34±0,11	0,44±0,04	13,85±0,10

TA: rendimiento alto, TM: rendimiento medio, TB: rendimiento bajo (de *V. vinifera* en distintos cuarteles)

Da: densidad aparente; Dp: densidad real; W_{xx}: contenido de agua a distintas tensiones (kPa); MO: materia orgánica; CE_e: conductividad eléctrica del extracto de saturación; CIC: capacidad de intercambio catiónico.

Los valores obtenidos para la CE_e mostraron que el suelo se puede clasificar como no salino y se pueden calificar como bajos a moderados (11,6 a 13,8 $cmol_c\ kg^{-1}$) en cuanto a CIC, respondiendo a la textura del suelo (Hazelton y Murphy, 2007).

Análisis de cobre previo a la fitorremediación

Para corroborar la información preliminar, respecto a los niveles de Cu de los distintos sitios y con el fin de tener una referencia, se midió el contenido de Cu en las distintas formas presentes en el suelo. Tanto el Cu disponible, fracción que puede ser absorbidas por las plantas, el Cu intercambiable en posiciones de intercambio (disponible en función del agotamiento del presente en la solución suelo) y el Cu total son informados para cada tratamiento en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Niveles de distintas formas de cobre en tres sitios cultivados con vid, previo a la fitorremediación, Región de Valparaíso.

Tratamientos	Formas de cobre en suelos (0-20 cm)		
	Disponible	Intercambiable	Total
	$mg\ kg^{-1}$		
TA	40,0±0,6 c	27,0±1,4 c	328,5±50,2 c
TM	91,0±5,9 b	50,5±0,7 b	492,5±51,6 b
TB	146,4±14,1 a	126,0±2,8 a	771,5±41,7 a

TA: rendimiento alto, TM: rendimiento medio, TB: rendimiento bajo (de *V. vinifera* en distintos cuarteles)
Letras distintas en una misma columna indican diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0,05$)

Si se toma como base cualquiera de las formas de Cu analizadas, se tiene que el sitio TA es el que presenta el nivel más bajo, seguido de TM, y por último TB, además de que todos los tratamientos presentan diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Con relación al Cu disponible, si se toman los rangos expuestos por Jones (2003), se tiene que de los distintos valores promedios obtenidos para cada sitio, todos se clasifican como muy alto, ya que sobrepasan el rango de 10 $mg\ kg^{-1}$ de Cu disponible (DTPA).

Análisis post fitorremediación

El promedio de materia seca para los distintos tratamientos, considerando tanto la masa de materia seca radical como aérea se incluye en el Apéndice I. Se puede destacar la variabilidad que presentan los valores obtenidos tanto en la materia seca (MS) aérea como radical de los distintos tratamientos, además se puede notar que la especie trébol en todos sus tratamientos presenta valores menores ($p \leq 0,05$) a los de la otra especie o su combinación.

Cuando se evaluó el factor plantas versus el nivel de Cu en los tres suelos (factor suelo en adelante), tanto en la MS aérea y como en la MS radical, se encontró que en ambos casos había una interacción significativa ($p \leq 0,05$) entre los factores evaluados. El resultado de estas interacciones se muestra en los cuadros 7 y 8.

Cuadro 7. Efecto del factor planta en cada nivel de cobre, y viceversa en muestras de materia seca aérea.

Masa de materia seca aérea (g)			
Planta/Suelo	TA	TM	TB
Ballica	24,18 a	10,48 a	11,00 a
Trébol	7,58 b	6,59 b	5,65 b
Ballica+trébol	24,05 a	9,77 a	10,73 a
Suelo/Planta	Ballica	Trébol	Ballica+trébol
TA	24,18 a	7,58 a	24,05 a
TM	10,48 b	6,59 ab	9,77 b
TB	11,00 b	5,65 b	10,73 b

TA: rendimiento alto, TM: rendimiento medio, TB: rendimiento bajo (de *V. vinifera* en distintos cuarteles)
Letras distintas en una misma columna indican diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0,05$)

Cuadro 8. Efecto del factor planta en cada nivel de cobre, y viceversa en muestras de materia seca radical.

Masa de materia seca radical (g)			
Planta/Suelo	TA	TM	TB
Ballica	9,23 a	14,34 b	15,11 a
Trébol	1,55 c	1,72 c	1,36 b
Ballica+trébol	5,71 b	23,61 a	16,05 a
Suelo/Planta	Ballica	Trébol	Ballica+trébol
TA	9,23 b	1,55 a	5,71 b
TM	14,34 a	1,72 a	23,61 a
TB	15,11 a	1,36 a	16,05 a

TA: rendimiento alto, TM: rendimiento medio, TB: rendimiento bajo (de *V. vinifera* en distintos cuarteles)
Letras distintas en una misma columna indican diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0,05$)

En el Cuadro 7 es posible observar que entre los tratamientos con ballica y ballica+trébol no existen diferencias significativas ($p > 0,05$) en ninguno de los niveles de Cu presentes en los suelos (TA, TM y TB), y además en ambos tratamientos se generó una cantidad significativamente ($p \leq 0,05$) mayor de MS aérea comparado con el tratamiento con trébol. Asimismo, la ballica produjo la mayor cantidad de MS aérea en el tratamiento con un nivel menor del metal (TA). Con respecto a la masa radical de ballica (Cuadro 8), ésta fue significativamente inferior ($p \leq 0,05$) solo en el nivel TA, no encontrándose diferencias significativas ($p > 0,05$) en los otros niveles.

Respecto a la combinación ballica+trébol, se determinó que el comportamiento de este tratamiento respecto a la MS aérea fue similar al de ballica en todos los niveles de Cu

expuestos, no encontrándose diferencias significativas ($p > 0,05$) entre ambos. En cuanto a lo que respecta a la MS radical, se encontró que: i) en el nivel TA, la ballica obtuvo una producción significativamente ($p \leq 0,05$) mayor de MS; ii) en el nivel TM, fue ballica+trébol la que alcanzó la MS más alta; y iii) no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) en el nivel más bajo (TB).

Por otra parte, se evidenció que a medida que aumentaba la concentración del metal en el suelo la MS aérea disminuía, mientras que aumentaba la MS radical. Las tendencias anteriores se podrían relacionar con lo mencionado por Bidar *et al.* (2007), quienes exponen que tanto ballica como trébol acumulan el Cu preferentemente en las raíces, lo que podría deberse a una respuesta por parte de la planta que al verse afectada por los niveles tóxicos de este metal en el suelo disminuiría su crecimiento aéreo, pero aumentan la masa radical para poder compensar este problema.

En cuanto a los tratamientos solo con trébol (TA2, TM2 y TB2), se encontró que en este tratamiento se generó una cantidad significativamente ($p \leq 0,05$) menor de MS, tanto aérea como radical, bajo los distintos niveles de Cu en el suelo. Ciertamente esto obedece a las características genéticas y taxonómicas de la especie, pero también al hecho que la germinación del trébol fue más tardía que la de ballica en este ensayo. En cuanto a la MS aérea no existieron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre TA y TM, ni entre TM y TB, pero sí entre los niveles de Cu extremos, es decir, entre TA y TB. En el caso de la MS radical, no se evidenciaron diferencias significativas ($p > 0,05$).

En el Cuadro 9 se incluyen los valores de las distintas formas de Cu en el suelo al final del ensayo. Los valores del Cu disponible fluctuaron entre los 14 y 45 mg kg⁻¹, siendo los tratamientos relacionados con TA los que presentaron las concentraciones más bajas, y los TB las más altas. Así, clasificando los datos según los rangos propuestos por Jones (2003) para el Cu_{DTPA}, se encontró que éstos siguen estando en el rango muy alto (> 10 mg kg⁻¹).

Cuadro 9. Cobre en sus distintas formas post fitorremediación en el suelo según cada tratamiento.

Tratamientos	Planta(s)	Forma de cobre (0-20 cm)		
		Disponible	Intercambiable	Total
		mg kg ⁻¹		
TA1	Ballica	15,36 ± 0,43	2,40 ± 2,07	273,8 ± 5,97
TA2	Trébol	16,40 ± 0,80	2,40 ± 1,67	274,6 ± 11,89
TA3	Ballica+trébol	14,88 ± 0,46	3,00 ± 1,22	268,0 ± 3,61
TM1	Ballica	26,52 ± 1,80	5,00 ± 1,41	482,6 ± 45,89
TM2	Trébol	25,76 ± 1,65	6,80 ± 0,84	450,6 ± 26,32
TM3	Ballica+trébol	26,36 ± 1,00	5,80 ± 0,84	464,8 ± 37,16
TB1	Ballica	45,12 ± 2,88	17,20 ± 3,90	797,6 ± 37,96
TB2	Trébol	43,94 ± 2,50	18,20 ± 3,83	801,0 ± 43,20
TB3	Ballica+trébol	41,78 ± 1,22	12,20 ± 2,28	757,8 ± 45,49

TA: rendimiento alto, TM: rendimiento medio, TB: rendimiento bajo (de *V. vinifera* en distintos cuarteles)

No se encontró una interacción significativa ($p > 0,05$) entre los factores planta y el nivel de Cu inicial en el suelo asociado a rendimiento, mientras que solo el factor suelo resultó ser significativo ($p \leq 0,05$).

Es importante destacar que los valores de Cu disponible alcanzados, con respecto a aquellos previos a la fitorremediación, bajaron de manera considerable (Figura 6). Lo anterior demostraría que el Cu fue absorbido por las plantas, lo que confirmaría la capacidad remediadora de las especies vegetales seleccionadas.

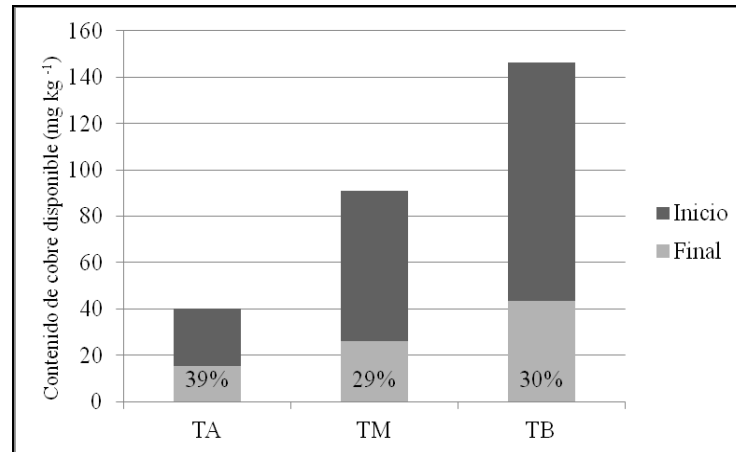


Figura 6. Contenido de cobre disponible (Cu_{DTPA}) según tratamiento al inicio y al final del ensayo, en suelos de la Región de Valparaíso. El porcentaje indica la proporción de Cu al final del ensayo respecto a la condición inicial.

Considerando la importancia del Cu disponible, dada su mayor actividad y asociación al crecimiento de la especie vegetal, las figuras 7 y 8 muestran la vinculación de estos valores con los niveles de materia seca a nivel aéreo y radical de las plantas, respectivamente.

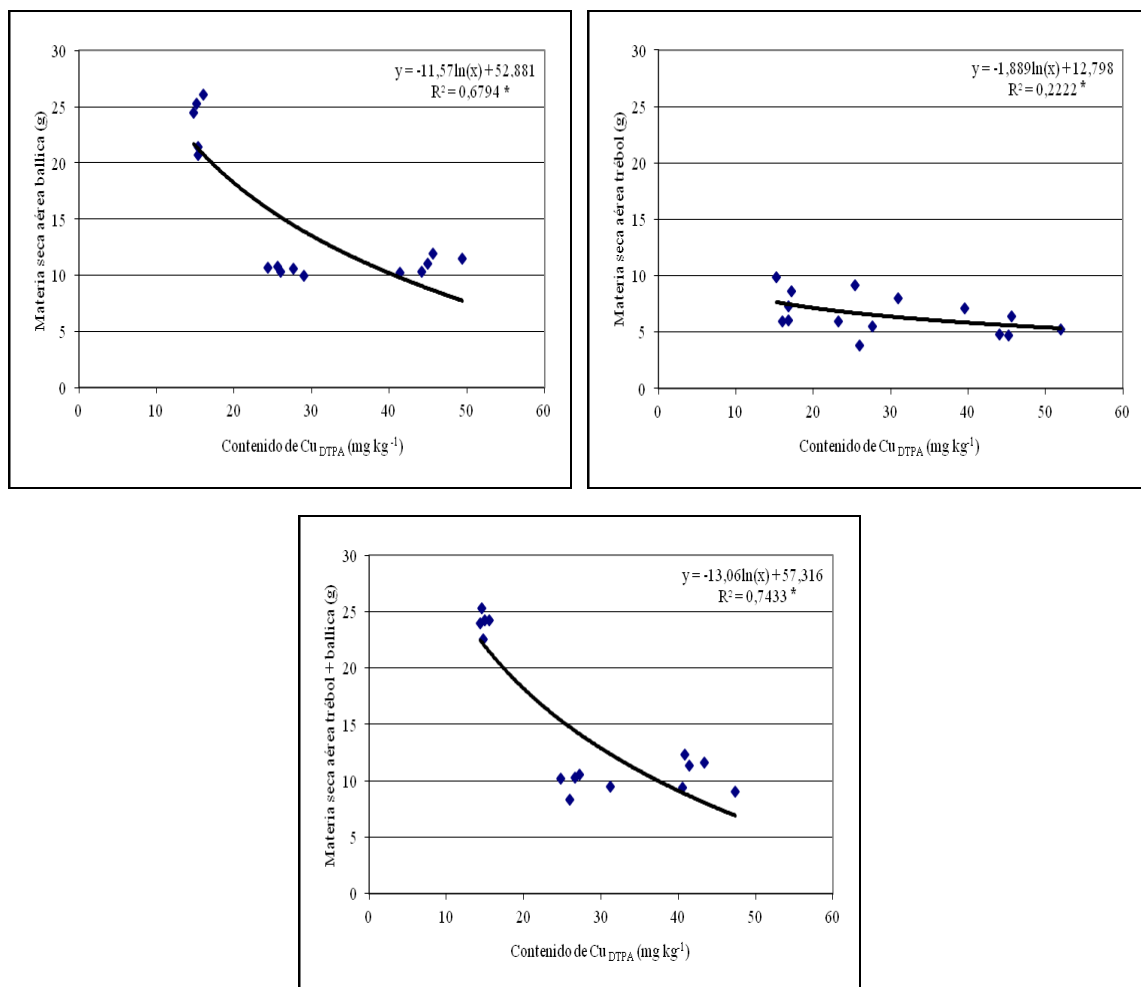


Figura 7. Relación entre masa de materia seca aérea y contenido de cobre disponible (Cu_{DTPA}) para cada especie vegetal utilizada y su combinación (*: $p < 0,05$).

Tanto en ballica como en ballica+trébol, se encontró que a mayor contenido de Cu disponible, menor fue la cantidad de MS aérea. Lo anterior indicaría que cuando una especie vegetal crece en un suelo contaminado con Cu (Cu disponible $> 100 \text{ mg kg}^{-1}$), ésta vería afectado principalmente su crecimiento aéreo (Gunawardana *et al.*, 2010). Aunque el trébol siguió la misma tendencia que las otras especies vegetales, los resultados observados no fueron concluyentes, y más bien se presenta como una especie altamente sensible al Cu, con baja producción de MS en un amplio rango de contenido de Cu en el suelo.

Al comparar el trébol con la ballica se encontró que esta última generó una cantidad de MS aérea mayor, los resultados sugieren que esta especie sería más adecuada para una fitorremediación en suelos contaminados con Cu. Es importante destacar que lo anterior debe ser corroborado con la absorción de Cu en el tejido vegetal de ballica y trébol.

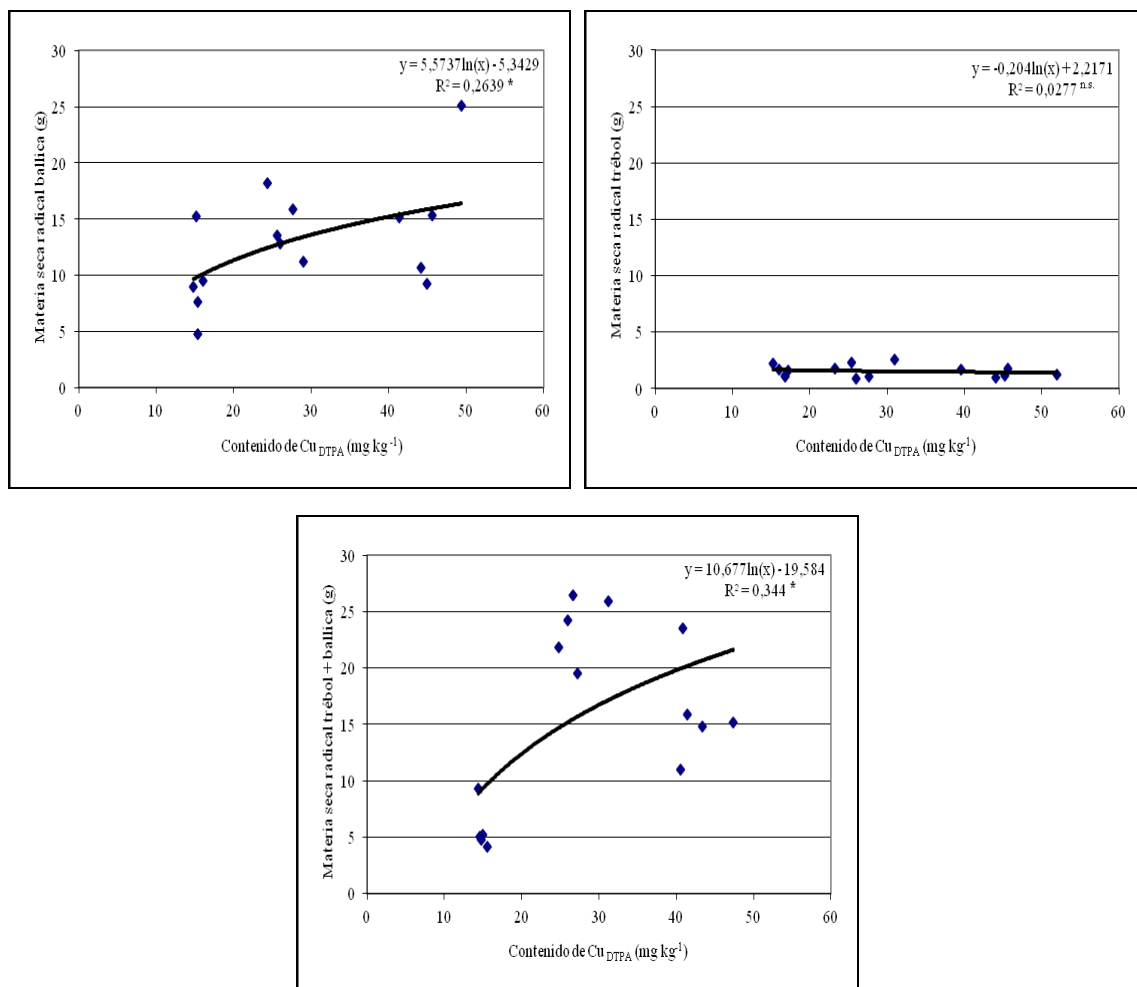


Figura 8. Relación entre masa de materia seca radical y contenido de cobre disponible (Cu_{DTPA}) para cada especie vegetal utilizada y su combinación (*: $p < 0,05$; n.s.: no significativa).

Al analizar la relación entre la MS radical y el contenido de Cu disponible en el suelo (Figura 8), tanto para ballica como para ballica+trébol se evidenció una relación positiva. Así cuando el contenido de Cu disponible aumentó en el suelo, se generó una MS radical mayor, relación inversa a lo encontrado entre contenido de Cu y MS aérea. Lo anterior sugiere que es en las raíces donde se acumula la mayor cantidad de Cu (Bidar *et al.*, 2007). Por otra parte, en el trébol no se observó una tendencia clara entre la concentración de Cu en el suelo y el contenido de Cu en las raíces.

Los niveles de Cu intercambiable en el suelo al final del ensayo mostraron nuevamente que en los sitios las concentraciones seguían el siguiente orden TB > TM > TA (Cuadro 9). En este caso, las diferencias entre especies, dentro de un mismo nivel de Cu, no fueron evidentes. Así también, nuevamente no existió interacción ($p > 0,05$) entre los factores planta y suelo; y solo este último factor (Cuadro 10) tuvo un efecto significativo directo

sobre los contenidos finales de Cu intercambiable, encontrándose diferencias significativas ($p \leq 0,05$) para los tres sitios estudiados.

Cuadro 10. Efecto del factor suelo en los valores finales de cobre intercambiable.

Factor suelo	Cobre intercambiable	
	mg kg ⁻¹	
TA	2,60	a
TM	5,87	b
TB	15,87	c

Letras distintas en una misma columna indican diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0,05$)

TA: rendimiento alto, TM: rendimiento medio, TB: rendimiento bajo (de *V. vinifera* en distintos cuarteles)

El Cu total en los suelos representa la suma de fracciones de este elemento, por lo tanto los valores que se midieron fueron siempre más altos respecto a los anteriormente presentados. Con posterioridad a la fitorremediación, se evidenciaron valores muy altos (Figura 9). Esto ratificó que aunque se haya producido un efecto fitoextractor de parte de las plantas, los rangos en los que quedó finalmente el suelo siguen siendo elevados, por ende el suelo aún sigue contaminado con el metal. Como consecuencia, se reafirma una de las desventajas de la fitorremediación, en el sentido que para lograr una limpieza completa o profunda de un suelo afectado por concentraciones de metales altas, se requiere un plazo superior a 5 años (Shao *et al.*, 2010; Marmiroli y McCutcheon, 2003).

En este caso tampoco se advirtió interacción entre ambos factores (suelo y planta), resultando significativo ($p \leq 0,05$) una vez más, solamente el factor suelo.

En los distintos niveles de Cu total según tratamiento (Figura 9), se puede observar que tanto para los sitios TA y TM los valores obtenidos al final del ensayo fueron 17,2% y 5,3% más bajos respecto a los del inicio, mientras que para TB, una vez finalizada la fitorremediación, los valores prácticamente no cambiaron respecto del inicio; sin embargo estas diferencias no lograron ser estadísticamente significativas.

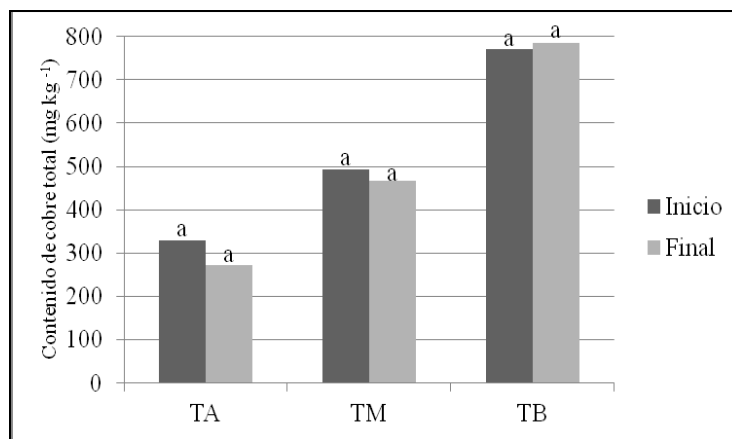


Figura 9. Contenido de cobre total según tratamiento al inicio y al final del ensayo, en suelos de la Región de Valparaíso.

En el Cuadro 11 se presentan los valores de Cu medidos en el material vegetal, los que denotan si las plantas lograron extraer el metal desde el suelo.

Cuadro 11. Contenido de cobre en el tejido vegetal por tratamiento.

Tratamientos	Planta(s)	Cobre en tejido vegetal (mg kg ⁻¹)	
		Aéreo	Radical
TA1	Ballica	329 ± 213,4	306 ± 77,8
TA2	Trébol	102 ± 14,0	320 ± 80,8
TA3	Ballica+trébol	181 ± 142,9	494 ± 93,5
TM1	Ballica	316 ± 107,1	484 ± 65,0
TM2	Trébol	131 ± 35,0	527 ± 173,8
TM3	Ballica+trébol	111 ± 70,1	501 ± 63,7
TB1	Ballica	224 ± 53,7	831 ± 118,3
TB2	Trébol	198 ± 71,5	930 ± 306,9
TB3	Ballica+trébol	95 ± 34,6	730 ± 89,5

TA: rendimiento alto, TM: rendimiento medio, TB: rendimiento bajo (de *V. vinifera* en distintos cuarteles)

Los valores medios de los distintos tratamientos difieren bastante entre sí y, si bien todas las especies sobrepasaron el rango de fitotóxico para Cu foliar (Cu total > 100 mg kg⁻¹) (Pugh *et al.*, 2002; Reeves y Baker, 2000), ninguna logró extraer más de 1.000 mg kg⁻¹ del metal para ser considerada una planta hiperacumuladora (Schnoor, 1997). Algunos investigadores (Ahumada *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2006; Carrasco *et al.*, 2005) en estas mismas especies, lograron obtener valores más bajos respecto a los mostrados en el Cuadro 11, pero tomando como base a suelos con contenido inicial de Cu menor al de este ensayo. Por otra parte, Santibáñez *et al.* (2008) emplearon ballica en suelos con distintos niveles de contaminación de Cu, obteniendo resultados similares a los de esta investigación.

Para poder realizar la comparación de los resultados, se calculó la absorción de Cu en relación a la MS producida por cada tratamiento y tejido (Cuadro 12).

Cuadro 12. Absorción de cobre en el tejido vegetal estimada por tratamiento.

Tratamientos	Planta(s)	Absorción de cobre en tejido vegetal			
		Aéreo	Radical	Aéreo	Radical
		g/maceta		kg ha ⁻¹	
TA1	Ballica	0,789 ± 0,51	0,278 ± 0,14	309,8 ± 201,67	109,4 ± 54,91
TA2	Trébol	0,079 ± 0,03	0,049 ± 0,02	31,0 ± 10,88	19,2 ± 6,49
TA3	Ballica+trébol	0,434 ± 0,34	0,283 ± 0,12	170,3 ± 135,49	111,1 ± 47,02
TM1	Ballica	0,332 ± 0,12	0,697 ± 0,19	130,5 ± 46,28	273,9 ± 73,16
TM2	Trébol	0,087 ± 0,03	0,094 ± 0,05	34,3 ± 11,11	36,8 ± 19,70
TM3	Ballica+trébol	0,109 ± 0,07	1,182 ± 89,5	43,0 ± 28,85	464,3 ± 77,19
TB1	Ballica	0,249 ± 0,07	1,125 ± 0,57	212,0 ± 50,41	289,0 ± 80,61
TB2	Trébol	0,117 ± 0,06	0,125 ± 0,05	58,2 ± 21,55	61,1 ± 37,00
TB3	Ballica+trébol	0,102 ± 0,04	1,197 ± 0,46	89,1 ± 30,69	166,3 ± 75,06

TA: rendimiento alto, TM: rendimiento medio, TB: rendimiento bajo (de *V. vinifera* en distintos cuarteles)

Con respecto a la interacción de los factores en la absorción de Cu por parte del tejido vegetal aéreo, ésta resultó ser significativa ($p \leq 0,05$), por lo que se muestra en los cuadros 13 y 14.

Cuadro 13. Efecto del factor planta en cada nivel del factor suelo, para absorción de cobre en tejido aéreo.

Planta/Suelo	Absorción de cobre en tejido aéreo					
	TA		TM		TB	
	g/maceta					
Ballica	0,789	a	0,332	a	0,249	a
Trébol	0,079	b	0,087	b	0,117	b
Ballica+trébol	0,434	a	0,109	b	0,102	b

Letras distintas en una misma columna indican diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0,05$)

TA: rendimiento alto, TM: rendimiento medio, TB: rendimiento bajo (de *V. vinifera* en distintos cuarteles)

En particular se obtuvo que para el nivel TA de suelo, no existieron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los tratamientos ballica y ballica+trébol. Sin embargo esta situación cambió al analizar el nivel TM y TB, ya que en estos dos casos fue la especie ballica la que presentó los valores significativamente mayores ($p \leq 0,05$) de absorción de Cu en el tejido aéreo, mientras que entre los tratamientos trébol y ballica+trébol no existieron diferencias significativas ($p > 0,05$). De acuerdo a lo anterior, ballica sería la especie que cumple de mejor manera la función de fitoacumular el metal en su parte aérea, en situaciones en que el nivel de Cu disponible del suelo se encuentra de medio a alto (TM y TB). Lo anterior reafirma lo expuesto por Arienzo *et al.* (2004), quienes comprueban que ballica tiene un potencial fitoacumulador importante para suelos contaminados con metales.

Cuadro 14. Efecto del factor suelo en cada nivel del factor planta, para absorción de cobre en tejido aéreo.

Suelo/Planta	Absorción de cobre en tejido aéreo					
	Ballica		Trébol		Ballica+trébol	
	g/maceta					
TA	0,789	a	0,079	a	0,434	a
TM	0,332	b	0,087	a	0,109	b
TB	0,249	b	0,117	a	0,102	b

Letras distintas en una misma columna indican diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0,05$)

TA: rendimiento alto, TM: rendimiento medio, TB: rendimiento bajo (de *V. vinifera* en distintos cuarteles)

Analizando el factor suelo en cada nivel de planta, se evidenció que: i) la ballica solo en el nivel más bajo de Cu (TA) presentó diferencias significativas ($p \leq 0,05$), y que además genera la mayor absorción del metal por parte del tejido aéreo de la planta; ii) en la especie trébol, no existieron diferencias significativas ($p > 0,05$) en ninguno de los niveles de Cu en el suelo; iii) mientras que para ballica+trébol, se observó la misma tendencia que en la especie ballica sola, donde solo el nivel TA presentó diferencias significativas.

Con relación al tejido vegetal de la raíz, no existió interacción entre los factores ($p > 0,05$), y solo el factor planta resultó tener un efecto significativo ($p \leq 0,05$).

Como se muestra en el Cuadro 15, no existieron diferencias estadísticas significativas ($p > 0,05$) entre la ballica y la mezcla ballica+trébol, pero sí entre estos tratamientos y el trébol, ($p \leq 0,05$) en cuanto a la absorción de Cu en el tejido radical. Lo anterior indicaría que la ballica sola o en mezcla con el trébol tendría una alta capacidad de fitoacumular el metal del suelo en su parte radical, tal como observan Santibáñez *et al.* (2008), quienes empleando ballica también obtuvieron una alta capacidad fitoacumuladora.

Cuadro 15. Efecto del factor planta en los valores de absorción de cobre en tejido radical.

Factor planta	Absorción de cobre en tejido radical	
	g/maceta	
Ballica	0,750	a
Trébol	0,089	b
Ballica+trébol	0,887	a

Letras distintas en una misma columna indican diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0,05$)

Para poder visualizar el real potencial fitoacumulador de las especies, se analizó la absorción total por parte de las plantas, es decir, la absorción de la zona radical más la parte aérea.

Como se puede observar en la Figura 10, para la especie ballica no existieron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre la planta en ninguno de los niveles de Cu presente en el suelo. Esto indicaría que para esta especie, independiente del nivel de contaminación del suelo, la planta fue capaz de absorber cantidades similares del metal, aunque cambiando su proporción en el tejido. En el caso del trébol, no existieron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los niveles bajo y medio (TA y TM), ni entre medio y alto (TM y TB). En la mezcla de ambas especies solo se presentaron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) en el nivel más bajo de Cu en el suelo (TA), sin diferencias entre los otros dos niveles. Lo anterior sugiere que la mezcla de las especies utilizadas en un rango medio a alto de contaminación es capaz de absorber cantidades similares de Cu.

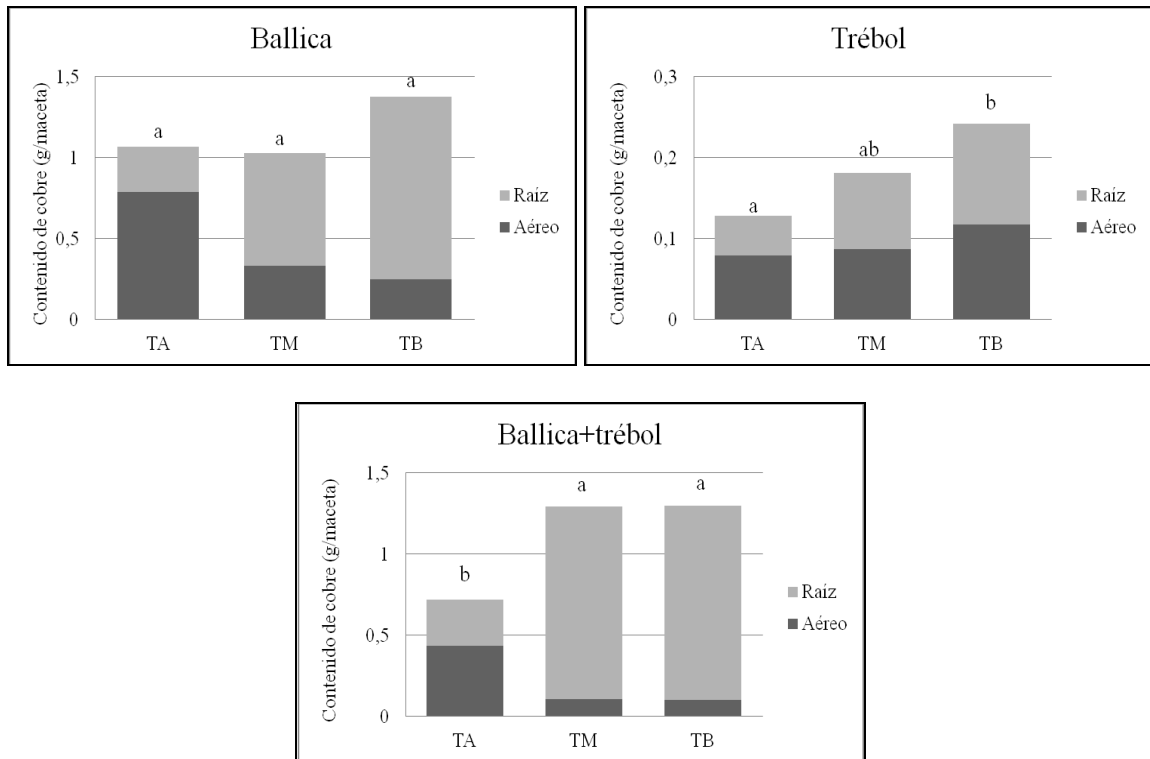


Figura 10. Absorción total de cobre, según especie. Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0,05$); TA: rendimiento alto, TM: rendimiento medio, TB: rendimiento bajo (de *V. vinifera* en distintos cuarteles).

Finalmente se comparó la capacidad de las distintas especies entre los mismos niveles de Cu (Figura 11). Se encontró que para los distintos niveles de Cu presentes en los suelos, ya sea TA, TM o TB, no existieron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre la ballica y la mezcla ballica+trébol. En consecuencia la ballica, ya sea actuando individualmente o en combinación con el trébol, cumplió la función de fitoacumular el metal. Por otra parte, el trébol individualmente mostró una capacidad fitoextractora menor en comparación con la ballica. En este sentido, Jarvis (1980) adjudica este comportamiento principalmente a las diferencias en los patrones de crecimiento de ambas especies.

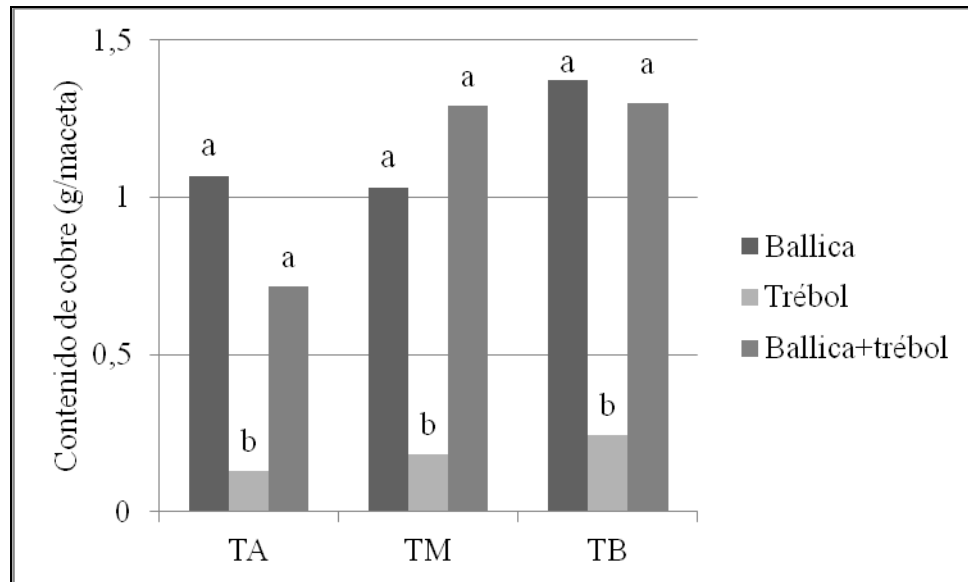


Figura 11. Absorción total de cobre, agrupados según nivel de cobre del suelo. Letras distintas en un mismo grupo de barras, indican diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0,05$); TA: rendimiento alto, TM: rendimiento medio, TB: rendimiento bajo (de *V. vinifera* en distintos cuarteles).

Por último, la remediación de metales pesados en suelos se puede lograr de varias formas (inmovilización modificando el pH del suelo o adicionando materia orgánica, entre otras) entre las que la fitoextracción con plantas que generen alta biomasa resulta ambientalmente amigable (Pietrzak y Uren, 2011; Maier *et al.*, 2000). No obstante, la remediación de viñedos debe ser abordada holísticamente, incluyendo un manejo adecuado del suelo, una selección apropiada de plantas e incrementos de la biodiversidad del sitio (Mackie *et al.*, 2012).

CONCLUSIONES

La materia seca aérea alcanzada por ballica y la mezcla de ballica+trébol no presenta diferencias significativas, pero constituyen la mayor cantidad de ésta en comparación a la obtenida en trébol, para todos los niveles de Cu disponible presentados en los suelos.

En cuanto a la absorción de Cu por parte del tejido aéreo, es ballica la especie que muestra los mayores valores en los suelos TM y TB. Con respecto al tejido radical, se tiene que entre ballica y la mezcla ballica+trébol no existen diferencias significativas, y que son ambos tratamientos los que acumulan de mejor manera el metal en esta parte de la planta. Considerando la absorción de Cu por la totalidad de la planta, es ballica tanto individualmente como en la mezcla con trébol la que acumula la mayor cantidad del metal en todos los niveles de Cu presentes en los suelos.

Los resultados de los análisis del tejido vegetal en los diferentes tratamientos indican que si bien las plantas logran extraer el Cu del suelo, ninguna especie alcanza a hacerlo en un rango tal para ser considerada una planta hiperacumuladora.

Con relación a los niveles de las distintas formas de Cu en los suelos, se tiene que el Cu disponible inicial, respecto al alcanzado post fitorremediación, disminuyó considerablemente en las tres condiciones de suelo (TA, TM y TB), denotando que hubo una extracción por parte de las especies vegetales. La forma intercambiable del Cu no presentó grandes cambios pre y post fitorremediación. En cuanto al Cu total, si bien mostró disminuciones en los suelos TA y TM, éstas no fueron significativas.

Se estima que para este tipo de investigación es precisa una mayor continuidad en el tiempo, ya que los resultados preliminares de este ensayo indican que no se logró una remediación definitiva de los suelos, de manera que los niveles de Cu siguen considerándose elevados. Es importante tener en cuenta que este estudio consideró un ensayo en macetas, y es necesario observar las especies utilizadas a nivel de campo y cómo reaccionan con otras variables conjugadas que pudiesen encontrarse *in situ*.

BIBLIOGRAFÍA

ADIAC. 2007. Elaboración de diagnóstico sectorial y propuesta de acuerdo de producción limpia. Asociación de Distribuidores de Insumos Agrícolas, Chile. Departamento de Acuerdos de Producción Limpia. Santiago. 118 p.

Aggarwal, H. y D. Goyal. 2007. Phytoremediation of Some Heavy Metals by Agronomic Crops. pp: 79-98. *In*: Sarkar D.; R. Datta y R. Hannigan (Eds.). Concepts and Applications in Environmental Geochemistry. Developments in Environmental Science 5. Science Direct. 761 p.

Ahumada, I.; O. Gudenschwager; M.A. Carrasco; G. Castillo; L. Ascar y P. Richter. 2009. Copper and zinc bioavailabilities to ryegrass (*Lolium perenne* L.) and subterranean clover (*Trifolium subterraneum* L.) grown in biosolid treated Chilean soils. *Journal of Environmental Management* 90: 2665–2671.

Alvarenga, P.; A. Gonçalves; R. Fernandes; A. de Varennes; G. Vallini; E. Duarte y A. Cunha-Queda. 2008. Evaluation of composts and liming materials in the phytostabilization of a mine soil using perennial ryegrass. *The Science of the Total Environment* 406: 43-56.

Andreoni, V. y P. Zaccheo. 2010. Potential for the Use of Rhizobacteria in the Sustainable Management of Contaminated Soils. pp: 313-334. *In*: Ashraf, M.; M. Ozturk y M. S. A. Ahmad (Eds.). Plant Adaptation and Phytoremediation. Springer Science+Business Media B.V. 426 p.

Arienzo, M.; P. Adamo y V. Cozzolino. 2004. The potential of *Lolium perenne* for revegetation of contaminated soil from a metallurgical site. *The Science of the Total Environment* 319: 13-25.

Ávila, G.; H. Gaete; S. Sauvé y A. Neaman. 2009. Organic matter reduces copper toxicity for the earth worm *Eisenia fetida* in soils from mining areas in Central Chile. *Chilean Journal of Agricultural Research* 69(2): 252-259.

Bavaresco, L.; M. Gatti y M. Fregoni. 2010. Nutritional Deficiencies. pp: 165-191. *In*: Delrot, S. *et al.* (Eds.). Methodologies and Results in Grapevine Research Springer Science+Business Media B.V. 448 p.

Bidar, G.; G. Garcon; C. Pruvot; D. Dewaele; F. Cazier; F. Douay y P. Shirali. 2007. Behavior of *Trifolium repens* and *Lolium perenne* growing in a heavy metal contaminated field: Plant metal concentration and phytotoxicity. *Environmental Pollution* 147: 546-553.

Bini, C.; S. Casaril y B. Pavoni. 2000. Fertility gain and heavy metal accumulation in plants and soils. *Toxic Environmental Chemistry* 77: 131-142.

Brooks, R. (Ed.). 1998. Plants that Hyperaccumulate Heavy Metals: their Role in Phytoremediation, Microbiology, Archaeology, Mineral Exploration and Phytomining. Wallingford, Oxon: CAB International. 380 p.

Caggiano, R.; M. D'Emilio; M. Macchiato y M. Ragosta. 2005. Heavy metals in ryegrass species versus metal concentrations in atmospheric particulate measured in an industrial area in southern Italy. *Environmental Biomonitoring and Assessment* 102: 67-84.

Cairney, T. (Ed.) 1987. Reclaiming Contaminated Land. Blackie & Sons Limited, Glasgow and London. 260 p.

Calace, N.; B. Petronio; M. Picciolo y M. Pietroletti. 2002. Heavy metal uptake by barley growing in polluted soils: relationship with heavy metal speciation in soils. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 33 (1-2): 103-115.

Carrasco, M.A.; O. León; L. Solis; I. Ahumada; C. Pedraza; G. Castillo y A. Sadzawka. 2005. Evaluación de biodisponibilidad de Mn, Fe, Cu y Zn en suelos tratados con biosólidos usando lechuga y ballica. *Boletín de la Sociedad Chilena de la Ciencia del Suelo* 21: 184.

Chen, Y.; Y. Wang; W. Wu; Q. Lin y S. Xue. 2006. Impacts of chelate-assisted phytoremediation on microbial community composition in the rhizosphere of a copper accumulator and non-accumulator. *Science of the Total Environment* 356: 247-255.

CIREN. 1997. Estudio Agrológico, V Región. Descripción de suelos, materiales y símbolos. Centro de Información de Recursos Naturales, Chile. Publicación 116. 371 p.

Ciura, J.; M. Poniedzialek; A. Sekara y E. Jedrszczyk. 2005. The possibility of using crops as metal phytoremediants. *Polish Journal of Environmental Studies* 14: 17-22.

De Gregori, I.; E. Fuentes; M. Rojas; H. Pinochet y M. Potin-Gautier. 2003. Monitoring of copper, arsenic and antimony levels in agricultural soils impacted and non-impacted by mining activities, from three regions in Chile. *Journal of Environmental Monitoring* 5: 287-295.

Dewis, J. y F. Freitas. 1970. Physical and Chemical Methods of Soil and Water Analysis. Food and Agricultural Organization of the United Nations. Rome, Italy. *Soils Bulletin* N° 10. 252 p.

Dong, Y.; Y.G. Zhu; F.A. Smith; Y. Wang y B. Chen. 2008. Arbuscular mycorrhiza enhanced arsenic resistance of both white clover (*Trifolium repens* L.) and ryegrass (*Lolium perenne* L.) plants in an arsenic-contaminated soil. *Environmental Pollution*. 155: 174-181.

Duquène, L.; H. Vandenhove; F. Tack; E. Meers; J. Baeten y J. Wannijn. 2009. Enhanced phytoextraction of uranium and selected heavy metals by Indian mustard and ryegrass using biodegradable soil amendments. *Science of the Total Environment* 407(5): 1496-1505.

- Dushenkov, V.; P.B.A.N. Kumar; H. Motto y I. Raskin. 1995. Rhizofiltration: The use of plants to remove heavy metals from aqueous streams. *Environmental, Science & Technology* 29(5): 1239-1245.
- Ebbs, S.D.; M.M. Lasat; D.J. Brandy; J. Cornish; R. Gordon y L.V. Kochian. 1997. Heavy metals in the environment: Phytoextraction of cadmium and zinc from a contaminated soil. *Journal of Environmental Quality* 26: 1424-1430.
- EPA. 2006. *In situ* Treatment Technologies for Contaminated Soil. Environmental Protection Agency, Washington D.C, USA. 35 p.
- Ernst, W.H.O. 1996. Bioavailability of heavy metals and decontamination of soils by plants. *Applied Geochemistry* 11: 163-167.
- Fageria, N.K.; V.C. Baligar y Y.C. Li. 2008. The role of nutrient efficient plants in improving crop yields in the twenty first century. *Journal of Plant Nutrition* 31: 1121–1157.
- Flint, A. L. y L. E. Flint. 2002. Particle density. pp: 229-240. *In*: Dane, J. H. and Topp, G. C. (Eds.). *Methods of Soil Analysis. Part 4. Physical Methods*. Soil Science Society of America. Book Series N° 5. Madison, Wisconsin, USA. 1692 p.
- Ginocchio, R.; A.J.M Baker y J. Cucuzza. 2004. Phytoremediation. *Mining Environmental Management* (noviembre-2004): 7-10.
- González, I.; M. Cisternas; U. Kelm y A. Neaman. 2010. Metalófitas en El Teniente y su potencial para la remediación de suelos contaminados por cobre. *Ciencia Ahora* 25: 29-35.
- González, I.; V. Muenia; M. Cisternas y A. Neaman. 2008. Cooper accumulation in a plant community affected by mining contamination in Puchuncaví Valley, central Chile. *Revista Chilena de Historia Natural* 81: 279-291.
- González, S. y R. Ite. 1992. Acumulación metálica en suelos del área bajo influencia de las chimeneas industriales de Ventanas (Provincia de Valparaíso, V Región). *Agricultura Técnica (Chile)* 50(2): 214-219.
- Gunawardana, B.; N. Singhal y A. Johnson. 2010. Amendments and their combined application for enhanced copper, cadmium, lead uptake by *Lolium perenne*. *Plant and Soil* 329: 283-294.
- Havlin, J.L.; S.L. Tisdale; W.L. Nelson y J.D. Beaton. 2013. *Soil Fertility and Fertilizers: An Introduction to Nutrient Management* (8th ed.), Pearson Prentice Hall. Upper Saddle River, USA. 516 p.
- Hazelton, P. y B. Murphy (Eds.). 2007. *Interpreting Soil Test Results. What Do all the Numbers Mean?*. CSIRO Publishing. Australia. 152 p.
- Jankaitė, A. y S. Vasarevičius. 2007. Use of *Poaceae* f. species to decontaminate soil from heavy metals. *Ekologija* 53(4): 84-89.

- Jarvis, S.C. 1980. The uptake and distribution of copper in perennial ryegrass and white clover grown in flowing solution culture with a controlled supply of copper. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 31: 870-876.
- Jones, B. 2003. *Agronomic Handbook: Management of Crops, Soils and their Fertility*. Boca Raton London New York Washington, D.C. CRC Press. 441 p.
- Kabata-Pendias, A. 2011. *Trace Elements in Soils and Plants* (4th ed.). Taylor and Francis Group. CRC Press. Michigan, USA. 505 p.
- Khan, S.; M. Afzal; S. Iqbal y Q.M. Khan. 2013. Plant-bacteria partnerships for the remediation of hydrocarbon contaminated soils. *Chemosphere* 90: 1317-1332.
- Kumar, P.B.A.N.; V. Dushenkov; H. Motto y I. Raskin. 1995. Phytoextraction: The use of plants to remove heavy metals from soils. *Environmental, Science & Technology* 29(5): 1232–1238.
- Lepp, N.W.; N.M. Dickinson y K.L. Ormand. 1984. Distribution of fungicide-derived copper in soils, litter and vegetation of different aged stands of coffee (*Coffea arabica* L.) in Kenya. *Plant and Soil* 77: 263-270.
- Lone, M.; Z. He; P.J. Stoffella y X. Yang. 2008. Phytoremediation of heavy metal polluted soils and water: Progresses and perspectives. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B* 9(3):210-220.
- Mackie, K.A.; T. Müller y E. Kandeler. 2012. Remediation of copper in vineyards: A mini review. *Environmental Pollution* 167: 16-26.
- Maier, R.; I. Pepper y C. Gerba. 2000. *Environmental Microbiology*. Academic Press, San Diego. 585 p.
- Marmioli, N. y S. McCutcheon. 2003. Making Phytoremediation a Successful Technology. pp: 85-119. *In*: S.C. McCutcheon y J.L. Schnoor (eds.). *Phytoremediation: Transformation and Control of Contaminants*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA. 987 p.
- Marques, A.P.G.C.; H. Moreira; A.R. Franco; A.O.S.S Rangel y P.M.L. Castro. 2013. Inoculating *Helianthus annuus* (sunflower) grown in zinc and cadmium contaminated soils with plant growth promoting bacteria – Effects on phytoremediation strategies. *Chemosphere* 92(1): 74-83.
- McGrath, S. 1998. Phytoextraction for Soil Remediation. pp. 261-287. *In*: Brooks, R. (Ed.). *Plants that Hyperaccumulate Heavy Metals: Their Role in Phytoremediation, Microbiology, Archaeology, Mineral Exploration and Phytomining*. CAB International, UK. 380 p.
- Meers, E.; A. Ruttens; M. Hopgood; E. Lesage y F. Tack. 2005. Potential of *Brassica rapa*, *Cannabis sativa*, *Helianthus annuus* and *Zea mays* for phytoextraction of heavy metals from calcareous dredged sediment derived soils. *Chemosphere* 61(4): 561-572.

- Mhatre, G.N. y C.E. Pankhurst. 1997. Bioindicators to detect contamination of soils with special reference to heavy metals. pp: 349-369. *In: Pankhurst, C.E. et al. (Eds.). Biological Indicators of Soil Health. CAB Int., Wallingford, UK. 451 p.*
- Montenegro, G.; C. Fredes; E. Mejías; C. Bonomelli y L. Olivares. 2009. Content of heavy metals in soils near a Chilean copper mining tailing. *Agrociencia* 43: 427-435.
- Muena, V. 2006. Evaluación de especies vegetales para fitorremediación de suelos contaminados en los Maitenes, Puchuncaví, V Región. Taller de Licenciatura. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Facultad de Agronomía. Quillota, Chile. 29 p.
- Municipalidad de Santa María. 2010. Plan de Desarrollo Comunal, Comuna de Santa María. 2010-2013. 45 p.
- Neaman, A.; G. Ávila; H. Gaete y M. Cisternas. 2005. Biotoxicidad del cobre en suelos agrícolas de la cuenca del río Aconcagua. *Boletín de la Sociedad Chilena de la Ciencia del Suelo* 21: 102.
- Neaman, A.; L. Reyes; F. Trolard; G. Bourrié y S. Sauvé. 2009. Copper mobility in contaminated soils of the Puchuncaví Valley, central Chile. *Geoderma* 150: 359-366.
- ODEPA. 2013. Boletín de Insumos (Enero). Oficina de Estudios y Políticas Agrarias, Chile. Ministerio de Agricultura, Gobierno de Chile. Santiago. 16 p.
- Pandolfini, T.; P. Gremigni y R. Gabrielli. 1997. Biomonitoring of Soil Health by Plants. pp: 325-348. *In: Pankhurst, C.E. et al. (Eds.). Biological Indicators of Soil Health. CAB Int, Wallingford, UK. 451 p.*
- Paynel, F.; F. Lesuffleur; J. Bigot; S. Diquélou y J. Cliquet. 2008. A study of ^{15}N transfer between legumes and grasses. *Agronomy for Sustainable Development* 28(2): 281-290.
- Peralta-Videa, J.R.; J.L. Gardea-Torresdey; E. Gómez; K.J. Tiemann; J.G. Parsons y G. Carrillo. 2002. Effect of mixed cadmium, copper, nickel and zinc at different pHs upon alfalfa growth and heavy metal uptake. *Environmental Pollution* 119: 291-301.
- Pichtel, J. y C.A. Salt. 1998. Vegetative growth and trace metal accumulation on metalliferous wastes. *Journal of Environmental Quality* 27: 618-624.
- Pietrzak, U. y D.C. McPhail. 2004. Copper accumulation, distribution and fractionation in vineyard soils of Victoria, Australia. *Geoderma* 122: 151-166.
- Pietrzak, U. y N. Uren. 2011. Remedial options for copper-contaminated vineyard soils. *Soil Research* 49: 44-55.
- Pugh, R.E.; D.G. Dick y A.L. Fredeen. 2002. Heavy metal (Pb, Zn, Cd, Fe and Cu) contents of plant foliage near the Anvil Range lead/zinc mine, Faro, Yukon Territory. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 52(3): 273-279.

- Reeves, R.D. y A.J.M. Baker. 2000. Metal-Accumulating Plants. pp: 193-229. *In*: Raskin, I. y B.D. Ensley (Eds.). *Phytoremediation of Toxic Metals: Using Plants to Clean up the Environment*. John Wiley & Sons, New York, USA. 304 p.
- Richards, D. 1983. The grape root system. *Horticultural Reviews* 5: 127-168.
- Rieder, W. y U. Schwertmann. 1972. Kupferanreicherung in hopfengenutzen Böden der Hallertau. *Landwirtschaftliche Forschung* 25: 170-177.
- Rojas-Tapia, D.; R. Bonilla y J. Dussán. 2011. Effect of inoculation with plant growth-promoting bacteria on growth and copper uptake by sunflowers. *Water, Air, and Soil Pollution* 223(2): 643-654.
- Rosselli, W.; C. Keller y K. Boschi. 2003. Phytoextraction capacity of trees growing on a metal contaminated soil. *Plant and Soil* 256: 265-272.
- Rusjan, D.; M. Strlič; D. Pucko y Z. Korošec-Koruza. 2007. Copper accumulation regarding the soil characteristics in Sub-Mediterranean vineyards of Slovenia. *Geoderma* 141: 111-118.
- Sadzawka, A.; M.A. Carrasco; R. Demanet; H. Flores; R. Grez; M.L. Mora y A. Neaman. 2007. *Métodos de Análisis de Tejidos Vegetales*. 2ª Ed. Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Serie Actas INIA N° 40. Santiago, Chile. 139 p.
- Sadzawka, A.; M.A. Carrasco; R. Grez y M.L. Mora. 2006. *Métodos de Análisis Recomendados para los Suelos Chilenos*. Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Serie Actas INIA N° 34. Santiago, Chile. 113 p.
- Safronova, V.I.; G. Piluzza; S. Bullitta y A.A. Belimov. 2011. Use of Legume-Microbe Symbioses for Phytoremediation of Heavy Metal Polluted Soils: Advantages and Potential Problems. pp: 443-469. *In*: I.A. Golubev (Ed.). *Handbook of Phytoremediation*. Nova Science Publishers, Inc. 815 p.
- Sandoval, M.; J. Dörner; O. Seguel; J. Cuevas y D. Rivera. 2012. *Métodos de Análisis Físicos de Suelos*. Departamento de Suelos y Recursos Naturales, Universidad de Concepción, Chile. Publicación N° 5. 80 p.
- Santibáñez, C.; C. Verdugo; R. Ginocchio. 2008. Phytostabilization of copper mine tailings with biosolids: Implications for metal uptake and productivity of *Lolium perenne*. *Science of the Total Environment* 395: 1-10.
- Santibáñez, F. y J.M. Uribe. 1990. *Atlas Agroclimático de Chile: Regiones V y Metropolitana*. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Laboratorio de Agroclimatología. Santiago, Chile. 66 p.
- Schnoor, J.L. 1997. *Phytoremediation. Ground-Water Remediation Technologies Analysis Center. Technology Evaluation Report, TE-98-01*. 37 p.

- Shao, H.; L. Chu; F. Ni; D. Guo; H. Li y W. Li. 2010. Perspective on Phytoremediation for Improving Heavy Metal-Contaminated Soils. pp: 227-244. *In*: Ashraf, M.; M. Ozturk y M.S.A. Ahmad (Eds.). *Plant Adaptation and Phytoremediation*. Springer Science+Business Media B.V. 426 p.
- Skopp, J.M. 2002. Physical Properties of Primary Particles. pp: 1-15. *In*: *Soil Physics Companion*. Warrick, A.W. (Ed.). CRC Press LLC. 403 p.
- Smith, R.A.H. y A.D. Bradshaw. 1992. Stabilization of toxic mine wastes by the use of tolerant plant populations. *Transactions of the Institution of Mining and Metallurgy* 81(A): 230-237.
- Sparks, D.L. 1996. *Methods of Soil Analysis, Part 3 Chemical Methods*. Soil Science Society of America Books Series N°5. SSSA-ASA, Madison, Wisconsin, USA. 1390 p.
- Tan, K.H. 1996. *Soil Sampling, Preparation and Analysis*. Marcel Dekker, Inc., New York. 408 p.
- Terry, N. y G.S. Bañuelos. 2000. *Phytoremediation of Contaminated Soil and Water*. CRC Press, Lewis Publishers, Boca Raton, USA. 480 p.
- Tiller, K.G. y R.H. Merry. 1981. Copper Pollution of Agricultural Soils. pp: 119-137. *In*: Loneragan, J.F.; A.D. Robson y R.D. Graham (Eds.). *Copper in soils and plants: Proceedings of the Golden Jubilee International Symposium on Copper in Soils and Plants*. Academic Press, Sydney. 380 p.
- Toselli, M.; E. Baldi; G. Marcolini; D. Malaguti; M. Quartieri; G. Sorrenti y B. Marangoni. 2009. Response of potted grapevines to increasing soil copper concentration. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 15: 85–92.
- Tromp, A. y C.A. de Klerk. 1988. Effect of copperoxychloride on the fermentation of must and on wine quality. *South African Society for Enology and Viticulture* 9: 31-36.
- Vamerali, T.; M. Bandiera y G. Mosca. 2010. Field crops for phytoremediation of metal-contaminated land. A review. *Environmental Chemistry Letters* 8: 1-17.
- Wagner, G. 1993. Large scale screening of heavy metals burdens in higher plants. pp: 425-434. *In*: Markert, B. (Ed.). *Plants as Biomonitors: Indicators for Heavy Metals in the Terrestrial Environment*. VCH, Weinheim. 465 p.
- Wei, L.; C. Luo; X. Li y Z. Shen. 2008. Copper accumulation and tolerance in *Chrysanthemum coronarium* L. and *Sorghum sudanense* L. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 55: 238-246.
- Wilson-Corral, V.; C. Anderson; M. Rodríguez-López; A. Arenas-Vargas y J. López-Pérez. 2011. Phytoextraction of gold and copper from mine tailings with *Helianthus annuus* L. and *Kalanchoe serrata* L. *Minerals Engineering* 24: 1488-1494.

Yruela, I. 2009. Copper in plants: acquisition, transport and interactions. *Functional Plant Biology* 36(5): 409-430.

Zayed, A.; S. Gowthaman y N. Terry. 1998. Phytoaccumulation of trace elements by wetland plants: duckweed. *Journal of Environmental Quality* 27: 715-721.

Zupan, M.; V. Hudnik; F. Lobnik y V. Kadunc. 1995. Accumulation of Pb, Cd, Zn from Contaminated Soil to Various Plants and Evaluation of Soil Remediation with Indicator Plant (*Plantago lanceolata*). pp. 325–335. *In*: Prost, R. (Ed.). *Contaminated Soils: 3rd International Conference on the Biogeochemistry of Trace Elements*. INRA, Paris. 528 p.

ANEXO I

Serie de suelo Santa María (CIREN, 1997)

Profundidad (cm)	Características físicas y morfológicas del pedón
0 - 17 A ₁	Pardo oscuro (7.5YR 3/2); franca; ligeramente plástico y adhesivo; friable en húmedo; bloques subangulares medios y finos, débiles. Raíces finas y medias abundantes; poros finos, medios y gruesos abundantes; actividad biológica abundante. Límite lineal, claro.
17 - 54 B ₁	Pardo oscuro (7.5YR 3/2); franco arcillosa; plástico y adhesivo; friable en húmedo; bloques subangulares medios, moderados. Raíces finas, medias y gruesas abundantes; poros finos y medios abundantes; actividad biológica abundante. Gravilla muy fina común. Límite ondulado, difuso.
54 - 67 B ₂	Pardo oscuro (7.5YR 4/4); franca; plástico y adhesivo; friable en húmedo; estructura de bloques subangulares medios, moderados. Raíces finas y medias comunes y gruesas escasas; poros finos y medios abundantes; actividad biológica abundante. Gravas redondeadas escasas en el límite con el horizonte inferior. Límite ondulado, claro.
67 - 110 B ₃	Rojo amarillento (5YR 4/4); franca; ligeramente plástico y adhesivo; friable en húmedo; estructura de bloques subangulares medios, moderados. Raíces finas comunes; poros abundantes; actividad biológica escasa. Gravilla fina redondeada de tipo andesítico y gravas comunes. Límite ondulado, abrupto.
110 y + BC	Substrato aluvial constituido por clastos redondeados de diversos tamaños y naturaleza petrográfica, con predominio de rocas básicas y neutras (basalto-andesita, diorita), con matriz franco arenosa a franco arcillo arenosa de color rojo amarillento y que constituye entre el 10 a 20% del volumen del substrato.

APÉNDICE I

Materia seca post fitorremediación según cada tratamiento

Tratamientos	Planta(s)	Masa de materia seca (g)		
		Aérea	Radical	Total
TA1	Ballica	24,18 ± 1,81	9,23 ± 3,85	33,41 ± 5,33
TA2	Trébol	7,58 ± 1,69	1,55 ± 0,56	9,13 ± 2,02
TA3	Ballica+trébol	24,05 ± 0,98	5,71 ± 2,04	29,76 ± 2,24
TM1	Ballica	10,48 ± 0,34	14,34 ± 2,76	24,82 ± 3,00
TM2	Trébol	6,59 ± 0,96	1,72 ± 0,75	8,32 ± 1,62
TM3	Ballica+trébol	9,77 ± 0,90	23,60 ± 2,91	33,37 ± 2,67
TB1	Ballica	11,00 ± 0,75	15,11 ± 6,19	26,12 ± 6,55
TB2	Trébol	5,65 ± 1,06	1,36 ± 0,37	7,01 ± 1,41
TB3	Ballica+trébol	10,73 ± 1,46	16,05 ± 4,58	26,79 ± 5,72

TA: rendimiento alto, TM: rendimiento medio, TB: rendimiento bajo (de *V. vinifera* en distintos cuarteles)