

Efectos del Cu en la absorción de nutrientes en una especie vegetal procedente de suelos mineros

TRIGUEROS VERA, D.¹, MINGORANCE ALVAREZ, M. D.¹, VALDÉS CASTRILLÓN, B.², ROSSINI OLIVA, S.²

¹Instituto Andaluz de Ciencias de la Tierra (CSIC-UGR), Profesor Albareda 1, 18008, Granada (España), daniel.trigueros@eez.csic.es

²Departamento de Biología Vegetal y Ecología, Universidad de Sevilla, Av. Reina Mercedes s/n, 41012, Sevilla (España).

Resumen

La intensa explotación de los recursos naturales acontecida a partir de la mitad del siglo pasado ha propiciado una degradación ambiental progresiva. En el caso de las explotaciones mineras se generan grandes áreas en las que los suelos ven reducida, o incluso mermada, su fertilidad. En el área minera de Riotinto se aprecian vastas áreas con suelos que presentan un bajo contenido en nutrientes, pH ácido, baja capacidad de intercambio catiónico y un enriquecimiento en metales, entre los que cabe destacar el Cu. A pesar de la existencia de unas condiciones edáficas desfavorables, diversas especies vegetales han conseguido establecerse en la zona evitando de este modo parte de la erosión y degradación del suelo. Entre estas especies cabe destacar *Erica australis* y *Erica andevalensis*. Para estudiar el efecto que los niveles de Cu disponible pueden tener sobre la nutrición mineral y el crecimiento de esta especie, plántulas de *E. australis* fueron cultivadas en solución nutritiva y expuestas a diferentes concentraciones de Cu (50, 100 y 200 μM) bajo condiciones controladas. La respuesta a los diferentes niveles de Cu fue medida determinando la absorción de macro- y micro- nutrientes en las diferentes partes vegetales, el contenido hídrico relativo de la parte aérea y de la raíz y la variación de biomasa fresca. El aumento de Cu en la solución nutritiva induce una disminución de la biomasa y del contenido hídrico y favorece la absorción de la mayoría de los nutrientes.

Palabras clave

***Erica australis*, Riotinto, metal, nutrición vegetal, biomasa.**

1. Introducción

El área minera de Riotinto (Faja Pirítica Ibérica, SO de España), ha sido objeto de una intensa actividad minera desde época de los Tartessos, alcanzándose su máximo apogeo a finales del s. XIX (TORNOS, 2008). Una explotación minera de tan dilatada historia ha generado millones de toneladas de escombros y residuos mineros, que acidifican y enriquecen el suelo de la zona en metales dificultando el establecimiento de la biota. Además, estos suelos presentan una serie de atributos que los caracterizan como suelos de baja fertilidad. A pesar de dichas características edáficas, diversas especies vegetales han sido capaces de establecerse en los suelos de la zona constituyendo poblaciones estables.

El establecimiento de comunidades vegetales constituye el eje central de cualquier plan de restauración de terrenos degradados (HOBBS & NORTON 1996). Las comunidades vegetales pioneras juegan un papel muy importante en la recuperación de suelos mineros



degradados, mejorando algunas de las características físico-químicas y nutritivas del suelo y facilitando el establecimiento de otras especies vegetales (FREITAS ET AL., 2004). Entre las especies que han colonizado de forma espontánea los suelos mineros de la Faja Pirítica se encuentran *Erica australis*, *E. andevalensis*, *Nerium oleander*, **Ulex eriocladus** y varias especies del género *Cistus* (TRIGUEROS VERA ET AL., 2010). Todas estas plantas son capaces de sobrevivir en suelos con escasa fertilidad y condiciones hostiles, como la elevada concentración de elementos potencialmente tóxicos y la presencia de ciertos micronutrientes en concentraciones superiores a las consideradas óptimas para el desarrollo vegetal.

Los metales, esenciales o no, son tóxicos para las plantas cuando están presentes en concentraciones elevadas (TURNER, 1994). Este es el caso del Cu, metal esencial para las plantas que interviene en varios procesos fisiológicos importantes, como la fotosíntesis y la respiración, pero que en exceso puede ser fitotóxico por la formación de especies reactivas de oxígeno, que dañan las células, o por la inactivación de proteínas (MARSCHNER, 1995; YRUELA, 2009). En los suelos del área de Riotinto se encuentra en concentraciones de hasta 410 mg Cu total/kg. Estos valores pueden ser considerados como contaminantes de acuerdo a diversas normativas (BOWEN, 1979; VAN DEN BERG ET AL., 1993), pudiendo alterar el estado nutritivo y fisiológico de las plantas que crecen en la zona.

Erica australis L. (Ericaceae) es una especie perenne dominante de los matorrales occidentales de la Península Ibérica con una amplia distribución en la zona de Riotinto. Se trata de una especie rebrotadora facultativa que coloniza áreas abandonadas formando densos matorrales de un estado sucesional temprano o intermedio (CRUZ ET AL., 2003). Aunque existen referencias de poblaciones monoespecíficas en la Faja Pirítica Ibérica, en Riotinto es frecuente encontrarla asociada a *E. andevalensis* formando comunidades de tipo *Ericetum australi-andevalensis* (RIVAS-MARTÍNEZ ET AL., 2001). Si bien, las dos especies se encuentran ampliamente representadas en la zona de Riotinto, *E. australis* es capaz de colonizar un mayor número de hábitats. Para investigar la potencialidad de *E. australis* como agente estabilizador y remediador de los suelos de Riotinto, se han estudiado los efectos que puede tener un exceso de Cu en el medio de cultivo. Por la dificultad que supone el estudio *in situ* del comportamiento de *E. australis* frente a diferentes concentraciones de Cu se realizaron ensayos bajo condiciones controladas, permitiendo el control de un mayor número de variables que puedan influir en la respuesta de la planta.

2. Objetivo

El presente trabajo tiene como objetivo el estudio del efecto del Cu sobre la nutrición de *E. australis* bajo condiciones controladas. El efecto del Cu se evaluó determinando la biomasa, el contenido hídrico y la cantidad de nutrientes acumulados en los diferentes órganos vegetales.

3. Metodología

3.1. Obtención de plántulas

Se recogieron cápsulas maduras de *E. australis* en Junio de 2008 de una población de la zona minera de Riotinto, localizada en las orillas del río Tinto, en un tramo próximo a su nacimiento. Las semillas fueron tratadas de acuerdo a TRIGUEROS VERA ET AL. (2010) y se germinaron previo tratamiento por choque térmico.



Las plántulas obtenidas fueron cultivadas durante tres meses en solución nutritiva (pH 4) conteniendo (en mM): NO_3^- , 4; H_2PO_4^- , 1; SO_4^{2-} , 2,5; K^+ , 4; Ca^{2+} , 2; Mg^{2+} , 1. Los micronutrientes se suministraron como se describe en la fórmula de Long Ashton (Hewitt 1966) y el hierro fue suministrado como 4 mg/L Fe-EDDHA. Tanto el cultivo de plántulas como los ensayos se realizaron en cámara de cultivo con ciclo de 16 h de luz (23 °C)/ 8 h de oscuridad (18 °C) y una iluminación de 160 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$. La solución nutritiva se mantuvo oxigenada durante la duración de los ensayos mediante una bomba de acuario.

3.2. Cultivo de *Erica australis* en solución de Cu

Para realizar los diferentes ensayos se prepararon soluciones nutritivas con niveles de Cu (CuSO_4) de 50, 100 y 200 μM . Estos valores se corresponden con los valores de Cu disponible en los suelos de Riotinto, estimados como fracción extraída con EDTA, que se encuentran entre 2 y 52 mg/kg. Se utilizaron 8 plantas crecidas según el apartado anterior para cada nivel de Cu. Se usaron tres plantas para realizar el seguimiento de la biomasa y para determinar el contenido hídrico y otras para el análisis de nutrientes.

La respuesta de las plantas tratadas se comparó con el control, constituido por plantas crecidas en solución nutritiva (1 μM Cu). Los ensayos se realizaron bajo las mismas condiciones descritas anteriormente. La solución nutritiva se reemplazó cada 10 días durante los 30 días de duración del ensayo. Al final del experimento se cosecharon las plantas y se separaron hojas, tallos y raíces. Estas últimas se lavaron con agua destilada.

3.3 Parámetros de crecimiento y nutrientes

Se determinó el peso fresco (Pf) de las plantas al principio, cada 10 días y al final del experimento para establecer la variación de la biomasa a lo largo del tiempo.

Se determinó el contenido hídrico (CH) de la parte aérea y de las raíces expresado como $(\text{Pf}-\text{Ps})/\text{Ps}$ (Ps, peso seco) al final del ensayo.

El material vegetal se secó a 60 °C durante 48 h, se molió y se sometió a digestión con $\text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{O}_2$ asistida por microondas (MarsXpress, CEM). Posteriormente se analizó el Cu y los macro- y micro-nutrientes por ICP-OES (Thermo ICAP 6000SERIES)

3.4. Tratamiento estadístico de los datos

Se contrastó la normalidad de los datos (test de Shapiro-Wilks) y la homogeneidad de varianzas (test de Levene). En el caso de no cumplirse estas premisas se procedió a la transformación de los datos o se utilizó el tests no paramétricos de la U de Mann-Whitney. La relación entre la acumulación de Cu y los otros nutrientes en los diferentes órganos vegetales fue analizada usando el coeficiente de correlación de Pearson. Además, se estudió la relación entre el nivel de exposición a Cu y la acumulación de Cu en hojas, tallos y raíces, y la relación entre la biomasa y el tiempo de exposición mediante análisis de regresión. La significación que se eligió en todas las pruebas para aceptar la hipótesis nula fue de 0.05. El tratamiento estadístico de los resultados se llevó a cabo con el paquete estadístico SPSS 15.0 (SPSS Inc.).



4. Resultados

4.1. Efecto del Cu en los parámetros de crecimiento de la planta

La variación del Pf a lo largo del ensayo (Fig. 1) mostró que la biomasa alcanzada a los 30 días de ensayo se reduce significativamente con el aumento de la exposición a Cu. Dichos efectos comienzan a ser evidentes a un nivel de 100 μM Cu, que se corresponde con unos niveles de Cu en hojas, tallos y raíces de 25, 28 y 804 mg/kg, respectivamente. A concentraciones de Cu en el medio de 100 y 200 μM las plantas presentaron unos valores de Pf al final del ensayo menores que los iniciales. El estudio de la evolución de la biomasa a lo largo del tiempo mostró que sólo se produce un aumento significativo en la biomasa en los diez días transcurridos entre pesada y pesada en las plantas control ($R^2 = 0,979$; $y = 98 * e^{-0,023t}$) y en las expuestas a 50 μM de Cu ($R^2 = 0,753$; $y = 99 + 1,24 * t$).

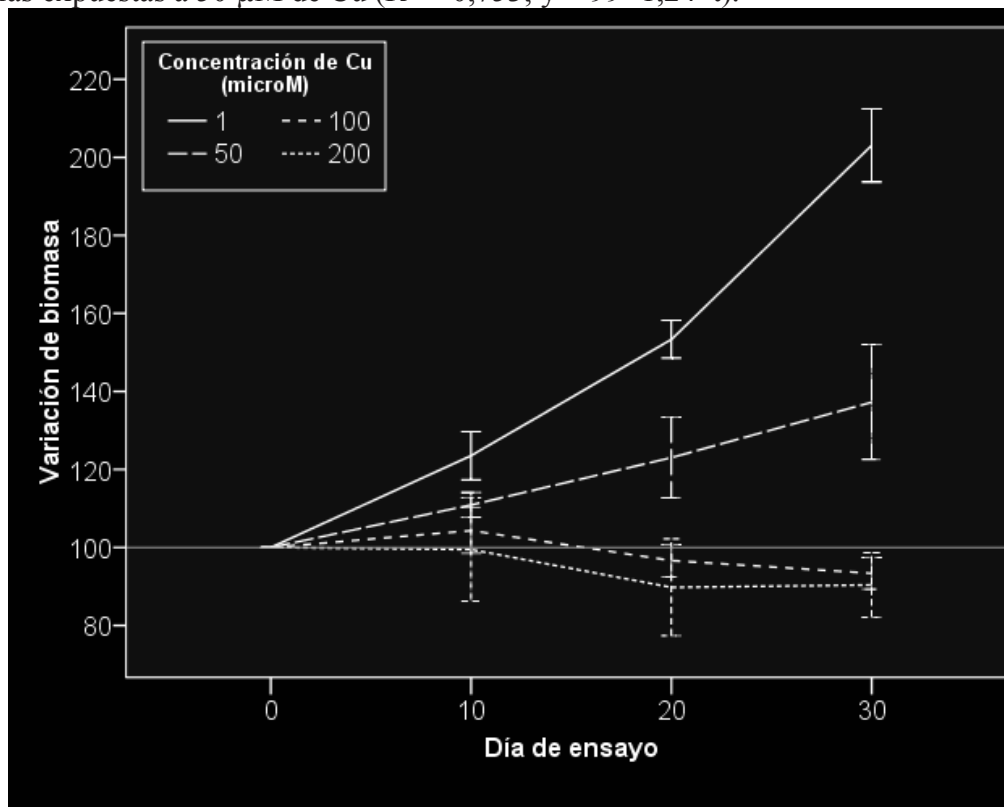


Figura 1. Variación de la biomasa (media \pm desviación típica) en las plantas de *Erica australis* expuestas a 1 (Control), 50, 100 y 200 μM de Cu..

Los contenidos hídricos de la parte aérea y de las raíces fueron significativamente afectados por la exposición a Cu. En la figura 2 se observa que la exposición a una concentración de Cu de 50 μM produjo una reducción significativa del CH de la parte aérea ($p = 0,029$) y de las raíces ($p = 0,029$) al compararse con el control. Al aumentar el nivel de exposición a Cu (100 y 200 μM) se observó una reducción ($p < 0,050$) del CH de la parte aérea más acusada. No se apreciaron diferencias significativas ($p > 0,050$) entre los contenidos hídricos de las plantas expuestas a 100 y 200 μM de Cu.



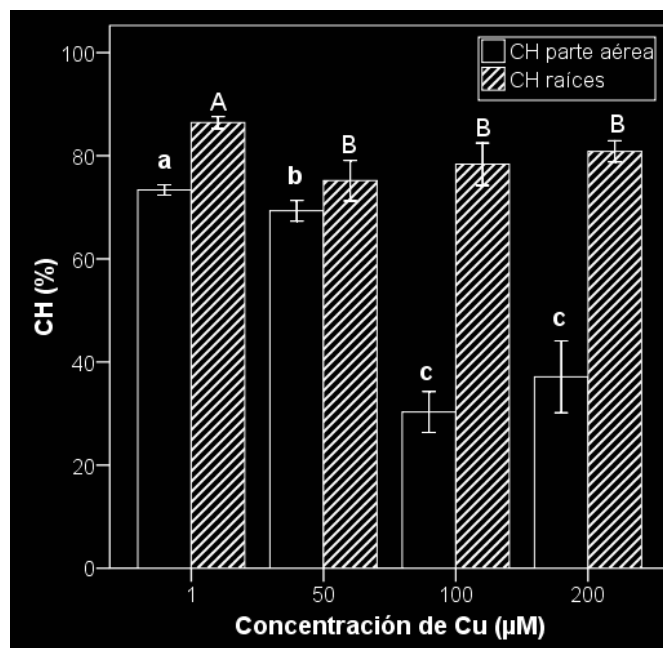


Figura 2. Contenido hídrico (CH) determinado en plantas de *Erica australis* sometidas a 1 (Control), 50, 100 y 200 µM de Cu. Los valores indican la media ± desviación típica. Diferentes letras indican diferencias significativas entre los valores de CH de la parte aérea (minúsculas) y de las raíces (mayúsculas).

4.2. Acumulación de Cu en hojas, tallos y raíces

La mayor acumulación de Cu se produjo fundamentalmente en las raíces (Tabla 1) y tan sólo un pequeño porcentaje fue transportado a la parte aérea. En ésta, el tallo acumuló la mayor cantidad de Cu, aunque sigue siendo unas 20 veces inferior a la encontrada en raíces. Por lo tanto, el patrón de acumulación de Cu fue raíces > tallos ≥ hojas.

Tabla 1. Concentraciones de Cu (mg/kg) determinadas en hoja, tallo y raíz de *Erica australis* expuestas a los diferentes niveles de Cu. Los valores indican la media ± desviación típica. Coeficientes de regresión (a, b) ± error típico.

	Concentración de Cu añadida (µM)				Regresión exponencial		
	1 (Control)	50	100	200	R ²	a	b
Hoja	4,5 ± 1,3	25 ± 5	59 ± 18	50 ± 30	0,913	5,0 ± 0,8	0,026 ± 0,003
Tallo	4,0 ± 0,1	28 ± 6	200 ± 100	170 ± 120	0,954	4,0 ± 0,7	0,037 ± 0,003
Raíz	23 ± 4	800 ± 200	3700 ± 300	6000 ± 1400	0,943	30 ± 8	0,052 ± 0,004

La cantidad de Cu encontrada (y) en los tres órganos aumentó exponencialmente ($y=a \cdot e^{bx}$) a medida que aumentaba el nivel de exposición a Cu (x) entre 1 y 100 µM (tabla 1).

4.3. Efecto del Cu en la nutrición mineral

La acumulación de Cu en los distintos órganos vegetales influyó en la absorción de macro- y micro- nutrientes. Se puede observar (tabla 2) que un aumento en el contenido de Cu en las hojas produjo una mayor acumulación de todos los macro- y micro- nutrientes, con la excepción del P y B. En el tallo, sin embargo, la cantidad de Cu sólo estaba relacionada positivamente con S y Zn. En la raíz, las cantidades de todos los macro- y micro- nutrientes se encontraron relacionadas positivamente con el nivel de Cu en dicho órgano, observándose un efecto antagonista entre la acumulación de Cu y la de K.



Tabla 2. Valores del coeficiente de Pearson ($p < 0,05$) para las relaciones entre la concentración de Cu en los diferentes órganos vegetales y las concentraciones de macro- y micro- nutrientes ($n \geq 16$).

	MACRONUTRIENTES					MICRONUTRIENTES			
	P (%)	K (%)	S (%)	Mg (%)	Ca (%)	Fe (mg/kg)	Mn (mg/kg)	B (mg/kg)	Zn (mg/kg)
HOJA	----	0,607	0,751	0,643	0,696	0,484	0,641	----	0,550
TALLO	----	----	0,848	----	----	----	----	----	0,605
RAÍZ	0,960	-0,558	0,889	0,591	0,577	0,982	0,843	0,939	0,809

5. Discusión

Para la mayoría de las especies, los valores de Cu considerados tóxicos en hojas se encuentran entre 20 y 30 mg/kg (ROBSON & REUTER, 1981; KABATA-PENDIAS, 2001). En nuestro estudio, las plantas tratadas con 100 y 200 μM Cu presentaron unos niveles superiores a este rango (Tabla 1).

Aunque el contenido de Cu en hojas de especies metalofitas puede llegar hasta valores de 1000 mg/kg (MARSCHNER, 1995), KRUCKEBERG & WU (1992) observaron que concentraciones de Cu por encima de los 60 μM inhiben significativamente el crecimiento vegetal en especies de suelos contaminados con Cu. Los elevados niveles de Cu encontrados en las hojas de *E. australis* pueden ser los responsables de la marcada reducción de biomasa y de contenido hídrico observada en las plantas tratadas con 100 y 200 μM de Cu. En las plantas expuestas a 50 μM Cu se observa una menor reducción del CH de la parte aérea y del crecimiento que podría estar relacionada con los valores de Cu en dichos tejidos, que se encuentran en el umbral de toxicidad por Cu (KABATA-PENDIAS, 2001).

En suelos alterados por la minería del Cu, las especies vegetales colonizadoras exportan poco Cu a la parte aérea, acumulando la mayoría en las raíces (POSCHENRIEDER ET AL., 2001). De este Cu, hasta un 60 % podría estar unido a las paredes celulares y a la interfase pared celular-membrana plasmática (IWASAKI ET AL., 1990). De este modo, las plantas evitan la acumulación de Cu en hojas, donde este metal produce mayor toxicidad puesto que interfiere con la fotosíntesis. Así, muchas de las plantas colonizadoras de suelos mineros siguen esta estrategia, basada en la *exclusión*, para hacer frente a unos elevados niveles de Cu disponible (KRUCKEBERG & WU, 1992; POSCHENRIEDER ET AL., 2001), al igual que ocurre con *E. australis* en nuestro estudio. ROSSINI OLIVA ET AL. (2010) observó un patrón de acumulación de Cu parecido en *E. andevalensis* al crecer plántulas en concentraciones crecientes de Cu. Sin embargo, esta estrategia es eficaz hasta cierto nivel de exposición, ya que existe una concentración umbral (entre 100 y 200 μM en nuestros experimentos) a partir de la cual el exceso de Cu parece producir la muerte de las raíces por sus efectos tóxicos sobre las membranas celulares, destruyendo los mecanismos de exclusión.

Diferentes estudios han demostrado que en determinadas concentraciones, algunos elementos interfieren en la acumulación de otros elementos (FRITIOFF & GREGER, 2006). Algunos cationes, por su similitud con otros elementos, pueden entrar en las plantas compitiendo por la ruta de entrada de nutrientes. Una vez dentro, los metales de transición pueden competir con los cationes esenciales por los sitios de unión específica, desplazándolos y originando una importante acción tóxica (YRUELA, 2009). También se ha observado que,



en los tejidos de las plantas, el Cu interactúa con varios elementos (KABATA-PENDIAS, 2001).

En el caso de toxicidad por Cu, dicho metal va alterando la estructura de la membrana celular y el crecimiento de las raíces (ERNST ET AL., 1992) pudiendo desencadenar la inhibición de la absorción y el transporte de nutrientes esenciales. En nuestro estudio, elevados niveles de Cu inducen una reducción de la acumulación de K en raíces que puede ser atribuida a la pérdida de K, indicando daños en la membrana celular y pérdida de su selectividad (ERNST ET AL., 1992). En cambio, el aumento de Cu en el medio favorece la acumulación en la raíz de todos los macro- y micro- nutrientes. Se ha publicado que algunos macroelementos, como el Ca, Mg o P, desempeñan un papel protector frente a los efectos tóxicos de algunos metales pesados (ZIMDAHL, 1976; KARATAGLIS, 1981; RENGEL, 1992). Consecuentemente, el aumento en los contenidos de nutrientes observados, tanto en raíces como en hojas de *E. australis*, puede constituir una estrategia para proteger a la planta frente a los efectos tóxicos del Cu. En particular, la correlación positiva observada entre Cu y P en raíz indica que el P juega un papel importante en el control del transporte y acumulación de Cu, como han mostrado algunos estudios en otras especies como el frijol enano (WALLACE & CHA, 1989) y la col china (XIONG ET AL., 2002). Aunque el antagonismo entre Fe y Cu ocurre muy a menudo en especies expuestas a niveles tóxicos de Cu, en el presente estudio los niveles de Fe en hojas y raíces aumentan a medida que lo hace el Cu. Este hecho no es una excepción, ya que situaciones similares han sido descritas en plantas de orégano (PANOU-FILOTHEOU ET AL., 2001) y trigo (LANARAS ET AL., 1993) expuestas a niveles tóxicos de Cu.

Por último, cabe señalar que las plantas de *E. australis* expuestas a 200 μM de Cu sufren una toxicidad a la que no pueden hacer frente, por lo que se produce una alteración de su fisiología y de todas las tendencias que han sido expuestas anteriormente.

6. Conclusiones

Erica australis muestra el comportamiento típico de las plantas excluidoras de metales y la mayor parte del Cu absorbido es acumulado en raíces, donde su toxicidad es menor. Sin embargo, cuando se expone a concentraciones de Cu superiores a 50 μM , se observa una inhibición del crecimiento que puede indicar que se ha sobrepasado el umbral de concentración a partir del cual los mecanismos de exclusión no funcionan de forma correcta.

Un aumento de Cu en raíz y hoja produce un aumento paralelo de la mayoría de los nutrientes, indicándonos que la mayor acumulación de macro- y micro- nutrientes puede constituir uno de los mecanismos que *E. australis* tiene para hacer frente a los efectos tóxicos de unas elevadas concentraciones de Cu en el medio de cultivo.

7. Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por la Fundación Ramón Areces (Título del proyecto: Mecanismos de Resistencia a Metales Pesados en Especies Significativas de la Cuenca Minera de Riotinto).

8. Bibliografía

BOWEN, H.J.M., 1979. Environmental chemistry of the elements. Academic Press, London.



CRUZ, A., PÉREZ, B., VELASCO, A. & MORENO, J.M., 2003. Variability in seed germination at the interpopulation, intrapopulation and intraindividual levels of the shrub *Erica australis* in response to fire-related cues. *Plant Ecol* 169:93-103

ERNST, W.H.O., VERKLEIJ, J.A.C. & SCHAT, A., 1992. Metal tolerance in plants. *Acta Bot Neerl* 141: 229-248

FREITAS, H., PRASAD, M.N.V. & PRATAS, J., 2004. Plant community tolerant to trace elements growing on the degraded soils of São Domingos mine in the south east of Portugal: environmental implications. *Environ Int* 30: 65-72

FRITIOFF, A. & GREGER, M., 2006. Uptake and distribution of Zn, Cu, Cd and Pb in an aquatic plant *Potamogeton natans*. *Chemosphere* 63: 220-227

HOBBS, R.J. & NORTON, D.A., 1996. Towards a conceptual framework for restoration ecology. *Restor Ecol* 4(2): 93-110

IWASAKI, K., SAKURAI, K. & TAKAHASHI, E., 1990. Copper binding by the root cell walls of Italian ryegrass and red clover. *Soil Sci Plant Nutr* 36, 431-440

KABATA-PENDIAS, A., 2001. Trace elements in soils and plants. CRC, Boca Raton, Florida.

KARATAGLIS, S.S., 1981. Influence of the soil Ca on the tolerance of *Festuca rubra* populations against toxic metals. *Phyton* 21: 103-113

KRUCKEBERG, A.L. & WU, L., 1992. Copper tolerance and copper accumulation of herbaceous plants colonizing inactive California copper mines. *Ecotoxicol Environ Safety* 23: 307-319

LANARAS, T., MOUSTAKAS, M., SYMEONIDIS, L., DIAMANTOGLIOU, S. & KARATAGLIS, S., 1993. Plant metal content, growth responses and some photosynthetic measurements on field-cultivated wheat growing on ore bodies enriched in Cu. *Physiol Plant* 88: 307-314

MARSCHNER, H., 1995. Mineral nutrition of higher plants. 2nd Ed. Academic Press, London.

PANOUI-FILOTHEOU, H., BOSABALIDIS, A.M. & KARATAGLIS, S., 2001. Effects of copper toxicity on leaves of oregano (*Origanum vulgare* subsp. *hirtum*). *Ann Bot* 88: 207-214

POSCHENRIEDER, C., BECH, J., LLUGANY, M., PACE, A., FENÉ, E. & BARCELÓ, J., 2001. Copper in plant species in a copper gradient in Catalonia (North East Spain) and their potential for phytoremediation. *Plant Soil* 230: 247-256

RENGEL, Z., 1992. Role of calcium in aluminium toxicity. *New Phytol* 121: 499-513



ROBSON, A.D., REUTER, D.J., 1981. Diagnosis of copper deficiency and toxicity. En: Loneragan, J.F., Robson, A.D. & Graham, R.D. (eds.): Copper in soil and plants. Academic, London.

RIVAS-MARTÍNEZ, S., DE LA FUENTE, V., RODRÍGUEZ, N., ORTÚÑEZ, E. & AMILS, R., 2001. Mineral composition of the soils and *Erica andevalensis* plants community in the Tinto river (Southwest Spain). Libro de resúmenes *XVIII Jornadas de Fitosociología*. p. 163. León.

ROSSINI OLIVA, S., MINGORANCE, M.D., VALDÉS, B. & LEIDI, E.O., 2010. Uptake, localisation and physiological changes in response to copper excess in *Erica andevalensis*. *Plant Soil* 328: 411-420

TORNOS, F., 2008. La geología y metalogenia de la Faja Pirítica Ibérica. *Macla* 10: 13-23

TRIGUEROS VERA, D., PARRA MARTÍN, R. & ROSSINI OLIVA, S., 2010. Effect of chemical and physical treatments on seed germination of *Erica australis*. *Ann Bot Fenn* 47, ISSN 1797-2442

TURNER, A.P., 1994. The responses of plants to heavy metals. In: Ross, S. M. (Ed.), Toxic Metals in Soil-Plant Systems. Wiley, New York.

VAN DEN BERG, R., DENNENMAN, C.A.J. & ROELS, J.M., 1993. Risk assessment of contaminated soil: Proposal for adjusted, toxicologically based Dutch soil cleanup criteria. In: Arendt, F., Annokkée, G.J., Bosman, R. & van den Brink, W.J. (eds.): Contaminated Soil '93. Kluwer Academic Publishers, London, pp. 349-364

WALLACE, A. & CHA, J.W., 1989. Interactions involving copper toxicity and phosphorus deficiency in bush bean plants grown in solutions of low and high pH. *Soil Sci* 147(6): 430-431

XIONG, Z.T., LI, Y.H. & XU, B., 2002. Nutrition influence on copper accumulation by *Brassica pekinensis* Rupr. *Ecotoxicol Environ Safety* 53: 200-205

YRUELA, I., 2009. Copper in plants: acquisition, transport and interactions. *Funct Plant Biol* 36: 409-430

ZIMDAHL, R.L., 1976. Entry and movement in vegetation of lead derived from air and soil sources. *APCA J* 26: 654-660.

