

ACUMULACIÓN DE COBRE EN PLANTAS SILVESTRES DE ZONAS AGRÍCOLAS CONTAMINADAS CON EL METAL.

Ramón Rigoberto Hernández-Colorado¹, Ana L. Alvarado^{2,3} y Rosaura M. Romero^{2,4*}

¹Programa de Posgrado en Química, Sistema de Estudios de Posgrado, Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Universidad de Costa Rica, 11501-2060 San José, Costa Rica.

²Escuela de Química, Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Universidad de Costa Rica, 11501-2060 San José, Costa Rica.

³Centro Electroquímica y Energía Química (CELEQ), Ciudad de la Investigación, Universidad de Costa Rica, 2060 San José, Costa Rica.

⁴Centro de Investigación en Productos Naturales (CIPRONA), Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Universidad de Costa Rica, 11501-2060 San José, Costa Rica.

Recibido 20 de enero del 2012; aceptado 5 de Julio del 2012

Resumen

El cobre es un elemento esencial pero en concentraciones altas puede llegar a ser tóxico para los organismos. Generalmente, se ha utilizado como fungicida para tratar varias enfermedades que presentan los cultivos de plantas, sin embargo debido a un uso excesivo, varios terrenos agrícolas tienen altos contenidos del metal en Costa Rica. Este estudio evalúa el potencial de las veinte especies de plantas más abundantes, que crecen en sitios contaminados con el metal en dos fincas de Alajuela y Siquirres. Se tomaron muestras de las plantas y del suelo circundante a las raíces y se analizó el contenido total del metal a las muestras secas. Ninguna de las especies resultó ser hiperacumuladora. El contenido del metal varió entre 19,0 y 170 mg kg⁻¹ en las plantas, mientras que entre 60,0 a 307 mg kg⁻¹ en el suelo. *Portulaca oleracea* fue la especie que obtuvo un BCF más alto: 2,5 (BCF, siglas en inglés para factor de bioconcentración), razón por la que podría ser evaluada para utilizarla en fitoextracción.

Abstract

Copper is an essential nutrient that is known to result in toxic damages to organisms. Copper salts have been utilized as fungicide because of its protective effect against several diseases in plants, but the repeated use of it has caused contamination of many Costa Rican agricultural lands. This study evaluated the potential of twenty most abundant species growing on two contaminated sites in Alajuela and Siquirres. Plants and associated soil samples were collected and analyzed for total metal concentrations using flame atomic adsorption technique. None of the species was identified as hyperaccumulator. Plant total Cu concentration varied from 19,0 to 170 mg kg⁻¹ and in the soil ranged from 60,0 to 307 mg kg⁻¹. Among the plants, *Portulaca oleracea* had the higher bioconcentration factor (BCF): 2,5. This specie could be suitable for phytoextracting of sites contaminated with copper.

Palabras clave: fitoextracción, metales pesados, cobre, *Portulaca oleracea*, cultivos, hiperacumuladora.

Key words: phytoextraction, heavy metals, copper, *Portulaca oleracea*, agricultural lands, hyperaccumulator.

* Autor para correspondencia: rosaura.romero@ucr.ac.cr

I. INTRODUCCIÓN

Las altas concentraciones de metales en los suelos pueden llegar a ser fitotóxicas, interfiriendo en el crecimiento de las plantas y en el recubrimiento de los suelos. De esta forma, los suelos quedan más expuestos a la erosión del viento y las hojas de las plantas contaminadas se trasladan a otros suelos y cuerpos de agua, propagando la contaminación. En tales situaciones, la meta inmediata consiste en minimizar la difusión de la contaminación y la erosión, estabilizando la capa vegetativa que los cubre.

La composición de las poblaciones de un ecosistema también se altera debido a la contaminación por metales pesados, ya que cada especie responde de diferente manera a las concentraciones de contaminantes. En general, desaparecen muchas especies, conduciendo a que predominen aquellas que son resistentes a los agentes contaminantes [1].

La variabilidad de respuestas de los organismos dificulta la explicación de los mecanismos para los efectos observados y la determinación de concentraciones letales o subletales de los metales pesados. A pesar de estas circunstancias, se han determinado los valores límites de concentración letal para el cadmio, cromo, cobalto, cobre, mercurio, níquel, plomo y zinc, para varias clases de organismos marinos como peces, crustáceos, moluscos, equinodermos, insectos y plantas, entre otros [2].

Por ejemplo, el cobre es un micronutriente esencial para la mayoría de los organismos, ya que es constituyente de muchas metaloenzimas y de otras proteínas implicadas en los procesos de transporte de electrones y en otras reacciones de óxido-reducción. Los requerimientos del cobre por parte de los microorganismos por lo general se satisfacen con concentraciones muy bajas del metal, pero cuando este elemento se encuentra en su forma iónica libre (Cu^{2+}) y en concentraciones altas, es tóxico para las células microbianas, así como para ciertas algas, hongos e incluso animales. En el caso de plantas, a un ámbito de 20-30 mg kg^{-1} dentro de los tejidos, comienzan a observarse síntomas de toxicidad, particularmente en las raíces [3]. La transmisión del cobre al hombre puede resultar del consumo de plantas contaminadas o indirectamente del consumo de la leche o de la carne de animales que hayan consumido dichas especies. Este metal se relaciona con varias enfermedades. Por ejemplo, puede estar involucrado en el daño neuronal por oxidación, en la enfermedad de Alzheimer y en la precipitación de la proteína β -amiloide, además de participar en otras enfermedades neurodegenerativas [4].

Costa Rica se ha caracterizado por velar por el ambiente mediante la preservación y el buen uso de sus recursos naturales, manteniendo cerca de un 25.1 % de su territorio como Parques Nacionales y Reservas [5]. Sin embargo, no ha sido hasta recientemente que el país se ha preocupado por la utilización de tecnologías limpias, el tratamiento adecuado de los desechos y en la limpieza de nuestro ambiente. Son muchos los residuos, que a lo largo de los años, se han acumulando debido a las actividades industriales y agrícolas que se realizaron o aún ahora se realizan.

Las contaminaciones persistentes en forma de metales pesados y de plaguicidas en el ambiente costarricense han sido provocadas en su mayoría por la extracción de oro, por algunas industrias como las tenerías y la agricultura. La actividad agrícola de Costa Rica ha sido una fuente de ingresos muy importante, principalmente por las plantaciones de banano y café, pero por otro lado las malas prácticas en el uso de agroquímicos han provocado contaminaciones serias. Por ejemplo, durante más de 20 años, a partir del año 1930, las plantaciones bananeras fueron sometidas a tratamientos con el fungicida "Caldo Bordolés" (2,5 kg de sulfato de cobre II y 2,5 kg de carbonato de calcio) a razón de 20-30 aplicaciones por año de 5 kg de cobre/ha/aplicación [6]. Inclusive hoy en día, hay varios productos aceptados por el Ministerio de Agricultura y Ganadería

(MAG), que son con base en cobre (Plaguicidas compuestos con base en cobre y pentacloronitrobenzeno, Norma RTCR-238:1924) y se utilizan comúnmente para gran variedad de cultivos. Lamentablemente estas actividades lo que ocasionan es el deterioro de terrenos de un alto potencial agrícola.

Análisis de suelos en varios sitios del Pacífico Sur del país indicaron contenidos de cobre en la capa arable de hasta de 2000 mg kg⁻¹ [6] y en otro estudio realizado por Pérez y Bornemisza [7], se determinó que la concentración del metal en la misma región osciló entre 662 y 718 mg kg⁻¹. Por otro lado, en suelos de origen volcánico procedentes de plantaciones de café del Valle Central, Turrialba y Coto Brus, se encontraron niveles del metal de hasta 94 mg kg⁻¹ [8, 9].

Los valores promedio de cobre en los suelos naturales, a nivel mundial, se encuentran en el ámbito de 13 a 24 mg kg⁻¹, mientras que en suelos contaminados por el metal se han reportado valores de hasta 4622 mg kg⁻¹, en sitios cercanos a fundiciones [10].

En muchos sitios contaminados con metales, se ha visto la aparición de especies vegetales que se vuelven tolerantes a los elementos, y que incluso son capaces de almacenarlos en su biomasa. Tales plantas, denominadas acumuladoras o hiperacumuladoras, dependiendo de la cantidad del metal que acumulen, se pueden utilizar para limpiar terrenos contaminados. La tecnología que utiliza estas especies es conocida como fitorremediación o en forma más general biorremediación.

Teniendo en cuenta la realidad costarricense, se analizó el contenido de cobre tanto en plantas silvestres como en el suelo de terrenos que han sido sometidos a tratamientos con agroquímicos con base en cobre durante más de cincuenta años, con el fin de valorar si existen plantas con potencial para ser utilizadas en biorremediación.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo.

El estudio se realizó durante el mes de julio en dos zonas del país: en una plantación de café en Carrizal (Alajuela) y en un bananal en Guápiles (Limón), situados a una altura de 309 m 10°21,59'N, 84°12,04'O y a 311 m 10°12,08'N, 83°47,29'O, respectivamente.

Muestras de suelo y plantas se recolectaron y se pusieron cada una en bolsas de plástico para ser transportadas al laboratorio. El suelo se muestreó de 0 a 10 cm de profundidad y correspondió a la rizosfera de las plantas. Las especies vegetales más abundantes, que crecían en forma silvestre, se recolectaron al azar.

Especímenes de herbario de todas las plantas se obtuvieron y fueron identificadas por el Sr. Luis Diego Vargas del Instituto Nacional de Biodiversidad (INBio).

Preparación de las muestras

Las muestras de suelo se secaron en una estufa a 130°C durante tres días, se molieron, y tamizaron. Las plantas se lavaron, liofilizaron, molieron, tamizaron y homogenizaron.

Digestión de las muestras de suelo y especies vegetales.

Toda la cristalería se lavó empleando jabón líquido y agua de cañería, luego se enjuagó tres veces con agua destilada y se colocó en un baño al 20% de ácido nítrico (calidad para análisis) durante veintidós días. Después, la cristalería se enjuagó tres veces con agua destilada y recibió un enjuague final con agua desionizada. La cristalería limpia se secó a temperatura ambiente.

Se tomaron muestras homogéneas de aproximadamente 200,0 mg y se digirieron en balones de 25,00 mL, empleando entre 4,0 y 9,0 mL de una mezcla 1:1 de ácido nítrico para análisis (69%-

71%) y ácido perclórico concentrado. Las muestras se digirieron entre cuarenta y noventa horas, hasta que quedaron completamente transparentes. Luego se dejaron enfriar y se aforaron con agua desionizada, se filtraron cuantitativamente en papel Whatman N°40 y se midieron en el espectrómetro de AA.

Análisis por absorción atómica.

La técnica de análisis empleada para medir las concentraciones de cobre en las muestras vegetales y de suelo, fue la de absorción atómica de llama (AA). Para esto se utilizó una curva de calibración con siete patrones en un ámbito de concentraciones entre 0,00 y 10,00 mg L⁻¹ de cobre. La disolución madre empleada para elaborar todos los patrones, se preparó a partir de un TITRISOL® de cobre marca Merck. Se obtuvieron valores de 0,09 mg L⁻¹ y 0,3 mg L⁻¹, para los límites de detección (LD) y de cuantificación (LC), respectivamente.

Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA), utilizando el programa de Excel de Microsoft.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La cantidad de cobre en los suelos varía de acuerdo a su tipo y al uso que se le haya dado a la tierra. Por esta razón el suelo analizado en este estudio se compara con suelos de uso agrícola.

Todas las muestras presentaron cantidades de cobre en un ámbito de 60,0 a 307 mg kg⁻¹, el cual corresponde a valores mucho más altos que los valores promedio reportados para otros países como los europeos (**Cuadros I y II**). Por ejemplo, un valor de 13,4 mg kg⁻¹ y otro de 57,5 se reportan como los datos extremos para Bélgica e Italia, respectivamente [11]. Estas cifras corresponden a un estudio que incluyó a otros países como Austria, Francia, Inglaterra, Alemania, Holanda, Noruega, Finlandia y Suecia. Los valores más altos de este estudio se justificaron por las características geológicas de los suelos italianos, los cuales pertenecen a diferentes tipos de origen volcánico. Sin embargo, existen otras mediciones como las realizadas en suelos vinícolas del mismo país, que han sido expuestos por muchos años a fungicidas con base en cobre, donde se reportan cantidades de hasta 183 mg kg⁻¹ del metal [12]. También, en una zona mediterránea francesa, se observaron valores en los ámbitos de 31 a 250 y 32 a 184 mg kg⁻¹ en el suelo de plantaciones de viñedos donde se han utilizado compuestos de cobre para controlar plagas [13, 14]. La zona noroeste española utilizada para viñedos así como plantaciones de aguacate en Australia, tampoco han sido la excepción en cuanto a presentar niveles de más de 100 mg kg⁻¹ y 280-340 mg kg⁻¹, respectivamente [15, 16]. El hecho de que los suelos recolectados para este estudio han sido expuestos a fungicidas con base en cobre, justifica los valores encontrados.

Los resultados obtenidos de las especies vegetales recolectadas revelaron que contenían cantidades de cobre por encima del valor promedio que han reportado diferentes autores. Por ejemplo en un estudio realizado en follajes de diferentes zonas de Costa Rica, incluyendo las regiones de nuestro estudio, se encontró un promedio de 3,38 mg kg⁻¹ del metal [17]. Por otro lado en otro estudio realizado en la Península de Santa Elena (Guanacaste, Costa Rica), se encontró que las especies presentes contenían valores entre 1,6 y 25,0 mg kg⁻¹ [18]. Estos valores están dentro del ámbito de datos que se ha reportado en sitios no contaminados alrededor del mundo y los cuales varían de 1 a 33,1 mg kg⁻¹. Sin embargo, cuando las plantas se encuentran en sitios contaminados se han reportado valores de hasta 2 854 mg kg⁻¹ [19].

En este estudio, un total de 20 plantas sin signos de toxicidad se recolectó en plantaciones de banano y de café. Las concentraciones de cobre en las especies provenientes del bananal, quince en total, mostraron una concentración promedio de cobre (56,9 mg kg⁻¹) mayor que las del cafetal

(34,0 mg kg⁻¹), aunque la mayor cantidad promedio de cobre en el suelo se encontraba en el cafetal. De todas las plantas, la que más cantidad del metal acumuló en su biomasa fue *Melampodium divaricatum* con 170 mg kg⁻¹, y fue recolectada en el cafetal. Posterior a ella, otras seis especies recolectadas en el bananal presentaron valores superiores a 100 mg kg⁻¹: *Eleutheranthea ruderalis* (167 mg kg⁻¹), *Portulaca oleracea* (147 mg kg⁻¹), *Elephantopus spicatus* (146 mg kg⁻¹), *Commelina erecta* (141 mg kg⁻¹), *Momordica charantia* (138 mg kg⁻¹) y *Phyllodendron sp.* (115 mg kg⁻¹). Sin embargo, ninguna de las plantas acumuló una cantidad mayor de 1000 mg kg⁻¹, criterio que se considera para clasificar a una planta como hiperacumuladora de cobre [20].

Cuadro 1. Contenido de cobre en plantas y suelo recolectados en la Finca Provana, Limón.

Familia	Especie	CCMS ^a (mg kg ⁻¹)	C.V ^b (%)	CCS ^c (mg kg ⁻¹)	C.V ^b (%)	CFE ^d
Araceae	<i>Phyllodendron sp</i>	115	4,3	115	2,5	1,0
Asteliaceae	<i>Cordyline terminalis</i>	45,0	10	115	4,9	0,39
Asteraceae	<i>Elephantopus spicatus</i>	146	10	254	9,8	0,57
	<i>Eleutheranthea ruderalis</i>	167	6,0	303	3,9	0,55
	<i>Mikania guaco</i>	99,0	10	224	6,3	0,44
	<i>Neurolaena lobata</i>	77,0	8,2	117	7,1	0,66
Campanulaceae	<i>Hippobroma longiflora</i>	33,0	6,7	101	4,2	0,33
Cecropiaceae	<i>Cecropia insignis</i>	39,0	5,8	118	8,5	0,33
Commelinaceae	<i>Commelina erecta</i>	141	0,8	-	-	-
Cucurbitaceae	<i>Momordica charantia</i>	138	8,0	224	1,9	0,62
Euphorbiaceae	<i>Chamaesyce hyssopifolia</i>	69,0	9,8	85,0	3,5	0,81
Melastomataceae	<i>Clidemia petiolaris</i>	33,0	5,4	120	10	0,28
Piperaceae	<i>Piper auritum</i>	47,0	0,9	149	8,1	0,31
Portulacaceae	<i>Portulaca oleracea</i>	147	8,5	60,0	1,5	2,5
Urticaceae	<i>Laportea aestuans</i>	78,0	6,3	124	7,0	0,62

a: Contenido de cobre en materia seca; b: Coeficiente de variación; c: Contenido de cobre en suelo seco
d: Coeficiente de fitoextracción. Se calcula dividiendo el CCMS entre el CCS.

Cuadro 2. Contenido de cobre en plantas y muestras de suelos colectados en un cafetal en Carrizal de Alajuela.

Familia	Especie	CCMS (mg kg ⁻¹)	C.V. ^a (%)	CCS (mg kg ⁻¹)	C.V. ^a (%)	CFE
<i>Asteraceae</i>	<i>Acmella radicans</i>	19,0	6,9	307	3,9	0,06
	<i>Ageratum conizoides</i>	49,0	10	307	3,9	0,16
	<i>Galinsoga quadriradrata</i>	96,0	4,3	307	3,9	0,31
	<i>Melampodium divaricatum</i>	170	5,0	307	3,9	0,55
	<i>Sonchus oleracea</i>	57,0	6,1	307	3,9	0,19

a: Coeficiente de variación.

De los datos obtenidos no es posible decidir si las plantas con mayores cantidades del metal en su biomasa, pueden ser utilizadas para la limpieza de sitios contaminados. Sin embargo, los valores confirman que esas plantas tienen la habilidad de tolerar y acumular metales.

La habilidad de una planta para acumular metales de suelos se puede estimar utilizando el coeficiente de bioconcentración (BCF, bioconcentration factor). Este coeficiente se define como la relación de la concentración del metal en la planta con respecto al suelo y un valor superior a 1 implica que es factible utilizar la especie en fitoextracción [21].

En este estudio, *Portulaca oleracea* fue la especie que obtuvo un BCF más alto: 2,5. Este valor corresponde, aproximadamente, a un tercio del reportado para la mostaza india (*Brassica juncea*, 7,0) [22]. Esta última, es una productora de gran biomasa y posee la capacidad de hiperacumular varios metales, entre los que se encuentran muchos de alta relevancia ambiental tales como el plomo, el cromo y el cadmio. Al reunir estas cualidades, esta especie ha sido estudiada por muchos investigadores, lo que la constituye en una especie de referencia en los estudios de fitoextracción: se utilizó para limpiar con éxito un sitio contaminado con plomo y cadmio en Polonia [23] y puede ser utilizada en rizofiltración para remediar aguas superficiales y subterráneas [24].

No es posible comparar con base en valores de BCF, el estudio realizado en esta investigación con los realizados en otros sitios alrededor del mundo (**Cuadro III**). Desafortunadamente no se tienen los valores de BCF de dichas especies. Sin embargo, es evidente que no en todos los sitios se tiene la suerte de encontrar especies hiperacumuladoras.

Cuadro 3. Contenido de cobre en plantas estudiadas en sitios contaminados con el metal alrededor del mundo.

Lugar/país	Especie	Familia	Ámbito de concentración del metal (mg kg ⁻¹)		Referencia
			biomasa	suelo	
Cataluña. España.	<i>Hirschfeldia incana</i>	<i>Cruciferae</i>	97-355	30-18 500	[25]
	<i>Sedum sediforme</i>	<i>Grassulaceae</i>	406-639		
Yunnan. República Popular de China.	<i>Rumex hastatus</i>	<i>Polygonaceae</i>	33 (raíces), 42 (tallos) 45 (hojas)	67-4 125 181-6 713	[19]
	<i>Polygonum microcephalum</i>	<i>Polygonaceae</i>	491 (raíces) 110 (tallos) 133 (hojas)		
Río Agrío. España.	<i>Helianthus annuus</i>	<i>Asteraceae</i>	63	1 550	[26]
	<i>Sorghum bicolor</i>	<i>Poaceae</i>	7,5		
Río Yangtze. República Popular de China.	<i>Elsholtzia haichowensis</i>	<i>Lamiaceae</i>	154	301-14 625	[27]
	<i>Commelina communis</i>	<i>Commelinaceae</i>	512		
	<i>Rumex acetosa</i>	<i>Polygonaceae</i>	596		
Chipre	<i>Acacia retinoides</i>	<i>Fabaceae</i>	1900	1400 – 4000 1400-83600	[28]
	<i>Eucalyptus torquata</i>	<i>Myrtaceae</i>	2100		

IV. REFERENCIAS

1. Munawar, M., Munawar, I.F., Weisse, T., Leppard, G.G., Legner, M. *Journal of Aquatic Ecosystem Health*. **1995**, 3, 295-310.
2. Cervantes, C., Moreno Sánchez, R. *Contaminación ambiental por metales pesados*, AGT S.A.: México, **1999**.
3. Pais, I., Jones, B.Jr. *The Handbook of Trace Elements*. St. Lucie Press: Boca Raton, **1997**.
4. Brewer, G.J. *Current Opinión in Chemical Biology*. **2003**, 7, 207-212.

5. Obando, V. *Biodiversidad en Costa Rica: Estado del conocimiento y gestión*. Editorial INBio: Heredia, **2002**.
6. Cordero, A., Ramírez, G.F. *Agronomía Costarricense*. **1979**, 3, 63-78.
7. Pérez, J., Bornemisza, E. *Agronomía Costarricense*. **1986**, 10, 165-172.
8. Cabalceta, G., D' Ambrosio, A., Bornemisza, E. *Agronomía Costarricense*. **1996**, 20, 125-133.
9. Granados, L., Bornemisza, E. *Agronomía Costarricense*. **1991**, 15, 45-49.
10. Kabata-Pendias, A., Pendias, H. *Trace elements in soil and plants*, 3ª edición, CRC Press: Boca Raton, **2001**.
11. Heijerick, D.G., Van Sprang, P.A., Van Hyfte, A.D. *Environmental Toxicology and Chemistry*. **2006**, 25, 858-864.
12. Cattani, I., Fragoulis, G., Boccelli, R., Capri, E. *Chemosphere*. **2006**, 64, 1972-1979.
13. Brun, L.A., Maillet, J., Richarte, J., Herrman, P., Remy, J.C. *Environmental Pollution*. **1998**, 102, 151-161.
14. Michaud, A.M., Bravin, M.N., Galleguillos, M., Hinsinger, P. *Plant Soil*. **2007**, 298, 99-111.
15. Arias, M., López, E., Fernández, D., Soto, B. *Soil Science*. **2004**, 169, 796-805.
16. Merrington, G., Rogers, S.L., van Zwieten, L. *Australian Journal of Soil Research*. **2002**, 40, 749-759.
17. Vargas, E., McDowell, L. *Agronomía Costarricense* **1993**, 17, 55-59.
18. Reeves, R.D., Baker, A.J.M., Romero, R.M. *Journal of Geochemical Exploration*. **2007**, 93, 153-159.
19. Tang, S., Fang, Y. *Environmental Geology*. **2001**, 40, 902-907.
20. Baker, A.J.M., Brooks, R.R. *Biorecovery*. **1989**, 1, 81-126.
21. Leštan, D. In Mackova, M., Dowling, D., Macek, T. (Eds.), *Phytoremediation Rhizoremediation*, Springer, Dordrecht, 2006.
22. Nanda, P.B.A., Dushenkov V., Motto, H., Raskin I. *Sci. Technol*. **1995**, 29, 1232-1238.
23. van der Lelie, D., Schwitzguébel, J.P., Glass, D.J.; Vangronsveld, J., Baker, A.J.M. *Environmental Science and Technology*. **2001**, 35, 446A- 452A.
24. Dushenkov, V., Nanda, P.B.A., Motto, H., Raskin, I. *Environ. Sci. Technol*. **1995**, 29, 1239-1245.
25. Poschenrieder, C., Bech, J., Llugary, M., Pace, A., Fenés, E., Barceló, J. *Plant Soil*. **2001**, 230, 247-256.
26. Murillo, J.M., Marañón, T., Cabrera, F., López R. *Science of the Total Environment*. **1999**, 242, 281-292.
27. Pyatt, F.B. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **2001**, 50, 60-64.
28. Tang, S., Wilke, B.M., Huang, C. *Plant Soil*. **1999**, 209, 225-232.

AGRADECIMIENTO

Los autores desean agradecer la colaboración de los dueños de las fincas donde se hicieron las recolectas del material vegetal, y al Sr. Luis Diego Vargas por realizar las identificaciones de las plantas. Los datos experimentales presentados se obtuvieron gracias al financiamiento recibido por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONICIT) dentro del marco de FORINVES y por la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica.