

## **NIVEL DE CONTAMINACION EN SUELOS POR ELEMENTOS TRAZA. IMPACTO SOBRE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS.**

Juana Gonzalez\*; Ana M<sup>a</sup> Moreno\*; Lourdes Pérez\*; María T. Larrea\*\*; Pilar Prieto\*\*\*; Carmen de la Rosa\*\*\*; Angeles Mosso\*\*\*.

\*Dpto. Edafología. F. Farmacia.UCM. \*\*Centro de Espectrometría Atómica. F.C.Geológicas. \*\*\*Dpto. Microbiología. F.Farmacia.UCM.

### **RESUMEN**

En suelos seleccionados procedentes de dos áreas potencialmente contaminadas situadas al sur y sureste de la Comunidad de Madrid, se han determinado los contenidos en 14 elementos traza. Las concentraciones medias de As, Pb y Tl son más elevadas que los valores "background" dados para suelos del Mundo. Las correlaciones entre materia orgánica-Zn, Arcilla-Tl, CaCO<sub>3</sub>-Cr y CaCO<sub>3</sub>-Ni son significativas al nivel P=0,001.

La toxicidad de un elemento traza no depende únicamente de la concentración total si no también de su movilidad y biodisponibilidad. Se han utilizado dos tipos de agentes extractantes (Acetato-NH<sub>4</sub> y EDTA) con el fin de determinar los elementos traza asimilables del suelo. Los resultados muestran que son más elevados los porcentajes de extracción con EDTA para todos los elementos, a excepción del Cd, Cr y Ni, cuyos porcentajes fueron similares con ambos extractantes.

Los suelos estudiados muestran un elevado número de microorganismos, principalmente bacterias y mohos y en menor proporción levaduras, muchos de los cuales son resistentes al plomo.

### **INTRODUCCIÓN**

La toxicidad de los elementos traza en un suelo va a depender de varios factores: de la concentración, ya que a elevadas concentraciones resultan tóxicos incluso los elementos que se consideran esenciales para muchos procesos bioquímicos (Co, Cu, Zn, etc.); de la especiación o formas de presentarse los elementos en el suelo; y de su biodisponibilidad o facilidad para pasar a la solución y de ella a la cadena trófica. Estos últimos factores están ligados a la naturaleza del elemento y a las características y componentes del suelo. El factor concentración está condicionado fundamentalmente a aportes exógenos de elementos, cuyas fuentes de emisión pueden ser muy diversas.

Los microorganismos existentes en el suelo son muy importantes porque intervienen entre otras funciones en el ciclo de elementos traza. Son responsables de la movilización de metales y de su acumulación. Los microorganismos son sensibles tanto a las deficiencias como a excesivas concentraciones de elementos, aunque son capaces de adaptarse a ellas. Los metales pesados son tóxicos para la microbiota, reduciendo el crecimiento así como la actividad enzimática (Kabata Pendias and Pendias, 1992). Los Actinomicetos y fundamentalmente los hongos son más resistentes que las bacterias a elevadas concentraciones de metales pesados (Doelman, 1995).

Por otra parte los microorganismos pueden reducir la toxicidad de los metales por la incorporación de estos en sus células o por precipitación en la superficie de ellas en unión no específica (Gadd y Griffiths, 1978). Igualmente pueden contribuir a reacciones de metilación de elementos traza como As, Hg, Pb y Tl (Beiger y Jernelov, 1984), incrementando su toxicidad.

Los objetivos de este trabajo han sido: 1º) Determinar los parámetros edáficos que contribuyen fundamentalmente a la adsorción y movilidad de elementos traza, pH, CaCO<sub>3</sub>, Carbono Orgánico y fracción granulométrica. 2º) Cuantificar las concentraciones de elementos traza determinando su disponibilidad mediante diferentes agentes extractantes. 3º) Estudiar los microorganismos existentes en el suelo y su viabilidad en medios contaminados para su posible aplicación en la biorecuperación de suelos.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Se han seleccionado dos zonas de la C.A.M. que se consideran potencialmente contaminadas. Se trata de áreas industrializadas en las que las diversas actividades llevadas a cabo generan productos tóxicos que son incorporados a los suelos. La densidad de puntos muestreados ha estado en función de la potencial contaminación.

Zona situada al sur de la capital en el vertedero sellado de Alcantueña, en los términos de Fuenlabrada y Parla. Se han tomado 15 muestras de suelos (0-15 cm).

Zona situada en el Corredor del Henares, en los términos de San Fernando de Henares y Torrejón de Ardoz. Se han elegido once muestras de suelos (0-15 cm).

Se han realizado las siguientes determinaciones analíticas: pH en agua (1:2,5), CaCO<sub>3</sub>, carbono orgánico, análisis granulométrico y capacidad de intercambio catiónico (Acetato NH<sub>4</sub> pH=7) (ISRIC, 1993). Los elementos traza se han disuelto en mezcla triácida (HClO<sub>4</sub>, HNO<sub>3</sub> y HF). Las formas extraíbles se han obtenido con NH<sub>4</sub>OAc 1M a pH=7 y con EDTA 0,1M. Los contenidos totales y extraíbles se han determinado por

Espectrometría de emisión atómica con plasma acoplado (ICP-AES), en un equipo Perkin Elmer Optimic 3300 DV.

Los análisis microbiológicos se llevaron a cabo a las 24 horas de la toma de muestras, conservándose éstas en bolsas de plástico a 4°C. El número total de microorganismos fue determinado por Citometría de flujo en un citómetro Biorad (modelo Bryte HS). Las bacterias viables se determinaron en un medio agar extracto de suelo con cicloheximida y los hongos en un medio de agar Sabouraud con cloramfenicol, incubando durante 7 días a 28°C y 22°C. Para el estudio de los resistentes al plomo se adicionó a los medios  $Pb(NO_3)_2$  a concentraciones de 30, 300 y 1200ppm.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los suelos de ambas zonas presentan características similares ([Tabla 1](#)) con valores de pH que superan la neutralidad y contenidos en C. Orgánico muy bajos. Son por lo general carbonatados, con valores medios de éste componente son de 63 y 69  $gkg^{-1}$  para cada zona. Las proporciones de arena son semejantes encontrando mayores diferencias en los contenidos de fracción arcilla, que es superior en los suelos próximos al vertedero de Alcantueña, por lo que los valores de CIC son también superiores en ésta zona, a los que contribuye fundamentalmente la fracción fina y su naturaleza mineralógica, al ser muy escasa la materia orgánica.

Los minerales constituyentes de la fracción arcilla son: micas, ilitas y vermiculitas, y en menor proporción caolinita, existiendo también cuarzo, feldespato, calcita y en algún caso dolomita. Se observa en los suelos del Corredor del Henares frente a los de Alcantueña, un menor contenido en minerales a 1,4 nm y mayor en minerales a 0,7 nm.

Los contenidos medios en elementos traza vienen expresados en la [Tabla 2](#). En el Corredor del Henares los suelos presentan mayores contenidos medios en: As, Co, Cr, Ni, Sr, V y Zn. Los niveles de As y Tl para esta zona y de Pb y Tl para suelos de Alcantueña superan los valores "background" medios dados para suelos del Mundo (Kabata Pendias and Pendias, 1992), lo que podría indicar cierta contaminación en éstos elementos.

Los coeficientes de correlación entre parámetros edáficos y contenidos en elementos traza ([Tabla 3](#)), ponen de manifiesto la correlación altamente significativa ( $P < 0,001$ ) y positiva entre Materia Orgánica-Zn, Arcilla-Tl,  $CaCO_3$ -Cr,  $CaCO_3$ -Ni y pH-Ni, siendo también significativa pero negativa entre pH-Tl ( $P=0,0001$ ). Los demás elementos están correlacionados con los parámetros edáficos con menor significación ( $P < 0,05$ ) y positivamente excepto entre Materia Orgánica-Ba ( $R=-0,50$ ),  $CaCO_3$ -Pb ( $R=-0,63$ ), pH-Pb ( $R=-0,53$ ),  $CaCO_3$ -Tl ( $R=-0,60$ ) y pH-Cu ( $R=-0,50$ ), lo que puede indicar que tanto el

Pb como el Tl son elementos que no se asocian al  $\text{CaCO}_3$ , y presentan un comportamiento similar con el pH.

Con EDTA se extraen los elementos que están ocupando además de posiciones de cambio, otras más específicas en los componentes del suelo, unidos a  $\text{CaCO}_3$  y óxidos. El  $\text{NH}_4\text{OAc}$  extrae fundamentalmente las formas más lábiles, las que ocupan posiciones cambiables en materia orgánica y minerales de arcilla. Los intervalos de porcentajes de extracción presentan valores más elevados con EDTA que con  $\text{NH}_4\text{OAc}$  para todos los metales, siendo las diferencias muy acusadas para As, Cu, Pb y Zn, mientras que se mantienen rangos semejantes con ambos reactivos para Cd, Cr y Ni.

En Alcantueña existe mayor biodisponibilidad para As, Cd, Cr, Ni y Zn, al ser más elevados los porcentajes de extracción con  $\text{NH}_4\text{OAc}$  que en los suelos del Corredor del Henares. Para el Pb, el riesgo de toxicidad es mayor en suelos del Corredor del Henares, al ser superiores en esta zona los porcentajes de extracción con los dos reactivos. El Cu es el elemento que se extrae en menor proporción con  $\text{NH}_4\text{OAc}$  por formar complejos muy estables con M.O., siendo muy elevada la extracción con EDTA y mayor en los suelos del Corredor del Henares.

#### [Tabla 4](#)

**DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE MICROORGANISMOS TOTALES, VIVOS Y VIABLES EN SUELOS NATURALES.** El número de microorganismos totales de todas las muestras naturales es elevado, con una media de  $10^9/\text{g}$  estando la mayoría vivos ( $10^8/\text{g}$ ). Se han detectado valores menores de microorganismos viables del orden de  $10^7$  bacterias ([Tabla 5](#)),  $10^4$  mohos y de  $10^3$  levaduras. Konopka et al. (1999) obtuvieron resultados similares en el número de bacterias totales y viables cuando estudiaron poblaciones microbianas en suelos industriales.

Los resultados obtenidos por Citometría de flujo, confirman que la población microbiana detectada por la técnica de recuento en placa es sólo una fracción de la micropoblación total del suelo, ya que un gran número de estos no son cultivables (Pennanen et al., 1996).

**MICROORGANISMOS RESISTENTES AL PLOMO EN SUELOS NATURALES.** Los suelos naturales estudiados han presentado un número significativo de microorganismos resistentes a distintas concentraciones de plomo (30, 300 y 1200 ppm) que está en relación inversa con la concentración del metal ([Tabla 6](#)). Los hongos son los que tienen un mayor número resistente a 1200 ppm ya que prácticamente toda la población viable vive a esta concentración, mientras que sólo en una muestra se detectaron bacterias resistentes a la referida concentración. Nies (1999) ha observado que el tamaño de la población microbiana es menor cuando aumenta la concentración del

metal, también otros autores (Díaz-Raviña et al., 1994, Konopka et al. 1999) han aislado bacterias tolerantes a metales pesados en suelos con escasa contaminación.

En la zona del Henares, no se han detectado bacterias que se multipliquen en medios con 1200 ppm de plomo, pero se ha encontrado una población numerosa de hongos, principalmente mohos. En la zona de Alcantueña, los resultados indican que existe una población resistente al plomo capaz de multiplicarse a concentraciones de 1200 ppm, principalmente de bacterias y levaduras, y en menor medida de mohos.

Se ha realizado el aislamiento de 120 cepas resistentes a distintas concentraciones de plomo: 71 Bacilos Gram positivos, 32 mohos y 17 levaduras. Las cepas de bacilos se clasificaron en: 26 del género *Bacillus* y 45 del grupo de los bacilos irregulares "*Arthrobacter-Corineformes-Actinomicetos*". Las 10 cepas resistentes a 1200 ppm de plomo corresponden a los géneros *Bacillus*, *Corynebacterium* y *Rhodococcus*. No se han detectado bacterias Gram negativas a pesar de que son más tolerantes a los metales pesados que las Gram positivas (Beveridge y Doyle, 1989).

Los principales géneros de mohos identificados han sido *Penicillium*, *Mucor*, *Cladosporium* y *Aspergillus*, de las cuales 14 cepas son resistentes a 1200 ppm de plomo. Las 11 cepas de levaduras resistentes a esta concentración se han identificado como: *Debaryomyces*, *Rhodotorula*, *Cryptococcus*, *Zygoascus* y *Trichosporon*.

En estos últimos años existe un gran interés en la aplicación de mohos y levaduras para la bioabsorción de metales pesados en suelos contaminados, debido a que la producción de su biomasa es muy rápida y económica.

## CONCLUSIONES

En estos suelos los coeficientes de correlación con elevado nivel de significación y positivos entre MO-Zn, Arcilla-Tl, CaCO<sub>3</sub>-Ni, CaCO<sub>3</sub>-Cr y pH-Ni indican la asociación preferente de estos elementos traza con los componentes del suelo. El Tl y Pb presentan coeficientes de correlación negativos con pH y CaCO<sub>3</sub>.

Los suelos del Vertedero de Alcantueña presentan mayor biodisponibilidad para As, Cd, Cr, Ni y Zn, y los suelos del Corredor del Henares para el Pb. Por consiguiente el riesgo de contaminación de agua y cadena trófica está en relación con la mayor disponibilidad de los elementos en suelo.

El número de microorganismos totales es elevado (10<sup>9</sup>/g), siendo menor el de viables, bacterias (10<sup>7</sup>/g), mohos (10<sup>4</sup>/g), y levaduras (10<sup>3</sup>/g), muchos de los cuales son resistentes a elevadas concentraciones de plomo (1200 ppm).

## AGRADECIMIENTOS

Los autores de éste trabajo agradecen su financiación a cargo del proyecto PR 182/96-6734.UCM.

## REFERENCIAS

Beijer, K. and Jernelov, A., 1984. Microbial methylation of lead, in *Biological Effects of Organolead Compounds*. Grandjean, Ph., Ed., CRC Press, Boca Ratón, FL, 13.

Beveridge, T.J. and Doyle, R.J. 1989. *Metal ions and bacteria*. New York. Ed. John Wiley and Sons Inc.

Díaz-Raviña, M., Bååth, E., and Frostegård, A., 1994. Multiple heavy metal tolerance of soil bacterial communities and its measurement by a thymidine incorporation technique. *Appl. Environ. Microbiol.* 60 :2238-2247.

Doelman, P., 1995. Microbiology of soil and sediments, in *Biogeodynamics of Pollutants in soils and sediments*. Salomon, S.W. and Stigliani, W., Eds, Springer. Berlin.

Gadd, G.M. and Griffiths, A.J., 1978. Microorganisms and heavy metal toxicity. *Microb. Ecol.*, 4.

ISRIC. 1993. *Procedures for Soil Analysis*. Wageningen.

Kabata, Pendias A. and Pendias H., 1992. *Trace Elements in Soils and Plants*. CRC Press, London. 365.

Konopka, A., Zakharova, T., Bischoff, M., Oliver, L., Nakatsu, C. and Turco, R.F. 1999. Microbial biomass and activity in lead-contaminated soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:2256-2259.

Nies, D.H. 1999. Microbial heavy-metal resistance. *Appl. Microbiol. Biotech.*, 51:730-750.

Pennanen, T., Frostegård, A., Fritze, H. and Bååth, E. 1996. Phospholipid fatty acid composition and heavy metal tolerance of soil microbial communities along two heavy metal-polluted gradients in coniferous forest. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62 :420-428.

## FIGURAS Y TABLAS.

**TABLA 1.** Características generales de los suelos.

	pH	CaCO <sub>3</sub> g kg <sup>-1</sup>	CO g kg <sup>-1</sup>	CIC cmol <sub>1</sub> <sup>+</sup> kg <sup>-1</sup>	Arena %	Limo %	Arcilla %
Vertedero de Alcantueña (n=15)							
Media	7,8	63	7	14	65	11	24
Máximo	8,4	277	11	20	76	23	47
Mínimo	6,9	4	2	11	49	4	16
Corredor del Henares (n =11)							
Media	8,1	69	8	9	66	19	14
Máximo	8,4	146	13	14	80	31	22
Mínimo	7,6	8	2	6	46	10	9

**TABLA 3.** Correlaciones entre parámetros edáficos y contenidos en elementos traza.

Elementos	M.O.	Arcilla	CaCO <sub>3</sub>	pH
	R	R	R	R
As	0,52**	---	0,63**	0,61**
Ba	-0,50**	---	---	---
Cd	0,47**	---	---	---
Cr	0,61**	---	0,66***	---
Ni	0,58**	---	0,75***	0,66***
Sr	0,62**	---		0,62**
V	0,56**	---	0,57**	---
Zn	0,75***	---	---	---
Cu	---	0,59**	---	-0,50**
Ga	---	0,59**	---	---
Tl	---	0,67***	-0,60**	-0,78***
Co	---	---	0,57**	---
Pb	---	---	-0,63**	-0,53**

\*\* significación a P < 0,05

\*\*\* significación a P < 0,001

**TABLA 4.** Intervalos de porcentajes de extracción de elementos traza con EDTA y NH<sub>4</sub>OAc.

Elementos	Muestras	EDTA (%)	NH <sub>4</sub> OAc (%)
	Intervalo	9,8 - 42,7	2,4 - 19
As	Alcantueña	30 - 42,7	10,6 - 19
	Henares	9,8 - 37	2,4 - 9,6
	Intervalo	4 - 74,3	5,2 - 67,1
Cd	Alcantueña	4 - 74,3	32,6 - 67,1
	Henares	38,8 - 69,6	5,2 - 11
	Intervalo	7 - 65,4	1,9 - 5,6
Cu	Alcantueña	7 - 44,5	1,9 - 5,6
	Henares	35,3 - 65,4	2,2 - 5,4
	Intervalo	4,3 - 13,9	2,7 - 12
Cr	Alcantueña	7 - 13,9	7,8 - 12
	Henares	4,3 - 6,5	2,7 - 4,4
	Intervalo	29,3 - 75,4	22 - 72,2
Ni	Alcantueña	47 - 75,4	42,6 - 72,2
	Henares	29,3 - 47,9	22 - 32
	Intervalo	31,6 - 84,3	15 - 50
Pb	Alcantueña	31,6 - 70,8	15 - 42
	Henares	55,9 - 84,3	35 - 50
	Intervalo	19,6 - 83,2	1,6 - 54,9
Zn	Alcantueña	19,6 - 75,7	7,9 - 54,9
	Henares	20,1 - 83,2	1,6 - 7,7

**TABLA 5.** Micropoblación de las muestras de suelos (n<sup>o</sup>/g)

Microorganismos					
Muestras	Totales	Vivos	Bacterias	Mohos	Levaduras
CA 2	5,3·10 <sup>8</sup>	8,5·10 <sup>7</sup>	9·10 <sup>5</sup>	1·10 <sup>3</sup>	1,5·10 <sup>4</sup>
CA 4	3,5·10 <sup>9</sup>	2,7·10 <sup>9</sup>	3·10 <sup>7</sup>	1,5·10 <sup>3</sup>	1,5·10 <sup>3</sup>
JA He 4	5,2·10 <sup>9</sup>	1,2·10 <sup>8</sup>	4,6·10 <sup>6</sup>	2·10 <sup>4</sup>	<100
JA He 5	4,4·10 <sup>9</sup>	1,6·10 <sup>8</sup>	4·10 <sup>6</sup>	6·10 <sup>4</sup>	1·10 <sup>3</sup>
Media (x)	3,3·10 <sup>9</sup>	7,6·10 <sup>8</sup>	1·10 <sup>7</sup>	2·10 <sup>4</sup>	4·10 <sup>3</sup>



**CA:** Alcantueña **JA He:** Henares

**TABLA 6.** Micropoblación resistente a plomo (ufc/g)

<b>Pb</b>		<b>Muestras</b>				
ppm	<b>Micr.</b>	<b>CA 2</b>	<b>CA 4</b>	<b>Ja He 4</b>	<b>JA He 5</b>	<b>Media (X)</b>
30	<b>B</b>	$3 \cdot 10^5$	$1,4 \cdot 10^6$	$3,7 \cdot 10^6$	$5,1 \cdot 10^6$	$2,6 \cdot 10^6$
	<b>M</b>	$1 \cdot 10^3$	$1,5 \cdot 10^3$	$5,5 \cdot 10^4$	$4,5 \cdot 10^4$	$2,5 \cdot 10^4$
	<b>L</b>	$1,7 \cdot 10^4$	$1,5 \cdot 10^3$	<100	$1 \cdot 10^3$	$4,8 \cdot 10^3$
300	<b>B</b>	$1,6 \cdot 10^4$	$2 \cdot 10^5$	$3,1 \cdot 10^4$	$3,6 \cdot 10^6$	$9,6 \cdot 10^5$
	<b>M</b>	$1 \cdot 10^3$	$3 \cdot 10^3$	$1 \cdot 10^4$	$2,5 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^4$
	<b>L</b>	$1,7 \cdot 10^4$	$3 \cdot 10^3$	<100	$1 \cdot 10^3$	$5,2 \cdot 10^3$
1200	<b>B</b>	< $10^2$	$3 \cdot 10^3$	< $10^2$	< $10^2$	$7,5 \cdot 10^2$
	<b>M</b>	$1 \cdot 10^3$	$1 \cdot 10^3$	$1,5 \cdot 10^4$	$2,5 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^4$
	<b>L</b>	$1,6 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^3$	<100	$1 \cdot 10^3$	$4,5 \cdot 10^3$

**B:** Bacterias **M:** Mohos **L:** Levaduras **CA:** Alcantueña **JA He:** Henares