

Respuesta fisiológica de la comunidad bacteriana en suelos contaminados por cadmio y el papel de la lombriz (*A.caliginosa*) como posible biorremediador

Lacarta, J., Navarro, E., Jiménez, J., Muñiz, S.

Junio de 2012

Proyecto final de máster en iniciación a la investigación en ciencias agrarias y medio natural. Universidad de Zaragoza. Escuela Politécnica Superior de Huesca.

Entidades colaboradoras:



Contenido

Agradecimientos	4
RESUMEN	5
Introducción	5
1. El cadmio y su efecto toxic para el suelo y la biota. Marco legislativo.	5
2. Las lombrices (<i>Aporrectodea caliginosa</i>) y su papel como biorremediadores	7
3. Los microorganismos del suelo (bacterias) y su papel como bioindicadores	9
OBJETIVOS DEL ESTUDIO.....	11
MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
1. Caracterización del suelo	12
2. Recolección y mantenimiento de lombrices	13
3. Diseño experimental	13
4. Medición de la temperatura y humedad del suelo y del aire	15
5. Aplicación de las normas DIN/OECD de acuerdo con la legislación estatal vigente sobre suelos contaminados.....	15
6. Recolección de lixiviados.....	17
7. Pesaje y sacrificio de las lombrices de tierra.....	17
8. Preparación y conservación de las muestras de los lixiviados y de las lombrices de tierra.....	18
9. Preparación y conservación de las muestras de suelo.....	19
10. Análisis de metales de las muestras.....	21
11. Seguimiento de la actividad microbiana	21
12. Análisis estadístico	26
RESULTADOS	27
1. Condiciones ambientales	27
2. Análisis del suelo	27
3. Lixiviados	30
4. Seguimiento de las lombrices de tierra.....	32

5. Distribución del cadmio en los diferentes subsistemas	34
6. Perfil fisiológico de la comunidad bacteriana	35
DISCUSIÓN.....	46
1. Análisis de suelos	46
2. Lixiviados	48
3. Distribución del cadmio en los diferentes sistemas.....	48
4. Seguimiento de las lombrices de tierra.....	49
5. Análisis fisiológico de la comunidad bacteriana	51
CONCLUSIONES	56
Bibliografía	59
INDICE DE TABLAS	67
INDICE DE FIGURAS	68
INDICE DE FOTOS.....	68
INDICE DE GRÁFICOS	69

Agradecimientos

Me gustaría agradecer al Instituto Pirenaico de Ecología la oportunidad de desarrollar el proyecto tanto a nivel institucional como a todo el personal que me ayudó en el desarrollo del proyecto, en especial al Dr. Enrique Navarro y al Dr. Juan José Jiménez su labor como directores de proyecto y su consejo como investigadores experimentados en la materia.

También agradecérselo en especial a Selene Muñiz por su estimable colaboración en el diseño y ejecución del proyecto.

“La tarea de comprender no es replicar de manera conceptual algo que ya existe, sino más bien crear todo un nuevo reino, que junto con el mundo dado a nuestros sentidos, constituye la plenitud de la realidad”

Rudolf Steiner

RESUMEN

Cada vez con mayor frecuencia aparecen problemas de contaminación de suelos ligados a la presencia de metales pesados. Las características físico-químicas del suelo -como el contenido de materia orgánica, el contenido de arcilla y el pH- juegan un papel preponderante en la solubilidad y por tanto en la biodisponibilidad de tóxicos. Así mismo, la microbiología y la macrofauna del suelo intervienen en las reacciones que tienen lugar en la matriz del suelo alterando la composición química de éste y condicionando su estructura física, repercutiendo de forma directa en el contenido de metales pesados y la capacidad de retención del medio.

En este estudio se valoró el impacto que la contaminación por Cadmio tuvo sobre la funcionalidad de la comunidad bacteriana del suelo (medida como la capacidad de degradar diferentes sustratos de carbono), y el papel que las lombrices (*Aporrectodea caliginosa*) pueden jugar en la remediación de este tipo de contaminación. Palabras clave: Biolog®, fisiología microbiana, *Aporrectodea caliginosa*, toxicidad, cadmio

Introducción

1. El cadmio y su efecto tóxico para el suelo y la biota. Marco legislativo.

El cadmio (Cd) es un elemento que se encuentra de forma natural en los suelos en concentraciones medias de entre 0,2mg/kg y 24mg/kg en sustratos geológicos de origen sedimentario ricos en éste elemento. A escala planetaria, las concentraciones de Cd en el suelo están aumentando debido a los aportes de origen antropogénico alcanzando valores de 750mg/kg en suelos que sufren el impacto de actividades mineras y/o metalúrgicas. Los altos niveles de producción industrial de materiales no ferreos, las actividades agrícolas y la quema de combustibles fósiles y residuos son los principales medios de emisión de cadmio en el suelo suponiendo el 60% de las emisiones globales anuales al medio ambiente (39000 toneladas/año). El bajo calor de vaporización (26.8kcal mol⁻¹) hace que el transporte atmosférico (7200 toneladas/año) del cadmio, aunque no sea mayoritario, termine por precipitar en su mayoría sobre la superficie terrestre sirviéndose del agua superficial y subterránea para propagarse y terminando por afectar a los ecosistemas fluviales y terrestres de países con un desarrollo urbano e industrial importante (Laws, 1993). Por este motivo, cuando un suelo resulta contaminado por metales pesados es necesario llevar a cabo labores de remediación. No obstante, si bien este tipo de contaminación es una de las más extendidas, también es una de las más difíciles y caras de eliminar (Wong y Ma, 2008).

La presencia de un cierto contaminante en el medio ambiente no significa que esté es una forma que permita su entrada en los organismos y en sus células, es decir, que se encuentre biodisponible. El ión Cd²⁺ se considera una amenaza potencial para muchos seres vivos debido a su propensión a unirse con fuerza a moléculas orgánicas que contienen azufre, como las proteínas, y por ser un antagonista del Zn²⁺, al que parece sustituir en los sistemas enzimáticos, igual que a otros metales esenciales que actúan como cofactores (Mc Laughlin y Singh, 1999). Además Cd²⁺ es químicamente muy parecido al Mg²⁺ lo que explica que el primero sustituya al segundo en los minerales de fosfato. Este metal puede encontrarse como iones hidratados libres, formando complejos con ligandos orgánicos e inorgánicos, así como asociado a coloides orgánicos o inorgánicos. La concentración de los cationes libres hidratados

de Cd²⁺ varía entre 0,1 y 100 nM en muchos tipos de suelos. Algunos compuestos inorgánicos importantes son CdCl⁺, CdCl₂, CdNO³⁻, CdSO₄ y CdOH⁺. En los ecosistemas acuáticos tiende a formar compuestos solubles con ligandos orgánicos e inorgánicos como, por ejemplo, S²⁻ y HS⁻, iones haluro, sulfuros orgánicos, tioles, HPO₄²⁻ y CO₃²⁻. Los metales del suelo disueltos, intercambiables y unidos a compuestos orgánicos son las formas más lábiles o inestables por lo que se utilizan para evaluar su movilidad y su biodisponibilidad mientras que los metales adsorbidos, unidos a carbonatos u óxidos son las fracciones no lábiles o estables (Karaca *et al.*, 2010). Los compuestos orgánicos de bajo peso molecular (p.ej. ácido fúlvico) sirven como portadores de Cd en la disolución del suelo, mientras que los compuestos orgánicos de alto peso molecular (p.ej. ácido húmico) actúan como sumideros para el Cd (Mc Laughlin y Singh, 1999).

En la mayoría de los suelos, más del 99% del Cd se encuentra asociado a la fase sólida y menos del 1% se halla en la disolución del suelo, lo que ayuda a entender porqué el tiempo de retención de este metal en la capas superiores es del orden de cientos de años. La formación de precipitados es uno de los mecanismos que gobiernan la distribución del Cd entre la fase sólida y la fase acuosa. Los minerales de Cd que suelen formarse en los suelos incluyen sulfuros, carbonatos, hidróxidos y fosfatos. La adsorción puede ser específica o inespecífica. En la adsorción específica actúan fuerzas electrostáticas que hacen que los cationes se unan a las superficies para compensar la carga negativa de éstas. El Cd adsorbido inespecíficamente es equivalente al Cd intercambiable, que puede ser remplazado por otros cationes. En cambio, si la adsorción es específica los cationes de Cd están unidos mucho más estrechamente a las superficies adsorbentes y es más difícil que las abandonen (Mc Laughlin y Singh, 1999). Sin embargo, los procesos edáficos que controlan la solubilidad, movilidad y biodisponibilidad del Cd en el suelo aún se comprenden poco, sobre todo su especiación. El destino del Cd en el suelo dependerá principalmente del balance entre su adsorción, su lixiviación y su absorción por los organismos (Mc Laughlin y Singh, 1999).

Existen múltiples autores que coinciden en que los principales factores del suelo que favorecen la biodisponibilidad, y por tanto a la toxicidad, de los metales pesados son el pH (A. Lazzaro *et al.*, 2006; J. Andre *et al.*, 2009), el contenido de MO (Leonard, *et al.* 2000), el contenido de arcilla (O.J. Oworji *et al.*, 2009; A. Lazzaro *et al.*, 2006) y la capacidad de intercambio iónico del suelo (Olugbenga J.*et al.*, 2009). El pH es el factor dominante, la adsorción aumenta intensamente conforme lo hace el pH, lo que significa que la concentración de Cd en la disolución del suelo disminuye. La microbiota edáfica es más sensible a la fracción soluble del suelo que a los compuestos inmovilizados por la matriz del suelo que presentan menor facilidad para ser intercambiados organismos (Krishnamurti & Naidu, 2003; Vig *et al.*, 2003; Loft et al., 2004). Numerosos estudios aproximan el potencial máximo de solubilidad del suelo como la fracción del suelo soluble en CaCl₂. El CaCl₂ sirve como sal capaz de desplazar la mayoría de los iones débilmente retenidos por la matriz del suelo saturando el complejo de cambio con el ion Ca²⁺.

En cuanto al marco legislativo estatal en materia de contaminación de suelos, sus bases vienen reguladas por el RD 9/2005 por el que se establece una relación de actividades potencialmente contaminantes del suelo y los criterios y estándares para la declaración de suelos contaminados. En dicho RD se indica que un suelo contaminado por metales es aquel en el que se excede el nivel genérico de referencia (NGR), que es “la concentración de una sustancia

contaminante en el suelo que no conlleva un riesgo superior al máximo aceptable para la salud humana o los ecosistemas y calculada de acuerdo con los criterios recogidos en el Anexo VII del RD". Según el Anexo VII del RD, para la protección de ecosistemas se deberán utilizar datos toxicológicos procedentes de ensayos basados en protocolos normalizados de la Unión Europea o de la OECD. Uno de los métodos detallados en los ensayo de inhibición de crecimiento (LC50 o EC50) para organismos acuáticos es la norma OECD 201 que utiliza el procedimiento normalizado DIN-38414 para la obtención de los lixiviados. En cuanto a la toxicidad por metales pesados, el RD establece que cada comunidad autónoma tiene que establecer sus propios niveles de referencia. Actualmente para Aragón no existen unos NGR por metales pesados estipulados. A modo de ejemplo, en Cataluña el NGR para la protección de los ecosistemas en el caso del Cd es de 2,5mg/kg suelo seco en zonas agropecuarias y forestales y 0,6mg/kg en el resto.

Recientemente, se ha aprobado una ley que deroga y sustituye a la ley 10/1998. Se trata de la Ley 22/2011, de 28 de julio, de residuos y suelos contaminados, que tiene entre sus objetivos la regulación del régimen jurídico de los suelos contaminados. En el Título V se indica que, en un futuro desarrollo normativo de la ley, las actividades potencialmente contaminantes del suelo van a ser listadas de nuevo y que volverán a establecerse los criterios en lo que deberá basarse la declaración de un suelo contaminado, por lo que lo dispuesto en el RD 9/2005 sufrirá modificaciones en los próximos años.

2. Las lombrices (*Aporrectodea caliginosa*) y su papel como biorremediadores

Las lombrices de tierra son miembros dominantes de la fauna edáfica. El suelo contiene entre 100-500 individuos o 30-100 g por metro cuadrado en promedio, aunque depende del clima y de la vegetación existentes (Karaca *et al.*, 2010). *Aporrectodea caliginosa* es una especie endógea por lo que carece de pigmentos y vive en los 50 cm superiores del suelo, por debajo del mantillo. Estas lombrices de tierra construyen galerías temporales mientras excavan a través del suelo buscando alimento, que consiste en compuestos orgánicos presentes en las capas minerales (Karaca *et al.*, 2010; Bouché, 1972. Citado en Eijsackers, 2010; Turgay *et al.*, 2011). *A.caliginosa*, una especie cosmopolita y ubicua, parece excavar principalmente durante las horas de luz, mientras que las galerías abiertas durante la noche son menos (Springett, 1983). En general, la actividad de las lombrices de tierra es mayor en primavera y otoño (Lavelle, 1988; Francis y Fraser, 1998; Turgay *et al.*, 2011). La temperatura ideal para ellas está comprendida entre 15,6-26,7°C y la mayoría de las especies no pueden sobrevivir por debajo de 1°C ni por encima de 30-35°C. A menudo, sus galerías terminan en un pequeño ensanchamiento o cámara forrada con piedrecitas y semillas, a veces sellada con varios tabiques, donde una o varias lombrices de tierra pasan el invierno enrolladas en una bola (Darwin, 1881; Jiménez *et al.*, 2000; Karaca *et al.*, 2010; Turgay *et al.*, 2011). El agua del suelo es esencial para ellas porque su respiración es cutánea y porque su locomoción requiere el mantenimiento de una presión hidrostática adecuada en la cavidad celomática. Cuando ya no pueden evitar las condiciones desfavorables desplazándose a mayor profundidad en el suelo, las lombrices de tierra sobreviven entrando en un estado de quiescencia (una fase de inactividad que puede revertirse de forma inmediata) o en diapausa (un estado determinado

fisiológicamente) (Lavelle, 1988). Por ejemplo, *A. caliginosa* entra en diapausa facultativa durante el verano si el potencial de agua del suelo es demasiado bajo. Para ello, excava una celda esférica que recubre con mucus y excreta su contenido intestinal. Al enrollarse en el interior de la celda, minimiza la pérdida de agua durante la sequía (Francis y Fraser, 1998; Friis *et al.*, 2004). Estos invertebrados prefieren vivir en suelos con textura franca e ingieren preferentemente residuos orgánicos con una relación C/N baja y parcialmente descompuestos, aunque distintas especies tienen debilidad por determinados tipos de materia orgánica (p.ej. el mantillo de los bosques de coníferas no es deseable para la mayoría de las especies) (Karaca *et al.*, 2010). Las lombrices de tierra mejoran la estructura de los suelos compactados. Sus actividades de excavación y alimentación contribuyen notablemente a incrementar la infiltración del agua, la aireación del suelo y la estabilización de los agregados (Sánchez-Hernandez, 2006). Jégou *et al.* (2001) y Görres *et al.* (2001) observaron una mayor ingestión de partículas de suelos finas y por tanto una alteración en la distribución entre macroporos y microporos.

Existen dos vías de entrada de contaminantes en las lombrices: la vía dermal y la digestiva. Según Spurgeon *et al* (1996) y Reinecke *et al.* (1997) la captación de metales vía dermal se considera la primera vía de acumulación en lombrices sobre todo cuando éstos metales se encuentran libres en solución en los poros del suelo. Las lombrices de tierra tienen una capa gruesa de mucus que rodea la epidermis, a través de la cual se producen la respiración y la excreción de los productos de desecho (Peignenborg y Vijver, 2009). Cuando el tiempo de exposición es lo bastante largo como para que esta barrera externa se sature de metales, la adsorción alcanza un estado estable, pero la absorción vía dermal continúa y su importancia relativa aumenta progresivamente. La asimilación de metales por vía digestiva es prácticamente independiente del pH del suelo (Leonard, *et al.* 2000). Una vez que el material es ingerido por las lombrices su pH es neutralizado por secreciones de CaCO_3 por las glándulas calcíferas del aparato digestivo de la lombriz. Además el material ingerido sufre una serie de transformaciones que favorecen la formación de ácidos húmicos y moléculas inorgánicas de alto peso molecular que mejoran la capacidad de adsorción del suelo y reducen la fracción de metales pesados en la solución del suelo, disminuyendo su efecto tóxico.

Como la cantidad total de metales pesados presentes en el suelo no es directamente extrapolable a la cantidad de metales pesados biodisponibles las lombrices de tierra se consideran muy interesantes para evaluar la biodisponibilidad de metales pesados presentes en el suelo, pese a que sólo la concentración de metales en la fase líquida se considera biodisponibles (L. Weltje, 1998). Dada también la evidente ventaja que ofrecen las lombrices sobre la textura y la estructura del suelo podríamos considerarles una herramienta útil en el campo de la biorremediación y la prevención de la contaminación de sistema edáfico, puesto que, la calidad de los suelos contaminados por metales pueden mejorarse no solo eliminando los metales del suelo sino también reduciendo la concentración de metales pesados en la solución del suelo (Leonard, *et al.* 2000). Como son relativamente resistentes a los metales pesados, pueden bioacumular metales como el Cd y después ser retiradas del suelo mediante expelentes, lo que permitiría incluso recuperar los metales (Edwards y Lanno, 2004; Sinha *et al.*, 2008). Por ejemplo, Liang (2009) relataron que el 50% del Cd presente en un suelo contaminado (5mg/kg suelo seco) se bioacumuló en *Metaphire posthuma* lo que supuso una biorremediación que redujo su efecto tóxico sobre las bacterias del suelo hasta hacerlo insignificante. A menudo, el éxito de la remediación de los suelos está limitado por su pobre

estructura y una escasa fertilidad, factores que pueden ser mejorados en presencia de lombrices de tierra. La posibilidad de que la actividad de las lombrices de tierra aumente la biodisponibilidad de los metales en el suelo es de gran relevancia, sobre todo cuando los métodos de remediación usados, como el lavado o la fitoextracción eliminan sólo una parte de los metales (Udovic y Lestan, 2007). Por el contrario, algunos autores consideran que los métodos de remediación animal es restringida, ya que su eficacia y eficiencia dependen demasiado de las condiciones externas pudiendo incluso llegar a ser perjudiciales para las aguas subterráneas al favorecer un transporte descendente del contaminante a lo largo de las galerías perforadas por las lombrices.

De todas formas, las sustancias químicas pueden tener efectos perjudiciales sobre la estructura y función de la biocenosis del suelo, lo que tendrá consecuencias sobre el normal desarrollo de los procesos propios del ecosistema edáfico (p.ej. la descomposición de la materia orgánica y la capacidad de autodepuración del suelo) (Jänsh *et al.*, 2007). Naturalmente, los niveles de metales pesados capaces de admitir *A.caligiosa* son limitados y terminan por producir efectos tóxicos letales y subletales. Khalil *et al.* (1996) determinó que la concentración letal media (LC50) del Cd para ésta especie en un suelo con un pH de 7,05 y 21,6% de materia orgánica tras un período de exposición de 56 días era de 540 mg Cd/kg suelo seco (2mmol CdCl₂·4H₂O/Kg suelo seco) mientras que la concentración efectiva media (EC50) para la inhibición del crecimiento de los juveniles era 68,4 mg Cd/kg suelo seco.

Sin embargo, aunque se considera que las lombrices de tierra son buenos bioindicadores de la contaminación química del suelo, se ha comprobado que son relativamente tolerantes (p.ej. Spurgeon *et al.* (2004) respecto al Cd) y que tienen una menor sensibilidad a la contaminación del suelo por metales pesados que otros componentes de la biocenosis edáfica, como los microorganismos (Kahru *et al.*, 2005). De cualquier forma, la presencia de éstos anélidos no pasa desapercibida para la actividad microbiana del suelo. El mucus intestinal y cutáneo de las lombrices de tierra, con una gran disponibilidad de nutrientes y una elevada actividad microbiana, tiene un importante papel en la selección de los microorganismos presentes en la estimulación de las comunidades biológicas (Decaëns *et al.*, 2003)

3. Los microorganismos del suelo (bacterias) y su papel como bioindicadores

Como Alexander (2000) sugiere la concentración total de metales en suelo es un pobre indicador de la amenaza ambiental sobre organismos pudiendo llevar a una sub- o sobre-estimación del riesgo actual. Las características biológicas del suelo están reconocidas como bioindicadores de la calidad del suelo porque son más dinámicas y sensibles que las propiedades físico-químicas (Brookes 1995; Hinojosa *et al.*, 2004). Además, los análisis químicos nunca podrán ser más que aproximaciones que experimentan los organismos a microescala (A. R. Almas *et al.*, 2004). Bååth, (1989) y Khan & Scullion (2000) ya demostraron que el efecto de los metales en los sistemas edáficos incluyen alteraciones en la actividad y función del suelo, así como cambios en la composición de las comunidades microbianas. Los microorganismos son coloides biológicos que tienen una enorme superficie específica sobre la que inmovilizar los iones metálicos. Las células microbianas tienen una gran habilidad para

sorber (absorber y adsorber) y acumular iones metálicos a partir de disoluciones acuosas (Kurek *et al.*, 1982). Las funciones microbianas en suelos son típicamente resilientes (o capaces de absorber perturbaciones, sin alterar significativamente sus características de estructura y funcionalidad, es decir, pudiendo regresar a su estado original una vez que la perturbación ha terminado) de cara a la contaminación por metales. Dos factores pueden contribuir a esa recuperación. El primero es el descenso gradual de metales biodisponibles al ser inmovilizados por la matriz del suelo. Pero más importante aún es la tolerancia a los metales que desarrollan ciertos microorganismos, que tienden por remplazar a los sensibles. De ésta manera se producen cambios en la composición de la comunidad microbiana que tienden hacia una mayor tolerancia de metales pesados (A. R. Almas *et al.*, 2004). Sin embargo, un descenso en la diversidad microbiana puede reducir la resiliencia de las comunidades del suelo volviéndolas más sensibles a futuras alteraciones naturales o antropogénicas (Degens *et al.*, 2001). La actividad enzimática microbiana puede verse afectada directamente por metales pesados que actúan directamente sobre el sustrato o la enzima (Moreno *et al.*, 2003; Stuczynski *et al.*, 2003), o indirectamente afectando a los microorganismos envueltos en la actividad enzimática. A modo de ejemplo, Almas *et al.* (2004) obtuvieron un descenso en la actividad microbiana del 50% con respecto a la inicial al aplicar 0.60mmol/l de Cd y Zn sobre un pastizal con un pH al agua de 6.8 y una concentración de MO del 7.2%. Este estudio también presenta una correlación significativa entre el descenso de la concentración letal del 50% de la población bacteriana (LC50) y la concentración de metales pesados en el agua de los poros.

De hecho, se ha fundamentado que esa diversidad funcional es crucial para la estabilidad del sistema a largo plazo (Pankhurst, CE *et al.*, 1996). Estos cambios de diversidad y poblacionales pueden ser detectados a través de un método basado en el comportamiento degradativo de diferentes fuentes de carbono por parte de las comunidades del suelo conocido como microplacas Biolog®. Cada microplaca contiene 96 pocillos donde se distribuyen los diferentes sustratos objeto de degradación por los microorganismos. En realidad únicamente son 31 sustratos diferentes que, se conoce, son exudados de las raíces de las plantas (Campbell *et al.*, 1997) o que se han identificado previamente como altamente discriminatorios entre comunidades del suelo (Hitzl *et al.*, 1997) y otros 3 pocillos con agua que servirían como control (Lagomarsino *et al.*, 2007). Cada microplaca contiene cada uno de estos sustratos por triplicado. Además del sustrato, los pocillos incluyen una sal de tetrazolio que torna a violeta actuando como indicador de la respiración celular en cada sustrato (en realidad, la formación de NADH tiende a oxidar el sustrato y modificar su pH). Esta matriz permite obtener una “huella dactilar” de la comunidad microbiana y poder compararla tanto a nivel estructural como poblacional de forma rápida y sucesiva. Estudios previos (Campbell, J.V. *et al* (1997)) han demostrado que las diferencias en la actividad degradativa de ciertos sustratos del Biolog® permite la discriminación de diferentes poblaciones microbianas. Se trata de un método simple y rápido de análisis pero requiere una especial atención durante la toma de datos, su análisis y normalización así como en la interpretación de los resultados. En la Figura 1 se muestra la distribución de las diferentes fuentes de carbono en las microplacas Biolog®.

A1 Water	A2 β -Methyl-D-Glucoside	A3 D-Galactonic Acid γ -Lactone	A4 L-Arginine
B1 Pyruvic Acid Methyl Ester	B2 D-Xylose	B3 D-Galacturonic Acid	B4 L-Asparagine
C1 Tween 40	C2 i-Erythritol	C3 2-Hydroxy Benzoic Acid	C4 L-Phenylalanine
D1 Tween 80	D2 D-Mannitol	D3 4-Hydroxy Benzoic Acid	D4 L-Serine
E1 α -Cyclodextrin	E2 N-Acetyl-D-Glucosamine	E3 γ -Hydroxybutyric Acid	E4 L-Threonine
F1 Glycogen	F2 D-Glucosaminic Acid	F3 Itaconic Acid	F4 Glycyl-L-Glutamic Acid
G1 D-Cellobiose	G2 Glucose-1-Phosphate	G3 α -Ketobutyric Acid	G4 Phenylethylamine
H1 α -D-Lactose	H2 D,L- α -Glycerol Phosphate	H3 D-Malic Acid	H4 Putrescine

Figura 1. Formas de carbón contenidas en los Biolog® ECO-plates. Este patrón de 32 pocillos, se presenta por triplicado en cada microplaca. Fuente: Garland and Mills (1991)

OBJETIVOS DEL ESTUDIO

Considerando toda la bibliografía anterior se planteo un diseño experimental capaz de responder a las hipótesis de partida:

- Las lombrices de tierra son capaces de adsorber y absorber Cd en su estructura
- Las lombrices mejoran la solubilidad del Cd en el suelo
- Los agregados de las lombrices tienen mayores índices de retención de Cd que el suelo circundante
- Los lixiviados procedentes de suelos con lombrices serán menos voluminosos pero más enriquecidos en Cd
- La comunidad microbiana presenta cambios en su actividad degradativa en presencia de lombrices y/o Cd en el suelo
- Existen determinados compuestos de las microplacas Biolog® capaces de predecir episodios de contaminación

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Caracterización del suelo

Para el diseño experimental se tomó tierra perteneciente a un campo dedicado a pastoreo del Instituto Pirenaico de Ecología (IPE) en Jaca. La tierra se secó en invernadero y se tamizó a 2mm. Todo el volumen de tierra se mezcló homogéneamente y se caracterizó según análisis fisicoquímicos de textura (% arena, limo y arcilla), pH, % C orgánico, capacidad de intercambio catiónico (C.I.C.) y capacidad de retención de agua (Capacidad de campo –CC- y punto de marchitez –PM-).

El pH (en agua y en KCl) del suelo experimental y del suelo del que procedían las lombrices de tierra se determinó mediante electrometría, a partir de extractos obtenidos con una proporción 1:2,5 (g suelo/g H₂O destilada o KCl 0,1 M). El resto de parámetros se analizaron únicamente en el suelo experimental. El contenido en materia orgánica se estableció por calcinación, expresándose como porcentaje (g cenizas/100 g suelo), mientras que la espectrometría de absorción atómica fue la técnica utilizada para la determinar la C.I.C., expresada en equivalentes (meq/100 g suelo). Una aerometría permitió conocer la textura del suelo. Para conocer la capacidad de campo y el punto de marchitez del suelo experimental, se utilizaron dos cámaras de presión a 0,3 bar y 15 bar, respectivamente (FOTO 1). En cada cámara se introdujo un suelo patrón y 2 muestras del suelo a analizar, que previamente se habían mantenido saturados con agua durante 24 horas. Posteriormente, las cámaras fueron puestas en funcionamiento a la presión indicada durante otras 24 horas. Despues de pesarlas, las muestras y los suelos patrón se introdujeron en una estufa, donde permanecieron 3 días a 105°C. Por último, la capacidad de campo y el punto de marchitez de las muestras y de los patrones se determinaron aplicando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ peso} = (\text{Peso húmedo} - \text{Peso seco}) / (\text{Peso seco} - \text{Tara cristalizador}) \times 100$$



Foto 1. Cámaras de presión utilizadas para determinar la capacidad de campo y el punto de marchitez del suelo experimental.

2. Recolección y mantenimiento de lombrices

Las lombrices se tomaron en una parcela agrícola junto al IPE en Zaragoza, se seleccionaron únicamente ejemplares adultos mayores de 5cm de *Aporrectodea caliginosa*. Tras un período de mantenimiento de 2 semanas en un terrario (FOTO 2) con suelo de la misma procedencia de las lombrices se trasladaron a otro terrario con suelo experimental ya secado y tamizado para su aclimatación. Durante el período de aclimatación (14 días) la tierra se regó con agua destilada tratando de no saturar el suelo. El objetivo de ésta aclimatación era que las lombrices vaciaran de tierra su tubo digestivo, eliminando todo el suelo de donde fueron recolectadas. Se mantuvieron protegidas de la luz bajo un film de polietileno negro perforado para permitir el intercambio de gases.



Foto 2. Terrario en el que se mantuvieron las lombrices de tierra durante el período de mantenimiento.

3. Diseño experimental

El diseño experimental constaba de 4 tratamientos, con 6 macetas cada uno a modo de réplicas situadas sobre bandejas de PE de alta densidad similares a las mostradas en la FOTO 3, ya empleadas en el período de aclimatación. Cada maceta tenía una capacidad de 2,5L y en su base se colocó una malla fina de jardinería para evitar la fuga de lombrices.

Tratamiento S	Sin lombrices de tierra + Riego sin Cd
Tratamiento Cd	Sin lombrices de tierra + Riego con Cd
Tratamiento Lo	Con lombrices de tierra + Riego sin Cd
Tratamiento LoCd	Con lombrices de tierra + Riego con Cd

El experimento comenzó el 15/07/2011 (Día 0), cuando el suelo de cada maceta se regó con agua destilada hasta alcanzar una humedad igual a su capacidad de campo, y se sembraron las lombrices de tierra en las macetas de las bandejas Lo, LoCd y Lo (T1). Su fecha de finalización fue el 16/08/2011 (Día 32), momento en el que se recogieron los lixiviados procedentes del último día de riego (Día 31) y se sacrificaron las últimas lombrices de tierra. Entre los Días 1 y 31 (del 16/07 al 15/08/2011) se realizaron los riegos, se recogieron los lixiviados y se

registraron los datos de la temperatura y la humedad del aire y el suelo. Puesto que el peso del suelo contenido en cada maceta era de 1906,2 g y la capacidad de campo del suelo experimental era del 30,3% (% peso), y en base a los resultados de algunas pruebas empíricas previas, el Día 0 del experimento cada maceta se regó con 580 ml de agua destilada, con el fin de que el suelo que contenían alcanzara la capacidad de campo antes de introducir las lombrices de tierra. En cambio, desde el Día 1 del experimento hasta su finalización (Día 31) cada maceta fue regada diariamente con 200 ml de agua destilada o de la disolución de Cd, según correspondiera.

En el tiempo que duró el experimento en sentido estricto, se distinguen dos períodos:

1. Día 1-16 (del 16/07 al 31/07/2011): Durante ese tiempo, la instalación experimental consistió en 5 bandejas, cuyas macetas se regaron sólo con agua destilada.
2. Día 17- 31 (del 01/08 al 15/08/2011): El Día 17 del experimento se sacrificaron las 18 lombrices de tierra de la bandeja Lo (T1). A partir de ese día, solamente quedaron cuatro bandejas, correspondientes a cuatro tratamientos (FOTO 3):



Foto 3. Diseño experimental con los cuatro tratamientos.

Entre los días 17-31, el Cd se añadió al suelo de los tratamientos Cd y LoCd regando las macetas con una disolución de 343,125 mg Cd/l agua destilada (3,05 mM). Puesto que el Cd metálico es insoluble en agua, este metal pesado fue incorporado al agua de riego en forma de sal $\text{CdCl}_2 \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$ (de la casa Panreac). Este compuesto presenta una elevada solubilidad en agua (1680 g/l a 20°C). Neuhauser *et al.* (1985) no encontraron diferencias en la toxicidad que distintas sales (acetato, cloruro, nitrato y sulfato) de Cd, Cu, Ni, Pb y Zn causaron en *Eisenia fetida*. Sin embargo, otros autores han indicado que la sal más hidrosoluble de un metal es la que provoca un efecto tóxico mayor, lo que se ha comprobado con los nitratos de Pb y Cu (Sánchez-Hernández, 2006). Al no haber encontrado en la bibliografía ninguna información concluyente ni específica que pudiera ser aplicable a la especie y el metal pesado utilizados en

este experimento (*A. caliginosa* y el Cd), se entendió que no existían motivos para no añadir el Cd en forma de cloruro dihidrato ni tampoco para usar preferentemente alguna otra sal.

La concentración de Cd fue elegida para evitar que las lombrices de tierra murieran a causa de la exposición al metal. Khalil *et al.* (1996) determinaron una concentración letal media (LC50) para *A. caliginosa* de 540 mg Cd/kg. A pesar de que este se calculó en experimentales ligeramente diferentes a las nuestras (pH 7,05; materia orgánica 21,6%; Cd añadido como sulfato...), se tomó dicho valor como referencia de toxicidad por ser el único disponible para esta especie y metal. Con el fin de conocer qué cantidad de Cd debía aportarse a cada maceta diariamente para no superar esa dosis, se dividió 540 mg/kg entre 15, que eran los días de duración del periodo de riegos con Cd. Los cálculos indicaron que cada día debían añadirse 68,625 mg Cd a los 200 ml de agua destilada con los que iba a regarse cada maceta. Por tanto, después de multiplicar por un factor de conversión de 2,03 para transformar el peso del elemento en el peso de la sal, resultó que había que aportar 139,309 mg CdCl₂*2,5H₂O por maceta y día.

4. Medición de la temperatura y humedad del suelo y del aire

Las condiciones de temperatura y humedad del aire y el suelo fueron medidas y anotadas diariamente, antes de regar las macetas. Para medir la temperatura del suelo se utilizó una sonda termométrica, que permaneció introducida en la maceta nº 1 de la bandeja S.

En cuanto a la medición de la humedad del suelo, se empleó el reflectómetro Tektronix 1502C TDR Cable Tester, que permite determinar la humedad volumétrica del suelo por reflectometría de dominio temporal (time domain reflectometry, TDR) (Moret-Fernández *et al.*, 2006) con la ayuda del programa informático TDR-Lab (Moret-Fernández *et al.*, 2011). El programa informático TDR-Lab (<http://hdl.handle.net/10261/35790>) ha sido desarrollado por el Grupo de Física del Suelo y Laboreo de Conservación de la Estación Experimental Aula Dei (CSIC), en colaboración con el Departamento de Materiales de Interés Tecnológico del Instituto de Ciencia de Materiales de Aragón (ICMA-CSIC) (Universidad de Zaragoza – CSIC). Para registrar los valores de esta variable se colocó una sonda en la maceta nº 8 de la bandeja Cd, otra sonda en la maceta nº 18 de la bandeja Lo y una tercera en la maceta nº 20 de la bandeja LoCd. Al mismo tiempo, se registraron la temperatura y la humedad relativa del aire durante toda la fase experimental, gracias a una pequeña estación meteorológica.

5. Aplicación de las normas DIN/OECD de acuerdo con la legislación estatal vigente sobre suelos contaminados

Con el fin de determinar cuál sería la concentración de Cd en el suelo experimental que justificaría su declaración como un suelo contaminado, en aquellos casos en que se considere prioritaria la protección del medio ambiente, en aplicación del apartado 2.b. del Anexo III del RD 9/2005, se llevaron a la práctica los procedimientos descritos en la norma DIN 38414-S4 (DIN, 1984), elaborada por el Instituto Alemán de Normalización (Deutsches Institut für Normung, DIN) y en la norma OECD nº 201 (OECD, 2006), elaborada por la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE y OECD en inglés), que se centran en el modo de obtener lixiviados con agua a partir de distintos sustratos y en cómo realizar un ensayo

toxicológico de inhibición del crecimiento con algas y cianobacterias de agua dulce, respectivamente.

Para ello, se contaminaron artificialmente cinco muestras de suelo con cinco concentraciones de Cd en progresión geométrica (x 3). El Cd se añadió al suelo en forma de cloruro 2,5 hidratado en disolución. Además de estas concentraciones, se añadió una muestra de suelo sin contaminar como control. Cada muestra consistió en 50 g de suelo seco y tamizado a 2 mm de tamaño máximo de partícula:

Forma química	C1	C2	C3	C4	C5	Control
$\text{Cd}^{2+} (\mu\text{g/g})$	6,7	20	60	180	540	0
$\times 2,03$ (factor de conversión)						
$\text{CdCl}_2 \cdot 2,5\text{H}_2\text{O} (\mu\text{g/g})$	13,6	40,6	121,8	365,4	1096,2	0

El motivo de haber elegido esas concentraciones fue que la mayor de ellas coincidiera con la concentración máxima que, suponiendo que el suelo retuviera todo el Cd aportado con el riego, tendría el suelo del tratamiento LoCd al finalizar el experimento, que sería también la máxima a la que podrían verse expuestas las lombrices de tierra.

Cada muestra de 50 g de suelo se introdujo en una botella de plástico de 1 l y se añadió 0,5 l de agua destilada ultrapura (Milli-Q). Estas mezclas fueron sometidas a una agitación arriba y abajo a 140-142 rpm mediante un agitador rotatorio (AFA AIM-25) durante 24 horas a la temperatura ambiental (FOTO 4). Tras este tiempo, los sobrenadantes fueron filtrados, utilizando un embudo de Büchner y filtros de celulosa con un tamaño de poro de 0,45 μm , y fijados con HNO_3 Hiperpur, de acuerdo con el procedimiento explicado en apartados anteriores. Las concentraciones de Cd presentes en los filtrados se determinaron mediante su análisis por ICP-OES.

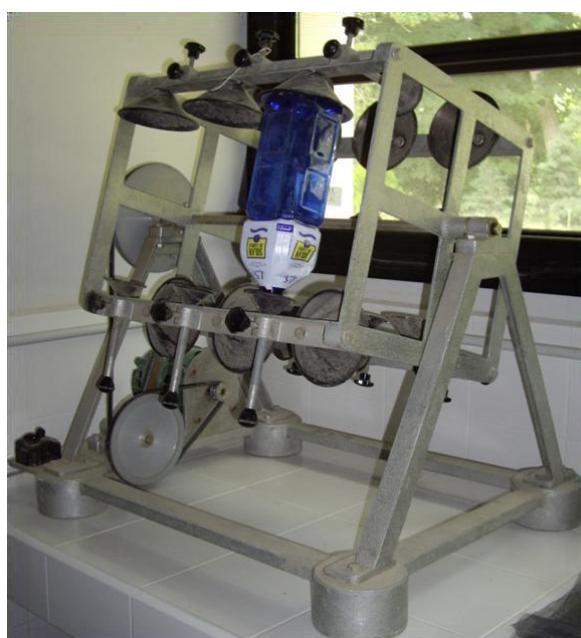


Foto 4. Agitador rotatorio utilizado para obtener los lixiviados según la norma DIN.

A continuación, se realizó un ensayo toxicológico exponiendo cultivos de algas verdes unicelulares (*Chlamydomonas reinhardtii*, CC125) a las concentraciones de Cd que estaban presentes en los lixiviados, con el fin de conocer sus posibles efectos inhibitorios sobre el crecimiento de las algas, utilizando la densidad óptica (Optical Density, OD) como variable respuesta.

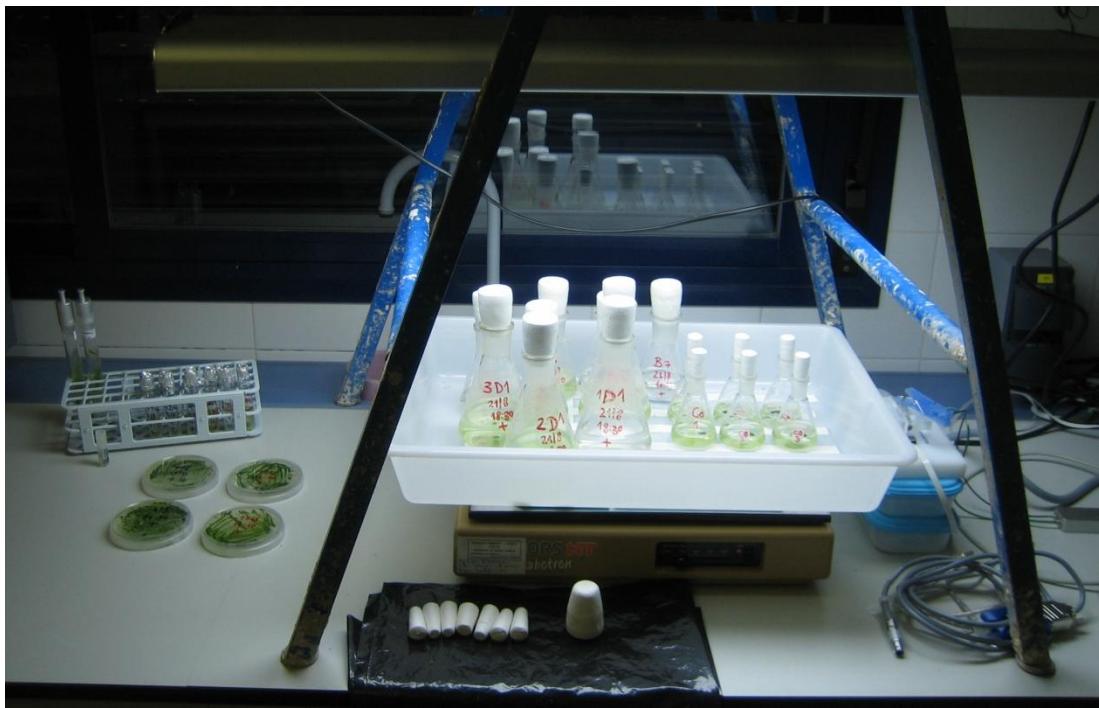


Foto 5. Ensayos de inhibición de crecimiento en algas

6. Recolección de lixiviados

Los lixiviados derivados del riego diario de las macetas quedaban retenidos en las bandejas, desde donde eran recogidos gracias a un tubo de silicona conectado al fondo de cada bandeja. Las bandejas se colocaron con una ligera inclinación para facilitar la recogida de los lixiviados. Los lixiviados se recogieron todos los días, transcurridas aproximadamente 24 horas desde el riego que los generó y antes de volver a regar las macetas. Tras medir el volumen del agua que había percolado a través de las macetas y que se había acumulado en las bandejas, se conservó una muestra de 100 ml del volumen total recogido de cada bandeja. De este modo, diariamente se guardaron cuatro muestras de lixiviados, de 100 ml cada una, correspondientes a los cuatro tratamientos.

7. Pesaje y sacrificio de las lombrices de tierra

Las 18 lombrices de tierra correspondientes a cada bandeja (Lo, LoCd y Lo (T1)) fueron pesadas justo antes de introducirlas en las macetas el Día 0 del experimento.

Después de sacrificarlas, también se pesaron las 18 lombrices de tierra representativas de la situación inicial (T0, tras el periodo de aclimatación), las 18 lombrices de tierra representativas de la situación intermedia (T1, bandeja Lo (T1)) y las 36 lombrices de tierra representativas de

la situación final (T2, tratamientos Lo y LoCd). El pesaje se hizo tanto en fresco como en seco, una vez deshidratados los cuerpos en una estufa, utilizando una balanza de precisión (Mettler Toledo AX205 Delta Range).

En todos los casos, las lombrices de tierra se pesaron individualmente y sin forzar a los animales a vaciar su tubo digestivo como paso previo (p.ej. Capowiez *et al.*, 2010).

La forma de extraer las lombrices de tierra del suelo del terrario y de las macetas consistió en una búsqueda manual. El método utilizado para sacrificarlas fue sumergirlas en etanol absoluto, lo que causó su muerte de forma rápida. Al finalizar el experimento, habían sido sacrificadas las 72 lombrices de tierra, aunque en tres momentos distintos:

Situación	Descripción	Bandeja	Nº de lombrices de tierra sacrificadas
T0	Tras el periodo de aclimatación	Terrario	18
T1	Al finalizar el primer periodo experimental (Día 1-16)	Lo (T1)	18
T2	Al finalizar el segundo periodo experimental (Día 17-31)	Lo y LoCd	18 + 18 = 36

8. Preparación y conservación de las muestras de los lixiviados y de las lombrices de tierra

Con el fin de eliminar los precipitados y los sólidos en suspensión, las muestras de lixiviados fueron filtradas utilizando un embudo de Büchner y filtros de celulosa (Sartorius Stedim Biotech) con un tamaño de poro de 0,45 µm. Para mantener disueltos los metales que pudieran estar presentes en el medio líquido, las muestras también fueron fijadas con ácido nítrico 69% Hiperpur (Panreac), con un nivel de impureza debida al Cd de 0,5 ppb (µg/l). La proporción utilizada para la fijación fue de 1,54 ml HNO₃/25 ml disolución, lo que equivale a ≈ 4% (% volumen). Los lixiviados se guardaron en botes de plástico con tapa roscada. Estos recipientes se mantuvieron en refrigeración (a 4°C) hasta que se enviaron las muestras para ser analizadas (p.ej. Kalbitz y Wennrich, 1998). El resto de muestras líquidas a las que se hace referencia en este apartado y en el siguiente también permanecieron refrigeradas hasta su análisis.

Las muestras de los lixiviados del tratamiento S fueron reducidas a tres para su análisis: la muestra del Día 1 del experimento, una muestra integrada de los lixiviados recogidos durante el resto del primer periodo experimental (Día 2-16) y otra muestra integrada de los lixiviados recogidos durante todo el segundo periodo (Día 17-31). Con las muestras del tratamiento Lo se obró del mismo modo. En cambio, en el caso de los tratamientos Cd y LoCd se analizaron ocho muestras: dos pertenecientes al primer periodo experimental (la muestra del Día 1 y una muestra integrada de los lixiviados de Día 2-16, como se había hecho en los tratamientos S y Lo) y seis pertenecientes a otros tantos días del segundo periodo, en el que las macetas de estos dos tratamientos fueron regadas con Cd (Día 17, 20, 23, 26, 29 y 31).

En cuanto a las lombrices de tierra, después de pesarlas y sacrificarlas, se deshidrataron en una estufa, donde permanecieron a 60°C durante 3 días. Los animales se guardaron de tres en tres en recipientes de plástico cerrados. En el caso de las lombrices de tierra representativas de la situación inicial (T0), los grupos de tres se formaron aleatoriamente, mientras que las representativas de las situaciones intermedia (T1) y final (T2) se agruparon por maceta, ya que cada maceta contenía 3 lombrices de tierra. Finalmente, los recipientes se introdujeron en un congelador hasta que las muestras fueron preparadas y enviadas para su análisis.

Para la preparación de las muestras de las lombrices de tierra, se tomó como referencia el método explicado por Dai *et al.* (2004). Los lombrices de tierra deshidratadas y congeladas se trocearon y se introdujeron de tres en tres en tubos de vidrio Pirex con tapa roscada, añadiendo posteriormente HNO₃ y HCl concentrados según la proporción 100 mg lombrices de tierra : 4 ml HNO₃ + 2 ml HCl, hasta un máximo de 28 ml (FOTO 5). Después de 12 horas de digestión ácida, a lo largo de las cuales los tubos fueron agitados dos veces, el contenido de éstos se traspasó a unos recipientes de vidrio Pirex de mayor tamaño, que se cerraron herméticamente y se colocaron en el interior de una estufa, en la que permanecieron 3 horas a 130°C. Transcurrido este tiempo, los recipientes se sacaron de la estufa y se dejaron enfriar hasta que alcanzaron la temperatura ambiental. En cada recipiente, el volumen que quedaba de la disolución ácida se igualó añadiendo agua destilada ultrapura (doblemente destilada, Milli-Q), hasta conseguir un volumen de 40 ml. Se tomaron 15 ml de cada uno de los recipientes para que fuera determinado su contenido en Cd por ICP-OES (FOTO 6).



Foto 6. Digestión ácida de las lombrices.



Foto 7. Preparación de las muestras de lombriz para su análisis por ICP-OES.

9. Preparación y conservación de las muestras de suelo

Tomando como referencia el artículo científico escrito por Hobbelen *et al.* (2006) y con el objetivo de conocer no solamente la concentración total de Cd presente en el suelo sino también de poder estimar cuál era su fracción biodisponible, se tomaron tres tipos de muestras del suelo:

Tipo de muestra	Información proporcionada
Muestra sólida del suelo	Cd total en el suelo
Muestra del agua de los poros	Cd disuelto en la disolución del suelo
Muestra de un extracto con CaCl ₂ 0,01 M	Cd hidrosoluble e intercambiable

El contenido de Cd en el agua de los poros y en los extractos con CaCl₂ 0,01 M sólo se analizaron en el suelo de los tratamientos Cd y LoCd, ya que fueron los únicos cuyas macetas se regaron con este metal pesado.

El Día 32 del experimento, después de recoger los últimos lixiviados y de extraer las últimas lombrices de tierra, el agua de los poros fue recolectada introduciendo 40 g de suelo fresco en cada tubo Falcon de 50 ml y centrifugando los tubos durante 40 minutos con una fuerza centrífuga de 2000g. Se consiguió extraer de esta forma 1,5 ml (tratamiento Cd) y 4 ml (tratamiento LoCd) por cada 40 g de suelo fresco. Los sobrenadantes obtenidos fueron filtrados con filtros de celulosa con 0,45 µm de tamaño de poro y posteriormente fijados con HNO₃ Hiperpur, del mismo modo que se hizo con las muestras de lixiviados.

Para obtener el extracto con CaCl₂ 0,01 M no se utilizó el suelo fresco sino que éste se dejó secar al aire previamente en un invernadero. El suelo seco se colocó en recipientes de plástico y se añadió la disolución, con una proporción de 5:1 (5 g de disolución CaCl₂ 0,01 M:1 g de suelo). Los recipientes se introdujeron en un agitador, donde estuvieron sometidos durante 2 horas a 200 rpm. Los extractos resultantes también fueron filtrados y fijados como se ha explicado anteriormente.

Tanto en el caso del agua de los poros como en el de los extractos con CaCl₂ 0,01 M, se enviaron a analizar cuatro muestras de 15 ml: una muestra integrada procedente del suelo del tratamiento Cd y tres muestras del suelo del tratamiento LoCd, correspondientes a las macetas nº 20, 22 y 24.

En lo referente a la concentración total de Cd del suelo, se tomaron dieciséis muestras de suelo también seco: una del suelo original (situación T0), otra integrada de las macetas de la bandeja Lo (T1) (situación T1) y catorce representativas de la situación T2, consistentes en dos muestras integradas de las macetas de los tratamientos S y Cd, seis muestras de las seis macetas del tratamiento Lo (nº 13, 14, 15, 16, 17 y 18) y otras seis de las macetas del tratamiento LoCd (nº 19, 20, 21, 22, 23 y 24). Por otra parte, también se determinó la concentración de Cd en las heces de las lombrices de tierra, a partir de dos muestras integradas: una del tratamiento Lo (macetas del nº 13 al 18) y otra del tratamiento LoCd (sólo de las macetas nº 19, 21 y 23).

Antes de poder ser analizadas, estas muestras sólidas tuvieron que someterse a una digestión ácida con HNO₃/H₂O₂ en un ultraclave-microondas Milestone. Para ello, se introdujeron 0,1g de muestra sólida en el tubo de teflón del digestor y se añadieron 4 ml de HNO₃ PA-ISO 69% y 1 ml de H₂O₂ 33%. Después de tapar el tubo de teflón, el reactor se puso en funcionamiento con una rampa de temperatura final de 20 minutos a 220 °C. Una vez enfriado el reactor, se enrasaron los tubos con agua destilada ultrapura (Milli-Q) hasta alcanzar un volumen de 25 ml. Este procedimiento de preparación de las muestras sólidas de suelo lo llevaron a cabo en el Servicio de Ionómica del Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS, CSIC) (Murcia), donde se realizaron todos los análisis por ICP-OES para determinar la concentración de Cd presente en las muestras líquidas y sólidas.

10. Análisis de metales de las muestras

Las muestras que habían sido filtradas, fijadas y mantenidas en refrigeración (lixiviados, agua de los poros, extractos con CaCl_2 0,01 M y extractos procedentes de la digestión ácida de las lombrices de tierra) fueron enviadas al Servicio de Ionómica del CEBAS-CSIC. Allí se determinaron las concentraciones de Cd y de otros elementos químicos mediante Espectrometría de Emisión Óptica con Plasma Acoplado Inductivamente, conocida por sus siglas en inglés como ICP-OES (Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometry).

11. Seguimiento de la actividad microbiana

a. Extracción bacteriana de las muestras de suelo

La literatura incluye cantidad de métodos de extracción bacteriana del suelo pero todos ellos incluyen dos pasos principales: 1 dispersión de los agregados y 2 separación entre células y partículas orgánicas e inorgánicas (Heribert, I and Goberna, M., 2004).

Primero se realizó una puesta a punto del método. En la bibliografía existe una gran diversidad de métodos de extracción bacteriana del suelo ya sea a través de métodos físicos (Katayama *et al.*, 1998), químicos (Insam, H. y Goberna, M., 2004) o ambos combinados (Liu, 2010). Durante el período de prueba se reprodujeron los métodos descritos por Liu (2010) y Katayama (1998) parcialmente modificados.

Según el método de Liu se tomaron 20g de suelo fresco y se diluyeron en 100ml de 0.2% pirofosfato de sodio, ajustando a pH 7.5 con NaOH diluido. La disolución se llevaba a una batidora en vaso de cocina (Moulinex) donde se homogeneizaba la muestra en 15 ciclos de 6 segundos de duración. Según Lindalh (1996) una exposición breve a altas revoluciones no daña la estructura celular de las bacterias. Tras la homogeneización de la muestra se añadían 20ml de sacarosa en disolución con agua destilada (1.33g/ml) en un tubo falcon de 50mL sobre la que se depositaban otros 20ml de la disolución de suelo homogeneizada. El gradiente bifásico se centrifugó a 5000rpm durante 2 minutos con una aceleración y deceleración progresiva y suave. Una vez centrifugado la gran mayoría de las bacterias quedarían en la interfase entre la sacarosa y la disolución con tierra y pirofosfato de sodio. El extracto bacteriano resuspendió en una disolución de 1/3 en volumen de NaCl 0.8% en un tubo falcon de 50ml y se volvió a centrifugar a 8000rpm durante 10 minutos para evitar plasmólisis celular y homogeneizar la muestra. El sobrenadante final se pipeteó a otro tubo rellenándolo hasta 4.8ml de PBS (Phosphate Buffer Saline). Al realizarlo el procedimiento en paralelo por cuadruplicado es posible inocular los 96 pocillos del microplato con 31 fuentes diferentes de carbono. El almacenamiento del inóculo se realizó en nevera a 4°C hasta su utilización.

El otro método empleado en la extracción fue puramente físico según esta descrito por Katayama et al. (1998). Se tomaron 10g de suelo fresco y se diluyeron en 95ml de agua miliQ. La muestra se homogeneizó durante 15 minutos en la misma batidora en vaso que el otro método. De la suspensión de suelo se pipeteó 10ml en un tubo falcon de 50ml. Se sometió a sonicación durante un minuto para favorecer la dispersión celular y seguidamente se introdujo en la centrífuga a 1000g durante 10 minutos. De los 10ml se separaron 9.5ml donde

presumiblemente se encontraba la mayor fracción bacteriana y a los 0.5ml restante, tras resuspenderlo hasta 10ml se le sometió de nuevo a otro ciclo de dispersión-centrifugación para continuar extrayendo más inóculo bacteriano de la muestra. El ciclo se repitió 5 veces hasta tener 47.5 ml de inóculo bacteriano que se almacenó en nevera a 4°C durante un breve período de tiempo hasta su utilización.

Una vez comparados ambos métodos y tras realizar la tinción celular según el mismo procedimiento se concluyó que el método físico era el que más bacterias era capaz de recuperar y el que menos interferencias podría causar con la actividad degradativa de los sustratos del Biolog® al evitar posibles interferencias por la incorporación de glucosa.

Ya puesto a punto el método de extracción se tomó una muestra integrada (recogiendo muestras de suelo de diferentes profundidades) de las 6 macetas para el tratamiento S. En el resto de tratamientos se tomaron muestras de únicamente la mitad de las macetas con el fin de no interferir en el resto de análisis. Para cada una de las muestras de suelo se repitió el mismo procedimiento de extracción celular y tinción celular. Con los mismos extractos, sin teñir, se inocularon cuatro microplacas Biolog®, una por cada uno de los tratamientos.

b. Tinción celular y conteo bacteriano

El método de tinción celular se tomó del artículo de Gregory *et al.* (2001) La observación bacteriana por microscopía de epifluorescencia alcanza un nivel resolutivo adecuado para el conteo celular. La fluorescencia es una propiedad de algunos átomos y moléculas de emitir luz a elevadas longitudes de onda después de absorber la luz de una particular y corta longitud de onda (Herman 1998). Una vez absorbido el fotón de energía, el electrón de la molécula fluorescente es excitado de su estado base a mayores estados energéticos. Para el que electrón vuelva a alcanzar su estado base de energía debe perder parte de su energía vibratoria en el ambiente, emitiendo un fotón de elevada longitud de onda, fenómeno conocido como fluorescencia. Algunas moléculas son autofluorescentes y emiten fluorescencia cuando se excitan. A este fenómeno se le conoce como fluorescencia primaria. La fluorescencia secundaria representa la emisión producida después de que una molécula se combine con una molécula con fluorescencia primaria denominada fluorocromo (Altemüller y van Vliet-Lanoe, 1990)¹. Los fluorocromos empleados para la visualización de la viabilidad bacteriana fueron el SybrGreen I (Molecular Probes, Eugene, Oreg.) y Yoduro de Propidio (SigmaChemical Co.) se fijan ambos a los ácidos nucleicos con máximos de excitación a 488nm y máximos de emisión a 521nm y 617nm para el verde y el rojo respectivamente. La combinación de ambos fluorocromos permite diferenciar entre células con la membrana celular intacta (verde), dañada (verde y rojo) y células muertas (rojo). El Yoduro de propidio es incapaz de atravesar la membrana celular pero una vez en el interior de la célula se une al DNA intercalándose entre las bases sin ninguna preferencia aunque también se une al RNA mientras el SybrGreen II es permeable a través de la membrana celular y se une únicamente al RNA. De manera que si una célula no está dañada, sus ácidos nucleicos se tiñen únicamente por el fluorocromo SybrGreen II, mientras que si tiene algún daño en la membrana se pueden distinguir ambos fluorocromos y si la célula ha muerto prevalece la tinción por el Yoduro de propidio.

¹ Tomado del artículo Li, Y. *et al* (2004)

Para la preparación del fluorocromo SybrGreen II se dejaba aclimatar hasta su fusión total y se preparaba una disolución de trabajo para una semana antes de congelarlo a -20°C para su mejor preservación. La disolución de trabajo constaba de 20µl de SybrGreen II y 2ml de dimetil sulfóxido (DMSO). La disolución se protegía de la luz en todo momento y se almacenaba a 4°C y oscuridad para un máximo de 4 usos durante una semana.

En la preparación del Yoduro de propidio (PI) se pesaban 2µg de producto en una balanza de precisión y se diluían en 2ml de PBS. La disolución de trabajo se protegía de la luz con un film del aluminio y se guardaba en la nevera a 4°C para su uso repetido hasta 6 meses.

El inóculo bacteriano extraído por el procedimiento físico descrito en el apartado anterior se filtró a 60µm con filtros de celulosa en una bomba de vacío para reducir las interferencias causadas en la lectura de la densidad óptica (OD). Una vez filtrado se tomaba 1ml del inóculo filtrado y se añadía 10µl del fluorocromo SybrGreen II y otros 10µl de PI. La muestra se deja en oscuridad durante 30 minutos dejando que los fluorocromos tiñan los ácidos nucleicos.

La preparación de la muestra para el microscopio comenzaba por filtrar de nuevo el inóculo a través de un filtro de 0.2µm de policarbonato negro. Luego se preparaba un portaobjetos al que se le añadía una gota de aceite de inmersión bajo y sobre el filtro de policarbonato cubriendolo con un cubreobjetos.



Foto 8. Bomba para filtrado y equipo de fijación del filtro de policarbonato para su posterior visualización

Para la visualización de las bacterias se utilizó un microscopio de epifluorescencia de la casa Nikon modelo Eclipse TE2000-S (FOTO 9) equipado con una lámpara de mercurio y unos filtros monocromáticos (G-2A y B2-E/C) para la visualización de la fluorescencia emitida por los diferentes fluorocromos. El conteo celular se hizo a través del programa informático NIS-elements (casa Nikon) tomando como una muestra representativa 10 campos aleatorios (FOTO 10) del filtro de 0.2µm de policarbonato negro sobre el que se filtró la muestra. De cada campo se tomaron dos fotos, una con un cada filtro monocromático.



Foto 9. Microscopio de epifluorescencia modelo Eclipse TE2000-S

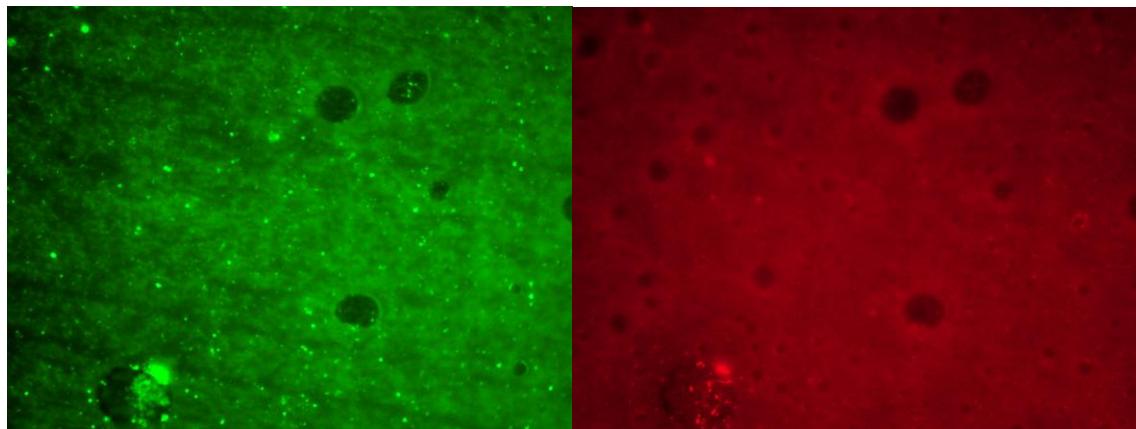


Foto 10. Campo de conteo celular por fluorescencia del fluorocromo Sybr Green II (verde) y Yoduro de propidio (rojo)

c. Inoculación en las microplacas Biolog® y lectura de la actividad degradativa

Cada uno de los pocillos, con una fuente de carbono diferente, tiene asociada una sal de tetrazolio que actúa como colorante con un máximo de absorbancia a 590nm cuando se reduce debido a la presencia de NADP como agente reductor. La lectura de la coloración del pocillo se relaciona directamente con la actividad degradativa del sustrato en el que se encuentra la comunidad microbiana (FOTO 11).

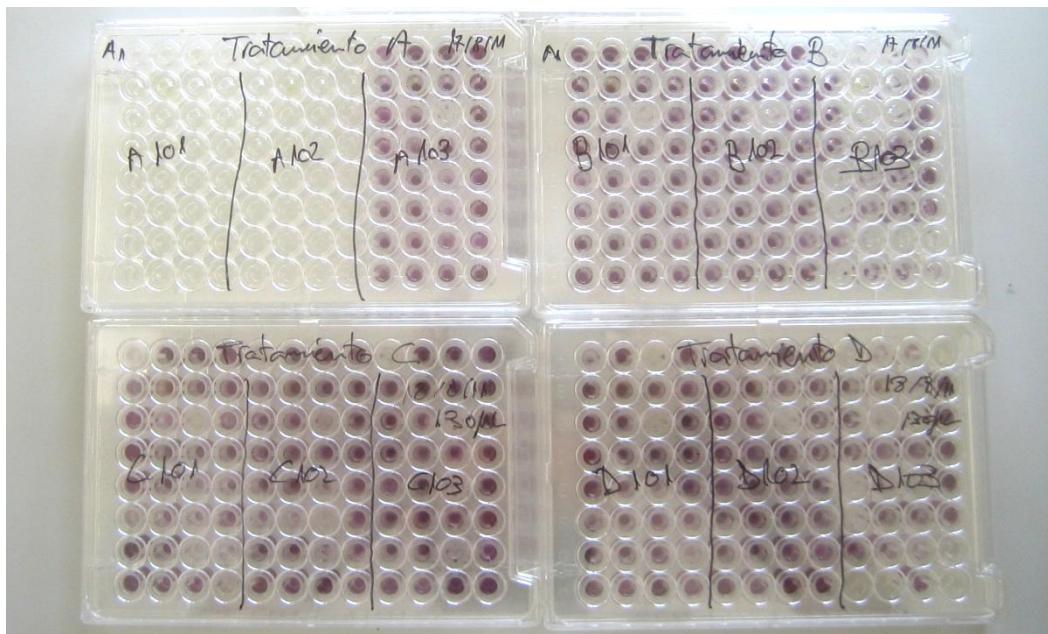


Foto 11. Microplacas utilizadas en el seguimiento de la actividad degradativa para los cuatro tratamientos.

El mismo inóculo empleado para el conteo celular se empleaba para llenar los 96 pocillos que componen las tres réplicas de fuentes de carbono que contiene la microplaca. Cada pocillo se llenó con 200 μ l de inóculo dentro de la campana de flujo laminar, en condiciones asépticas. El aparato medidor de la absorbancia empleado fue el modelo Anthos 2010 microplate reader (casa Biochrom) que realizaba la lectura automática de cada uno de los pocillos de la placa a 590nm y lo registraba de forma digital por medio del programa ADAP 2.0 de la misma casa (FOTO 12).



Foto 12. Lector de microplacas Anthos 2010 empleado para la lectura de coloración de los pocillos

Seguidamente se realizó la lectura de la densidad óptica para el inicio del registro evolutivo de coloración de los pocillos. Como para el inicio es de suponer que no se ha producido ninguna actividad degradativa por parte de la comunidad bacteriana inoculada se normalizaron los valores de toda la serie de datos conforme a los valores iniciales de cada pocillo. El resto de

lecturas se tomaron a primera hora de la mañana y última hora de la tarde hasta que los resultados obtenidos se estabilizaron, suceso que ocurrió aproximadamente a las 170 horas tras su inoculación.

Tras cada lectura, las microplacas se mantenían en aislamiento dentro de un cultivador (Pol-Eko Aparatura) a 25ºC protegidas de la luz en la funda original (FOTO 13).



Foto 13. Incubador Eko Aparatura empleado durante el seguimiento de las microplacas

12. Análisis estadístico

Los datos obtenidos de las lecturas de OD a 590 nm para cada microplaca se normalizaron dividiendo su valor por la OD inicial de cada sustrato. Utilizando el programa estadístico R se modelizaron las curvas de degradación según un modelo de crecimiento sigmoidal. Para cada curva se obtuvieron tres parámetros que definieron el comportamiento degradativo de una forma dinámica. Estos parámetros fueron la pendiente máxima de la curva, el máximo de degradación obtenido y el tiempo en alcanzar la mitad de la máxima pendiente (el tiempo en alcanzar una mayor velocidad de degradación de los sustratos). Los tres parámetros de cada sustrato se compararon en los diferentes tratamientos para encontrar diferencias.

Se agruparon los valores degradativos de todos los sustratos para un determinado tiempo y se normalizaron dividiéndolo por el valor agrupado en el t=0. De cada tratamiento se obtuvo una batería de datos normalizados que se modelizaron en función del tiempo de degradación según un modelo sigmoidal de la misma manera que para cada sustrato independiente. Las curvas obtenidas se compararon para analizar sus diferencias en los parámetros que la modelizan.

Debido a la presencia de anomalías -como la falta de normalidad, linealidad o la elevada dispersión- en los datos no fue posible realizar ANOVAs en el índice de Shannon Weaver. Se realizó un estudio de la diversidad microbiológica de los diferentes tratamientos a lo largo de

todo el tiempo de degradación empleando los valores de degradación medios normalizados para cada tiempo de muestreo.

RESULTADOS

1. Condiciones ambientales

Durante el periodo de aclimatación de las lombrices de tierra, la temperatura del aire osciló entre 22,6-26,5°C y su humedad relativa entre el 32-50%. En cuanto al periodo experimental (Día 1-31) la temperatura del aire estuvo comprendida entre 20,8-26,1°C y la humedad relativa entre el 34-67%, como valores mínimo y máximo.

2. Análisis del suelo

a. Caracterización del suelo

En la TABLA 1 se muestran los valores de pH de este suelo experimental en la situación inicial (T0), antes de que comenzara el experimento, en la situación intermedia (T1), una vez finalizada la primera fase experimental y antes de que empezara la segunda, y en la situación final (T2), al terminar el experimento.

Tiempo	Tratamiento	pH agua	pH KCl	MO (%peso)	CIC (meq/100g)
T0	-	8.06	7.85	4.78	17.2
T1	-	7.77	7.89	5.02	18.9
T2	Tratamiento S	8.02	7.89	5.03	17.7
T2	Tratamiento Cd	7.8	7.88	5.28	18.3
T2	Tratamiento Lo	7.84	7.91	5.25	19.4
T2	Tratamiento LoCd	7.63	7.84	5.16	18.7

Tabla 1. Características físico-químicas del suelo

Se trataba de un suelo de textura franca, con un 44,2% de arena, un 38,1% de limo y un 17,7% de arcilla. Las partículas del suelo se han clasificado en función de su diámetro de acuerdo con los criterios del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA en inglés): arena (0,05-2 mm), limo (0,002-0,05 mm) y arcilla (< 0,002 mm).

La capacidad de campo (0,3 bar) del suelo resultó ser del 30,3% (% peso) y su punto de marchitez (15 bar) del 14,5% (% peso). La densidad aparente del suelo experimental seco y tamizado a 2 mm era de 1270,826 kg/m³ (o g/l).

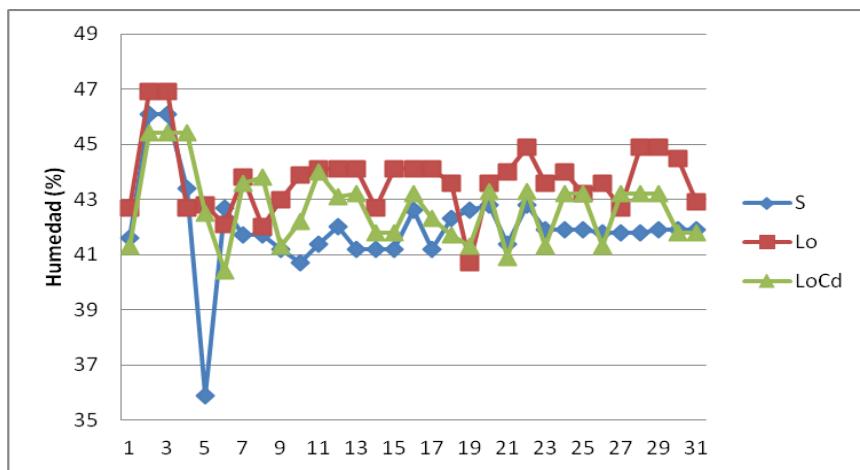


Figura 2. Evolución de la humedad en el suelo de los diferentes tratamientos

En cuanto a la humedad volumétrica del suelo (FIGURA 2) las macetas del tratamiento Cd es que el mantuvo una menor humedad en promedio, tanto en Día 6-16 como en Día 17-31 (41,6% y 42%, respectivamente). En el extremo opuesto se encuentra el suelo del tratamiento Lo, cuya humedad volumétrica media fue del 43,5% (Día 6-16) y del 43,7% (Día 17-31). En cuanto al suelo de LoCd, mostró un comportamiento intermedio entre los dos anteriores, con valores promedio del 42,6% (Día 6-16) y del 42,3% (Día 17-31). La humedad volumétrica media del suelo de los tratamientos Cd y Lo fue ligeramente superior en Día 17-31 que en Día 6-16, mientras que en el tratamiento LoCd sucedió lo contrario.

b. Concentración de cadmio en poros

La concentración de Cd disuelto en el agua de los poros (TABLA 2) del tratamiento Cd fue mayor que las del tratamiento LoCd, si no se considera la maceta nº 20. Los valores de las macetas nº 22 y nº 24 del tratamiento LoCd fueron prácticamente iguales ($\approx 0,49 \text{ mg/l}$), mientras que la concentración del tratamiento Cd ($0,778 \text{ mg/l}$) fue 1,6 veces superior a este valor. Sin embargo, la concentración del metal en el agua de los poros de la maceta nº 20, donde estaba situada una de las sondas de humedad, fue casi 5 veces superior a la de las otras dos macetas del mismo tratamiento LoCd. Si se calcula el promedio de todos los datos disponibles de este último tratamiento ($1,128 \text{ mg/l}$, $\sigma = 1,11$), resulta que fue 1,45 veces o un 45% mayor que la concentración correspondiente al tratamiento Cd.

A partir de las concentraciones de Cd en el agua de los poros, puede estimarse que, al finalizar el experimento, la cantidad de este metal en la disolución del suelo era aproximadamente de $0,046 \mu\text{g/g}$ suelo seco en el tratamiento Cd y de $0,178 \mu\text{g/g}$ suelo seco en el tratamiento LoCd.

c. Concentración de cadmio soluble

En cuanto al metal extraíble con CaCl_2 (TABLA 2), el valor de su concentración en el tratamiento Cd ($2,175 \mu\text{g/g}$ suelo seco) estuvo dentro del rango de concentraciones correspondientes a las macetas del tratamiento LoCd (entre $1,646$ y $2,752 \mu\text{g/g}$), cuyo promedio fue igual a $2,196 \mu\text{g/g}$ suelo seco ($\sigma = 0,55$).

d. Concentración de cadmio total

La concentración total de Cd en el suelo (TABLA 2) en la situación T0 fue inferior a $0,5 \mu\text{g/g}$ suelo seco, el límite de detección para muestras sólidas de la técnica analítica ICP-OES,

mientras que en la situación T1 fue de 3,19 µg/g suelo seco. También en la situación T2 la concentración de Cd fue inferior a 0,5 µg/g suelo seco, en los dos tratamientos que no fueron regados con Cd (S y Lo). En cambio, el valor del tratamiento Cd fue de 328,54 µg/g suelo seco, mientras que la concentración promedio del metal en el suelo del tratamiento LoCd resultó ser de 310,93 µg/g suelo seco ($\sigma = 75,58$), es decir, 1,06 veces o un 5,4% inferior que la del tratamiento sin lombrices.

e. Concentración de cadmio en las deposiciones de las lombrices

Las heces estuvieron enriquecidas en Cd (TABLA 2). En el tratamiento Lo alcanzaron una concentración de 1,95 µg Cd/g suelo seco, es decir, al menos 3,9 veces o un 290% superior a la concentración total del suelo procesado y no procesado por las lombrices de tierra (< 0,5 µg/g). En el tratamiento LoCd, la concentración de Cd en las deposiciones (337,01 µg/g suelo seco) también fue mayor que la del suelo de cualquiera de las macetas, exceptuando la nº 20. Puesto que las heces analizadas se recogieron en las macetas nº 19, 21 y 23, en este caso las comparaciones se han realizado con la concentración promedio en el suelo de esas tres macetas (288,94 µg/g suelo seco). Como resultado, la concentración del metal en las deposiciones del tratamiento LoCd fue 1,17 veces o un 16,6% superior a la del suelo circundante.

		Cd total	Cd poros	Cd CaCl ₂	Cd lombrices
		µg/g	mg/l	µg/g	µg/g
T0		<0,5			1,465
T1		3,19			1,161
T2	Tratamiento S	<0,5			
	Tratamiento Cd	328,54	0,778	2,175	
	Tratamiento Lo				
	Maceta 13	<0,5			1,000
	Maceta 14	<0,5			1,043
	Maceta 15	<0,5			0,730
	Maceta 16	<0,5			0,608
	Maceta 17	<0,5			0,691
	Maceta 18	<0,5			0,640
	Heces macetas 13 a 18	1,95			
	Tratamiento LoCd				
	Maceta 19	241,13			79,034
	Maceta 20	442,96	2,411	2,752	100,962
	Maceta 21	321,81			144,421
	Maceta 22	233,72	0,488	2,190	176,028
	Maceta 23	303,87			147,311
	Maceta 24	322,08	0,485	1,646	54,184
	Heces macetas 19, 21, 23	337,01			

Tabla 2. Resumen de las concentraciones de Cd en el suelo y en las heces de las lombrices de tierra, en los extractos con CaCl₂, en el agua de los poros y en las lombrices de tierra, en las situaciones T0 (acondicionamiento), T1 (riego sin metales) y T2 (riego con metales).

3. Lixiviados

a. Volumen

Entre el Día 2 y el final de la primera fase del experimento (Día 2-16), el volumen de los lixiviados recogidos diariamente osciló entre 830-1060 ml por bandeja (\approx 138-177 ml por maceta), lo que supone entre el 67,1% y el 88,3% respecto al volumen de agua destilada aportada con el riego. La media aritmética de los volúmenes recogidos en este periodo estuvo comprendida entre 907-957,3 ml (con una desviación estándar o típica (σ) entre 44,8-64,3). Durante la segunda fase experimental (Día 17-31), el volumen varió entre 905-1075 ml por bandeja (\approx 151-179 ml por maceta), es decir, que entre el 75,4% y el 89,6 % del volumen de riego se convirtió en lixiviados. El promedio del volumen en este caso osciló entre 984,7-1009,5 ml (σ entre 35,2-47,1).

Al calcularse los promedios, se observa que en Día 2-16 el menor porcentaje de agua de riego lixiviada (77,2%) correspondió a la bandeja S, mientras que el mayor (84,1%) perteneció a la bandeja Lo. En Día 17-31, también fue el tratamiento S el que mostró el porcentaje de lixiviados inferior (82,1%) pero, en este caso, el valor superior correspondió al tratamiento Cd (84,1%).

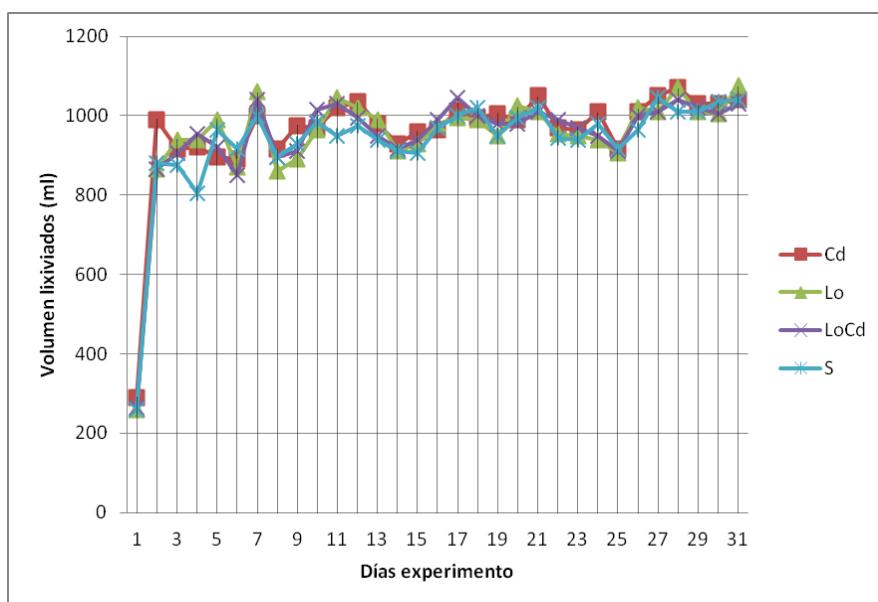


Figura 3. Volumen de lixiviados recogidos

b. Concentración de cadmio

El Día 1, la concentración de este metal en los lixiviados pertenecientes a todos los tratamientos fue tan baja ($< 0,01$ mg/l) que resultó indetectable por ICP-OES. En cuanto al resto del primer periodo experimental, los valores los tratamientos S, Cd y LoCd también fueron inferiores al límite de detección de la técnica analítica utilizada. El tratamiento Lo supone la excepción, ya que sus lixiviados contenían 0,056 mg Cd/l.

En Día 17-31, las macetas de los tratamientos S y Lo continuaron siendo regadas tan sólo con agua destilada y las concentraciones de Cd en sus lixiviados durante este periodo fueron de 0,059 mg/l y 0,032 mg/l, respectivamente.

Concentraciones de Cd en los lixiviados

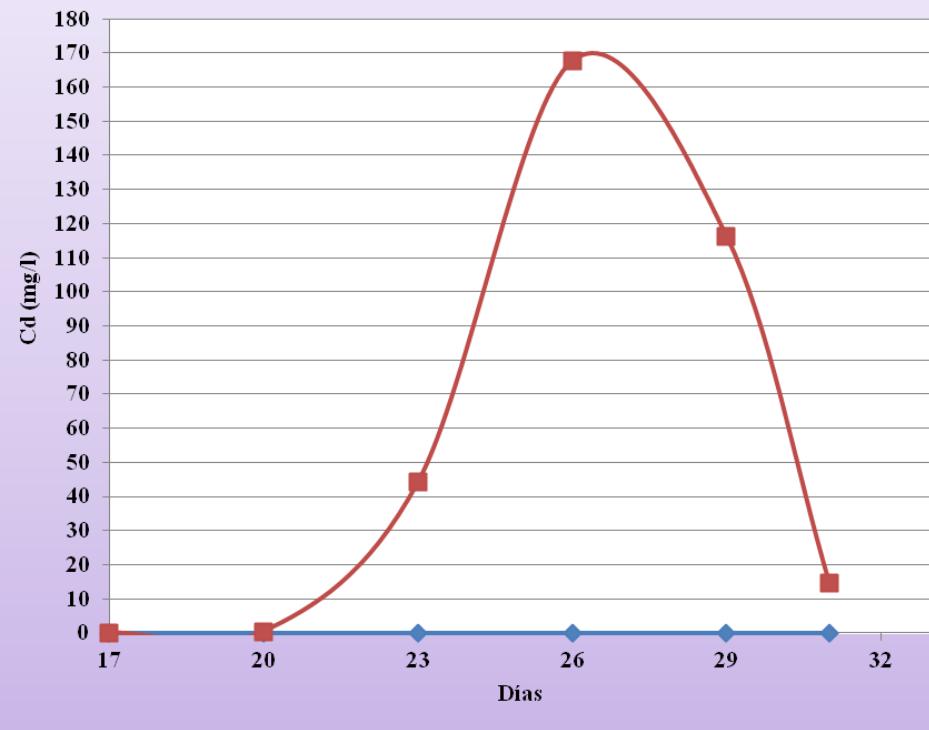


Figura 4. Comparativa de la variación temporal en las concentraciones de Cd en los lixiviados del tratamiento Cd (línea azul con rombos) y el tratamiento LoCd (línea roja con cuadrados) en Día 17-31.

Por el contrario, a partir del Día 17 del experimento y durante 15 días, las macetas de los tratamientos Cd y LoCd fueron regadas diariamente con la disolución de Cd. Los resultados obtenidos en ambos tratamientos son muy diferentes entre sí, como puede verse en la FIGURA 4. En el tratamiento Cd, las concentraciones del metal en los lixiviados estuvieron comprendidas entre 0,006 mg/l (Día 23) y 0,020 mg/l (Día 31), si bien el Día 20 la concentración fue indetectable. En cambio, los lixiviados del tratamiento LoCd contuvieron un mínimo de 0,039 mg Cd/l (Día 17) y un máximo de 167,733 mg Cd/l (Día 26).

En base a las diferencias entre la concentración de Cd en la disolución utilizada para el riego y las concentraciones determinadas en los lixiviados de los tratamientos Cd y LoCd en los seis días de la segunda fase del experimento de los que se tienen datos, se han calculado los porcentajes correspondientes al Cd que pasó a formar parte de los lixiviados, así como los porcentajes del metal que, bien quedó retenido en la disolución del suelo o en alguna de las fracciones de la fase sólida, bien fue absorbido por las lombrices de tierra (TABLA 3). El Cd presente en los lixiviados de un día determinado pudo proceder tanto de la cantidad añadida con el riego justo ese día como de aquella parte que quedó retenida en el suelo en los días previos de riego con el metal.

		% Cd lixiviado	% Cd retenido
TRATAMIENTO Cd	Día 17	0,003	99,997
	Día 20	≈ 0	≈ 100
	Día 23	0,002	99,998
	Día 26	0,003	99,997
	Día 29	0,004	99,996
	Día 31	0,006	99,994
TRATAMIENTO LoCd	Día 17	0,011	99,989
	Día 20	0,091	99,909
	Día 23	12,852	87,148
	Día 26	48,884	51,116
	Día 29	33,909	66,091
	Día 31	4,220	95,780

Tabla 3. Porcentajes del Cd retenido en el suelo y del Cd presente en los lixiviados de los tratamientos Cd y LoCd en los Días 17, 20, 23, 26, 29 y 31 del experimento.

Pero los resultados del tratamiento LoCd son radicalmente distintos. El primer día de riego con Cd (Día 17) el suelo fue capaz de retener casi el 100% del metal aportado (aunque el porcentaje exacto ya fue menor que todos los correspondientes al tratamiento Cd), mientras que el cuarto día de riego (Día 20) el porcentaje del metal transferido a los lixiviados siguió siendo inferior al 0,1%. No obstante, el Día 23 (el séptimo día de riego) la capacidad del suelo para retenerlo se redujo notablemente (supuso un 87,148 %) y continuó haciéndolo hasta el décimo día de riego (Día 26), momento en el que se alcanzó el valor mínimo de entre los registrados (51,116% de Cd retenido), siendo transferido a los lixiviados el 48,884% del metal aportado.

La tendencia cambió a partir de ese punto, ya que entre los días décimo y decimoquinto de riego, parece que el suelo recuperó su capacidad de retención de Cd, de forma que el Día 31 el metal presente en el lixiviado tan sólo representó el 4,220% del que había sido añadido con el riego (95,780% de Cd retenido).

4. Seguimiento de las lombrices de tierra

a. Mortalidad

La supervivencia global, teniendo en cuenta todos los individuos recolectados en el campo, superó el 98% mientras que, si solamente se consideran los animales que participaron en el experimento de forma directa, su supervivencia fue del 96,30%. En las bandejas Lo y Lo (T1) sobrevivieron el 100% de las lombrices de tierra, mientras que las dos que presumiblemente

murieron pertenecían al tratamiento LoCd en el que, por tanto, hubo una mortalidad del 11,11%.

b. Crecimiento

El peso húmedo promedio de las lombrices de tierra en el momento de ser inoculadas en las macetas fue de 0,328 g en la bandeja Lo (T1), de 0,275 g en la bandeja Lo y de 0,318 g en la bandeja LoCd.

El aumento del peso de estos animales puede significar que ha ocurrido, bien un crecimiento, bien un engorde. Según van Gestel y Weeks (2004), cuando se usan lombrices de tierra adultas en los ensayos ecotoxicológicos, la pérdida o ganancia de peso no puede interpretarse como un efecto del tóxico sobre el crecimiento. No obstante, teniendo en cuenta el peso inicial de los especímenes utilizados en este experimento y el grado de desarrollo de su clitelo, parece que se trataba de individuos subadultos, es decir, que aún conservaban su capacidad para crecer. Por esta razón, cuando se ha detectado un aumento de peso en las lombrices de tierra, ha sido interpretado como crecimiento, no como engorde.

Las lombrices de tierra crecieron entre los Días 1 y 31 del experimento, tanto en el tratamiento Lo como en el tratamiento LoCd (FIGURA 5). Sin embargo, el peso de los animales que no fueron expuestos al Cd se incrementó en casi un 35%, mientras que el de los expuestos aumentó tan solo un 8,59% en ese periodo e, incluso, parece haberse reducido en un 5,22% desde el comienzo de los riegos con Cd (Días 17-31), si se supone que el crecimiento en Día 1-16 fue del 14,57%.

Es decir, en comparación con los animales del tratamiento Lo, que ejercieron la función de controles respecto a los efectos tóxicos del Cd, los del tratamiento LoCd sufrieron una inhibición del crecimiento del 75,43% en Día 1-31 y del 129,31% en Día 17-31.

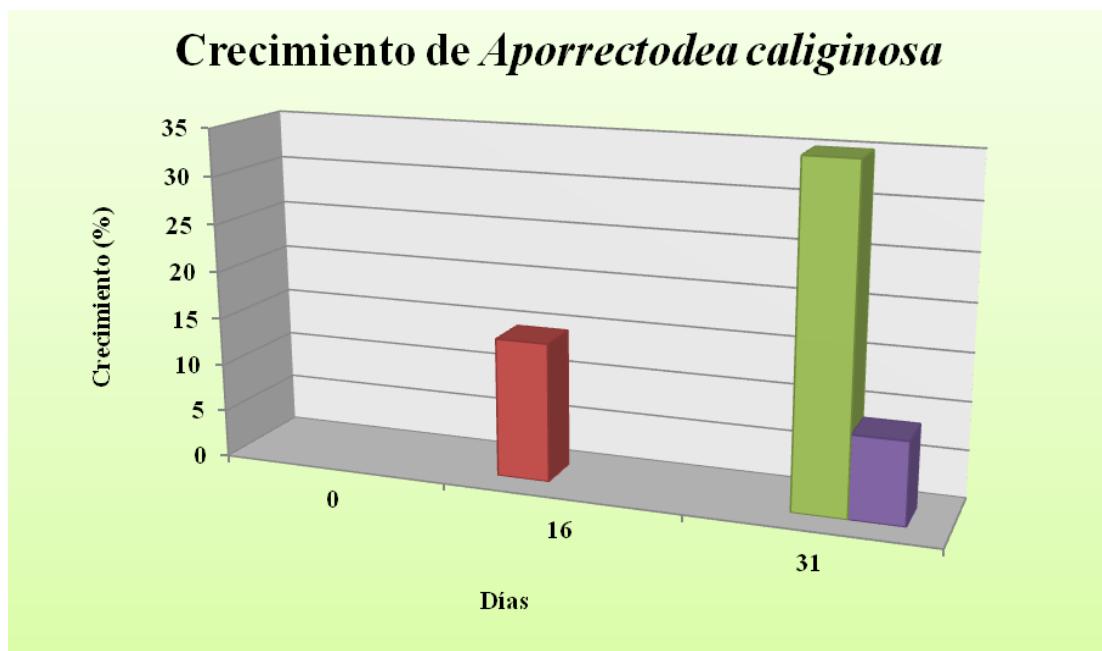


Figura 5. Porcentajes de crecimiento de las lombrices de tierra en Día 1-16 (tratamiento Lo (T1) en rojo) y en Día 1-31 (tratamiento Lo en verde y tratamiento LoCd en violeta).

c. Concentración de cadmio

La concentración de Cd en las lombrices de tierra representativas de la situación T0 fue de 1,465 µg/g peso seco en promedio (TABLA 4). En los animales representativos de la situación T1 y en los del tratamiento Lo, sacrificados en la situación T2, las concentraciones fueron algo inferiores (1,161 y 0,785 µg/g peso seco, respectivamente). Ninguna de las 54 lombrices de tierra analizadas para obtener estos datos fue expuesta deliberadamente a este metal pesado.

En cambio, las macetas del tratamiento LoCd sí que se regaron con la disolución de Cd durante 15 días, tras los cuales la concentración promedio detectada en las lombrices de tierra fue de 116,99 µg/g peso seco.

Si se expresan los resultados por individuo, las concentraciones promedio de Cd fueron de 0,143 µg/lombriz (T0), 0,139 µg/lombriz (T1), 0,108 µg/lombriz (T2, tratamiento Lo) y 13,152 µg/lombriz (T2, tratamiento LoCd). Así, el riego con Cd provocó una concentración 149 veces mayor en las lombrices expuestas que en las control (Lo). Dicho de otra manera, la exposición al Cd causó que su concentración en los organismos se multiplicara por 149.

Concentración de Cd (µg/g peso seco)			
Tiempo	Tratamiento	Media	σ
T0	Terrario	1.465	0.275
T1	Lo	1.161	0.303
T2	Lo	0.785	0.188
T2	LoCd	116.99	46.475

Tabla 4. Medias aritméticas y desviaciones estándar (σ) de las concentraciones de Cd en las lombrices de tierra en las situaciones T0, T1 y T2.

Al hablar de la concentración de Cd de las lombrices de tierra, se está haciendo referencia tanto a la cantidad presente en los tejidos animales como a la existente en el suelo que había en su interior en el momento de ser sacrificadas, puesto que no fueron forzadas a vaciar su tubo digestivo previamente. Por otra parte, Vijver *et al.* (2005) observaron que la adsorción de Cd en la pared corporal de *L. rubellus* era insignificante respecto a su concentración interna y concluyeron que no era necesario corregir la adsorción al estudiar la acumulación de los metales en estos organismos.

5. Distribución del cadmio en los diferentes subsistemas

Si se comparan estos resultados con los del tratamiento Cd (60,84% del metal retenido en el suelo y 39,16% lixiviado), se observa que la presencia de las lombrices de tierra causó una reducción del porcentaje de Cd retenido respecto al aportado con el riego del 3,26% o del 8,15%, en el último caso sin considerar la maceta nº 20 (FIGURA 6).

Partición del Cd aportado con el riego

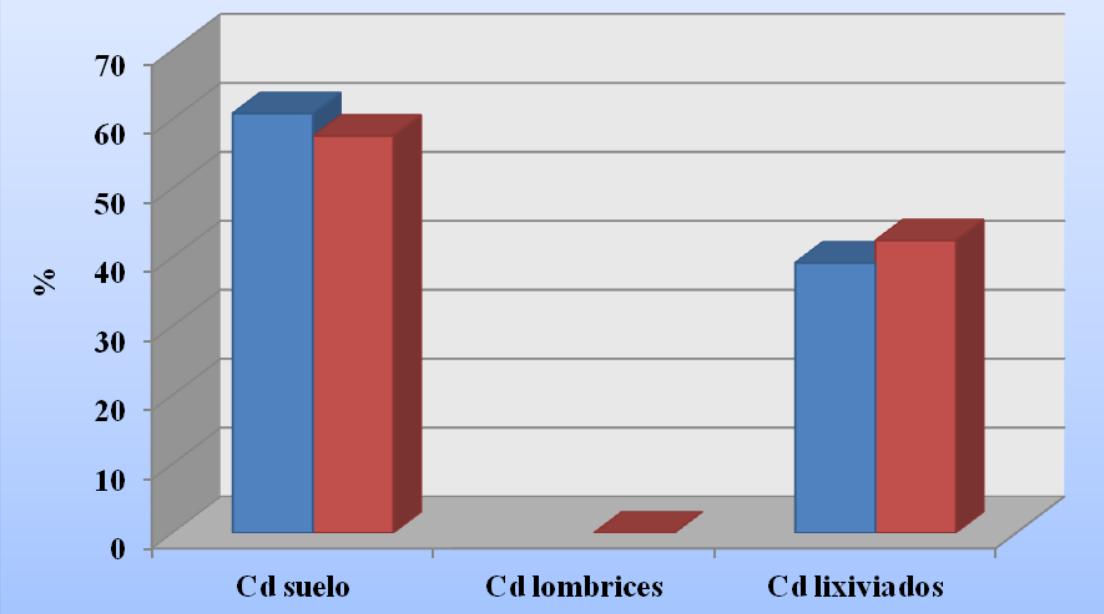


Figura 6. Porcentajes del Cd aportado con el riego en Día 17-31 que quedó retenido en el suelo y en las lombrices de tierra y el que fue lixiviado, en los tratamientos Cd (en azul) y LoCd (en rojo).

6. Perfil fisiológico de la comunidad bacteriana

a. Conteo bacteriano

Dada la novedad del método y la falta de tiempo y medios para saber exactamente la capacidad de extraer bacterias respecto a las que realmente había en el suelo, se decidió no usar los datos obtenidos cuantitativamente. El objetivo era haberlos usado para normalizar los resultados de los Biolog. Según Galard, L. (1997) la normalización del inóculo permitiría eliminar efectos que podrían generar confusión en el desarrollo del perfil fisiológico de la comunidad microbiana (Community Level Physiological Profile o CLPP). Gregory *et al.* (2001) hablan de una elevada abundancia de bacterias en el medio acuático a una densidad de 10^5 a 10^6 células/cm⁻³ aunque Galard, L. (1997) lo considera moderado mientras que Haack, S. *et al.* (1995) hablan de al menos 10^8 células/ml para poder generar una respuesta adecuada. Sin embargo, el método si puede aportar una información cualitativa, acerca de en qué tratamientos hay más o menos bacterias activas. Así que aun sin saber cuántas hay en total en el suelo, se obtuvo una valiosa información del impacto de los diferentes tratamientos en la comunidad bacteriana.

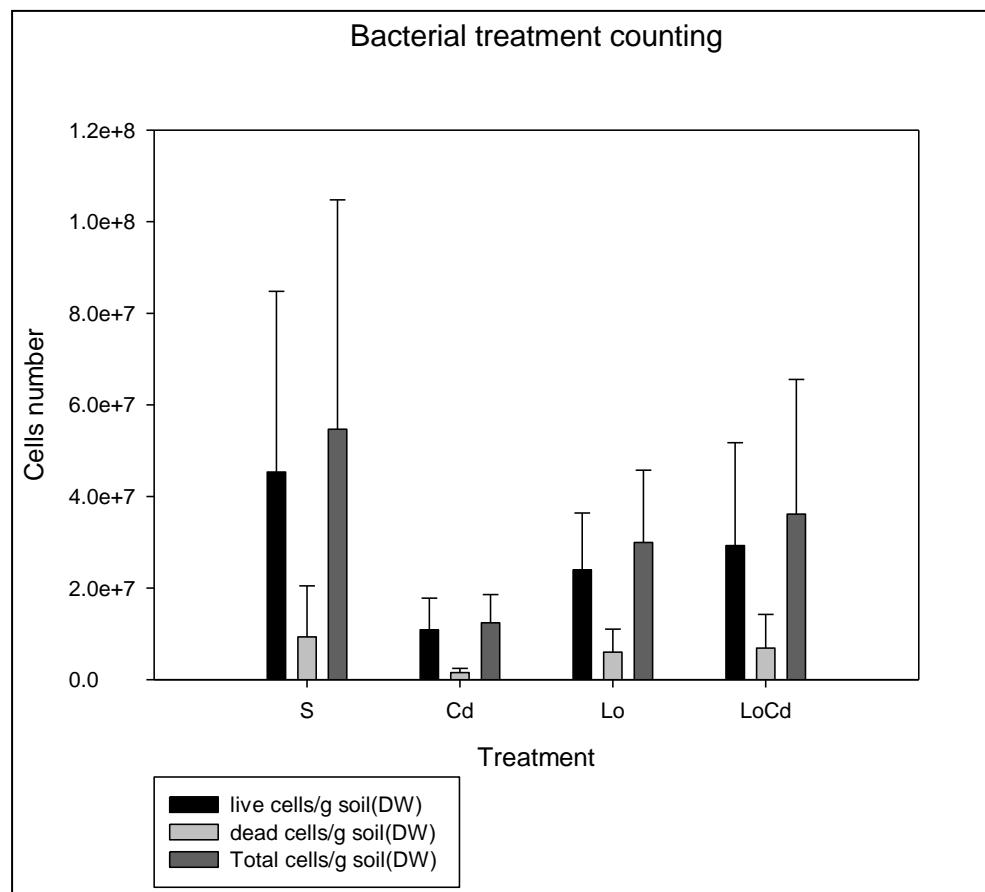


Figura 7. Número de células vivas, muertas y totales en los inóculos bacterianos de los diferentes tratamientos.

Los resultados aportaron información acerca de la dinámica poblacional en los diferentes tratamientos, complementando el resto de análisis realizados. Según la FIGURA 7 se puede diferenciar como para el tratamiento suelo la cantidad de bacterias por gramo de suelo seco es muy superior al resto de tratamientos aunque la variabilidad de los datos es muy grande al agrupar las tres réplicas en una. Los valores de densidad bacteriana de los tratamientos Lo y LoCd son muy similares tanto para el número de células viables como para el número de células muertas por gramo de suelo seco lo que parece indicar una baja relevancia del Cd sobre el número poblacional de la comunidad bacteriana cuando hay presencia de lombrices de tierra. Como era presumible esperar, el tratamiento Cd tiene la menor cantidad de células viables y totales.

El porcentaje promedio de células viables se mantiene muy parecido en los 4 tratamientos con valores que rondan entre 81.6% (LoCd) y el 84% (S). El valor mínimo lo registra una réplica del tratamiento Cd con una viabilidad del 68% mientras que el máximo lo tiene una réplica del tratamiento Lo con un 93% de viabilidad.

b. Respuesta degradativa global de todos los sustratos

Tal como Hackett (1997) observó existe una relación sigmoidal entre las lecturas de densidad óptica a 590nm (OD590) y el tiempo. Curvas a partir de las cuales se pueden extraer diferentes parámetros que nos facilitan la comparación de los tratamientos tales como la pendiente (b), el máximo (d) y el tiempo de degradación medio o TM50 (e). Generalmente las curvas se

normalizan según una curva modelo sobre la que se comparan el resto de curvas, a éste proceso se le conoce como *average well color development (AWCD)* pero debido a la gran variabilidad de los datos obtenidos de las curvas y número de bacterias presentes en cada muestra se decidió hacer una análisis comparativo de las curvas sin normalizar.

El AWCD, representado en la FIGURA 8, se trata de una manera de normalizar los datos y conocer el comportamiento global en la actividad degradativa de los sustratos que componen el Biolog®. Para cada réplica se normalizó su valor dividiendo por la señal emitida a 690nm en el momento de la inoculación

$$AWCD = \sum OD_i / 31$$

Donde OD_i es el valor de densidad óptica de cada pocillo con fuente de carbono, descartando el agua. Se generó una curva general donde se agrupa el comportamiento degradativo de todos los sustratos para un determinado tiempo. De ésta forma es posible conocer que tratamiento presentó, en términos generales, mayor actividad degradativa.

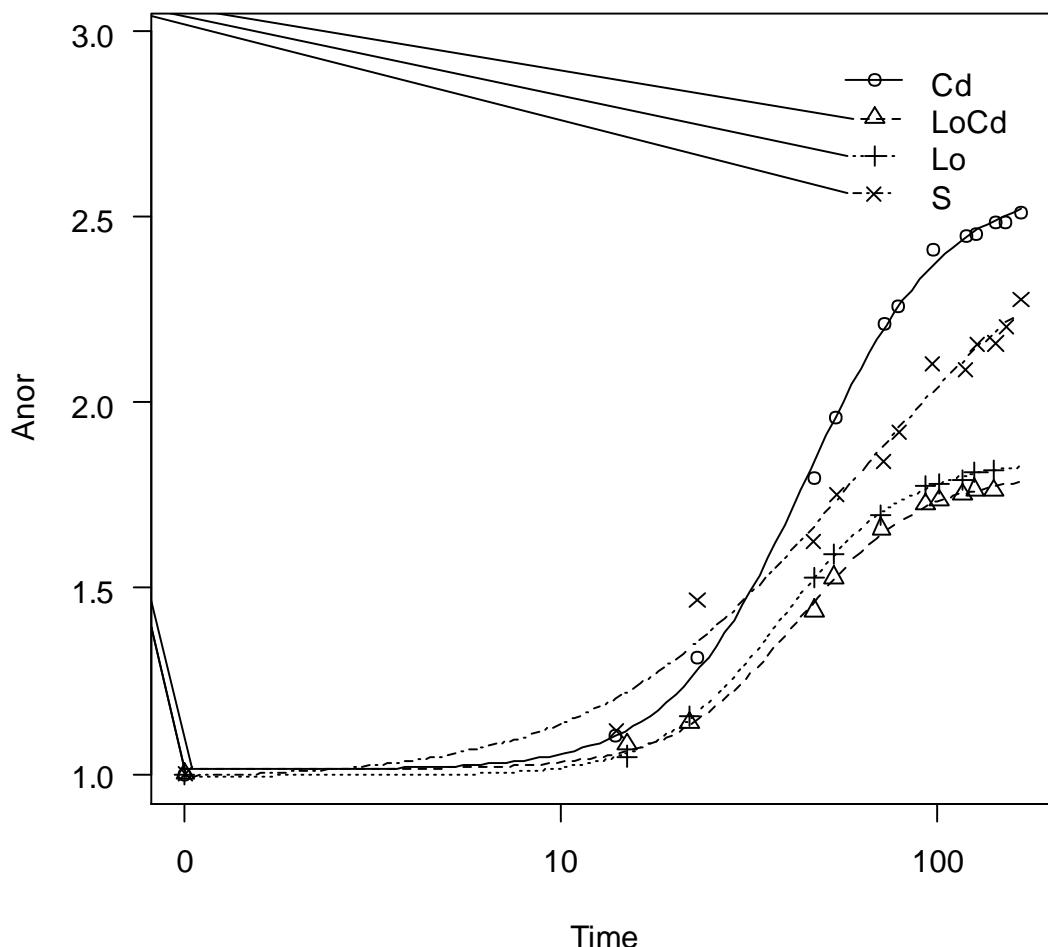


Figura 8. Representación de la AWCD normalizada por el valor de OD inicial de todos los sustratos con respecto al tiempo para los diferentes tratamientos

Las únicas diferencias significativas entre parámetros de las curvas, se dan entre los máximos del tratamiento Cd frente a los máximos de los tratamientos LoCd y S. Los resultados apuntan

a una mayor tasa de actividad degradativa de las microplacas inoculadas con bacterias procedentes del tratamiento expuesto a riego con Cd. La actividad presente en el tratamiento S parece no haber alcanzado su valor asintótico lo que nos permite deducir que durante el período de muestreo no se consiguió degradar en su totalidad los sustratos presentes en las microplacas.

La misma distribución presentan las AWCD al reducir el número de sustratos del análisis y catalogándolos por su formulación química (hidratos de carbono o ácidos carboxílicos).

c. Respuesta degradativa de cada sustrato

De cada sustrato se modelizó una curva según la distribución de una función sigmoidal, similar a la generada por cada tratamiento en el AWCD, donde el eje X era el tiempo y el eje Y el valor de la OD₅₉₀ normalizado por el valor de la OD₅₉₀ inicial para cada tratamiento. Según esos modelos generados para cada sustrato se obtuvieron los valores de OD normalizados máximos, el tiempo en alcanzar el valor medio de la actividad degradativa y el valor de la pendiente máxima que en la TABLA 5 se denominan Max (verde), Tm50 (amarillo) y pendiente (rojo) respectivamente. Posteriormente se realizó un análisis comparativo de cada uno de estos parámetros para cada fuente de carbono entre los diferentes tratamientos con el fin de encontrar diferencias significativas en las respuestas degradativas de las comunidades microbiológicas que representan los diferentes tratamientos.

La TABLA 5 muestra las diferencias significativas que se detectaron. Así se puede observar que al comparar el tratamiento S y Lo los máximos de degradación de los sustratos *α-D-Lactose*, *D,L-α-Glycerol Phosphate*, *D-Malic Acid* y *Glucose-1-Phosphate* son aproximadamente 66% menores en el tratamiento Lo mientras que las pendientes de degradación son de tres a seis veces mayores para los sustratos *Putrescine*, *α-D-Lactose*, *Phenylethyl-amine* y *D-Galactonic acid x-Lactone*. En cuanto al Tm50, el único sustrato que ha resultado ser significativo (*4-Hydroxy Benzoic Acid*) entre estos dos tratamientos (S y Lo) da a entender que el tratamiento Lo tarda aproximadamente el doble de tiempo en degradar la mitad de todo el sustrato degradado.

Al comparar el tratamiento S con el Cd las pendientes de algunos sustratos (*L-Phenylalanine* y *α-Ketobutyric Acid*) son del orden de 4 veces mayores en el tratamiento Cd frente al S. Para los valores máximos el tratamiento Cd tiene valores 1.4 veces mayores que el tratamiento control. El Tm50 del *D-Malic Acid* es el doble en el tratamiento S frente al Cd mientras que para *D-Glucosaminic Acid* y *4-Hydroxy Benzoic Acid* los valores del Tm50 son 1.8 y 1.4 respectivamente mayores en el tratamiento Cd frente al S.

Si comparamos los tratamientos S y LoCd los valores máximos son aproximadamente 1.6 veces mayores en el primero frente al segundo pero para *α-D-Lactose*, aunque su máximo es mayor en el tratamiento S, su pendiente en el tratamiento LoCd es 3.3 veces mayor si se compara con el control (S).

La comparación de los tratamientos Cd y Lo evidencian que en el primero una gran cantidad (11 de 32) de sustratos donde sus máximos son significativamente mayores, con un orden de magnitud que varía entre 1.25 (*α-D-Lactose*) y 2.18 (*Putrescine*). Al igual que ocurría en la

anterior comparación para α -D-Lactose, aunque su máximo es mayor en el tratamiento Cd, su pendiente en el tratamiento Lo es 3 veces mayor. Tendencia que se repite en al comparar los tratamientos Cd y LoCd para el mismo sustrato.

Además de esa coincidencia para la α -D-Lactose, el tratamiento LoCd también tiene unos valores máximos significativamente menores para la Putrescine y Glycyl-L-Glutamic Acid al compararlo frente al tratamiento Cd hay otros 10 sustratos más, todos ellos diferentes a la anterior comparación, que muestran esta tendencia.

Por último las curvas de degradación de los sustratos entre los tratamientos Lo y LoCd son tan similares que prácticamente no presentan diferencias significativas más que para la pendiente del 2-Hydroxy Benzoic Acid, unas 7 veces mayor en el tratamiento LoCd, y el máximo de degradación del Pyruvic Acid Methyl Ester, 1,4 veces mayor en el tratamiento LoCd frente al tratamiento Lo.

d. Actividad degradativa de los sustratos con base hidratocarbonada

El Análisis multivariable de las componentes principales en el espacio canónico o PCA es el método más empleado para la interpretación del los resultados de la CLPP (Community Level Physiological Profile), se trata de un proceso en el que se generan unos nuevos ejes (o componentes principales) que son combinaciones de algunas de las variables que concentran la mayor proporción de la varianza. Es capaz de comparar la similaridad relativa de las muestras contrastando sus valores de unos pocos componentes principales y evaluar cual de las variables originales es responsable de los componentes principales analizando las correlaciones de las variables originales con las componentes principales (Galard, L. 1997).

Las pendientes de degradación para los hidratos de carbono presentes en los pocillos del Biolog quedan representadas en el espacio canónico (FIGURA 9) en el 94,4% de los datos. El primer eje del espacio canónico multidimensional es el que mayor peso presenta agrupando el 83,8% de la variabilidad de los datos, mientras que el segundo eje agrupa solo el 10,6%. Los pesos relativos de cada sustrato empleados en la modelización del eje se representan en la TABLA 6. Existe una cierta coincidencia en la dispersión de los datos de los tratamientos de LoCd frente al S y a Lo diferenciando bien al tratamiento con Cd de los otros tratamientos. La actividad degradativa de D-Cellobiose (G1) y α -D-Lactose (H1) se ve disminuida por la presencia de cadmio en el suelo mientras que la presencia de lombrices parece afectar de manera positiva a la degradación de D-Mannitol (D2) por las bacterias del suelo en ausencia de cadmio y β -Methyl-D-Glucoside (A2) con presencia de cadmio.

SUSTRADOS BIOLOG	S/Lo	S/Cd	S/LoCd	Cd/Lo	Cd/LoCd	Lo/LoCd
A1 Water						
A2 β -Methyl-DGlucoside				1.7	2.08	
A3 D-Galactonic acid γ -Lactone	0.26			1.61	1.86	
A4 L-Arginine						
B1 Pyruvic Acid Methyl Ester						0.78
B2 D-Xylose						
B3 D-Galacturonic Acid		0.75		1.3		
B4 L-Asparagine						
C1 Tween 40						
C2 i-Erytritol					1.59	
C3 2-Hydroxy Benzoic Acid						0.14
C4 L-Phenylalanine	0.23				2	
D1 Tween 80						
D2 D-Mannitol		0.68		1.71		
D3 4-Hydroxy Benzoic Acid	0.51	0.7	0.55		1.79	
D4 L-Serine		0.7		1.53		
E1 α -Cyclodextrin					1.56	
E2 N-Acetyl-D-Glucosamine		0.67		1.67		
E3 γ -Hydroxybutyric Acid						
E4 L-Threonine						
F1 Glycogen			1.59			1.7
F2 D-Glucosaminic Acid		0.68			1.61	
F3 Itaconic Acid					0.75	
F4 Glycyl-L-Glutamic Acid				1.68	1.72	
G1 D-Cellobiose						
G2 Glucose-1-Phosphate	1.53			1.36		
G3 α -Ketobutyric Acid		0.27				1.6
G4 Phenylethyl-amine	0.15					
H1 α -D-Lactose	0.35	1.51		0.31	1.59	0.29
H2 D,L- α -Glycerol Phosphate	1.84			1.64		
H3 D-Malic Acid	1.65	1.93		1.5	1.72	
H4 Putrescine	0.19				2.18	2.2

Tabla 5. Análisis comparativo de los parámetros que modelizan la curva sigmoidal de cada sustrato entre los diferentes tratamientos (Amarillo=TM50, verde=máximo, rojo=pendiente)

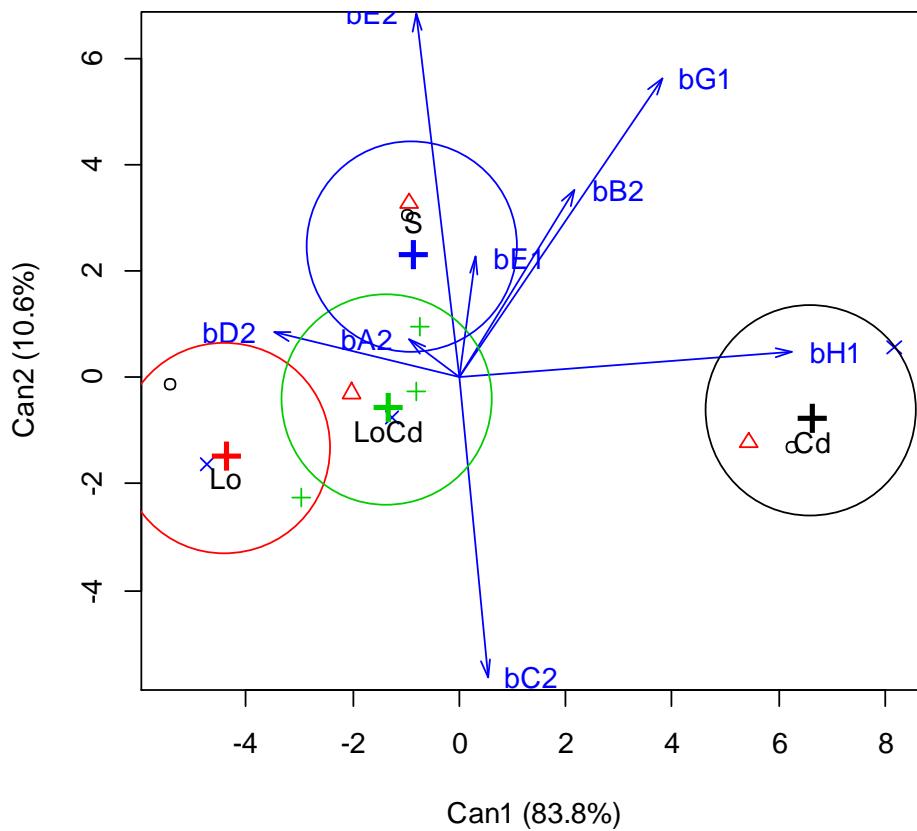


Figura 9. Representación en el espacio canónico de las pendientes de degradación de los hidratos de carbono presentes en las microplacas Biolog

```

Canonical Discriminant Analysis for Treat:

      CanRsq Eigenvalue Difference Percent Cumulative
1 0.96092    24.5879      21.489 83.8200      83.820
2 0.75600     3.0984      21.489 10.5623      94.382
3 0.62234     1.6479      21.489  5.6177      100.000

Class means:

      Can1      Can2      Can3
Cd    6.61826 -0.64737  0.37054
Lo   -4.37483 -1.33305  1.03342
LoCd -1.35696 -0.44247 -1.75165
S    -0.88647  2.42289  0.34769

std coefficients:
      Can1      Can2      Can3
bA2 -0.916010  0.925897 -0.8579826
bB2 -0.039939 -0.159409 -0.2615431
bC2 -1.701541  0.418856 -0.3038100
bD2 -2.865279 -0.075643  0.6897120
bE1 -0.012491  1.189957  0.4951521
bE2 -2.872368  1.525303 -0.2760122
bG1  2.116964  0.963719 -0.0010855
bH1  3.291343 -0.338012  0.2703136

```

Tabla 6. Resultados del análisis de las componentes principales para las pendientes de degradación de los hidratos de carbono presentes en las microplacas Biolog

Para los máximos de degradación de los hidratos de carbono. El primer eje del espacio multivariable canónico (FIGURA 10) representa la práctica totalidad de la dispersión de los datos (95.8%). Está fuertemente influenciado por los sustratos N-Acetyl-D-Glucosamine (E2), D-Xylose (B2) y D-Cellobiose (G1) tal y como evidencia la TABLA 7. Los diferentes tratamientos se encuentran medianamente dispersos y se comportan de manera independiente para la máxima capacidad de degradación de los diferentes hidratos de carbono. Se observa que el tratamiento suelo es el que mayores máximos de degradación presenta mientras que las lombrices actúan favoreciendo la capacidad degradativa de los hidratos de carbono cuando se encuentran en ausencia de cadmio pero en presencia de cadmio producen un efecto antagonístico que reduce notablemente la capacidad degradativa incluso más que lo observado en el tratamiento cadmio.

D-Mannitol (D2), α -Cyclodextrin (E1), N-Acetyl-D-Glucosamine (E2) y D-Cellobiose (G1) parecen aumentar su capacidad degradativa mientras α -D-Lactose (H1), β -Methyl-DGlucoside (A2), D-Xylose (B2) y i-Eryritol (C2) la reducen.

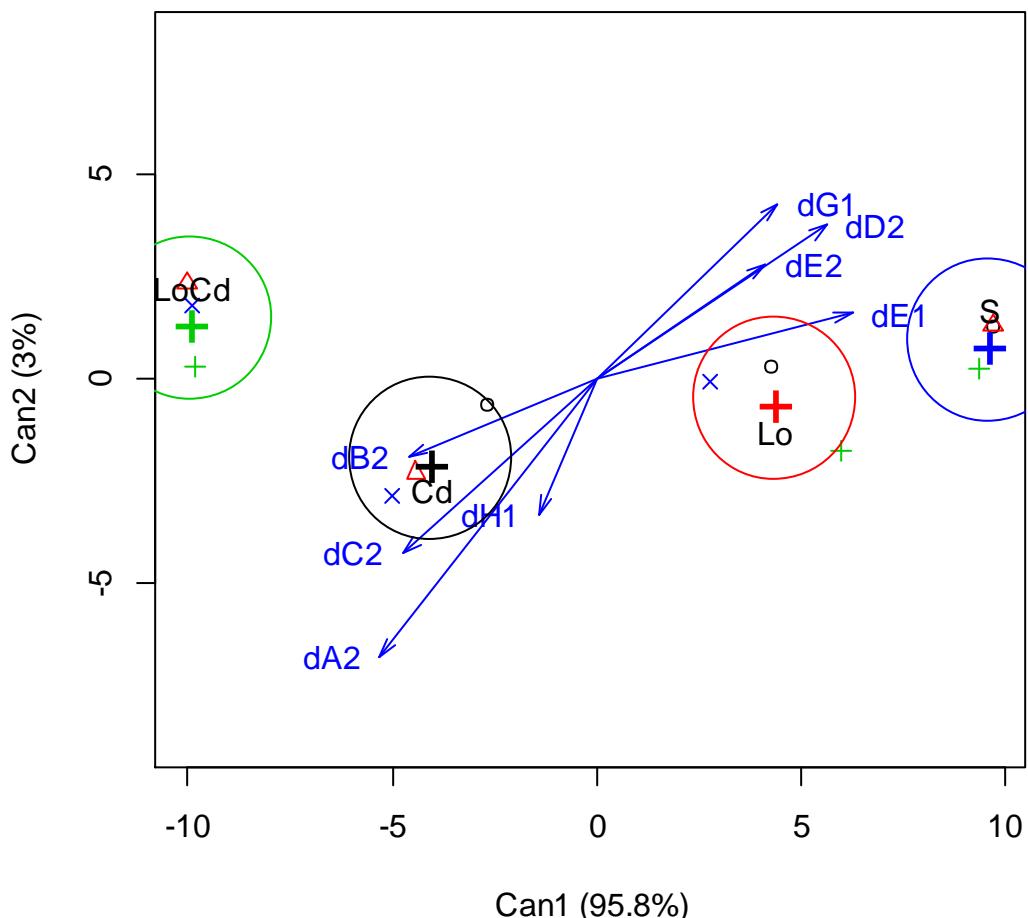


Figura 10. Representación en el espacio canónico de los máximos de degradación de los hidratos de carbono presentes en las microplacas Biolog

```

Canonical Discriminant Analysis for Treat:

      CanRsq Eigenvalue Difference Percent Cumulative
1 0.98832     84.6414      81.996 95.8176      95.818
2 0.72566      2.6451      81.996  2.9943      98.812
3 0.51208      1.0495      81.996  1.1881     100.000

Class means:

      Can1      Can2      Can3
Cd   -4.0357 -1.92851  0.649132
Lo    4.3539 -0.49761 -1.328801
LoCd -9.9166  1.48108 -0.096415
S     9.5983  0.94504  0.776084

std coefficients:

      Can1      Can2      Can3
dA2   2.6645 -3.21963  0.2862
dB2  -31.9610  9.81616 -3.9132
dC2   -3.4734 -3.60781  9.0316
dD2  -10.3576  1.24521  6.1015
dE1   16.0484 -0.53286 -1.5238
dE2  -69.8641 21.32591 -7.4554
dG1   42.3264 -19.87591  5.9795
dH1   12.4416 -6.70382 -1.9272

```

Tabla 7. Resultados del análisis de las componentes principales para los máximos de degradación de los hidratos de carbono presentes en las microplacas Biolog

El tiempo medio de degradación de los sustratos hidrocarbonados queda representado en un 97% en el espacio multifuncional (FIGURA 11). El primer eje es el que mayor representación y peso posee y más fuertemente influenciado está por la D-Cellobiose (G1), un factor de orden negativo.

Los diferentes tratamientos parecen diferenciarse bien entre sí. El tratamiento suelo tiene una distribución positiva en el eje 1 mientras que el tratamiento de lombrices con cadmio la tiene negativa lo que podría indicar una degradación más rápida en los tratamientos con presencia de lombrices y cadmio frente a los demás tratamientos en especial con el suelo sin alterar. El tratamiento con lombrices y cadmio parece estar más influenciado por una mayor velocidad de degradación de la D-Cellobiose (G1), α -Cyclodextrin (E1) y β -Methyl-DGlucoside (A2) mientras que el tratamiento cadmio tiene mayor actividad de degradación de la N-Acetyl-D-Glucosamine (E2) y D-Xylose (B2). Los datos estudiados se exponen en la TABLA 8.

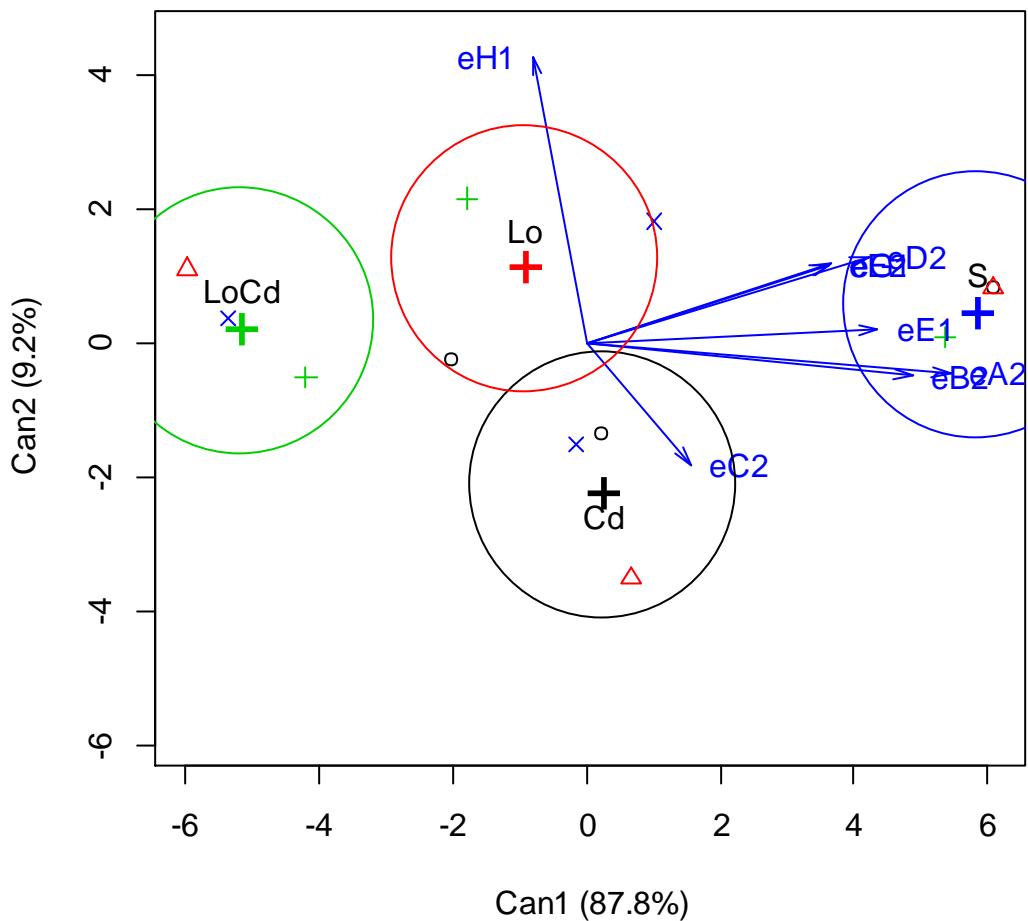


Figura 11. Representación en el espacio canónico de los tiempos medios de degradación de los hidratos de carbono presentes en las microplacas Biolog

```

Canonical Discriminant Analysis for Treat:
  CanRsq Eigenvalue Difference Percent Cumulative
 1 0.95849  23.09144      20.673 87.8087      87.809
 2 0.70745  2.41817      20.673  9.1955      97.004
 3 0.44066  0.78782      20.673  2.9958     100.000

  Class means:

      Can1      Can2      Can3
Cd  0.24941 -2.12078  0.32893
Lo -0.92227  1.23631  1.02404
LoCd -5.16075  0.31748 -0.79633
S   5.83361  0.56699 -0.55664

  std coefficients:
      Can1      Can2      Can3
eA2  6.7332  6.7769  4.7387
eB2  4.5309 -8.3095 -2.7855
eC2 -6.2309 -2.9315 -1.5893
eD2 -1.6391 -2.3865 -2.6464
eE1  2.7955  9.5903  4.9632
eE2  6.3929 -39.0364 -12.5852
eG1 -14.2777 31.8872  6.4497
eH1  1.7661  3.6719  1.8888

```

Tabla 8. Resultados del análisis de las componentes principales para los tiempos medios de degradación de los hidratos de carbono presentes en las microplacas Biolog

e. Índice de diversidad Shannon-Weaver

El índice de diversidad Shannon-Weaver (SW) se emplea para conocer la biodiversidad en comunidades biológicas. Es un valor tiene en consideración tanto el número de especies diferentes como el número de individuos que forman las poblaciones de las diferentes especies dando valores altos. Su fórmula tiene la siguiente estructura:

$$H = - \sum p_i (\ln p_i)$$

Donde p_i es el la frecuencia relativa del valor normalizado de OD para un determinado sustrato en un momento determinado. En este caso, se ha utilizado como descriptor de la diversidad metabólica de la comunidad; sustituyendo las especies “biológicas”, por las especies químicas (formas de carbono a degradar), y la densidad d individuos por la intensidad de la degradación. Así, índices mayores indicarían la capacidad de degradar muchos sustratos diferentes con mucha eficiencia, y un índice bajo, justo lo contrario.

Como se puede ver en el GRAFICO 1 los valores de diversidad SW son muy similares para todos los tratamientos para un estado donde la comunidad microbiana ya se encuentra desarrollada en las microplacas (96h)

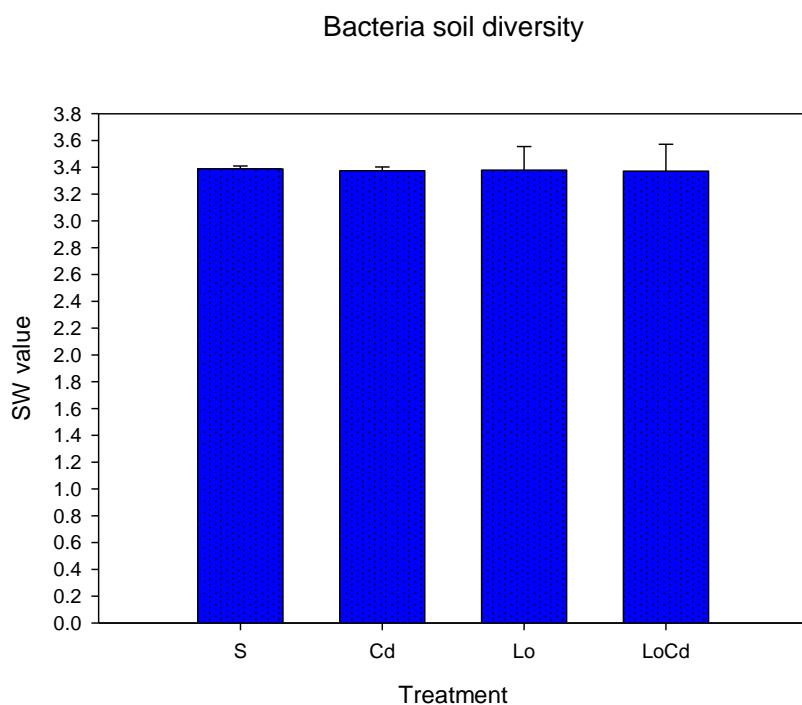


Gráfico 1. Valores de diversidad SW de la comunidad microbiológica del suelo en los diferentes tratamientos a las 96h desde la inoculación en las microplacas

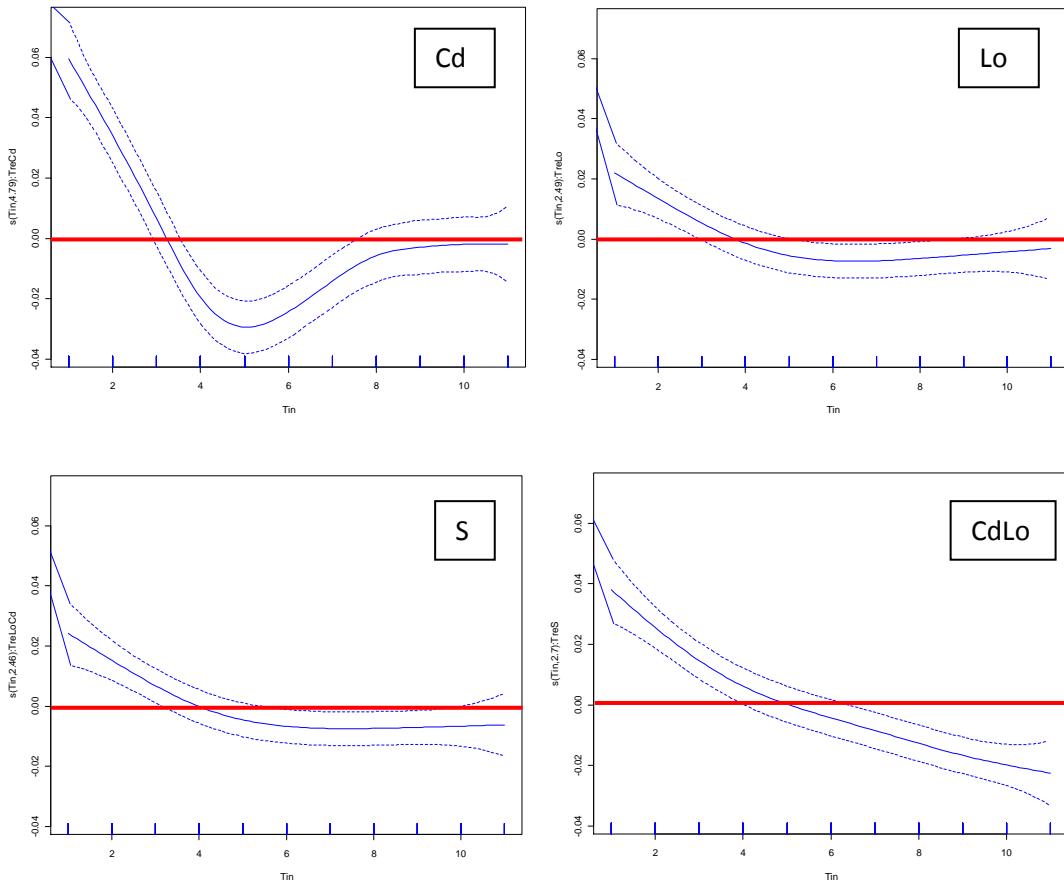


Gráfico 2. Evolución temporal de la diversidad SW para los diferentes tratamientos.

Se realizó un estudio de la evolución temporal de la diversidad metabólica durante el periodo de incubación, utilizando modelos GAM. El tiempo se ha sustituido por valores consecutivos del 1 al 11 (que sustituyen a 0, 14, 23, 47, 54, 72, 79, 97, 119, 127 y 143 horas respectivamente). La línea roja representa a una comunidad cuya diversidad metabólica fuese constante en el tiempo; o sea que degradase todos los sustratos con igual afinidad, velocidad y capacidad a lo largo del tiempo, y se usará por tanto como guía para interpretar el resultado. En la GRAFICO 2 se aprecia un descenso de la diversidad microbiológica en los primeros períodos de tiempo (hasta 54h) para luego estabilizarse, en los tratamientos Lo, S y Cd, o continuar descendiendo, tratamiento LoCd. Este descenso es más acusado en el caso de Cd. La caída de la diversidad metabólica es más acusada en el tratamiento Cd.

DISCUSIÓN

1. Análisis de suelos

La capacidad de las lombrices de tierra para acumular metales es máxima cuando la temperatura y la humedad maximizan su actividad (Karaca et al., 2010) y se reduce en suelos saturados o excesivamente secos. Así, de entrada, es muy probable que tanto la actividad de

A. caliginosa como su bioacumulación del Cd se hayan visto favorecidas por las condiciones experimentales.

El pH óptimo del suelo para *A. caliginosa* está comprendido entre 6-7 pero considerando que todos los individuos fueron recolectados a un pH superior se supone que valores superiores de pH próximos a la neutralidad no afectaron negativamente a su desarrollo.

Por otro lado, estos organismos suelen perder biomasa durante los experimentos si no se añade alimento adicional. En este caso, no se aportó materia orgánica al suelo pero su contenido original (4,78%) es considerado muy alto para un suelo agrario y no pareció limitar el crecimiento de los animales no expuestos al Cd.

Al haber sido tamizado a 2 mm y carecer de estructura, el suelo tendió a compactarse en cuanto comenzaron los riegos. Además, estuvo próximo a la saturación continuamente, lo que significa que sus poros, de reducido tamaño, permanecieron llenos de agua. Esto pudo tener un efecto negativo sobre la aireación de suelo. Las zonas más oscuras del suelo y un cierto olor desagradable, podrían indicar zonas anóxicas en el interior de las macetas, lo que pudo resultar perjudicial para las lombrices de tierra y un factor de influencia sobre la conformación de la comunidad microbiana si el oxígeno que obtuvieron a partir del agua fue insuficiente o si se formaron sustancias tóxicas (p. ej. H₂S) debido a las condiciones reductoras.

No se detectaron cambios de pH del suelo en los tratamientos Lo y LoCd. El suelo experimental era ligeramente básico cuando fue recogido y siguió siéndolo al finalizar el experimento, independientemente de la presencia o ausencia de lombrices de tierra.

Tampoco se aprecia una tendencia clara respecto al contenido en materia orgánica del suelo ya que, si bien los tratamientos Lo y LoCd mostraron unos valores menores que los tratamientos S y Cd, las diferencias son muy pequeñas (5,25 y 5,16% frente a 5,33 y 5,28%). La falta de diferencias se puede achacar a que el período de experimentación no fue suficientemente amplio para poder observar un cambio en el contenido de materia orgánica.

Podría esperarse que *A. caliginosa* causara una disminución del contenido en materia orgánica del suelo al alimentarse de ella, incorporando el C a su propia biomasa, pero esto no se ha corroborado. Aunque se ha descrito un aumento del C orgánico en las deposiciones y en las paredes de las galerías de esta especie respecto al resto del suelo (Zhang y Schrader, 1993), las lombrices de tierra favorecen tanto la mineralización como la humificación de la materia orgánica (Lavelle, 1988), al tiempo que incrementan la proporción de polisacáridos, que pueden quedar protegidos frente a la degradación en el interior de las heces (Scullion y Malik, 2000). La falta de resultados concluyentes impide apoyar ninguna de las experiencias realizadas por otros autores.

En cambio, la mayor capacidad de intercambio catiónico (C.I.C.) detectada (19,4 meq/100 g) correspondió al suelo del tratamiento Lo de la situación T2. Los resultados de la situación T1 y del tratamiento LoCd en T2 resultaron ser un poco inferiores al valor del tratamiento Lo (18,9 y 18,7 meq/100 g, respectivamente) pero mayores que los obtenidos en T0 y en los tratamientos S y Cd en T2. Por tanto, parece que las lombrices de tierra incrementaron ligeramente la C.I.C. del suelo, incluso aquellas que fueron expuestas al Cd, probablemente en parte debido a la

mayor proporción de arcilla y limo de sus deposiciones (Sharpley y Syers, 1976; Lavelle, 1988; Zhang y Schrader, 1993).

2. Lixiviados

El mayor volumen de lixiviados en proporción al agua de riego correspondió al tratamiento Lo en Día 2-16 y al tratamiento Cd en Día 17-31. El suelo del tratamiento S fue el que generó un menor volumen de lixiviados en Día 1-31. Por tanto, no puede afirmarse que las lombrices de tierra causaran un aumento del volumen de los lixiviados puesto que los volúmenes evacuados fueron similares para tratamientos con y sin presencia de lombrices. Sin embargo, algunos autores han indicado que estos organismos favorecen la infiltración y la conductividad hidráulica del suelo al mejorar su estructura, gracias a los agregados de nueva formación que constituyen sus deposiciones y a la construcción de galerías, que son macroporos que facilitan el flujo del agua hacia niveles edáficos más profundos.

Los lixiviados del tratamiento Lo tuvieron una concentración detectable de Cd en Día 17-31, igual que los del tratamiento S (0,032 y 0,059 mg/l, respectivamente) Estas concentraciones superaron a las de los lixiviados del tratamiento Cd, que mostraron una suave tendencia creciente, comenzando con valores próximos a 0,01 mg/l y terminando con los 0,020 mg/l del Día 31. En este periodo, el suelo del tratamiento Lo siguió siendo el que contó con una humedad volumétrica más alta (43,7%) pero el mayor porcentaje de lixiviados correspondió al tratamiento Cd (84,1% en Día 2-31).

Las concentraciones de Cd en los lixiviados del tratamiento LoCd se incrementaron rápidamente desde el primer día de riego con el metal hasta el décimo (de 0,039 mg/l a 167,733 mg/l), disminuyendo después hasta los 14,480 mg/l del decimoquinto día. Este comportamiento hace suponer una capacidad de solubilización del metal Cd en presencia de lombrices que, tras superar los límites de retención físicos de la matriz del suelo, termina por drenar el exceso. Sorprendentemente, la tendencia cambió a partir de ese punto, ya que entre los días décimo y decimoquinto de riego, parece que el suelo recuperó su capacidad de retención de Cd, de forma que el Día 31 el metal presente en el lixiviado tan sólo representó el 4,220% del que había sido añadido con el riego (95,780% de Cd retenido).

3. Distribución del cadmio en los diferentes sistemas

No parece que la absorción o la excreción del metal por parte de estos animales puedan explicar las intensas variaciones en la concentración de Cd en los lixiviados. Sin embargo, es posible que tuvieran un efecto indirecto en su reparto entre las fases sólida y acuosa del suelo, así como entre las distintas fracciones de la fase sólida, afectando a su movilidad. Entre los mecanismos propuestos para explicar esta influencia, se encuentran la especiación y el secuestro de los metales en los tejidos de estos organismos, la estimulación de los microorganismos del suelo, la disminución del pH y el aumento del C orgánico disuelto (COD) (Sizmur y Hodson, 2009). Además del pH, la capacidad de intercambio catiónico (C.I.C.) y la presencia de cationes competidores constituyen los principales factores que influyen en la adsorción de los metales, que es el fenómeno más importante que gobierna la distribución del Cd entre la fase sólida y la fase acuosa del suelo (Mc Laughlin y Singh, 1999).

La correlación entre la concentración total de Cd en el suelo y la del agua de los poros fue elevada ($R^2 = 0,80$) y también entre ésta y la de los extractos con CaCl_2 0,01 M (0,74), aunque la correlación entre la concentración total y la de los extractos fue menor (0,34). Hobbelen *et al.* (2006) encontraron que la concentración de Cd en el agua de los poros estaba correlacionada con la total en el suelo. La mayor concentración total que encontraron fue de 24,4 mg/kg, con una concentración de 3,39 $\mu\text{g/l}$ en el agua de los poros (0,14 %) y de 0,085 mg/kg en el extracto con CaCl_2 0,01 M (3,48 %). En contraste, en este experimento el máximo valor detectado en el suelo fue de 442,96 $\mu\text{g/g}$ (mg/kg), con una concentración en el agua de los poros de 2,411 mg/l (5,44 %) y de 2,752 $\mu\text{g/g}$ en el extracto con CaCl_2 0,01 M (6,21 %). Por tanto, las proporciones entre el Cd total, disuelto e intercambiable del suelo no se mantienen en ambos conjuntos de resultados.

En la mayoría de suelos, más del 99% del Cd se encuentra asociado a la fase sólida, mientras que su presencia en la disolución del suelo es <1% (McLaughlin y Singh, 1999). Aunque solamente el 0,015% del metal total del suelo del tratamiento Cd correspondió al presente en la disolución del suelo, este valor ascendió al 0,057% en el tratamiento LoCd. Al parecer, el Cd disuelto en el agua que percoló a través del suelo, pasando a formar parte de los lixiviados, tuvo más importancia que el que permaneció en la disolución del suelo. Las deposiciones y las galerías producidas por *A. caliginosa* pudieron mejorar la conductividad hidráulica, es decir, la velocidad del flujo hídrico a través del perfil edáfico, reduciendo el tiempo de contacto entre el Cd y las partículas sólidas. Además, la menor porosidad de las paredes de las galerías (Görres *et al.*, 2001; Jégou *et al.*, 2001) pudo dificultar el movimiento del agua y el metal disuelto entre la drilosfera y el resto del suelo.

Las deposiciones de *A. caliginosa* estaban enriquecidas en Cd. En el tratamiento LoCd, el valor promedio del suelo de las tres macetas de donde se tomaron las muestras fue de 288,94 $\mu\text{g Cd/g}$, mientras que las heces contenían 337,01 $\mu\text{g/g}$, es decir, 1,17 veces o un 16,6% más que el suelo circundante. Udovic *et al.* (2007) encontraron mayores concentraciones de Cd, Pb, Zn y Ca en las deposiciones de *E. fetida* y *Octolasion tyrtaeum* (endógea) que en el suelo. En cambio, Morgan y Morgan (1992) observaron que la concentración de Cd, Pb, Zn y Cu en las heces de distintas especies (entre ellas, *A. caliginosa*) fue similar a la del suelo, sin que hubiera diferencias interespecíficas.

4. Seguimiento de las lombrices de tierra

El peso húmedo promedio de las lombrices de tierra cuando fueron sembradas en las macetas fue de 328 mg en la bandeja Lo (T1), de 275 mg en la Lo y de 318 mg en la LoCd. Booth *et al.* (2005) indicaron que los juveniles (3 meses de edad) de *A. caliginosa* tienen un peso comprendido entre 200-300 mg y que el de los adultos es de 500-600 mg. Además, en un estudio realizado por Francis y Fraser (1998), el peso medio de los individuos adultos de esta especie fue de 580 mg. Puesto que los individuos de esta especie salen de sus capullos a principios del verano y los ejemplares se recolectaron a mediados del mes de Junio, es razonable pensar que en la población de la que formaban parte había una gran proporción de juveniles.

Las lombrices de tierra que actuaron como controles crecieron un 34,97% en el mes que duró el experimento, mientras que el crecimiento de los organismos del tratamiento Cd fue tan sólo del 8,59%. Por lo tanto, la exposición al Cd produjo una inhibición del crecimiento del 75,43% en *A. caliginosa* en Día 1-31, mientras que su peso se redujo un 5,22% en Día 17-31, periodo en el que se localizaron los riegos con el metal. Los cambios que se producen en el crecimiento son un reflejo del consumo de las reservas energéticas que el organismo expuesto tiene que dedicar a la metabolización, detoxificación, secuestro y excreción de los contaminantes (Zaltauskait. y Sodien., 2010). Si la pérdida de peso en las lombrices de tierra expuestas a un tóxico es significativa, debe interpretarse como una indicación de efectos subletales (Spurgeon *et al.*, 2003; van Gestel y Weeks, 2004). Capowiez *et al.* (2010) observaron que la exposición de *L. terrestris* a distintos pesticidas causó una pérdida de peso, aunque nunca superior al 20%.

La concentración promedio de Cd en el suelo del tratamiento LoCd fue de 310,93 µg/g suelo seco el Día 31 del experimento, mientras que la concentración máxima detectada fue de 442,96 µg/g. Aunque *A. caliginosa* es una especie especialmente sensible a los metales pesados (Spurgeon y Hopkin, 1996a), Khalil *et al.* (1996a) determinaron una LC₅₀ para esta especie de 540 mg/kg (µg/g), por lo que no parece que las concentraciones alcanzadas en el suelo fueran lo suficientemente elevadas como para causar su muerte, al menos a corto plazo. Resulta llamativo que, con una concentración total media de Cd en el suelo de 310,93 µg/g, la concentración media en *A. caliginosa* fuera de 116,99 µg/g, cuando Dai *et al.* (2004) indicaron una concentración máxima detectada en esta misma especie de 102,9 mg/kg con una concentración máxima en el suelo de tan sólo 5,2 mg/kg. En este estudio, utilizaron un suelo que había sido contaminado por una industria metalúrgica durante 70 años, del cual fueron recolectadas las lombrices de tierra aunque el motivo pueda deberse a que la exposición fue mucho más prolongada al entrar en contacto con el Cd desde su nacimiento y realizar el muestreo una vez los individuos alcanzaron su fase adulta.

El porcentaje de Cd acumulado por las lombrices de tierra respecto al metal añadido fue tan sólo del 0,003% en promedio, siendo la máxima cantidad encontrada en los tres organismos de cada maceta igual a 0,0505 mg y la mínima de 0,0265 mg. Aunque en este estudio, la importancia del Cd bioacumulado fue muy pequeña en comparación con el aportado y con el retenido en el suelo, otras especies pueden tener una mayor capacidad de reducir la concentración de este metal en el suelo. En este sentido, *M. posthuma* fue capaz de retirar el 50% del Cd presente en un suelo contaminado con 5 mg/kg, lo que protegió a las bacterias del suelo frente a sus efectos tóxicos, siendo un ejemplo de biorremediación directa (Liang *et al.*, 2009).

En base a los resultados de este estudio, parece que la acumulación del Cd en *A. caliginosa* pudo explicarse mejor por su concentración total en el suelo que por la presente en la disolución del suelo, aunque la correlación mejora un poco respecto a esta última si se considera el metal hidrosoluble y el intercambiable. Resulta sorprendente que, a pesar de que el diseño de este experimento hacía intuir que la absorción del Cd disuelto iba a ser importante, los resultados indican que es posible que la ingestión del metal unido a las partículas sólidas fuera más relevante. Hobbelin *et al.* (2006) determinaron que las concentraciones de Cd en *A. caliginosa* podían explicarse mejor por el metal disuelto en el agua de los poros que por su concentración total en el suelo pero, en el caso del Cd y *L.*

rubellus y del Cu para ambas especies, la correlación fue mayor al utilizar la concentración total.

En general, la mortalidad es menos sensible que los parámetros subletales, como las alteraciones en el crecimiento y la reproducción, que son más adecuados para evaluar los efectos de los tóxicos sobre las poblaciones y las comunidades.

5. Análisis fisiológico de la comunidad bacteriana

M. Niklin'ska et al (2005) obtuvo diferencias significativas en la actividad metabólica general medida en microplacas BIOLOG de suelos contaminados por metales pesados en relación al valor de pH (medido en KCl) y la concentración de metales pesados en la solución del suelo. También encontró significancia al relacionar la relación C/N con la concentración total de metales pesados en el suelo. De sus estudios se puede deducir que los cambios físico-químicos producidos por las lombrices de tierra sobre el suelo han podido alterar ligeramente el pH del suelo y la relación C/N y por ende el comportamiento degradativo y estructural de la comunidad biológica.

Los metales pesados en suelo por encima de los niveles ambientales pueden producir un efecto adverso en la población bacteriana como una pérdida de la población, cambios en la estructura poblacional, composición y actividad fisiológica (Knight, 1997; Kozdroj, 2000; Anne, 2001; Claudia, 2003)². Así, los conteos celulares de los suelos sugieren que el Cd afectó de manera negativa a la proliferación de microorganismos en un suelo sin lombrices mientras que en presencia de estas, el efecto del Cd sobre la comunidad bacteriana quedó mitigado.

Basándonos en los resultados de los contajes (ver FIGURA 7) el número de células depositadas en los placas Biolog fueron diferentes para los diferentes tratamientos. Mientras que el tratamiento Cd alcanzó solo el 10% del número total de bacterias inoculadas, el tratamiento S acumuló el 41% del total de las células viables se inocularon en los cuatro tratamientos. Una parte de la experiencia de Fritze, H. et al. (2000) parece coincidir con el estudio realizado, ya que el número total de células viables inoculadas en el tratamiento Cd es cuatro veces inferior al tratamiento S mientras que sus resultados sobre la actividad respiratoria se contradicen al relacionar un descenso de la actividad respiratoria con la presencia de Cd.

Al contrario con lo esperado, los valores máximos de degradación modelizados para cada sustrato y comparados entre los diferentes tratamientos fueron muy superiores en el tratamiento Cd frente al resto de tratamientos -del rango de 1.3 a 2.2 veces superior-. No obstante, según Akmal, M. (2005), el mayor ratio de descenso de actividad se produjo de los 30 a los 60 días de exposición, por lo que el ensayo pudo no haber manifestado la totalidad de la respuesta tóxica sobre la comunidad bacteriana en ese momento. Esta hipótesis se apoya en el argumento de que las lombrices favorecen la solubilización del Cd y por tanto su efecto tóxico sobre la comunidad microbiana del suelo.

Según Fritze, H et al. (2000) las diferentes formas de Cd no afectaron a la actividad respiratoria de la comunidad microbiana en suelos boscosos abonados con cenizas y humus. Además, el humus control necesitó 1570mg Cd/Kg para reducir la actividad respiratoria a la mitad,

² Tomado de Akmal, M (2005)

cantidad muy superior al total de Cd aportado en forma de riego (540mg CaCl₂ /Kg suelo seco). En el ensayo realizado, el Cd parece potenciar la actividad degradativa de los sustratos. Es importante considerar que los valores de Cd aplicados por Fritze fueron casi tres veces superiores a los aplicados y el tiempo de exposición de tóxico mayor de manera que la comunidad microbiana pudo no estar sometida a una exposición lo suficientemente larga o elevada como para reducir su actividad degradativa. El tratamiento LoCd, con mayor densidad inicial de inóculo, degradó los sustratos con menor eficiencia, mientras que el tratamiento Lo fue superior al control. Las lombrices incluyen en las paredes de las galerías, el contenido intestinal y las deposiciones una gran disponibilidad de nutrientes y una elevada actividad microbiana (Liu *et al.*, 2011). Pero existen evidencias de que la comunidad asociada a la drilosfera tiene un alto grado de especialización en la degradación de compuestos y es muy sensible a la toxicidad por Cd en los niveles usados. Ello podría explicar la menor actividad degradativa de los sustratos por parte del tratamiento Cd en comparación con el tratamiento Lo.

Lasse D., *et al.* (2001) obtuvo un comportamiento similar de la evolución temporal de la diversidad –índice SW- en las capacidades degradativas de la comunidad microbiana del suelo en presencia de 25µg Hg(II)/g suelo, mostrando estas un descenso inicial y una recuperación posterior (GRÁFICO 2). Mientras que Jiang (2010), que aplicó 30mg Cd/Kg suelo, no obtuvo ninguna diferencia significativa en el valor de diversidad SW entre los diferentes tratamientos en presencia de Cd al compararlo con el control ni ninguna reducción en el número de sustratos utilizados. Se puede concluir que la comunidad microbiana es muy sensible a los cambios de su entorno modificando su estructura pero también resulta altamente resistente a alteraciones ya que tiende a mantener los valores de diversidad metabólica, aunque esto sea a costa de modificar sus capacidades de degradar sustratos. Así, la perdida de eficiencia en degradar algunos sustratos, se vería compensada por el incremento de la misma para otros sustratos, ante una perturbación como la presencia de lombrices y/o cadmio.

El Cd es de los metales pesados más solubles (Soon, 1993); de tal manera que su movilidad y su toxicidad para los microorganismos del suelo y los procesos microbianos es mayor (Smith, 1996). Akmal, M (2005) concluyó que la presencia de 100mg Cd/kg suelo reducía alrededor del 50% la actividad enzimática ureasa, fosfatasa y deshidrogenasa con respecto al control en 30 días de exposición al tóxico y Fritze, H *et al.* (2000) necesitó 1570mg Cd/Kg para reducir la actividad respiratoria en un 50%. Considerando que la actividad enzimática está asociada a los procesos degradativos y a la actividad celular se puede concluir que el Cd tiende a reducir la capacidad degradativa de ciertos sustratos presentes en el suelo.

La presencia de lombrices causa un efecto bioacumulador frente a altas concentraciones de Cd (Demuynck, D. *et al.*, 2007). Además, las lombrices de tierra pueden descender la movilidad y biodisponibilidad de los metales pesados en el suelo (Sizmur y Hodson 2009) potenciando la degradación de determinados compuestos al pasar por el tracto digestivo de la lombriz y variar su forma química (Ruiz *et al.*, 2009). Estas alteraciones en la estructura química de los metales pesados presentes en el suelo y el resto de nutrientes modifican la aptitud de determinadas poblaciones bacterianas por la degradación de los compuestos presentes en los pocillos del Biolog®.

El artículo de Jiang *et al.* (2010) concluyó que la presencia de 20mg Cd/Kg suelo reducía los valores máximos de AWCD en un 8.18% comparado con el control. La respuesta degradativa global de todos los sustratos en los tratamientos con presencia de Cd definen a la comunidad microbiana presente en ellos como poblaciones mucho más adaptadas a la degradación de las fuentes de carbono presentes en las microplacas Biolog®. A pesar de que los resultados del conteo celular dan valores poblacionales más bajos, los tratamientos con presencia de Cd mantienen un potencial degradativo mayor. El tratamiento Cd, pese a ser el que menor cantidad de células presentaba en el inóculo, reaccionó en términos generales mucho mejor a la degradación de los sustratos que el resto de tratamientos, con una diferencia significativamente mayor al compararlo con los tratamientos S y LoCd. Este comportamiento puede explicarse por el desarrollo de bacterias tolerantes a los metales pesados y con gran capacidad de degradación. Algunos artículos pueden explicar éste suceso debido al desarrollo de comunidades cadmio-tolerantes, suceso que daría sentido a la menor cantidad de bacterias inoculadas en el tratamiento Cd y los índices de biodiversidad similares. Según Fritze, H *et al.* (2000) los actinomicetos se benefician de la adición de cenizas o Cd. Díaz-Ravina *et al.* (1994) añadió Cd (en forma CdSO₄) en un suelo agrícola durante 5 a 8 meses. Sus resultados señalaron que la incorporación de 896mg Cd/kg de suelos seco propiciaron el desarrollo de una comunidad de bacterias Cd-tolerantes mientras que niveles inferiores (448 mg Cd kg suelo) de Cd revelaron menores diferencias comparadas con el suelo control. Según apunta Fritze, H *et al.* (2000) y Díaz-Ravina *et al.* (1994;1996) la comunidad microbiana en ausencia de lombrices asimila los sustratos con mucha mayor eficacia mientras que la presencia de lombrices, que favorece la solubilización del Cd en el agua de los poros y dota al suelo de polisacáridos, juega un papel sinérgico sobre la comunidad microbiana reduciendo notablemente su actividad degradativa general y, como veremos en el siguiente punto, cambiando la afinidad que presenta el ecosistema en la degradación de determinados sustratos.

En el ensayo realizado al comparar (ver TABLA 5) el tratamiento Cd frente al S se produjo un incremento de los sustratos *β-Methyl-Dglucoside*, *D-Galactonic acid*, *γ-Lactone*, *D-Mannitol*, *L-Serine*, *N-Acetyl-D-Glucosamine*, *Glycyl-L-Glutamic Acid*, *Glucose-1-Phosphate*, *α-D-Lactose*, *D-Malic Acid* y *Putrescine*. Al comparar el tratamiento LoCd frente al S fueron diferentes sustratos los que se incrementaron, tales como *β-Methyl-Dglucoside*, *D-Galactonic acid* *γ-Lactone*, *i-Erytritol*, *L-Phenylalanine*, *4-Hydroxy Benzoic Acid*, *α-Cyclodextrin*, *Glycogen*, *D-Glucosaminic Acid*, *Itaconic Acid*, *Glycyl-L-Glutamic Acid*, *α-Ketobutyric Acid*, *α-D-Lactose* y *Putrescine*. Akmal, M (2005) obtuvo una mayor utilización de los sustratos *L-asparagine*, *L-phenylalanine*, *pyruvic acid methyl ester acid* y *L-threonine* mientras *N-acetyl-D-glucosamine*, *D-galacturonic acid*, *D-xylose* y *α-cyclodextrin* fueron menos degradados por una comunidad bacteriana en presencia de 100mg Cd/kg suelo. Jiang (2010) obtuvo que 30mg Cd/Kg suelo producía un incremento significativo de *L-serine*, *glycogen* and *D-cellulose* mientras *L-threonine*, *D-galacturonic acid*, *L-asparagine*, *itaconic acid*, *D-glucosaminic acid*, *putrescine* sufrían un descenso significativo en su degradación. Yao et al. (2003) reportó un aumento de la utilización de *D-fructose*, *D-glucose* y *D-melobiose* y simultáneamente un descenso de la *D-lactose*, *L-serine* and *glycyl-L-glutamic acid*. Galard y Aaron (1991) y Lori Kae Schwa. (2010) también hablaron sobre la afinidad degradativa de determinados sustratos (ver TABLA 9).

Existe controversia en si los sustratos presentes en la microplaca Biolog®, fácilmente identificables en el suelo y de importancia ecológica para el ecosistema son realmente representativos de las poblaciones microbianas claves presente en la comunidad del suelos o si

por el contrario deberían emplearse sustratos con un mayor poder discriminatorio (Garland, 1999). De esta forma se puede concluir que la interacción entre metales pesados y la utilización de sustratos puede diferir enormemente entre los diferentes sustratos y las condiciones ambientales a las que la comunidad microbiana está sometida.

La transformación de la celulosa por vía enzimática implica la acción de un sistema multienzimático, el complejo celulasas, constituido básicamente por tres enzimas: Endoglucanasa, que ataca al azar enlaces β -1,4-glicosídicos de la cadena de celulosa; exoglucanasa, que actúa sobre el extremo no reductor de la cadena dando lugar a unidades de celobiosa, y β -glucosidasa, que hidroliza específicamente celobiosa para dar lugar a glucosa. Una vez degradada las zonas amorfas de la celulosa, tiene lugar la tercera etapa de la hidrólisis, en donde la región cristalina comienza a ser hidrolizada, como resultado de la acción sinergística de la endoglucanasa y la exoglucanasa. Finalmente, una etapa que limita la degradación de la celulosa es la hidrólisis de la celobiosa a glucosa mediante la acción de la β -1,4-glucosidasa Cb, porque las glucanasas son inhibidas por la celobiosa. (Ovando-Chacón y Waliszewski, 2005). El descenso en la actividad degradativa de **D-Cellobiose** en el PCA puede deberse a una reducción o alteración estructural de β -glucosidasa, enzima que regula la hidrólisis de *cellobiose*. Además, los metales pesados pueden afectar a la actividad enzimática directamente uniéndose con el sustrato o con la propia enzima (Moreno et al., 2003; Stuczynski et al., 2003) o indirectamente afectando a los microorganismos envueltos en la actividad (Kandeler et al., 2000). La presencia de cadmio también puede afectar a la síntesis de la enzima *galactosidase*. Esta enzima también afecta a la hidrólisis de la celobiosa y la lactosa.

Las enzimas celulasas son producidas por una variedad de bacterias capaces de degradar parcial o totalmente la celulosa en celobiosa y glucosa (Ovando-Chacon y Waliszewski, 2005). Tal y como expusieron Lazzaro. A et al (2006) y contrariamente a lo que indica Jiang (2010) la actividad degradativa de la celobiosa está supeditada a la presencia de cadmio aunque la presencia de lombrices parece favorecer su degradación por encima del efecto inhibidor del cadmio.

La presencia de cadmio disminuye la capacidad de degradar de la **D-Xylose**, comportamiento que puede relacionarse a alteraciones en la estructura poblacional microbiana capaces de degradar este compuesto. Los rhizobios de crecimiento rápido utilizan una mayor variedad de fuentes carbonadas, siendo la sacarosa y el manitol los sustratos de preferencia. El glicerol y las pentosas (L-arabinosa, xilosa, ribosa) son preferidas por los rhizobios de crecimiento lento (Graham, 1975). La mayoría de las bacterias acidolácticas obtienen energía sólo del metabolismo de los carbohidratos y su distribución está restringida a ambientes con azúcares (Frioni, L. 1999). En los suelos neutros o alcalinos, como los estudiados, predominan *Bacillus*, *Sporocytophaga*, *Clostridium* y otras bacterias, y en los ácidos, los hongos filamentosos (Schlegel H.G, 1993), todos capaces de producir exoenzimas que degradan la xilosa.

	Sustrato\Autores	Akmal 2005	Jiang 2010	Yao 2003	Galard y Aaron 1991	Lori Kae Schwa. 2010
A1	Water					
A2	β -Methyl-DGlucoside				-	+
A3	D-Galactonic acid γ -Lactone				-	+
A4	L-Arginine				-	
B1	Pyruvic Acid Methyl Ester	+			-	
B2	D-Xylose	-			+	+
B3	D-Galacturonic Acid	-	-		-	+
B4	L-Asparagine	+	-		-	
C1	Tween 40					+
C2	i-Erytritol				+	+
C3	2-Hydroxy Benzoic Acid				-	
C4	L-Phenylalanine	+			-	
D1	Tween 80				-	+
D2	D-Mannitol				+	+
D3	4-Hydroxy Benzoic Acid				-	
D4	L-Serine			-	-	
E1	α -Cyclodextrin	-			+	+
E2	N-Acetyl-D-Glucosamine	-			+	+
E3	γ -Hydroxybutyric Acid				+	+
E4	L-Threonine	+	-		-	
F1	Glycogen		+		-	
F2	D-Glucosaminic Acid		-		-	+
F3	Itaconic Acid				-	+
F4	Glycyl-L-Glutamic Acid				-	
G1	D-Cellobiose		+	+	+	+
G2	Glucose-1-Phosphate				-	
G3	α -Ketobutyric Acid				-	+
G4	Phenylethyl-amine				-	+
H1	α -D-Lactose			-	+	+
H2	D,L- α -Glycerol Phosphate				-	
H3	D-Malic Acid				-	+
H4	Putrescine		-			

Tabla 9. Comparación bibliográfica en el comportamiento de la actividad degradativa de la comunidad bacteriana. Los valores positivos (+) y negativos (-) reflejan un aumento y un descenso de la capacidad degradativa de los sustratos en presencia de algún contaminante.

La pared de las bacterias gramm positivas consta principalmente de un solo tipo de molécula: el peptidoglicano, formado por cadenas de dos aminoazúcares: **N-acetil glucosamina** y ácido N-acetil murámico, que no se encuentran en eucariotas, dotando a la célula de gran rigidez. La quitina, formada por largas cadenas de glucosamina, constituye un elemento importante del

exoesqueleto de artrópodos, paredes de hongos y de algunas algas y huevos de nematodos. Numerosas bacterias, hongos y actinomicetos son los responsables de su degradación a glucosa y amonio. La presencia de altas concentraciones de Cd en el suelo parece resultar más sensible para los hongos y actinomicetos responsables de degradación de la N-acetil glucosamina (Akmal, M. 2005). Los actinomicetos dominan en suelos agrícolas, las bacterias en los inundados y los hongos en clima templado y ligera acidez. (Frioni, L. 1999). En el escenario experimental simulado donde existe un flujo de agua continuo y contaminado por una fuente puntual, la mayor parte del proceso degradativo recae sobre los microorganismos ya que son los componentes favorecidos por el medio y los menos desfavorecidos por la presencia de Cd. En estas condiciones resultan un elemento clave en la degradación de la N-acetil glucosamina y ácido N-acetil murámico y por tanto de una fuente de alimento para el resto de la comunidad microbiológica (glucosa) y vegetal (amonio).

El **ácido galactourónico** responde a la degradación de la pectina por las enzimas pectinesterasa y galacturonasa capaces de hidrolizar los enlaces éster, liberando metano y ácido péctico, éste es degradado por una poligalacturonidasa que hidroliza los enlaces glucosídicos 1-4 produciendo ácido galactourónico. El ácido galactourónico es convertido a pentosa por decarboxilación produciendo fofo-6-fructosa que puede ser convertida en glucosa o ser degradada en la vía de la glucolisis (Eglantina, M.S., 1999). La presencia de las lombrices favorece una mayor degradación del ácido galactourónico al promover bacterias de los géneros *Erwinia*, *Bacillus* y *Pseudomonas* intervienen en la hidrólisis de la hemicelulosa dando finalmente azúcares y ácido galactourónico mediante la enzima citasa. La presencia de cadmio parece desfavorecer a comunidades microbianas que compiten directamente con los géneros anteriormente citados tal y como expuso Akmal, M. (2005)

El **ácido hidroxibenzoíco** sería uno de los principales factores limitantes para el desarrollo de bacterias de la familia *Azotobacteriaceae* en suelos agrícolas (Frioni, L. 1999). La presencia de lombrices y cadmio favorece la degradación de éste compuesto por lo que cabe esperar una proliferación de individuos de ésta familia.

CONCLUSIONES

Si se diera una situación similar a la descrita (un vertido de aguas contaminadas con cadmio a suelos), las consecuencias para el medio ambiente subterráneo serían notablemente diferentes dependiendo de si el suelo albergara previamente lombrices de tierra o no. En concreto, en ausencia de lombrices, el suelo actuaría en mayor medida como un filtro, reteniendo gran parte del metal presente en las aguas del vertido. En cambio, con lombrices, la disolución de Cd atravesaría el suelo y alcanzaría las capas más profundas o llegaría a las aguas subterráneas, si fuera el caso, con una carga relativamente poco mermada de este metal. Como resultado, la concentración total de Cd en el suelo se reduciría, aunque aumentaría su concentración en la disolución del suelo, por lo que también lo haría la posibilidad de que fuera absorbido por las raíces de las plantas o por otros organismos, como las bacterias o los hongos. Otro de los riesgos que conlleva esta mayor movilidad del Cd es su transferencia potencial a los niveles más profundos del suelo y la posible contaminación de las aguas subterráneas, así como de los ecosistemas de agua dulce conectados con ellas. No obstante, la capacidad del suelo para actuar como un filtro natural sigue siendo muy elevada

incluso en presencia de las lombrices de tierra, por lo que la mayor parte del metal aportado quedará retenido en su fase sólida, por lo menos a corto plazo.

La presencia de lombrices, por tanto, resulta en un efecto protector para otros organismos del suelo pero nocivo para las aguas subterráneas y los flujos de agua superficial más próximos así como la ecología que mantiene.

El riego con Cd provocó que la concentración de este metal pesado en las lombrices de tierra del tratamiento LoCd se incrementara en un 14803,2% respecto a los controles (tratamiento Lo). Dicho de otra manera, la exposición al Cd causó que su concentración en los organismos se multiplicara por 149. Dado que las lombrices de tierra son una presa importante para otros animales, como las aves o algunos mamíferos como los topos, la tolerancia de estos invertebrados ante la contaminación por metales pesados y la facilidad con la que absorben y acumulan el Cd en sus tejidos implicaría el riesgo de que se produzca un envenenamiento secundario que afecte a niveles superiores de la cadena trófica.

La posibilidad de que la actividad de las lombrices de tierra aumente la biodisponibilidad de los metales en el suelo es de gran relevancia, sobre todo cuando los métodos de remediación usados, como el lavado o la fitoextracción eliminan sólo una parte de los metales (Udovic y Lestan, 2007).

Los suelos contaminados por metales pueden mejorarse no solo eliminando los metales del suelo sino también reduciendo la concentración de metales pesados en la solución del suelo (Leonard, *et al.* 2000). Como son relativamente resistentes a los metales pesados, la lombrices podrían utilizarse como bioacumuladoras de metales y después ser retiradas del suelo mediante expelentes, lo que permitiría incluso recuperar los metales (Edwards y Lanno, 2004; Sinha *et al.*, 2008)

La aplicación de los resultados de este estudio resulta muy interesante desde un punto de vista preventivo. Por ejemplo, es destacable la habilidad de *A. caliginosa* para evitar que el suelo llegue a alcanzar el nivel de contaminación por Cd (expresado como su concentración total) que tendría en su ausencia. Asimismo, su influencia debería tenerse en cuenta a la hora de estimar el impacto de ciertas actividades potencialmente contaminantes del suelo, como son la fundición de metales o la aplicación directa de fertilizantes fosfatados.

El RD 9/2005 trata los valores de LC50 y EC50 de forma similar a los niveles genéricos de referencia (NGR) y, del mismo modo que dispone que un suelo se considerará contaminado respecto a la protección de la salud humana si la concentración de un tóxico es 100 o más veces superior al NGR, el suelo estará contaminado en relación a la protección de los ecosistemas si la concentración de ese tóxico supera en 100 veces o más la LC50 o la EC50 para determinados organismos terrestres o acuáticos. Así, puesto que la concentración letal media para *A. caliginosa* y el Cd es de aproximadamente 540 mg/kg, la concentración necesaria para que el suelo se declarara contaminado tendría que ser de 54000 mg Cd/kg, que es un valor desorbitado. En este caso, si se considerase *A. caliginosa* como organismos de referencia para el cálculo de límites para suelos contaminados, sin tener en cuenta su elevada tolerancia al Cd, tendríamos seguramente importantes impactos sobre otros miembros de la biocenosis edáfica. Este tipo de estudios, por tanto, resaltan la necesidad de seguir mejorando la legislación y las herramientas usadas en la protección ambiental.

Otro resultado interesante de este estudio, ha sido la respuesta de la comunidad microbiana. Las comunidades mantuvieron los valores de diversidad metabólica, al aplicar una perturbación como la presencia de lombrices y/o cadmio.

Los suelos con presencia de metales pesados suponen un obstáculo para el desarrollo de un número elevado de células bacterianas, según demostró el conteo celular. Sin embargo se propició el desarrollo de bacterias tolerantes a los metales pesados y con gran capacidad de degradación tal y como apuntaron Fritze, H *et al.* (2000) y Díaz-Ravina *et al.* (1994; 1996). Estos autores señalan que en ausencia de lombrices la comunidad presenta mayores eficiencias de degradación, mientras que la presencia de lombrices, que favorece la solubilización del Cd en el agua de los poros y dota al suelo de polisacáridos, juega un papel sinérgico sobre la comunidad microbiana reduciendo notablemente su actividad degradativa general situándola al mismo nivel que el suelo control.

La presencia de lombrices, que favorece la solubilización del Cd en el agua de los poros y dota al suelo de polisacáridos, juega un papel sinérgico sobre la comunidad microbiana reduciendo notablemente su actividad degradativa general y, como veremos en el siguiente punto, cambiando la afinidad que presenta el ecosistema en la degradación de determinados sustratos. Parece existir un antagonismo entre la capacidad degradativa de la comunidad microbiológica en presencia de Cd y la presencia de lombrices.

La tolerancia a los metales que desarrollan ciertos microorganismos, tienden a remplazar a los sensibles. De ésta manera se producen cambios en la composición de la comunidad microbiana hacia una mayor tolerancia de metales pesados (A. R. Almas *et al.*, 2004). Sin embargo, un descenso en la diversidad microbiana puede reducir la resiliencia de las comunidades del suelo volviéndolas más sensibles a futuras alteraciones naturales o antropogénicas (Degens *et al.*, 2001).

Existe una amplia controversia sobre la influencia de metales pesados presentes en el suelo en la degradación de compuestos orgánicos como exudados de las raíces, carbohidratos o ácidos carboxílicos. La totalidad de los estudios revisados señalan que la actividad microbiana se ve tanto favorecida como entorpecida en la degradación de compuestos orgánicos en presencia de cadmio. En términos globales se puede concluir que la presencia de cadmio favorece la degradación de i-Erytritol, D-Mannitol, D-Cellobiose, α -D-Lactose mientras que reduce la degradación de L-Arginine, D-Galacturonic Acid, 2-Hydroxy Benzoic Acid, L-Serine, L-Threonine, D,L- α -Glycerol Phosphate.

La pendiente de degradación de la D-Cellobiose y α -D-Lactose se ve disminuida por la presencia de cadmio en el suelo mientras que la presencia de lombrices parece afectar de manera positiva a la degradación de D-Mannitol por las bacterias del suelo en ausencia de cadmio y β -Methyl-D-Glucoside, compuesto que parecen más sensibles a ser transformados tras pasar por el tracto digestivo de la lombriz.

La máxima actividad degradativa de los sustratos de tipo hidrocarbonado está fuertemente influenciada por los sustratos N-Acetyl-D-Glucosamine, D-Xylose y D-Cellobiose. Las lombrices favorecen una mayor degradación microbiana de éstos compuestos en ausencia de cadmio pero en presencia de cadmio se produce un efecto antagónico al modificar las condiciones físico-químicas del suelo una vez ha pasado por su tracto digestivo comprometiendo parte del

ciclo de retorno de nutrientes a la matriz del suelo en los sistemas ribereños contaminados por Cd, donde las bacterias tienen un papel preponderante en la degradación de estos compuestos.

En análisis Biolog no necesariamente refleja la comunidad microbiana original sino únicamente una determinada parte capaz de degradar los sustratos que se le facilitan. Como consecuencia de ello, las observaciones no pueden ser interpretadas para el potencial metabólico de la comunidad microbiana original tal y como sugirió Hackett and Griffiths (1997).

Los tiempos medios de degradación (TM50) para los carbohidratos tienen una fuerte tendencia marcada por la presencia del cadmio en el suelo que modifica la comunidad microbiana en uno u otro sentido dependiendo si hay presencia o no de lombrices.

Bibliografía

Akmal, M., et al., 2005. Changes in enzymes activity, substrate utilization pattern and diversity of soil microbial communities under cadmium pollution. Journal of environmental sciences vol.17 nº5_802-807

Anderson, J. et al., 2009. Molecular and Functional Assessment of Bacterial Community Convergence in Metal-Amended Soils. *Microbiology Ecology* No 58:10–22

ASTM. 1999. Standard test method for laboratory determination of water (moisture) content of soil and rock by mass (D 2216-98). American Society for Testing and Materials.

Appenroth, K.-J. 2010. Definition of “heavy metals” and their role in biological systems. In: Sheremeti, I. and Varma, A. (Eds.) *Soil heavy metals, Soil Biology*, Vol. 19, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 19-29.

Beelen, P. et al., 2004. Location-especific ecotoxicological risk assessment of metal-polluted soils. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 23, No. 11: 2769-2779

Blanchart, E., Lavelle, P., Braudeau, E., Le Bissonnais, Y. and Valentin, C. 1997. Regulation of soil structure by geophagous earthworm activities in humid savannas of Côte d'Ivoire. *Soil*

Demuynck, D. et al., 2007. Cd/Zn exposure interactions on metallothionein response in *Eisenia fetida* (Annelida, Oligochaeta). *Laboratoire d'Ecologie Numérique et d'Ecotoxicologie. Biology & Biochemistry*, Vol. 29, Issues 3-4: 431-439.

Booth, L. H., Heppelthwaite, V. J. and O'Halloran, K. 2005. Effects-based assays in the earthworm *Aporrectodea caliginosa*: their utilization for evaluation of contaminated sites before and after remediation. *Journal of Soils & Sediments*, Vol. 5, No. 2: 87-94.

Brookes, PC. 1995. The use of microbial parameters in monitoring soil pollution by heavy metals. *Biology and Fertility of Soils* 19: 269-275

Campbell, C.D. et al., 1997. Use of rhizosphere carbon sources in sole carbon source tests to discriminate soil microbial communities .Journal of Microbiological Methods 30: 33 –41

Campbell, C.D. et al., 1997. Use of rhizosphere carbon sources in sole carbon source tests to discriminate soil microbial communities. Journal of microbiological methods 30: 33-41

Capowiez, Y., Dittbrenner, N., Rault, M., Triebeskorn, R., Hedde, M. and Mazzia, Ch. 2010. Earthworm cast production as a new behavioural biomarker for toxicity testing. Environmental Pollution, Vol. 158, Issue 2: 388–393.

Chao-Rong, GE and Zhang, Q., 2011. Microbial Community Structure and Enzyme Activities in a Sequence of Copper-Polluted Soils. Pedosphere 21 (2): 164-169.

Čoja, T., Zehetner, K., Bruckner, A., Watzinger, A. and Meyer, E. 2008. Efficacy and side effects of five sampling methods for soil earthworms (*Annelida, Lumbricidae*). Ecotoxicology & Environmental Safety, Vol. 71, Issue 2: 552-565.

Dai, J., Becquer, T., Rouiller, J. H., Reversat, G., Bernhard-Reversat, F., Nahmani, J. and Lavelle, P. (2004) Heavy metal accumulation by two earthworm species and its relationship to total and DTPA-extractable metals in soils. Soil Biology & Biochemistry, Vol. 36, Issue 1: 91-98.

Dandan, W., Huixin, L., Zhengui, W., Xia, W and Feng, H. 2006. Effect of earthworms on the phytoremediation of zinc-polluted soil by ryegrass and Indian mustard. Biology & Fertility of Soils, Vol. 43, No. 1: 120-123.

Dandan, W., Huixin, L., Feng, H. and Xia, W. 2007. Role of earthworm-straw interactions on phytoremediation of Cu contaminated soil by ryegrass. Acta Ecologica Sinica, Vol. 27, Issue 4: 1292-1299.

Darwin, Ch. (1881) The formation of vegetable mould through the action of worms with observations on their habits. John Murray. London. 152 pp.

Davis, N. A., Hodson, M. E. and Black, S. 2003. The influence of time on lead toxicity and bioaccumulation determined by the OECD earthworm toxicity test. Environmental Pollution, Vol. 121, Issue 1: 55-61.

Decaëns, T., Mariani, L., Betancourt, N. and Jiménez, J.J. 2003. Seed dispersion by surface casting activities of earthworms in Colombian grasslands. Acta Oecologica (*Oecologia Generalis*), Vol. 24, Issue 4: 175-185.

Diaz Ravina, M.; Baath, E.; Frostegard., A., 1994. Multiple heavy metal tolerance of soil bacterial communities and its measurement by the thymidine incorporation technique. Appl. Environ. Microbiol., 60 (7), 2238 – 2247.

Diaz Ravina, M.; Baath, E., 1996. Development of metal tolerance in soil bacterial communities exposed to experimentally increased metal levels. Appl. Environ. Microbiol., 62 (8), 2970-2977.

DIN. 1984. German standard determination of leachability by water: sludge and sediments (DIN 38414-S4). Deutsches Institut für Normung.

Edwards, C. A. and Bater, J. E. 1992. The use of earthworms in environmental management. *Soil Biology & Biochemistry*, Vol. 24, No. 12: 1683-1689.

Edwards, C. A. and Lanno, R., 2004. Soil animals in detoxification and bioremediation, organic waste treatment and ecosystem restoration: earthworms as an example. XIVth International Colloquium on Soil Zoology and Ecology: Abstracts, Session 6, p. 180.

Eijsackers, H., 2010. Earthworms as colonizers: primary colonization of contaminated land, and sediment and soil waste deposits. *Science of the Total Environment*, Vol. 408, Issue 8: 1759-1769.

Eglantina, M.S. 1999. Los ácidos grasos volátiles, fuente de energía en los rumiantes. Departamento de nutrición y bioquímica. Universidad Nacional Autónoma de México.

Feller, C., Brown, G. G., Blanchart, E., Deleporte, P. and Chernyanskii, S. S. 2003. Charles Darwin, earthworms and the natural sciences: various lessons from past to future. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, Vol. 99, Issues 1-3: 29-49.

Francis, G. S. and Fraser, P. M. 1998. The effects of three earthworm species on soil macroporosity and hydraulic conductivity. *Applied Soil Ecology*, Vol. 10, Issues 1-2: 11-19.

Friis, K., Damgaard, C. and Holmstrup, M. 2004. Sublethal soil copper concentrations increase mortality in the earthworm *Aporrectodea caliginosa* during drought. *Ecotoxicology & Environmental Safety* Vol. 57, Issue 1: 65-73.

Farrel, M. *et al.*, 2010. Microbial diversity and activity are increased by compost amendment of metal-contaminated soil. *FEMS Microbiology Ecology* 71: 94–105

Frioni, L., 1999. Procesos microbianos. Fundación Universidad Nacional de Río Cuarto (ed.)

Fritze, H., *et al.*, 2000. Effects of Cd-containing wood-ash on the microflora of coniferous forest humus. *FEMS Microbiology Ecology* 32, 43–51

Gremion, F. *et al.*, 2004. Impacts of heavy metal contamination and phytoremediation on a microbial community during a twelve-month microcosm experiment. *FEMS Microbiology Ecology* 48: 273-283

Garland JL., 1996. Analytical approaches to the characterization of samples of microbial communities using patterns of potential C source utilization. *Soil Biol Biochem* 28:213-221

Garland JL., 1997. Analysis and interpretation of community-level physiological profiles in microbial ecology. *FEMS Microbiol Ecol* 24:289-300

Garland JL, Mills AL., 1991. Classification and characterisation of heterotrophic microbial communities on the basis of pattern of community-level sole-carbon-source utilization. *Appl Environ Microbiol* 57:2351-2359

Garland JL, Mills AL, Young JS., 2001. Relative effectiveness of kinetic analysis vs single point readings for classifying environmental samples based on community-level physiological profiles (CLPP). *Soil Biol Biochem* 33:1059-1066

Garland, JL. 1999. Potential and limitations of BIOLOG for microbial community analysis. *Methods of Microbial Community Analysis*

Graham, P.H.J., 1975. Symbiotic Nitrogen Fixation in Plants, Nutman (ed.), Cambridge Univ. Press.

Greve, D. et al., Optimisation of the analysis of community-level physiological profiles. National Institute for Health and the Environment, Bilthoven

Gregori, G. et al. 2001. Resolution of viable and membrane-compromised bacteria in fresh water and marine waters based in analytical flow cytometry and nucleic acid double staining. American society of microbiology vol 67 nº 10: 4662-4670

Görres, J. H., Savin, M. C. and Amador, J. A. 2001. Soil micropore structure and carbon mineralization in burrows and casts of an anecic earthworm (*Lumbricus terrestris*). *Soil Biology & Biochemistry*, Vol. 33, Issue 14: 1881-1887.

Haimi, J. 2000. Decomposer animals and bioremediation of soils. *Environmental Pollution*, Vol. 107, Issue 2: 233-238.

Hedde, M., Lavelle, P., Joffre, R., Jiménez, J.J. and Decaëns, T. 2005. Specific functional signature in soil macro-invertebrate biostructures. *Functional Ecology*, Vol. 19, Issue 5: 785-793.

Hackett CA, Griffiths BS. 1997. Statistical analysis of the timecourse of Biolog substrate utilization. *J Microbiol Meth* 30(1): 63-69

Hackett, C. and Griffiths, B., 1997. Statistical analysis of the time-course of Biolog substrate utilization. *Journar of microbiological methods* 30: 63-69

Hattori H. 1996. Differences in the influence of cadmium on the decomposition of various types of organic materials in soil. *Soil Sci Plant Nutr* 42: 737-743.

Hitzs, W. et al., 1997. Separation power of the 95 substrates of the BIOLOG system determined with various souls. *FEMS microbial. Ecol.* 22: 167-174

Hinojosa, MB., et al., 2004. Soil moisture pre-treatment effects on enzyme activities as indicators of heavy metal-contaminated and relaim soils. *Soil Biology and Biochemistry*: 1559-1568

Hobbelin, P.H.F., Koolhaas, J.E. and van Gestel, C.A.M. 2006. Bioaccumulation of heavy metals in the earthworms *Lumbricus rubellus* and *Aporrectodea caliginosa* in relation to total and available metal concentrations in field soils. *Environmental Pollution*, Vol. 144, Issue 2: 639-646.

Ikeda H. et al., 2004. Extraction of bacterial cells from soil by centrifugation. *Saga university*.

Jiang, W. et al., 2010. Soil bacterial functional diversity as influenced by cadmium, phenanthrene and degrage bacteria application. *Environ Earth Sciences* 59:1717-1722

Jänsch, S., Römbke, J., Schallnaß, H.J. and Terytze, K. 2007. Derivation of soil values for the path “soil–soil organisms” for metals and selected organic compounds using species sensitivity distributions. *Environmental Science & Pollution Research International*, Vol. 14, Issue 5: 308–318.

Jégou, D., Schrader, S., Diestel, H. and Cluzeau, D. 2001. Morphological, physical and biochemical characteristics of burrow walls formed by earthworms. *Applied Soil Ecology*, Vol. 17, Issue 2: 165-174.

Jiménez, J. J., Brown, G. G., Decaëns, T., Feijoo, A. and Lavelle, P. 2000. Differences in the timing of diapauses and patterns of aestivation in some tropical earthworms. *Pedobiologia*, Vol. 44, Issue 6: 677-694.

Jones, C.G., Lawton, J.H. and Shachak, M. 1994. Organisms as ecosystem engineers. *Oikos*, Vol. 69, No. 3: 373-386.

Joschko, M., Diestel, H. and Larink, O. 1989. Assessment of earthworm burrowing efficiency in compacted soil with a combination of morphological and soil physical measurements. *Biology & Fertility of Soils*, Vol. 8, No. 3: 191-196.

Joschko, M., Graff, O., Müller, P. C., Kotzke, K., Lindner, P., Pretschner, D. P. and Larink, O. 1991. A non-destructive method for the morphological assessment of earthworm burrow systems in three dimensions by X-ray computed tomography. *Biology & Fertility of Soils*, Vol. 11, No.: 88-92.

Jouquet, P., Dauber, J., Lagerlöf, J., Lavelle, P. and Lepage, M. 2006. Soil invertebrates as ecosystem engineers: intended and accidental effects on soil and feedback loops. *Applied Soil Ecology*, Vol. 32, Issue 2: 153-164.

Kahru, A., Ivask, A., Kasemets, K., Pöllumaa, L., Kurvet, I. and François, M. 2005. Biotests and biosensors in ecotoxicological risk assessment of field soils polluted with zinc, lead, and cadmium. *Environmental Toxicology & Chemistry*, Vol. 24, No. 11: 2973-2982.

Kalbitz, K. and Wennrich, R. 1998. Mobilization of heavy metals and arsenic in polluted wetland soils and its dependence on dissolved organic matter. *The Science of the Total Environment*, Vol. 209, Issue 1: 27-39.

Karaca, A., Kizilkaya, R., Turgay, O. C. and Cetin S. C. 2010. Effects of earthworms on the availability and removal of heavy metals in soil. In: Sherameti, I. and Varma, A. (Eds.) *Soil heavy metals, Soil Biology*, Vol. 19, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 369-388.

Khalil, M. A., Abdel-Lateif, H. M., Bayoumi, B. M., Van Straalen, N. M. and Van Gestel, C. A. M. 1996a. Effects of metals and metal mixtures on survival and cocoon production of the earthworm *Aporrectodea caliginosa*. *Pedobiologia*, Vol. 40, No. 6: 548-556.

Khalil, M. A., Abdel-Lateif, H. M., Bayoumi, B. M. and van Straalen, N. M. 1996b. Analysis of separate and combined effects of heavy metals on the growth of *Aporrectodea caliginosa* (*Oligochaeta; Annelida*), using the toxic unit approach. *Applied Soil Ecology*, Vol. 4, Issue 3: 213-219.

Kurek, E., Czaban, J. and Bollag, J-M. 1982. Sorption of cadmium by microorganisms in competition with other soil constituents. *Applied & Environmental Microbiology*, Vol. 43, No. 5: 1011-1015.

Kandeler E, Tscherko D, Bruce KD, Stemmer M, Hobs PJ, Bardgett RD & Amelung W 2000. Structure and function of the soil microbial community in microhabitats of a heavy metal polluted soil. *Biol Fertil Soils* 32: 390–400.

Kumpiene, J. *et al.* 2009. Microbial biomass , respiration and enzyme activities after in situ aided phytostabilization of a Pb- and Cu-contaminated soil. *Ecological and Environmental Safety* 72: 115–119

Lagomarsino, A. *et al.*, 2007. Structural and Functional Diversity of Soil Microbes is Affected by Elevated [CO₂] and N Addition in a Poplar Plantation. *J Soils Sediments* 7 (6) 399 – 405

Lasse, D. y SØrensen, S., 2001. Effects of mercury contamination on the culturable heterotrophic, functional and genetic diversity of the bacterial community in soil. *Microbiology Ecology* 36

Lazzaro, A. *et al.*. 2006. Bacterial community structure and activity in different Cd-treated forest soils. Department of Soil Ecology, Swiss Federal Institute for Forest, Snow and Landscape Research (WSL). *FEMS Microbiology Ecology* 58: 278–292

Liu, J. *et al.*, 2010. An improved method for extracting bacteria from soil for high molecular weight DNA recovery and BAC library construction. *The journal microbiology*. Vol 48, No 6: 728-733

Lum KR, Kokotich EA & Schroeder WH 1987. Bioavailable Cd, Pb and Zn in wet and dry deposition. *Sci Tot Environ* 63:161–173.

Landner, L. and Reuther, R. (Eds.) 2004 Metals in society and in the environment: a critical review of current knowledge on fluxes, speciation, bioavailability and risk for adverse effects of copper, chromium, nickel and zinc. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands. 406 pp.

Lanno, R., Wells, J., Conder, J., Bradham, K. and Basta, N. 2004. The bioavailability of chemicals in soil for earthworms. *Ecotoxicology & Environmental Safety*, Vol. 57, Issue 1: 39-47.

Lavelle, P. 1988. Earthworm activities and the soil system. *Biology & Fertility of Soils*, Vol. 6, No. 3: 237-251.

Lavelle, P., Decaëns, T, Aubert, M., Barot, S., Blouin, M., Bureau, F., Margerie, P., Mora, P. and Rossi, J.-P. 2006. Soil invertebrates and ecosystem services. *European Journal of Soil Biology*, Vol. 42, Supplement 1: S3-S15.

Lee, K. E. 1992. Some trends and opportunities in earthworm research or Darwin's children: the future of our discipline. *Soil Biology & Biochemistry*, Vol. 24, No. 12: 1765-1771.

Li, L.-Z., Zhou, D.-M., Luo, X.-S., Wang, P. and Wang, Q.-Y. 2008. Effect of major cations and pH on the acute toxicity of cadmium to the earthworm *Eisenia fetida*: implications for the Biotic

Ligand Model approach. Archives of Environmental Contamination & Toxicology, Vol. 55, No. 1: 70-77.

Liang, S.-H., Chen, M.-H., Chen, Ch.-Ch., Chen, C. S., Chen, J.-H. and Chen, S. Ch. 2009. Impact of cadmium on the bacterial communities in the gut of *Metaphire posthuma*. Journal of Hazardous Materials, Vol. 172, Issues 2-3: 1212-1217.

Liu, Y.J., Zaprasis, A., Liu, S.-J., Drake, H. L. and Horn, M. A. 2011. The earthworm *Aporrectodea caliginosa* stimulates abundance and activity of phenoxyalkanoic acid herbicide degraders. The International Society for Microbial Ecology (ISME) Journal, Vol. 5, Issue 3: 473-485.

Lock, K. and Janssen, C. R. 2001. Cadmium toxicity for terrestrial invertebrates: taking soil parameters affecting bioavailability into account. Ecotoxicology, Vol. 10, No. 5: 315-322.

Loureiro, S., Soares, A. M. V. M. and Nogueira, A. J. A. 2005. Terrestrial avoidance behavior tests as screening tool to assess soil contamination. Environmental Pollution, Vol. 138, Issue 1: 121-131.

Lowe, Ch. N. and Butt, K. R. 2005. Culture techniques for soil dwelling earthworms: a review. Pedobiologia, Vol. 49, Issue 5: 401-413.

Lum KR, Kokotich EA & Schroeder WH. 1987. Bioavailable Cd, Pb and Zn in wet and dry deposition. Sci Tot Environ 63:161–173.

Maenpaa, K. A., Kukkonen, J. V. K. and Lydy, M. J. 2002. Remediation of heavy metal-contaminated soils using phosphorus: evaluation of bioavailability using an earthworm bioassay. Archives of Environmental Contamination & Toxicology, Vol. 43, No. 4: 389-398.

Mariani, L., Jiménez, J. J., Asakawa, N., Thomas, R. J. and Decaëns, T. 2007. What happens to earthworm casts in the soil? A field study of C and N dynamics in the Neotropical savannahs. Soil Biology & Biochemistry, Vol. 39, Issue 3: 757-767.

Marinissen, J. C. Y. and Dexter, A. R. 1990. Mechanisms of stabilization of earthworm casts and artificial casts. Biology & Fertility of Soils, Vol. 9, No. 2: 163-167.

Mas, A. y Azcue, J.M (Eds.). 1993. Metales en sistemas biológicos. Promociones y Publicaciones Universitarias (PPU). Barcelona. 324 pp.

Mc Laughlin, M.J. and Singh, B.R. (Eds.) 1999. Cadmium in Soils and Plants. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands. 271 pp.

Mitra, O., Callaham Jr, M. A., Smith, M. L. and Yack, J. E. 2009. Grunting for worms: seismic vibrations cause *Diplocardia* earthworms to emerge from the soil. Biology Letters, Vol. 5, No. 1: 16-19.

Moret-Fernández, D., Arrué, J. L., López, M. V. and Gracia, R. (2006) A new TDR waveform analysis approach for soil moisture profiling using a single probe. Journal of Hydrology Vol. 321, Issues 1-4: 163-172.

Moreno JL, Garcia C & Hernandez T. 2003. Toxic effect of cadmium and nickel on soil enzymes and the influence of adding sewage sludge. Eur J Soil Sci 54: 377–386.

Nakatsu, C. *et al.*, 2005. Soil Microbial Community Responses to Additions of Organic Carbon Substrates and Heavy Metals (Pb and Cr). *Applied and Environmental Microbiology* 71 No 12: 7679-7689

Niklinska, M Chodak, R Laskowski. 2005. Characterization of the forest humus microbial community in a heavy metal polluted area. *Soil Biology and Biochemistry*. Volume: 37, Issue: 12: 2185-2194

Nwuche, C. and Ugoji, E. 2008. Effects of heavy metal pollution in the soil microbial activity. *Institute of Journal Environmental Sciences Technology*, 5 (2): 409-414

Nyboe, O. *et al.*, 2008. Differential bioavailability of copper complexes to bioluminescent *Pseudomonas fluorescens* reporter strains. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 27, No. 11, pp. 2246–2252

Ovando-chacon, S.L. y Waliszewski, K.N. 2005. Preparativos de celulasas comreciales y aplicaciones en procesos extractivos. *Universidad y ciencia*, 21 (42): 113-122.

Pankhurst, BM. *et al.*, 1997. *Biological Indicators of Soil Health*. Wallingford: CAB International: 297–324.

Qiaoyun, H. *et al.*, 2000.- dsorption of cadmioun by soil colloids and minerals in presence of rhizobia. *Pedosphere* No 10(4): 299-307

Ruiz, E., Rodríguez, L. and Alonso-Azcárate, J. A. 2009. Effects of earthworms on metal uptake of heavy metals from polluted mine soils by different crop plants. *Chemosphere*, Vol. 75, Issue 8: 1035-1041.

Schlegel H.G. *General microbiology*. 7th ed. Cambridge University Press 1993

Stuczynski TI, Mc Carty GW & Siebielec G. 2003. Response of soil microbiological activities to cadmium, lead and zinc salt amendments. *J Environ Qual* 32: 1346–1355.

Smalla, Ute Wachtendorf, Holger Heuer, Wen-Tso Liu and Larry Forne. 1998. Analysis of BIOLOG GN Substrate Utilization Patterns by Microbial Communities. *Applied and Environmental Microbiology* Vol. 64, No. 4: 1220–1225

Shi, W. *et al.*, 2002. Long-term effects of chromium and lead upon the activity of soil microbial communities. *Applied Soil Ecology* 21: 169-177

Shi, W. *et al.*, 2002. Long-term effects of chromium and lead upon the activity of soil microbial communities. *Applied Soil Ecology* 21: 169-177

Sizmur, T. and Hodson, M. E.. 2009. Do earthworms impact metal mobility and availability in soil?: a review. *Environmental Pollution*, Vol. 157, Issue 7: 1981-1989.

Stuczynski TI, Mc Carty GW & Siebielec G. 2003. Response of soil microbiological activities to cadmium, lead and zinc salt amendments. *J Environ Qual* 32: 1346–1355.

Vig K, Megharaj M, Sethunathan N & Naidu R. 2003.. Bioavailability and toxicity of cadmium to microorganisms and their activities in soil: a review. *Adv Environ Res* 8: 121–135.

Vento, M.P. *et al.*, 2000. Estudio sobre la preparación del compost estático y su calidad. Universidad de Camawey. Instituto de suelos

Wang, Y. *et al.*, 2006. The influence of soil heavy metals pollution on soil microbial biomass, enzyme activity, and community composition near a copper smelter. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 67: 75–81

Wakelin, S. *et al.*, 2009. A single application of Cu to field soil has long-term effects on bacterial community structure, diversity, and soil processes. *Pedobiologia* 53: 149–158

Wai C. & Ming-Hung W, 2010. Effects of bacteria on metal bioavailability, speciation, and mobility in different metal mine soils: a column study. *Journal Soils Sediments* 10:313–325

Yao, H., Xu, J. y Huang, C. 2003. Substrate utilization pattern, biomass and activity of microbial communities in a sequence of heavy metal-polluted paddy soils. *Geoderma*. Volume 115, Issues 1–2: 139–148

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características físico-químicas del suelo	27
Tabla 2. Resumen de las concentraciones de Cd en el suelo y en las heces de las lombrices de tierra, en los extractos con CaCl ₂ , en el agua de los poros y en las lombrices de tierra, en las situaciones T0 (acondicionamiento), T1 (riego sin metales) y T2 (riego con metales).	29
Tabla 3. Porcentajes del Cd retenido en el suelo y del Cd presente en los lixiviados de los tratamientos Cd y LoCd en los Días 17, 20, 23, 26, 29 y 31 del experimento.....	32
Tabla 4. Medias aritméticas y desviaciones estándar (σ) de las concentraciones de Cd en las lombrices de tierra en las situaciones T0, T1 y T2.	34
Tabla 5. Análisis comparativo de los parámetros que modelizan la curva sigmoidal de cada sustrato entre los diferentes tratamientos (Amarillo=TM50, verde=máximo, rojo=pendiente)40	40
Tabla 6. Resultados del análisis de las componentes principales para las pendientes de degradación de los hidratos de carbono presentes en las microplacas Biolog	41
Tabla 7. Resultados del análisis de las componentes principales para los máximos de degradación de los hidratos de carbono presentes en las microplacas Biolog	43
Tabla 8. Resultados del análisis de las componentes principales para los tiempos medios de degradación de los hidratos de carbono presentes en las microplacas Biolog	44
Tabla 9. Comparación bibliográfica en el comportamiento de la actividad degradativa de la comunidad bacteriana. Los valores positivos (+) y negativos (-) reflejan un aumento y un descenso de la capacidad degradativa de los sustratos en presencia de algún contaminante..	55

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Formas de carbón contenidas en los Biolog® ECO-plates. Este patrón de 32 pocillos, se presenta por triplicado en cada microplaca. Fuente: Garland and Mills (1991)	11
Figura 2. Evolución de la humedad en el suelo de los diferentes tratamientos	28
Figura 3. Volumen de lixiviados recogidos	30
Figura 4. Comparativa de la variación temporal en las concentraciones de Cd en los lixiviados del tratamiento Cd (línea azul con rombos) y el tratamiento LoCd (línea roja con cuadrados) en Día 17-31.	31
Figura 5. Porcentajes de crecimiento de las lombrices de tierra en Día 1-16 (tratamiento Lo (T1) en rojo) y en Día 1-31 (tratamiento Lo en verde y tratamiento LoCd en violeta).	33
Figura 6. Porcentajes del Cd aportado con el riego en Día 17-31 que quedó retenido en el suelo y en las lombrices de tierra y el que fue lixiviado, en los tratamientos Cd (en azul) y LoCd (en rojo).	35
Figura 7. Número de células vivas, muertas y totales en los inóculos bacterianos de los diferentes tratamientos.	36
Figura 8. Representación de la AWCD normalizada por el valor de OD inicial de todos los sustratos con respecto al tiempo para los diferentes tratamientos.....	37
Figura 9. Representación en el espacio canónico de las pendientes de degradación de los hidratos de carbono presentes en las microplacas Biolog.....	41
Figura 10. Representación en el espacio canónico de los máximos de degradación de los hidratos de carbono presentes en las microplacas Biolog.....	42
Figura 11. Representación en el espacio canónico de los tiempos medios de degradación de los hidratos de carbono presentes en las microplacas Biolog.....	44

INDICE DE FOTOS

Foto 1. Cámaras de presión utilizadas para determinar la capacidad de campo y el punto de marchitez del suelo experimental.....	12
Foto 2. Terrario en el que se mantuvieron las lombrices de tierra durante el periodo de mantenimiento.....	13
Foto 3. Diseño experimental con los cuatro tratamientos.	14
Foto 4. Agitador rotatorio utilizado para obtener los lixiviados según la norma DIN.	16

Foto 5. Ensayos de inhibición de crecimiento en algas.....	17
Foto 6. Digestión ácida de las lombrices. Foto 7. Preparación de las muestras de lombriz para su análisis por ICP-OES.....	19
Foto 8. Bomba para filtrado y equipo de fijación del filtro de policarbonato para su posterior visualización	23
Foto 9. Microscopio de epifluorescencia modelo Eclipse TE2000-S.....	24
Foto 10. Campo de conteo celular por fluorescencia del fluorocromo Sybr Green II (verde) y Yoduro de propidio (rojo).....	24
Foto 11. Microplacas utilizadas en el seguimiento de la actividad degradativa para los cuatro tratamientos.....	25
Foto 12. Lector de microplacas Anthos 2010 empleado para la lectura de coloración de los pocillos	25
Foto 13. Incubador Eko Aparatura empleado durante el seguimiento de las microplacas	26

INDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Valores de diversidad SW de la comunidad microbiológica del suelo en los diferentes tratamientos a las 96h desde la inoculación en las microplacas	45
Gráfico 2. Evolución temporal de la diversidad SW para los diferentes tratamientos.....	46