

**Informe anual  
Proyecto I+D y T**

**BERRILUR-3**  
**Cliente: Departamento  
de Medio Ambiente,  
Planificación Territorial,  
Agricultura y Pesca,  
Gobierno Vasco**

**Contacto Neiker:**

Carlos Garbisu  
[cgarbisu@neiker.net](mailto:cgarbisu@neiker.net)  
94 403 43 31

**Contacto Cliente:**

Ref. NEIKER: 71.0176.0

Ejercicio: 2011

Ref. DMAPTAP:

Fecha:

**Acrónimo:** BERRILUR-3

**Título:** Salud del suelo y contaminación química: desarrollo y aplicación de tecnologías para identificación, diagnóstico y terapia

**Jefe de proyecto:** Garbisu Crespo, Carlos | **email:** cgarbisu@neiker.net

Clasificación del proyecto	Unidad de negocio: Medio Ambiente y Recursos Naturales
Departamento: Ecología y Recursos Naturales	Campos de aplicación: Recursos Naturales
Área estratégica: Agrosistemas	Línea: Suelos y Fertilización
Tipo de proyecto: Estratégico	Origen: Centros Tecnalia, IK4 y UPV/EHU (los socios participantes en el Consorcio BERRILUR deciden pedir la continuación del proyecto)

**Palabras clave**

Objeto: Suelo

Aspecto: Ecología Microbiana

Finalidad: Adquisición de conocimientos básicos y aplicados

**Objetivo:** Desarrollo y aplicación de tecnologías para identificación, diagnóstico y terapia en relación con la problemática de la contaminación del suelo en la CAPV

**Objetivos específicos:**

- 1.- Impacto de la contaminación difusa
  - 1.1. Escenario actividades agroforestales
  - 1.2. Escenario deposición atmosférica en zona rural
- 2.- Impacto de la contaminación crónica:
  - 2.1. Escenario vertederos
  - 2.2. Escenario reutilización de materiales

Duración: 3 años

Fecha de inicio: 01/01/2010

Fecha final: 31/12/2012

**1. Equipo participante de NEIKER - Tecnalia**

- + Jefe de Proyecto: Carlos Garbisu (responsable científico)
- + Otros participantes:
  - Lur Epelde (investigadora)
  - Fernando Blanco (responsable laboratorio de I+D)
  - Iker Martín (técnico)
  - Mikel Anza (técnico)

- Maite Gómez (becaria)

## 2. Informe sobre las actividades más destacadas de la investigación en el proyecto y resultados obtenidos

### ***Salud del suelo en vertedero: impacto de la contaminación sobre propiedades microbianas edáficas con potencial bioindicador de la salud del suelo***

#### 1. INTRODUCCIÓN

El vertedero de Epele se ubica en el término municipal de Hernani y comenzó su actividad en 1971. En él se depositaron durante más de 20 años residuos tanto comerciales como industriales de los ayuntamientos de Hernani, Goizueta y Urnieta. Estos residuos incluían serrín, madera, papel, cartón, pinturas, barnices, esmaltes, tintes, residuos industriales de pescadería, escorias, escombros de construcción, chatarra, etc. El volumen estimado de residuos es de unos 32.600 m<sup>3</sup> con un espesor máximo de 10 metros. Al estar el vertedero dispuesto en una ladera con gran talud, se produjeron episodios de deslizamiento de residuos a favor de la ladera, los cuales llegaron hasta el arroyo Epele. Existen evidencias de que el vertedero afectó considerablemente a las aguas del arroyo Epele, y es de suponer que los suelos ubicados debajo del área de influencia del vertedero han recibido una contaminación considerable principalmente de metales pesados.

La contaminación, junto con el cambio climático, la pérdida de biodiversidad y la deposición de nitrógeno entre otros, ha desembocado en uno de los problemas medioambientales más preocupantes a los que se enfrenta nuestra sociedad: la degradación del suelo. Conviene recordar que lejos queda la visión del suelo como un ente inanimado compuesto por minerales y sustancias químicas. Así, frecuentemente se olvida que el suelo es un medio vivo, que nos proporciona una gran variedad de servicios/funciones (provisión de alimentos, fibra y combustible; descomposición de la materia orgánica; reciclaje de nutrientes; fijación de N<sub>2</sub>; eliminación de contaminantes; depuración del agua y aire; etc.) de los que depende nuestra supervivencia y bienestar. Muchas de estas funciones dependen en gran parte de la actividad de los microorganismos presentes en el suelo, principalmente bacterias y hongos. Por ello, del mantenimiento de unas comunidades microbianas diversas, abundantes y activas depende directamente la salud del suelo, ya que son los microorganismos los principales responsables del funcionamiento del ecosistema edáfico. En esta línea, los parámetros microbiológicos relacionados con la ecología microbiana del suelo nos proporcionan información muy útil acerca de la salud del suelo y sirven como indicadores precoces ante las diferentes fuentes de estrés ambiental a las que se ve sometido un suelo. Finalmente, destacar que los indicadores microbianos destacan por su carácter integrador, sensibilidad y rapidez de respuesta.

#### 2. OBJETIVOS

Evaluar los efectos de la contaminación por metales pesados de un vertedero sobre la salud del suelo mediante indicadores microbianos.

#### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

En el transcurso del presente año 2011 se han realizado dos muestreos en el vertedero de Hernani: el 16 de febrero y el 7 de junio. En el primer muestreo se tomaron muestras en tres puntos bien diferenciados, intentando conseguir un gradiente de contaminación que nos permitiera evaluar el impacto de los metales pesados sobre los parámetros microbianos con potencial bioindicador de la salud del suelo. Para ello se tomaron muestras "control" fuera del área de influencia del vertedero, y dos puntos situados por debajo del límite del vertedero, "catarata" y "carretera". Tras analizar los resultados obtenidos, se procedió a realizar un segundo muestreo el 7 de junio con el objetivo de conseguir muestras de suelo sometidas a un

grado de contaminación más elevado: "balsa". En esta ocasión se tomaron medidas de pH *in situ* mediante el kit de medición directa del pH en suelo de Hanna HI99121. Todas las muestras se mantuvieron a 4 °C hasta completar la analítica.

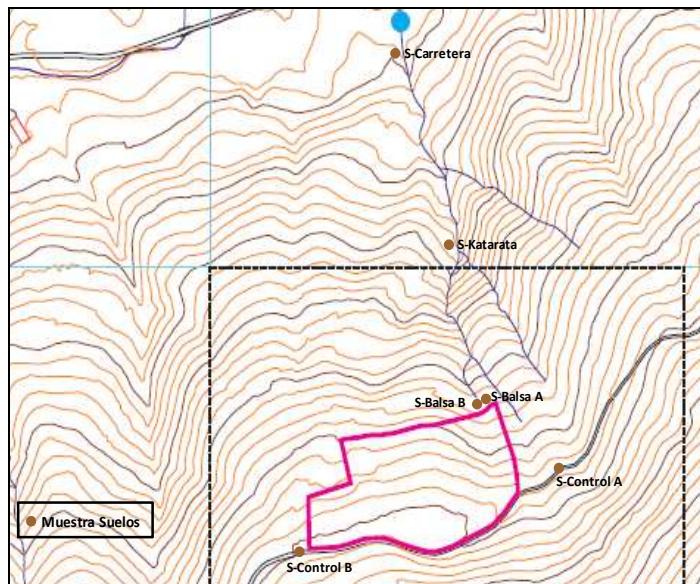


Figura 1.- Ubicación de los puntos de muestreo en el vertedero de Hernani objeto de estudio

Una vez en el laboratorio, las muestras se tamizaron a 2 mm y se analizaron los siguientes parámetros microbianos: actividad fosfatasa, fosfatasa específica,  $\beta$ -glucosidasa,  $\beta$ -glucosidasa específica, carbono de la biomasa microbiana, perfil fisiológico-catabólico a nivel de comunidad, respiración basal y respiración inducida por sustrato y diversidad estructural (bacterias y hongos) mediante DGGE.

Brevemente, las actividades enzimáticas se determinaron mediante colorimetría en espectrofotómetro cuantificando los productos de sus hidrólisis en ensayos tamponados y tras una incubación del medio de reacción a 37 °C.

El carbono de la biomasa microbiana se determinó mediante el método de la fumigación-extracción. Para ello, se pesaron 4 gramos de suelo fresco de cada muestra por duplicado y se fumigaron con cloroformo, el cual lisa las células, en un desecador aplicando vacío durante 24 horas. Tanto el carbono de la biomasa microbiana como el carbono orgánico no microbiano se extrajeron en una solución de sulfato potásico y digirieron en una solución sulfúrica en presencia de ácido crómico. Finalmente, el carbono de la biomasa microbiana se determinó espectrofotométricamente por diferencia entre los carbonos orgánicos extraídos con y sin fumigación.

Los perfiles fisiológicos-catabólicos a nivel de comunidad se determinaron mediante las EcoPlacasBiolog™, determinando espectrofotométricamente el color desarrollado en cada pocillo, con una fuente de carbono determinada. El tetrazolio presente en cada pocillo se redujo en presencia de NADH dando lugar a un color morado que está directamente relacionado con la tasa y la extensión a la que ocurrió la respiración microbiana.

La respiración basal se determinó a partir de 40 gramos de suelo fresco tamizado en frascos herméticos e incubados a 28 °C durante 72 horas. En el mismo frasco se introdujo un vaso con 10 mL de NaOH 0.2 N que capturó el CO<sub>2</sub> producido por la respiración de los microorganismos. La valoración de los vasos de NaOH 0.2 N con HCl 0.1 N nos proporcionó los valores de respiración basal de cada muestra. Seguidamente, a todos los suelos se les añadió una cantidad conocida de una solución de nutrientes que contenía glucosa, potasio di-hidrógeno

fosfato y diamonio sulfato. Se introdujo un nuevo vaso con 10 mL de NaOH 0.2 N e incubó durante 6 horas a 28 °C. La posterior valoración con HCl 0.1 N nos dio los valores de respiración inducida por sustrato.

Finalmente, el análisis de los perfiles genéticos de las comunidades microbianas se realizó por PCR-DGGE. El ADN de los suelos se extrajo mediante el kit PowerSoil™ y cuantificó en el Nanodrop. Los primers utilizados en la PCR de bacterias fueron F968-GC (5' CGclamp-AAC GCG AAG AAC CTT AC 3') y R1378 (5' CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG 3') , y en la de hongos FF390 (5' CGA TAA CGA ACG AGA CCT 3') y FR1-GC (5' CGclamp-ACGGGCCGAICCATTCAATCGGTAT 3'). Para el análisis de los diferentes fragmentos amplificados se utilizó el sistema D-Code Universal Mutation Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA) usando geles de acrilamida al 6% (acrylamide/bis solution, 37,5/1) con un gradiente desnaturizante de 35 a 60% en el caso de bacterias y del 7,5% de poliacrilamida con gradiente desnaturizante del 40 al 55% en el caso de los hongos (donde el 100% de desnaturizante corresponde a 7 M de urea y 40% de formamida). El DGGE se realizó utilizando 20 µL del producto de amplificación del PCR en buffer 1X TAE (40 mM tris-acetato, 20 mM acetato de sodio, 1 mM EDTA, pH 8.0) a 60 °C. El gel en gradiente fue cubierto con 5 mL de gel de acrilamida sin agentes desnaturizantes. La electroforesis se llevó a cabo a 100 V durante 10 min seguidos de 19 horas a 70 V. Posteriormente el gel se tiñó con SybrSafe durante 30 minutos y visualizó en el transiluminador. El análisis de las bandas se realizó con el software GeneTools.

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los valores de pH obtenidos tanto en el laboratorio como en el campo revelaron que los suelos situados por encima del vertedero son ácidos, mientras que en las zonas de muestreo situadas debajo del vertedero (balsa, catarata y carretera) los valores de pH son más altos, posiblemente debido a un proceso de encalado que se aplicó en el vertedero en fechas lejanas (Figura 2A). En el primer muestreo, en la catarata se observó una gran variabilidad en los valores de pH, obteniéndose valores entre 5,0 y 8,0. A medida que los puntos de muestreo se alejan del vertedero (balsa < catarata < carretera) los valores de pH disminuyeron, pero sin llegar a recuperar los valores de pH ácidos del control (pH 4; Figura 2B).

Las muestras de suelo cosechadas presentaron una mayor concentración de metales pesados directamente relacionada con la distancia al vertedero. Es decir, la muestra más próxima al límite inferior del vertedero, la balsa (ver Figura 1), presentó una mayor concentración de metales pesados, seguido de la catarata y finalmente la carretera (datos no mostrados en este informe). A modo de ejemplo comentar que las concentraciones aproximadas de zinc en la balsa fueron de  $10.000 \text{ mg kg}^{-1}$ , de  $1.000 \text{ mg kg}^{-1}$  en la catarata, y de  $175 \text{ mg kg}^{-1}$  en la carretera.

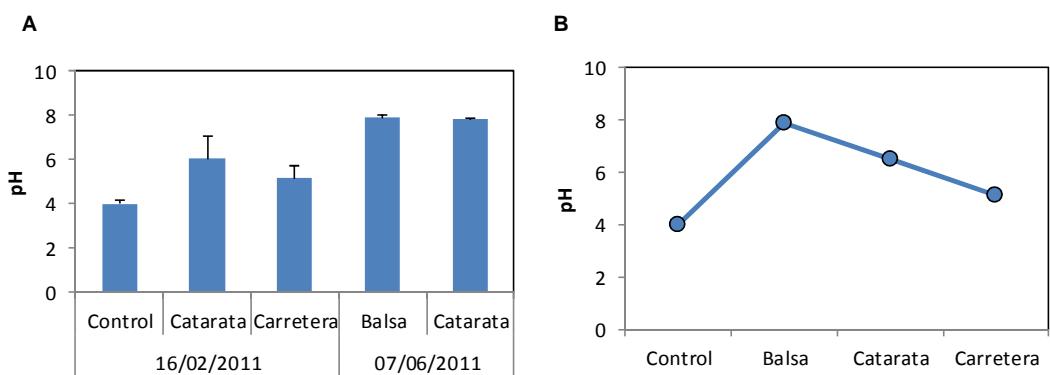


Figura 2.- Valores de pH obtenidos

### Actividades enzimáticas en suelo y respiración

En la Tabla 1 se muestran los valores de las actividades enzimáticas fosfatasa y  $\beta$ -glucosidasa correspondientes a los dos muestreos. En el primer muestreo, en el caso de la fosfatasa, los valores fueron superiores en el control con respecto a las muestras contaminadas, mientras que en relación con la  $\beta$ -glucosidasa, fue en la catarata donde se observaron los valores más altos. En el muestreo del 7 de junio destaca el valor bajo de actividad  $\beta$ -glucosidasa obtenido en la balsa con respecto a la catarata, lo cual indica que el metabolismo del carbono está afectado de forma considerable. Se puede decir que la tasa de degradación potencial de la materia orgánica, y en concreto la de la celulosa, es inferior en esta zona del vertedero altamente contaminada en comparación a otras zonas menos contaminadas. En cuanto a la variabilidad temporal, en junio se observaron valores ligeramente más altos en la actividad fosfatasa con respecto a febrero. Esto no ocurrió así en la actividad  $\beta$ -glucosidasa.

Tabla 1.- Actividades fosfatasa y  $\beta$ -glucosidasa. A.F.Esp., actividad fosfatasa específica; A.G.Esp., actividad  $\beta$ -glucosidasa específica; SD, desviación estándar

	Actividad fosfatasa				Actividad glucosidasa				
	mgNP/kgf.h	SD	A.F.Esp.	Act fosf/CBM	SD	mgNP/kgf.h	SD	A.G.Esp.	Act gluc/CBM
<b>16/02/2011</b>									
Control	1639	290	3,4	0,2	152	45	0,3	0,1	
Catarata	977	319	1,7	0,4	297	41	0,5	0,1	
Carretera	728	165	1,9	0,3	134	78	0,3	0,1	
<b>07/06/2011</b>									
Catarata	2007	84	3,4	0,2	149	18	0,25	0,03	
Balsa	2183	242	4,3	0,9	84	4	0,17	0,03	

La respiración, al igual que las actividades enzimáticas, es un parámetro indicativo de la actividad de los suelos. En el primer muestreo se obtuvieron valores más altos de respiración basal tanto en la catarata como en la carretera ( $> 3 \text{ mg C kg}^{-1} \text{ h}$ ) con respecto al control. Sin embargo, la respiración inducida por sustrato fue superior en la catarata.

**Tabla 2.- Respiración basal y Respiración inducida por sustrato. RB, respiración basal; RI, respiración inducida por sustrato; SD, desviación estándar**

	<b>RB</b>		<b>RI</b>	
	mgC/kg.h	SD	mgC/kg.h	SD
<b>16/02/2011</b>				
Control	2,2	0,6	6,2	1,9
Catarata	3,1	1,3	10,7	3,5
Carretera	3,3	2,7	6,4	0,7
<b>07/06/2011</b>				
Catarata	16,0	1,0	45,0	10,0
Balsa	26,0	1,9	81,0	29,0

En el muestreo de junio los valores de la respiración basal y la respiración inducida por sustrato fueron superiores en la muestra más contaminada, la balsa, con respecto a la carretera.

Además, el cociente metabólico ( $qCO_2 = Resp / CBM$ ) fue superior en la balsa (0.045) con respecto a la catarata (0.029) lo que indica un mayor estrés sufrido por los microorganismos presentes en la zona, probablemente provocado por los metales pesados presentes en el medio.

Tanto en la respiración basal como en la inducida por sustrato los valores fueron significativamente superiores en el muestreo de junio con respecto al de febrero, indicando una mayor actividad microbiana en los suelos.

### ***Carbono de la biomasa microbiana***

La cantidad de biomasa microbiana presente en los suelos se determinó mediante el carbono de la biomasa microbiana (Tabla 3). No se observaron diferencias significativas entre los emplazamientos, si bien los promedios de los valores fueron más altos en la catarata en el caso del primer muestreo, y en la balsa en el segundo muestreo.

No podemos concluir que en junio la cantidad de biomasa presente en los suelos fuera mayor que en febrero.

**Tabla 3.- Carbono de la biomasa microbiana. SD, desviación estándar**

	<b>CBM</b>	
	mg/kgf	SD
<b>16/02/2011</b>		
Control	432	202
Catarata	575	109
Carretera	402	143
<b>07/06/2011</b>		
Catarata	515	86
Balsa	585	54

## Diversidad estructural y funcional

Las EcoPlacasBiolog™ revelaron un mayor poder catabólico y una mayor diversidad funcional en la catarata a la hora de utilizar distintas fuentes de carbono por las bacterias cultivables heterotrofas presentes en cada tipo de suelo (Tabla 4). El color se desarrolló en estas muestras en un mayor número de fuentes de carbono y de una manera más intensa. Los índices de biodiversidad de Shannon y Simpson también fueron mayores en la catarata.

Tabla 4.- Diversidad funcional de las muestras cosechadas el 19/02/2011. AWCD, tasa y extensión del desarrollo del color; NUS, número de sustratos utilizados; Shannon, índice de Shannon; Simpson, índice de Simpson; SD, desviación estándar

### Perfil fisiológico-catabólico a nivel de comunidad (BIOLOG™)

	AWCD	SD	NUS	SD	Shanon	SD	Simpson	SD
Control	0,5	0,1	17,0	1,0	2,72	0,06	0,93	0,00
Catarata	0,8	0,1	23,3	1,5	3,01	0,07	0,95	0,00
Carretera	0,6	0,2	15,7	4,5	2,61	0,29	0,92	0,01

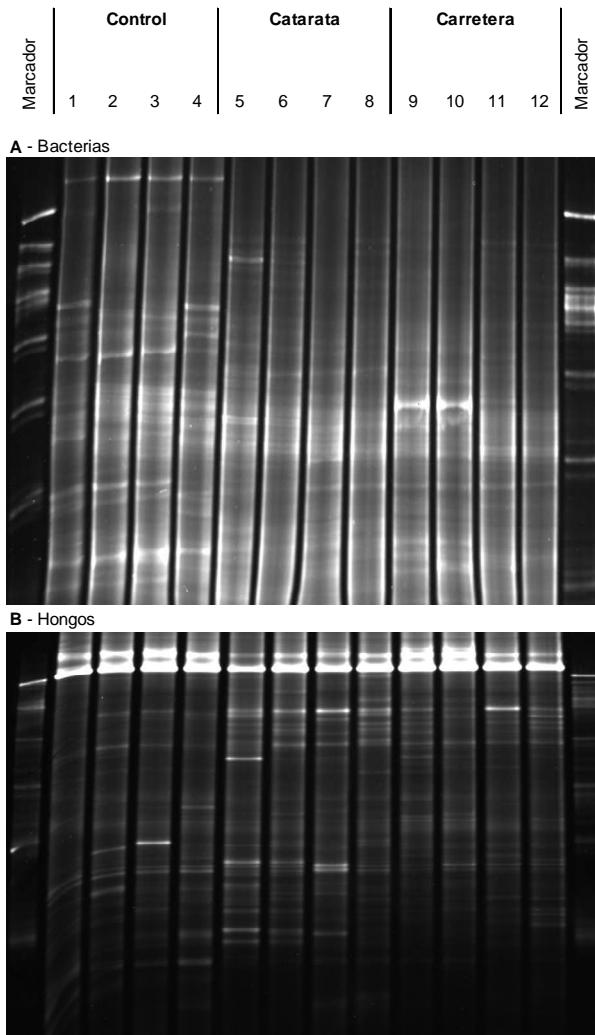
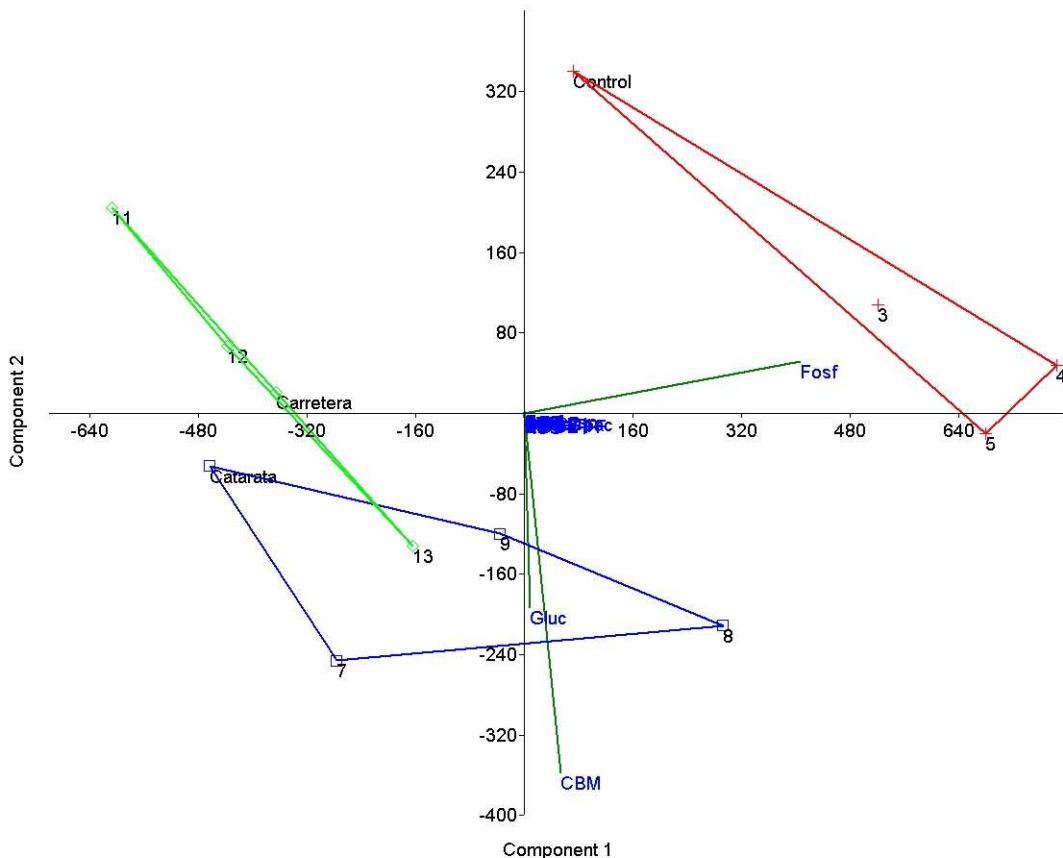


Figura 3.- Diversidad estructural (A bacterias, B hongos) de las muestras tomadas en el vertedero de Hernani en febrero de 2011: control, catarata y carretera

En lo que a la diversidad estructural se refiere, no se observaron diferencias significativas entre las distintas zonas del vertedero muestreadas el 12 de febrero de 2011 (Figura 3). En vista del patrón de bandas observado en los geles con gradiente desnaturalizante realizados, podemos hablar de una composición de la comunidad tanto bacteriana como fúngica distinta entre muestras. Sin embargo, no podemos decir que hubiera una mayor diversidad en ninguna de ellas, al ser el promedio de bandas obtenido muy similar: 18-19 bandas en el caso de las bacterias y 16-17 bandas en el caso de los hongos en todas las muestras. Los índices de Simpson y Shannon tampoco revelaron diferencias significativas.

En el muestreo de junio tampoco se observaron diferencias significativas en la diversidad estructural de las bacterias y hongos entre la muestra más contaminada de la balsa, y la menos contaminada de la catarata (datos no mostrados).

Por último se realizó un análisis de componentes principales con todos los parámetros determinados (Figura 4) en donde el eje vertical explica más del 80% de la variabilidad observada. En la figura 4 se observa cómo los distintos emplazamientos se separan, siendo la fosfatasa en el caso del control, y de la  $\beta$ -glucosidasa y el carbono de la biomasa microbiana en el caso de la catarata los parámetros que más peso tuvieron.



**Figura 4.- Análisis de componentes principales de las muestras tomadas en el vertedero el 16/02/2011 en la zona control, catarata y carretera. Los parámetros determinados fueron las actividades fosfatasa y  $\beta$ -glucosidasa, el carbono de la biomasa microbiana, la respiración basal e inducida por sustrato, los perfiles fisiológicos-catabólicos a nivel de comunidad y los perfiles genéticos de las comunidades microbianas por PCR-DGGE**

## 5. CONCLUSIONES

Las conclusiones que se presentan en este informe se derivan principalmente de los datos correspondientes al segundo muestreo, en donde se tomaron muestras de suelo con un valor de pH casi idéntico y de una textura similar. Esto hace que las conclusiones tengan una mayor relevancia al eliminar dos factores tan importantes en el funcionamiento del suelo como lo son el pH y la textura.

Por lo tanto, y teniendo en cuenta los datos obtenidos en la muestra más contaminada de la balsa (pH 7,9 y 10.000 mg kg<sup>-1</sup> de Zn) y la menos contaminada de la catarata (pH 7,8 y 1.000 mg kg<sup>-1</sup> de Zn) se concluye que:

- Existió una variabilidad temporal entre los muestreos de febrero y de junio que imposibilitó la comparación entre ambos, como se observa en los datos de la respiración.

- La menor actividad del enzima  $\beta$ -glucosidasa en la muestra más contaminada de la balsa indica que el metabolismo del carbono está afectado, con menores tasas potenciales de degradación de la materia orgánica, con respecto a las muestras menos contaminadas.
- Además, las comunidades microbianas edáficas presentaron un mayor nivel de estrés como así lo sugiere el valor más alto del cociente metabólico.
- No se observaron diferencias significativas en la diversidad estructural de las comunidades bacterianas y fúngicas entre la muestra más contaminada de la balsa, y la menos contaminada de la catarata.

## **EFECTO DE LA INTERACCIÓN ENTRE LA CONTAMINACIÓN Y OTRAS FUENTES DE ESTRÉS AMBIENTAL EN LA SALUD DE UN SUELO DE VERTEDERO**

### **1. INTRODUCCIÓN**

El suelo, un recurso natural de enorme importancia para la supervivencia y el bienestar de nuestra especie, se enfrenta actualmente a una variedad de estreses ambientales de enorme envergadura, como son, entre otros, la contaminación, la pérdida de biodiversidad, el cambio climático y la deposición de nitrógeno. Es importante destacar que estas fuentes de estrés ambiental no actúan independientemente, sino que interactúan entre sí.

En el contexto de la actual degradación de uno de nuestros recursos más importantes, es imperativo disponer de una batería fiable de indicadores de la salud del suelo, entre los cuales las propiedades (micro)biológicas destacan por su carácter integrador, sensibilidad y rapidez de respuesta. Entre los indicadores (micro)biológicos de la salud del suelo, aquellos relacionados con la actividad, biomasa y biodiversidad de las comunidades microbianas del suelo tienen un gran potencial como herramientas biomonitorizadoras del impacto de estreses ambientales en el funcionamiento del ecosistema edáfico. Después de todo, las comunidades microbianas del suelo son, en gran medida, responsables de la salud (funcionamiento) del ecosistema edáfico. Por otra parte, a partir de la evolución en los valores de estos parámetros con potencial bioindicador, podemos determinar la resistencia (i.e., la capacidad para aguantar las perturbaciones) y la resiliencia (i.e., la capacidad de recuperarse del efecto producido por las perturbaciones) del suelo, dos atributos de gran relevancia ecológica en relación con la sostenibilidad funcional del ecosistema edáfico.

### **2. OBJETIVO**

Entre otros aspectos, durante el transcurso del proyecto BERRILUR III, se está trabajando activamente en la identificación, diagnóstico y terapia de suelos contaminados con metales pesados en un emplazamiento (i.e., vertedero minero) afectado por contaminación crónica. Complementariamente, el objetivo del ensayo aquí presentado es evaluar los efectos de la interacción entre la contaminación y otras fuentes de estrés ambiental (en concreto, pérdida de biodiversidad, cambio climático y deposición de nitrógeno) en la salud del suelo. Con este propósito, se ha muestreado suelo de un vertedero minero abandonado, contaminado con metales pesados, y sometido a diferentes fuentes de estrés ambiental a escala microcosmos.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

Se estableció un ensayo a escala microcosmos con suelo contaminado con niveles moderados de zinc, cadmio y plomo *versus* un suelo control no contaminado de un área adyacente. Ambos suelos fueron sometidos a tratamientos de “pérdida de biodiversidad” exponiéndolos a un proceso de autoclavado. De forma similar, se aplicó un tratamiento de “cambio climático” manteniendo los suelos a 42°C durante 24 horas (simulando una ola de calor). Finalmente, se estudió un tratamiento de “deposición de nitrógeno” después de la aplicación de 15 kg N/ha a los suelos experimentales.

Transcurridos 0, 1, 2, 4, 8 y 16 semanas desde la aplicación de los distintos estreses, se determinaron parámetros de actividad (respiración basal del suelo, actividad enzimática proteasa, actividad enzimática  $\beta$ -glucosaminidasa), biomasa (PCR a tiempo-real de bacterias y el gen quitinasa A) y diversidad/riqueza (número de bandas obtenidas en el análisis de PCR-DGGE del gen quitinasa A) de la comunidad microbiana edáfica.

#### **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

##### **Interacción entre la contaminación y la pérdida de biodiversidad**

Como consecuencia del tratamiento de autoclavado (y la pérdida de biodiversidad concomitante), se observó un abrupto aumento inicial de la actividad microbiana, medida a través de la respiración basal y la actividad  $\beta$ -glucosaminidasa (en este último caso el aumento se produjo tan sólo en el suelo no contaminado), que fue parcialmente recuperado hacia la finalización del periodo de incubación.

En cambio, la respuesta que se registró en la actividad proteasa y la abundancia de bacterias fue de disminución en los suelos no contaminados, que se asemejaron a los suelos contaminados no tratados hacia la finalización del periodo de incubación. Mientras tanto, los suelos contaminados (tanto los tratados como los no tratados) mostraron valores más altos que los suelos no contaminados al inicio de la incubación.

Por otro lado, la abundancia del gen quitinasa se redujo en ambos suelos a raíz de la aplicación del tratamiento.

Finalmente, la riqueza funcional del gen quitinasa A (medida con PCR-DGGE) disminuyó en los suelos no contaminados, mientras que fue aumentando en el tiempo en los suelos contaminados.

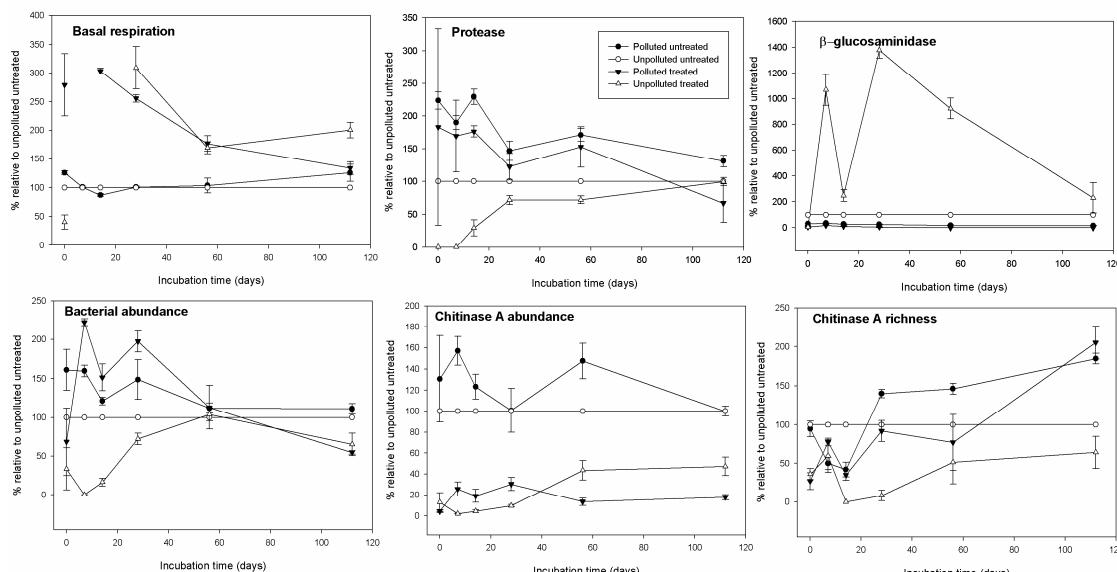


Figura 1: Respuesta temporal de los parámetros analizados frente al tratamiento de pérdida de biodiversidad

##### **Interacción entre la contaminación y la deposición de nitrógeno**

Como consecuencia de la adición de N, los suelos contaminados mostraron valores más altos de actividad proteasa y valores más bajos de actividad  $\beta$ -glucosaminidasa, respecto a los suelos no contaminados.

Sin embargo, en general, no se observaron efectos derivados de la aplicación del tratamiento de deposición de nitrógeno en los parámetros medidos. Únicamente, en los suelos no contaminados se observó un aumento inicial de la abundancia del gen quitinasa A, que se recuperó para la finalización del periodo de incubación.

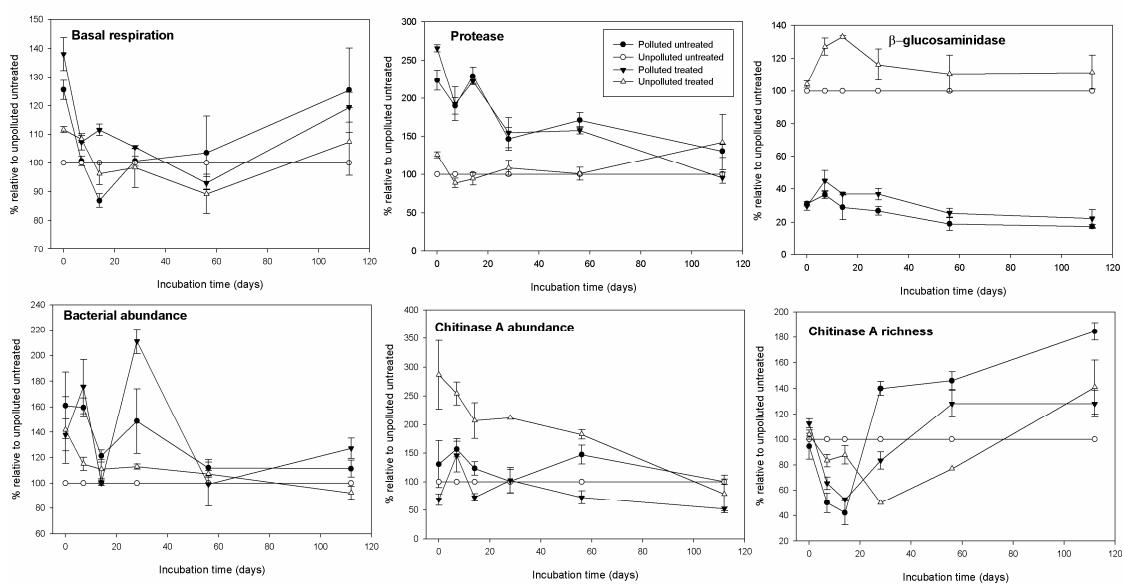


Figura 2: Respuesta temporal de los parámetros analizados frente al tratamiento de deposición de nitrógeno

### Interacción entre la contaminación y el cambio climático

En este caso, se observó un aumento inicial en la respiración basal del suelo no contaminado que se recuperó para la cuarta semana de incubación.

Los suelos contaminados mostraron valores más altos de actividad proteasa y abundancia bacteriana y valores más bajos de actividad  $\beta$ -glucosaminidasa, respecto a los suelos no contaminados, pero ningún suelo se vio afectado por la aplicación del tratamiento en estos parámetros.

Al contrario, la abundancia y la riqueza del gen chitinas A se redujeron (especialmente en el suelo no contaminado) a raíz de la aplicación del tratamiento de cambio climático.

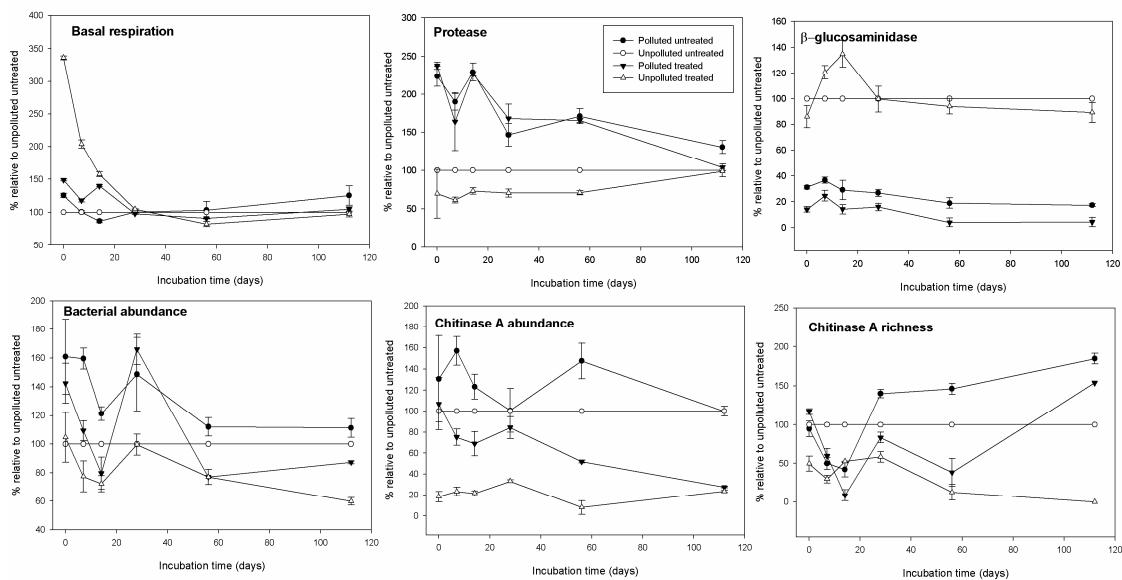


Figura 3: Respuesta temporal de los parámetros analizados frente al tratamiento de cambio climático

## 5. CONCLUSIONES

- ✓ Los suelos contaminados y no contaminados mostraron patrones variables en la mayoría de los parámetros estudiados para cada fuente de estrés ambiental. El suelo contaminado se muestra más resistente hacia otras fuentes de estrés ambiental.
- ✓ PÉRDIDA DE BIODIVERSIDAD: el suelo contaminado se muestra resistente (de acuerdo a los parámetros proteasa,  $\beta$ -glucosaminidasa, abundancia bacteriana,

abundancia de quitinasa A y riqueza de quitinasa A) y resiliente (de acuerdo al parámetro de respiración); el suelo no contaminado se muestra resiliente (de acuerdo a los parámetros de respiración, proteasa,  $\beta$ -glucosaminidasa, abundancia de bacterias y riqueza de quitinasa A). En cambio, ninguno de los dos suelos recupera los valores de abundancia de quitinasa A tras la aplicación del tratamiento de pérdida de biodiversidad.

- ✓ DEPOSICIÓN DE NITRÓGENO: ambos suelos son muy resistentes a la deposición de nitrógeno; el suelo no contaminado muestra resiliencia (capacidad de recuperarse) después de un aumento inicial de la abundancia de quitinasa A.
- ✓ CAMBIO CLIMÁTICO: ambos suelos se muestran resistentes al tratamiento de cambio climático de acuerdo a los parámetros de respiración, proteasa,  $\beta$ -glucosaminidasa y abundancia bacteriana, pero no de acuerdo a la abundancia y riqueza del gen chitinasa A (especialmente el suelo no contaminado).
- ✓ Las propiedades microbianas del suelo son muy útiles a la hora de evaluar los efectos combinados de distintas fuentes de estrés ambiental sobre la salud del suelo. Por otra parte, se ha puesto de manifiesto la necesidad de medir varios tipos de propiedades microbianas a la vez, ya que la respuesta obtenida es distinta en cada una de ellas.

### 3. Información científica generada

- Autores: Barrutia O, Artetxe U, Hernández A, Olano JM, García-Plazaola JI, Garbisu C, Becerril JM

Título: Native plant community growing on an abandoned lead-zinc mining area in northern Spain: implications for phytoremediation and germplasm preservation

Ref. revista: International Journal of Phytoremediation

Clave: A      Volumen: 13    Páginas, inicial: 256      Final:270      Fecha: 2011

- Autores: Soares dos Santos F, Brasil do Amaral-Sobrinho NM, Mazur N, Garbisu C, Barrutia O, Becerril JM

Título: Antioxidative response, phytochelatin production and photoprotective pigments composition of *Brachiaria decumbens* Stapf plants exposed to Cd and Zn

Ref. revista: Quimica Nova

Clave: A      Volumen: 34    Páginas, inicial:16      Final:24      Fecha: 2011

- Autores: Muñoz-Leoz B, Ruiz-Romera E, Antigüedad I, Garbisu C

Título: Tebuconazole application decreases soil microbial biomass and activity

Ref. revista: Soil Biology and Biochemistry

Clave: A      Volumen: 43 Páginas, inicial:2176      Final:2183      Fecha: 2011

- Autores: Barrutia O, Garbisu C, Epelde L, Sampedro MC, Goicolea MA, Becerril JM

Título: Plant tolerance to diesel minimizes its impact on soil microbial characteristics during rhizoremediation of diesel-contaminated soils

Ref. revista: Science of the Total Environment

Clave: A      Volumen: 409 Páginas, inicial:4087      Final:4093      Fecha: 2011

- Autores: Garbisu C, Alkorta I, Epelde L

Título: Assessment of soil quality using microbial properties and attributes of ecological relevance

Ref. revista: Applied Soil Ecology

Clave: A      Volumen: 49 Páginas, inicial: 1      Final:4      Fecha: 2011

● Autores: Muñoz-Leoz B, Garbisu C, Antigüedad I, Ruiz-Romera E  
Título: Fertilization can modify the non-target effects of pesticides on soil microbial communities  
Ref. revista: Soil Biology and Biochemistry  
Clave: A Volumen: aceptado Páginas, inicial: Final: Fecha: 2012

● Autores: Gómez-Sagasti M, Alkorta I, Becerril JM, Epelde L, Anza M, Garbisu C  
Título: Microbial monitoring of the recovery of soil quality during heavy metal phytoremediation  
Ref. revista: Water, Air & Soil Pollution  
Clave: A Volumen: aceptado Páginas, inicial: Final: Fecha: 2012

● Autores: Epelde L, Martín I, Blanco F, Larrabide V, Gómez-Sagasti MT, Albiz P, Garbisu C  
Título: How does the interaction between pollution and other sources of environmental stress affect soil health?  
Tipo de participación: Póster  
Congreso: Ecology of Soil Microorganisms: Microbes as Important Drivers of Soil Processes  
Publicación: Libro de Resúmenes  
Lugar de celebración: Praga (República Checa)  
Fecha: 27 Abril-1 Mayo 2011

#### 4. Actividades de formación y transferencia realizadas

- *El suelo, abramos la caja negra*, Café Científico Eureka Café, Hika Ateneo Bilbao. 22 Marzo 2011. Entrevista en Radio Euskadi el día anterior (21 marzo 2011) en el programa “La Casa de la Palabra” del periodista Roge Blasco sobre esta conferencia. Entrevista: <http://www.eitb.com/es/audios/radio-euskadi/programas/la-casa-de-la-palabra/detalle/623185/secretos-mediterraneo/>.
- *Transferencia de Resultados de Proyectos – Departamento de Ecosistemas*, Jornada NEIKER-Tecnalia y DMAPTAP del Gobierno Vasco, NEIKER-Arkaute. 1 Abril 2011.
- *BERRILUR. Una forma de trabajar para velar por la salud del suelo*, V Foro Comunidades Autónomas. Suelos Contaminados, Hotel Carlton, Bilbao. 28 Junio 2011.
- Entrevista en Radio Euskadi (20 septiembre 2011) en el programa “La Mecánica del Caracol”, entrevistadora: Eva Caballero, sobre la importancia del suelo y la problemática de su contaminación y remediación. Entrevista: <http://www.eitb.com/es/audios/detalles/740428/tormentas-polvo-importancia-biologica-suelo/>.
- Los resultados del proyecto han sido presentados en los siguientes Másteres de la UPV/EHU:

Contaminación y Toxicología Ambientales

Biodiversidad, Funcionamiento y Gestión de Ecosistemas

Microbiología y Salud

Agrobiología Ambiental

## **5. Desviaciones con respecto a la memoria del proyecto**

No ha habido desviaciones reseñables con respecto a la memoria del proyecto.