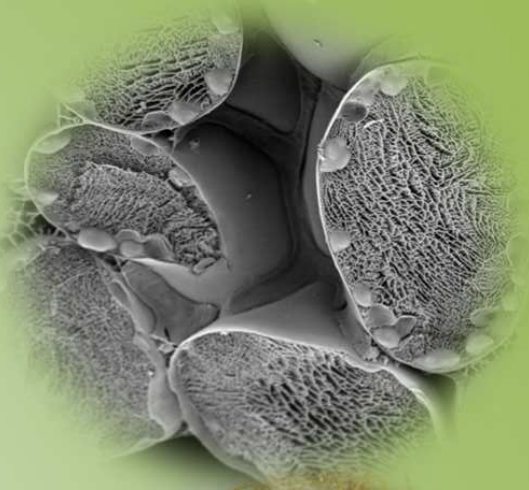


# Responses shown by plant populations to real settings of polluted soils: an ecological approach to remediation

M<sup>a</sup> Jesús Gutiérrez Ginés

TESIS DOCTORAL  
2013



 **CSIC**

 **Universidad  
de Alcalá**

Departamento de Ciencias de la Vida



Ana Jesús Hernández Sánchez, Profesora Emérita del Departamento de Ciencias de la Vida, de la Universidad de Alcalá,

Jesús Pastor Piñeiro, "Investigador vinculado ad honorem" del Museo Nacional de Ciencias Naturales, CSIC,

HACEN CONSTAR:

Que el trabajo descrito en la presente memoria, titulado "Responses shown by plant populations to real settings of polluted soils: an ecological approach to remediation", ha sido realizado bajo su dirección por María Jesús Gutiérrez Ginés en el Departamento de Ciencias de la Vida de la Universidad de Alcalá, dentro del Programa de Doctorado "Ecología, Conservación y Restauración de Ecosistemas" (D330), reuniendo todos los requisitos necesarios para su aprobación como Tesis Doctoral.

Alcalá de Henares, 6 de junio de 2013

Dra. Ana Jesús Hernández Sánchez  
Directora de la tesis

Dr. Jesús Pastor Piñeiro  
Codirector de la tesis



Gonzalo Pérez Suárez, Director del Departamento de Ciencias de la Vida de la Universidad de Alcalá,

hace constar:

que el trabajo descrito en la presente memoria, titulado "Responses shown by plant populations to real settings of polluted soils: an ecological approach to remediation", ha sido realizado dentro del Programa de Doctorado "Ecología, Conservación y Restauración de Ecosistemas" (D330), reuniendo todos los requisitos necesarios para su aprobación como Tesis Doctoral, por acuerdo del Consejo de Departamento celebrado el día 13 de Junio de 2013.

Alcalá de Henares, 13 de Junio de 2013.

Dr. Gonzalo Pérez Suárez



# Responses shown by plant populations to real settings of polluted soils: an ecological approach to remediation

Memoria presentada para optar al grado de Doctora por la  
Universidad de Alcalá

Programa de doctorado:

“Ecología, Conservación y Restauración de Ecosistemas” (D330)

M<sup>a</sup> Jesús Gutiérrez Ginés

Directora: Dra. Ana Jesús Hernández Sánchez

Co-director: Dr. Jesús Pastor Piñeiro

Alcalá de Henares, Junio de 2013



## *Ítaca*

Cuando emprendas tu viaje hacia Ítaca  
debes rogar que el viaje sea largo,  
lleno de peripecias, lleno de experiencias.  
No has de temer ni a los lestrigones ni a los cíclopes,  
ni la cólera del airado Posidón.

Nunca tales monstruos hallarás en tu ruta  
si tu pensamiento es elevado, si una exquisita  
emoción penetra en tu alma y en tu cuerpo.

Los lestrigones y los cíclopes  
y el feroz Posidón no podrán encontrarte  
si tú no los llevas ya dentro, en tu alma,  
si tu alma no los conjura ante ti.

Debes rogar que el viaje sea largo,  
que sean muchos los días de verano;  
que te vean arribar con gozo, alegremente,  
a puertos que tú antes ignorabas.

Que puedas detenerte en los mercados de Fenicia,  
y comprar unas bellas mercancías:  
madreperlas, coral, ébano, y ámbar,  
y perfumes placenteros de mil clases.

Acude a muchas ciudades del Egipto  
para aprender, y aprender de quienes saben.  
Conserva siempre en tu alma la idea de Ítaca:  
llegar allí, he aquí tu destino.

Mas no hagas con prisas tu camino;  
mejor será que dure muchos años,  
y que llegues, ya viejo, a la pequeña isla,  
rico de cuanto habrás ganado en el camino.

No has de esperar que Ítaca te enriquezca:  
Ítaca te ha concedido ya un hermoso viaje.

Sin ellas, jamás habrías partido;  
mas no tiene otra cosa que ofrecerte.

Y si la encuentras pobre, Ítaca no te ha engañado.  
Y siendo ya tan viejo, con tanta experiencia,  
sin duda sabrás ya qué significan las Ítacas



## Agradecimientos

Son la doctoranda y sus directores quienes firman la memoria de la Tesis, pero detrás de este documento, está también el trabajo de muchísimas personas sin las cuales llegar a hasta aquí no habría sido posible, o por lo menos, habría sido mucho más difícil. Por fin llega el momento de escribir estas líneas y no sé ni por dónde empezar, así que lo haré por el principio, o casi.

El Departamento de Ecología (todavía llamado así por aquel entonces) ya era bastante conocido por los alumnos de Ambientales, pero cuando decidí emprender el viaje de la tesis una de las primeras personas a las que debía ver era a Ana Guerrero, secretaria del Departamento. No es casualidad que también haya sido una de las últimas a las que he tenido que pedir ayuda. Muchas gracias por estar siempre atenta y “cuidando” de nosotros. La segunda persona era Lorenzo, quien debía encargarse de facilitarme todo el soporte necesario; gracias por tu ayuda y tu paciencia cuando nada funciona. Después, todos los profesores que, de una u otra manera han contribuido a mi formación, especialmente al Dr. Julio Camargo y al Dr. José Vicente de Lucio por haberme permitido colaborar con ellos en las clases prácticas de “Ecotoxicología”, “Toxicología Ambiental y Salud Pública” y “Educación Ambiental”.

Puesto que la práctica totalidad de la parte experimental se llevó a cabo en el Centro de Ciencias Medioambientales del CSIC (todavía llamado así por aquel entonces), las siguientes personas a las que debía conocer eran todos los técnicos de laboratorio y personal de apoyo, quienes serían una parte fundamental de este trabajo. Su dedicación ha sobrepasado muchas veces lo puramente profesional. Tengo que agradecer a Pilar Carmona su organización en el caos de las miles de muestras; a M<sup>a</sup> José Villoslada su ayuda en la preparación de muestras y en las medidas con Mastersizer, siempre dispuesta a echar una mano en el trabajo y en lo que no lo era (cuántos cafetitos liberadores de estrés). Fue Irene Ranz con quien se puso a punto la “pistola de rayos X”, con ella he compartido semanas y meses (muchos). Gracias a las tres por vuestro trabajo y vuestra amistad. Ha sido inestimable también el trabajo y la paciencia (sobre todo paciencia) de Octavio Cedenilla, Luis Cuadra y Elena Fernández, quienes han realizado todas las determinaciones químicas de las muestras. Agradezco también la colaboración de Elisa Garzo, responsable de Ambientes Controlados (ICA); de Fernando Pinto, técnico del LTSEM (ICA); de Alberto García y Marta Furió, Microscopía Electrónica del MNCN. Tengo que agradecer a Sofía Hernández su ayuda en la preparación de tantas y tantas muestras de plantas, y a Víctor Pastor que se ofreció a moler suelos en los momentos más necesarios.

Durante el viaje he llegado a muchos puertos, muchos de ellos insospechados. Many thanks to Dr. Jaco Vangronsveld for welcoming me in the Centre for Environmental Sciences, Hasselt University (Belgium), where I learnt how to work with endophytes. I am very grateful for all I learnt during my three month stay there, which was a result of Jaco's advice and the tireless supervision of Dr. Nele Weyens and all students of the Center. They helped me cheerfully with all my doubts, and were always ready to teach me a bit more. Thank you, Michelle, Sara, Sacha, especially Sofie and Panos.

Todo lo que empezó en Hasselt, continuó en el Departamento de Microbiología de la Universidad de Alcalá (actualmente Dpto. de Ciencias Biomédicas). Fue la Dra. M<sup>a</sup> Isabel Pérez-Leblic quien colaboró en el trabajo con las bacterias endófitas. Con gran interés y dedicación, siempre sacaba tiempo para ayudarme, resolver todas las dudas y superar todas las dificultades, que no han sido pocas. Mil gracias.

Ha sido fundamental también la ayuda de la Dra. Carmen Bartolomé en la determinación de muchas especies vegetales. Muchas gracias.

Recuerdo las semanas que pasé en el Departamento de Geología y Geoquímica de la Universidad Autónoma de Madrid, donde aprendí y realicé las extracciones secuenciales con la ayuda y supervisión de la Dra. Ana M<sup>a</sup> Álvarez.

I will never forget my short stay at Fish, Wildlife and Conservation Biology Department, Colorado State University. Dr. William Clemens received me in his laboratory (and his home) with great enthusiasm, and counted on me for every activity, even before my arrival. Thanks to him and to Pete Cadmus, I got to learn how to work in community ecotoxicology of aquatic ecosystems. I will not forget those great discussions about what had to be improved in our subject methodologies. It is very unlikely that someone could learn as much as I did in such a short time. Many thanks to Justin, Henry and to families Clements-Hammerdorfer and Cadmus for being my own.

Gracias a Ana Burton por su gran profesionalidad en la corrección de los artículos en inglés, y también a Álvaro Álvarez, sobre todo en los momentos en los que las correcciones hacían falta para ayer.

Y a Eugenio Molina, por su ayuda con ArcMap, para realizar esos preciosos mapas de distribución de contaminantes.

No me olvido de Ángel Mínguez, con quien hemos llevado a cabo muchas actividades con gran ilusión. Gracias por ayudarnos a "experimentar" con tus alumnos del Colegio Santa Cruz (Guadalajara) todas las actividades educativas sobre contaminación de suelos. Del mismo modo, al Centro Cultural Poveda (Sto.

Domingo), donde me embarqué en la investigación didáctica de temas medioambientales.

Todo este trabajo se ha podido realizar gracias a la financiación que he recibido, primero de la beca de Formación de Personal Investigador de la Universidad de Alcalá (marzo-diciembre 2009), y posteriormente de la beca de Formación de Profesorado Universitario del Ministerio de Educación (AP2008-02934). Gracias a esta última se han podido realizar las dos estancias breves (Bélgica y EE.UU). Todo el trabajo experimental ha sido financiado por el proyecto CTM 2008-04827/TECNO del Ministerio de Ciencia e Innovación y el Programa EIADES de la Comunidad de Madrid (P2009/AMB-1478).

Unas líneas especiales para mi familia y amigos que me han apoyado y me han sufrido. Gracias a mis padres y a mi Abue siempre pacientes y comprensivos; sobre todo a mi madre, que ha querido ser parte de esta tesis recogiendo experimentos, yendo a vertederos o lo que fuera necesario; y a Miguel, que accedía pacientemente a regar a horas intempestivas, cargar con muestras de suelos o cualquier otro trabajo aburrido. A mi hermano y Almudenita, que siempre han sabido cómo animarme en los momentos más difíciles. Y a todos mis amigos/os y compañeras/os “eco-geo-físicos” por todos los buenos momentos y los malos también.

Gracias a todos.

En contra de todo lo establecido, dejo a mis directores para el final, porque mis agradecimientos a ellos trascienden esta tesis. Todo este viaje empezó hace más de 8 años, cuando con motivo de la beca de Excelencia de la CM contacté con Ana Jesús para participar en un proyecto de Educación Ambiental. Como resultado de ese trabajo, Ana Jesús “me mandó” al Congreso Internacional de Educación Ambiental en Granada. Yo estaba tan sorprendida que mi respuesta fue: “¿pero cómo voy a ir?, yo no puedo presentar ese trabajo”. Su respuesta en aquel momento indica perfectamente lo que ha sido una gran dedicación por su parte a lo largo de todos estos años: “pero ¿cómo no vas a poder?, anda, anda”. Y es que, desde entonces Ana Jesús y Jesús me han animado a seguir adelante con todo lo que nos proponíamos, siempre positivos y optimistas, siempre exigiendo más porque confiaban en que yo sería capaz. Su capacidad para manejar situaciones difíciles ha sido fundamental en muchos momentos de gran presión durante la tesis. Han sido muchos años en los que mi formación ha sido y sigue siendo una prioridad para ellos y de lo que me siento tremendamente agradecida. Gracias a los dos por vuestra confianza y vuestra entrega.

## Contents

---

ABSTRACT - RESUMEN	i-iv
Capítulo 1. Introducción	1
Chapter 2. Assessment of field portable X-ray fluorescence spectrometry for the <i>in situ</i> determination of heavy metals in soils and plants	9
Chapter 3. Implementing the “Gauss Peak Spectra” fitting method to assess the combined effects of heavy metals on the chlorophylls of plants growing in polluted soils	33
Chapter 4. Integrated approach to assessing the effects of soils polluted with heavy metals on a plant population	51
Capítulo 5. Metodología de estudio para la revegetación de vertederos de residuos sólidos urbanos sellados con suelo	81
Chapter 6. Phytoremediation of co-polluted soils by organic compounds and heavy metals: bioassays with <i>Lupinus luteus</i> L. And associated endophytic bacteria	135
Chapter 7. Contents of heavy metals and trace elements in native plant species growing in abandoned mine sites: tolerant species and accumulator species in polluted soils	165
Chapter 8. Phytostabilization of heavy metals by the root systems of grassland communities growing at abandoned mine sites	191
Chapter 9. General conclusions – Conclusiones generales	217
Anexo: Transferencias de resultados a la docencia	227

*La presente Tesis Doctoral está escrita en formato bilingüe para aspirar a la Mención Internacional*



# Responses shown by plant populations to real settings of polluted soils: an ecological approach to remediation

## ABSTRACT

This research is based on sites with sealed urban waste landfills in Community of Madrid, grouped by different lithologies (granites and gneisses, arkosic substrates - Madrid facies -, limestone and marl) and sites with abandoned mines of Central Iberian Peninsula. The research group supporting my project had a large database of these scenarios with polluted soils, which was a valuable background that led to the objectives of this thesis:

(i) optimize various analytical techniques of soil pollutants and their effect on grass plants and integrate them in different levels of biological organization; (ii) systematize available information regarding urban landfills sealed with soil from their surroundings and plant populations that have been colonizing them for 30 years, aimed towards the revegetation of these systems; (iii) analyze heavy metals and organic pollutants in topsoil layers of ecosystems located on referred sites and relate them with native plant populations adapted to pollution (tolerant species, metal accumulators and hyperaccumulators); (iv) conduct a set of bioassays in microcosms and greenhouse for remediation (phytoaccumulation, phytostabilization and biodegradation) of polluted soils collected from referred sites.

Hard work was necessary to achieve those objectives: field sampling and preparation of samples for analysis, greenhouse bioassays, application of methods for data analysis, knowing how to adjust them at each scenario. However, the results are provided in an integrated way and presented in chapters that correspond to articles published or to be published in scientific journals (some of them submitted or under review). Additionally, an annex is included to present publications related to transference of the results to education and teaching.

Although the methodology integrates analytic insights with those more holistic, it is evident that the advance in the study of addressed issues exposes gaps that need further work. Thus, this research opens up possibilities for future research. However, we highlight the following conclusions.

Field portable X-ray fluorescence has proved to be very effective for detecting *in situ* and reliably heavy metals and trace elements in soils and plants, thus it is interesting in screening research of sites with potentially polluted soils. Much quantitative data is exposed: topsoil layer pollutants that affect plant populations (heavy metals, trace elements, Al, chlorides, sulfates, nitrates and nitrites, hydrocarbons, polycyclic aromatic hydrocarbons, polychlorinated biphenyls, pesticides and other organochlorinated compounds, phenols and volatile compounds); heavy metals and trace elements taken up

by plant species growing in sites with polluted soils; underground phytomass grown in them.

Most of analyzed plant species, especially those of Poaceae family, are tolerant to more than one heavy metal at a concentration higher than accepted levels (Cu, Zn, Pb and As). Only *Agrostis castellana* resulted to be hyperaccumulator of Cu, Zn and Pb. On the other hand, some endophyte strains with plant growth promoting capacity and tolerant to benzo(a)pyrene and other organics (diesel and commercial mixtures of PCBs) were isolated. These results are interesting for **phytoremediation** and **bioremediation** of polluted soils. Likewise, the combined contribution of perennial herbaceous species with rhizomes and species of Poaceae family to **phytostabilization** of soil heavy metals was assessed. The accumulation of metals by root systems is related to metal concentration in the first centimeters of soil, being higher for Zn, Cu, Cd and Mn.

Finally, many of the followed protocols are considered interesting for ecotoxicological assessment of sites with polluted soils, as well as for risk analysis.

# **Respuestas de poblaciones vegetales a los principales casos de suelos contaminados: técnicas de remediación con enfoque ecológico**

## **RESUMEN**

La investigación realizada está referida a emplazamientos con vertederos de residuos sólidos urbanos clausurados en la Comunidad de Madrid, agrupados en diferentes litologías (granitos y gneis, substratos arcósicos -facies Madrid-, calizas y margas) y a los emplazamientos con minas abandonadas situadas en la zona centro de la Península Ibérica. El banco de datos relativos a dichos escenarios con suelos contaminados del que disponía el grupo de investigación que acogía nuestra incorporación al trabajo, resultaba un rico antecedente que nos condujo a proponernos los objetivos que hemos pretendido alcanzar en esta tesis:

(i) poner a punto diversas técnicas analíticas de contaminantes del suelo y para sus efectos en plantas herbáceas y poder ser integradas a distintos niveles de su organización biológica; (ii) sistematizar la información disponible en relación a vertederos VRSU sellados con suelo de los respectivos entornos donde se ubican, a partir de las poblaciones vegetales que los han ido colonizando en los últimos 20 años pero dirigida hacia la revegetación de estos sistemas; (iii) analizar los metales pesados y los contaminantes orgánicos en la capa superficial edáfica de ecosistemas ubicados en los emplazamientos referidos y relacionarlos con poblaciones vegetales autóctonas adaptadas a la contaminación (especies tolerantes, acumuladoras e hiperacumuladoras de metales; (iv) realizar en microcosmos y en ambientes controlados, una batería de bioensayos de remediación (fitoacumulación, fitoestabilización y biodegradación) en suelos contaminados recogidos en los emplazamientos aludidos.

Es fácil deducir el mucho trabajo realizado para alcanzar los objetivos aludidos, tanto de recogida de muestras de campo, como de su correspondiente preparación para análisis, así como los ensayos en invernadero, o la aplicación de métodos de tratamiento numérico de los datos, sabiendo ajustarlos a cada uno de los escenarios de estudio. No obstante, los resultados obtenidos son contemplados de forma integrada y se presentan en capítulos que responden a la publicación de los mismos en diferentes revistas científicas (algunos de ellos en fase de envío y/o revisión). Así mismo, se muestra en un Anexo otras publicaciones concernientes a la transferencia de resultados a la docencia.

Aunque la metodología utilizada integra visiones analíticas concretas con aquellas más holísticas, se reconoce que, a medida que avanzamos en el conocimiento de la temática abordada, se presentan lagunas que deben seguirse trabajando. Así pues, el estudio abordado deja posibilidades abiertas a la investigación futura. No obstante destacamos las siguientes conclusiones.



La fluorescencia de rayos-X portátil se ha revelado muy eficaz para detectar *in situ* y de forma fiable, metales pesados y elementos traza de suelos y plantas, por lo que resulta eficaz en la investigación preliminar de emplazamientos con suelos potencialmente contaminados. Se muestran muchos datos de tipo cuantitativo referidos tanto a la contaminación de la capa superficial edáfica que afectan a las poblaciones vegetales que se desarrollan en ella (metales pesados, elementos traza, aluminio, cloruros, sulfatos, nitratos y nitritos, hidrocarburos totales, hidrocarburos aromáticos policíclicos, bifenilos policlorados, insecticidas y otros compuestos organoclorados, fenoles y compuestos orgánicos volátiles), como a datos cuantitativos respecto a los metales que son absorbidos por las especies vegetales que se ubican en emplazamientos con suelos contaminados, además de datos respecto a la fitomasa subterránea que puede desarrollarse en ellos.

Una gran mayoría de las especies analizadas, especialmente de la familia Poáceas son tolerantes a más de un metal presente en el suelo por encima de sus niveles aceptados, (Cu, Zn, Pb y As). Solamente una especie, *Agrostis castellana*, se ha revelado como hiperacumuladora de Cu, Zn y Pb. Por otro lado, se han obtenido algunas cepas bacterianas endofitas que demuestran capacidad de incentivar el crecimiento de las plantas y tolerar BaP y otros contaminantes orgánicos (gasoil y mezclas comerciales de PCBs). Estos resultados son de interés tanto para la **fitorremediación** como para la **biorremediación** de suelos contaminados. Así mismo, valoramos la contribución conjunta de especies herbáceas perennes y con rizomas, así como la de Poáceas a la **fitoestabilización** de metales en suelos contaminados. La acumulación de metales absorbidos por los sistemas radiculares está relacionada con la concentración de ellos en los primeros cm del suelo, siendo mayor para el Zn, Cu, Cd y Mn.

Finalmente, decir que muchos de los protocolos seguidos para la obtención de resultados, son considerados de interés para la evaluación ecotoxicológica emplazamientos con suelos contaminados, así como también para aplicar al análisis de riesgos.

# Capítulo 1

---

## Introducción





## **Introducción**

### **1. Motivaciones para esta investigación**

El proyecto de tesis doctoral que ahora presentamos nació de una amplia experiencia de trabajo de campo en escenarios reales con suelos contaminados, adquirida por el equipo interdisciplinar al que me fui incorporando desde 2008, al comenzar trabajando con el mismo con motivo de una beca de iniciación a la investigación concedida por la Universidad de Alcalá. Desde entonces nos ha interesado progresar en todo aquello relacionado con emplazamientos que tienen suelos contaminados, algunos de ellos ubicados en zonas de gran valor ecológico, tanto para nuestro país como para otros enclaves latinoamericanos. Por otra parte, nuestra incorporación al amplio grupo de investigadores del Programa EIADES “Tecnologías de evaluación y recuperación de emplazamientos contaminados” de las dos convocatorias de Programas de I+D en Tecnologías, de la Comunidad de Madrid, (Ref. P2009/AMB-1478), mediante la beca referida anteriormente, (Programa en el que seguimos vinculada en la actualidad), así como la participación en el proyecto “Estudio de suelos contaminados mediante nuevas tecnologías. Remediación para diferentes modelos de contaminación” (CTM 2008-04827/TECNO, del Ministerio de Ciencia e Innovación), y la beca de FPU disfrutada, han resultado decisivos para nuestra investigación.

Entre las razones por las cuales consideramos pertinente continuar la investigación en esta temática, responde a la gran cantidad de suelos contaminados existentes en España, y que no son reconocidos como tales por las diferentes administraciones, que prácticamente los han ignorado (CM, 2006), lo que se traduce en un funcionamiento deficiente de los ecosistemas allí ubicados y en la existencia de unos niveles nocivos de metales (Cd, As, Cu, Cr, Pb, Zn, Ni), para los seres vivos, de los que no se tiene constancia y cuya importancia desconocen. La presencia de alguno o varios contaminantes, reduce significativamente la calidad de los suelos y sus posibilidades para usos de carácter selectivo (zonas verdes o agrícolas, habitacionales, hospitales, escuelas). Muchos de estos suelos no tienen responsables solventes, que puedan pagar por la detección de los problemas de contaminación y por su limpieza, ya que pertenecen a pequeños propietarios o a los ayuntamientos.

Por otra parte, es de urgente necesidad que algunos países latinoamericanos (como República Dominicana, escenario de mi proyecto fin de carrera), y otros de la Europa del Este, así como países con economías emergentes, puedan incorporar estos conocimientos, debido a que presentan este tipo de problemática en enclaves de interés ecológico (como reservas de la biosfera), o de importancia industrial (obtención y/o aplicación de minerales), o de uso predominantemente agrícola. El medio ambiente no entiende de fronteras nacionales o europeas, sino que resulta un fenómeno verdaderamente mundial.

## **2. Fase de investigación previa: escenarios seleccionados para este estudio y revisión de técnicas para la evaluación de las respuestas de las plantas a suelos contaminados**

Emplazamientos con vertederos de residuos sólidos urbanos clausurados en la Comunidad de Madrid, agrupados en diferentes litologías (granitos y gneis, substratos arcósicos -facies Madrid-, calizas y margas) y emplazamientos con minas abandonadas situadas en la zona centro de la Península Ibérica, fueron elegidos para la investigación. El banco de datos relativos a dichos escenarios que disponía el grupo de investigación que acogía nuestra incorporación al trabajo, resultaba un rico antecedente donde comenzar a rastrear información pertinente y contextualizada. De esta fase podemos sintetizar las cuestiones que exponemos a continuación.

La contaminación de suelos produce una degradación de los mismos que conlleva una disminución de la producción de biomasa y del reciclaje de nutrientes, afectando pues a los ecosistemas. El impacto en los mismos está ligado a su biodisponibilidad por parte de la componente autótrofa. Los trabajos relativos a esta temática suelen basarse solo en análisis químicos de plantas y suelos, o en la medida de la biomasa de las plantas como parámetro evaluador de la toxicidad (Cala et al., 1986; Gutiérrez et al., 1997; Ebbs and Kochian, 1998; Ebbs and Kochian, 1998; Lombi et al., 2001; Conde et al., 2008; Hernández-Allica *et al.*, 2008; Millán y Lobo, 2008; Shams *et al.*, 2010 y Su *et al.*, 2010; Adesodun *et al.*, 2010). En general, suelen quedarse en experimentos de invernaderos y cámaras de crecimiento, con ensayos bastante limitados en el tiempo y en donde se sólo se evalúa el efecto de un solo metal pesado en una especie concreta. En la mayor parte de los casos son utilizados

cultivos hidropónicos y, por lo general, no son utilizados microcosmos con suelos de escenarios reales. Sin embargo, es relativamente frecuente encontrarnos con un emplazamiento en el que haya más de un metal en el suelo y que varios ecosistemas del mismo estén afectados por este tipo de contaminación (Hernández et al., 2009).

Las técnicas más comúnmente utilizadas para evaluar la acción de contaminantes del suelo en las plantas hoy están consideradas desde el punto de vista de lo que se denominan las técnicas de fitorremediación. Prácticamente no hay estudios de revegetación en los escenarios con vertederos aludidos, y son escasos respecto a la restauración de emplazamientos con minas abandonadas en el territorio aludido, aunque comienzan a aparecer en otras zonas de nuestro país. Además, se desconoce prácticamente el comportamiento de una población vegetal concreta sometida a la acción múltiple de varios contaminantes en el suelo donde se ubica.

A la vista de toda la información consultada, percibimos la exigencia de combinar estudios de campo con experimentación en ambientes controlados, así como aplicar técnicas analíticas que en la actualidad fuese más respetuosas con el medio ambiente. Así mismo, para que el avance en la caracterización de la contaminación de los suelos y sus posibles impactos en la componente autótrofa de los sistemas en orden a la fitorremediación basada en principio ecológicos, era preciso tener información acerca de comunidades vegetales de referencia, además de no perder de vista la idea de poder restaurar la multifuncionalidad de las comunidades vegetales, es decir su fertilidad (Hernández y Pastor, 2008 a).

Toda la temática se articula actualmente con muchas de las dimensiones de la sostenibilidad (no solo de los recursos naturales como son los suelos y las especies vegetales de emplazamientos contaminados, sino con las aguas superficiales y subterráneas de los entornos de los mismos), así como con aspectos ligados a la salud animal y humana por posibles ecopatologías. La salud de ecosistemas podría haber sido el marco conceptual donde cabrían pues las cuestiones que en la actualidad se consideran vinculadas a muchos aspectos del desarrollo sostenible (Bunger & Gochfeld, 2001; Edwards, 2002; Friis, 2007; Hernández y Pastor, 2007 y 2008 b; Hernández et al., 2009). Y pensamos que también pueden encaminarse a la temática del “cambio global” en la mentalidad de muchos investigadores que, de una u otra forma, siguen refiriéndose a temas de recuperación de suelos

contaminados con visiones muy parciales o reduccionistas. Con toda probabilidad la ecología, como una de las ciencias de enfoques integrados, puede aportar un marco referencial en la investigación que se pretende realizar (Rapport et al., 1995 y 2003; Jensen et al., 2000; Bunger and Gachfeld, 2001; Pastor y Hernández, 2007; Hernández y Pastor 2008 a; Rufo y de la Fuente 2010).

### **3. Objetivos que se pretenden alcanzar**

- Poner a punto diversas técnicas analíticas de contaminantes del suelo y sus efectos en planta: la fluorescencia de rayos X portátil, la determinación de clorofilas de plantas vasculares afectadas por metales pesados del suelo mediante el método "Gauss Peak Spectra", la aplicación de técnicas microbiológicas para el aislamiento y cultivo de bacterias endófitas, la determinación de la distribución de metales en diferentes tejidos vegetales mediante microanálisis SEM-EDS y la representación espacial de contaminantes en un emplazamiento mediante Sistemas de Información Geográfica (ArcMap).

- Sistematizar la información disponible en relación a vertederos VRSU sellados con suelo de los respectivos entornos donde se ubican en la Comunidad de Madrid, a partir de las poblaciones vegetales que los han ido colonizando en los últimos 20 años pero dirigida hacia la revegetación de estos sistemas.

- Analizar los metales pesados y los contaminantes orgánicos en la capa superficial edáfica de ecosistemas (pastos fundamentalmente y herbazales), ubicados en diferentes sustratos de la zona centro de la Península Ibérica en los siguientes emplazamientos: antiguos vertederos de residuos clausurados mixtos, escombreras de residuos industriales y emplazamientos de minas abandonadas, y conocer poblaciones vegetales autóctonas adaptadas a la contaminación, susceptibles o no de dejar pasar los contaminantes a la red trófica (especies tolerantes, acumuladoras e hiperacumuladoras de metales).

- Abordar la temática de las relaciones suelos contaminados-respuestas de especies herbáceas vasculares a diferentes escalas desde la integración de resultados provenientes de la cuantificación de parámetros tanto a nivel de individuo (planta entera), los obtenidos mediante el análisis químico de sus órganos principales (raíz y parte aérea), así como los que proporciona la aplicación de la microscopía electrónica a nivel tisular y celular.

- Realizar en microcosmos y en ambientes controlados, una batería de bioensayos de remediación (fitoacumulación, fitoestabilización y biodegradación) en suelos contaminados recogidos en origen, según los casos de contaminación frecuentemente encontrados. Se utilizarán, por lo general, especies cultivadas que, además de poder adaptarse a los escenarios de contaminación, soporten otros factores relacionados con la climatología, la erosión y degradación física de los suelos.

- Investigar acerca de la percepción de la gente (estudiantes fundamentalmente), acerca de la contaminación de los suelos y sus efectos en la salud ambiental, mediante la elaboración de instrumentos sencillos y el análisis de sus respuestas, así como diseñar estrategias para insertar esta temática en los currícula docentes.

Es fácil deducir la gran cantidad de trabajo que debe realizarse para alcanzar los objetivos aludidos, tanto de recogida de muestras de campo, como de su correspondiente preparación para análisis, así como los ensayos en invernadero, o la aplicación de métodos de tratamiento numérico de los datos, sabiendo ajustarlos a cada uno de los escenarios de estudio.

#### **4. Esquema de la investigación realizada en la tesis y organización de esta Memoria**

En la figura 1 se muestra de forma integrada tanto el esquema metodológico que se hemos seguido para la consecución de los objetivos aludidos, como la organización de los resultados que se exponen en los capítulos siguientes. Cada uno de los capítulos se vincula a un artículo publicado, aceptado o enviado a una revista científica, pero lo que se respetan los requisitos de sus correspondientes editoriales en relación a estructura y referencias bibliográficas, si bien no mantenemos el texto a dos columnas como corresponde a algunas de las mismas. Además se han añadido los resúmenes en español a cada uno de ellos. Solamente el capítulo 5 se encuentra en vías de preparación para un capítulo de libro, con lo que ponemos su correspondiente guión al comienzo del mismo.



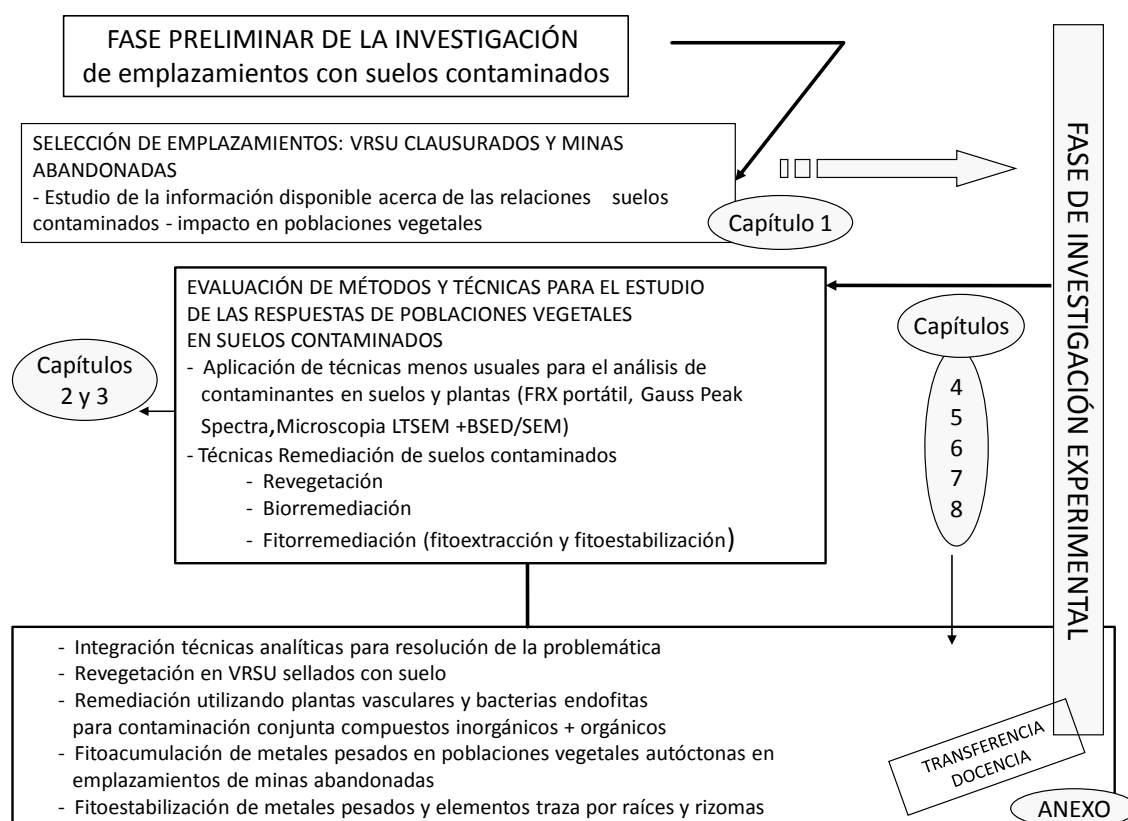


Figura 1

## Referencias bibliográficas

Adesodun JK, Atayese MO, Agbaje TA, Osadiaye BA, Mafe OF, Soretire AA. 2010. Phytoremediation Potentials of Sunflowers (*Tithonia diversifolia* and *Helianthus annuus*) for Metals in Soils Contaminated with Zinc and Lead Nitrates. *Water, Air and Soil Pollution*, 207: 195-201.

Burger J, Gochfeld M. 2001. On developing Bioindicators for Human and Ecological Health. *Environmental Monitoring and Assessment*, 66: 23-46

Cala V, Jiménez Ballesta R, Rodríguez J, Guerra A. 1986. Contribución a la evaluación edáfica de suelos mediante el estudio del comportamiento de diversos metales pesados. *Anales de Edafología y Agrobiología*, XLV, 5-6: 681-696

CM (Comunidad de Madrid). 2006. Plan Regional de Suelos Contaminados (2006-2016) de la Comunidad de Madrid. En: *Estrategias de Residuos de la Comunidad de Madrid (2006-2016)*, Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio. pp. 435-469.

Conde P, Bellido E, Martín Rubí JA, Jiménez Ballesta R. 2008. Concentration and spatial variability of mercury and other heavy metals in surface soil samples of periurban waste

- mine tailing along a transect in the Almadén mining district (Spain). *Environmental Geology*, 56(5): 815-824.
- Ebbs SD, Kochian LV. 1998. Phytoextraction of Zinc by Oat (*Avena sativa*), Barley (*Hordeum vulgare*), and Indian Mustard (*Brassica juncea*). *Environmental Science and Technology*, 32: 802-806.
- Edwards CA. 2002. Assessing the effects of environmental pollutants on soil organisms, communities, processes and ecosystems. *European Journal of Soil Biology*, 38: 225-231.
- Friis RH. 2007. *Essentials of Environmental Health*. Jones and Bartlett Publishers, Boston.
- Gutiérrez A, Navarrete J, Jiménez Ballesta R. 1997. Concentraciones de metales pesados en la vegetación autóctona desarrollada sobre suelos del entorno de una mina abandonada (Sistema ibérico, Bubierca-Zaragoza). *Boletín Geológico y Minero*, 108(1): 69-74.
- Hernández AJ, Pastor J. 2007. Ecosystems health and geochemistry: concepts and methods applied to abandoned mine sites. En: J. Loredó (Ed.) *The 23<sup>rd</sup> International Applied Geochemistry Symposium (IAGS 2007)*, Universidad de Oviedo. pp. 219-231.
- Hernández AJ, Pastor J. 2008 a. La restauración ecológica de ecosistemas degradados: marcos conceptuales y metodologías para la acción. En: R Milán, C Lobo (Eds.) *Contaminación de Suelos. Tecnologías para su Recuperación*, CIEMAT, Madrid. pp. 61-82.
- Hernández AJ, Pastor J. 2008 b. Validated Approaches to Restoring the Health of Ecosystems Affected by Soil Pollution. In: JB Dominguez, F Columbus (Eds.) *Soil Contamination Research Trends*, Nova Science Publishers, Inc., Hauppauge, NY. pp. 51-72.
- Hernández AJ, Gutiérrez-Ginés MJ, Pastor J. 2009. Ecology and health in risk analysis of polluted soils. In: C.A. Brebbia (Ed.) *Environmental Health Risk*, WIT Press, Southampton. pp. 257-268.
- Hernández-Allica J, Becerril JM, Garbisu C. 2008. Assessment of the phytoextraction potential of high biomass crop plants. *Environmental Pollution*, 152: 32-40.
- Jensen ME, Redmond RL, Dibenedetto JP, Bourgeron PS, Goodman IA. 2000. Application of Ecological Classification and Predictive Vegetation Modeling to Broad-Level Assessments of Ecosystem Health. *Environmental Monitoring and Assessment*, 64: 197-212.
- Lombi E, Zhao FJ, Dunham SJ, McGrath SP. 2001. Phytoremediation of Heavy Metal-Contaminated Soils: Natural Hyperaccumulation versus Chemically Enhanced Phytoextraction. *Journal of Environmental Quality*, 30: 1919-1926.
- Millán R, Lobo C (Eds.). 2008. *Contaminación de Suelos. Tecnologías para su Recuperación*. Ed. CIEMAT, Madrid.
- Pastor J, Hernández AJ. 2007. La fitorremediación y la revegetación en suelos en el contexto ecológico. En: *Tecnologías para el Tratamiento de suelos Contaminados. Soil Remediation Technologies*. Ed. Comunidad de Madrid. pp. 100-114.
- Rapport DJ, Gaudet CL, Calow P. 1995. Evaluating and Monitoring the Health of Large Scale Ecosystems. Ed. NATO, ASI Series, vol 128, Springer-Verlag, Berlin. pp. 33-41.

Rapport DJ et al. (Eds.). 2003. *Managing for Healthy Ecosystems*. Ed. Lewis Publishers, U.S.A.

Rufo L, de la Fuente V. *Successional Dynamics of the Climatophile Vegetation of the Mining Territory of the Río Tinto Basin (Huelva, Spain): Soil Characteristics and Implications for Phytoremediation*. *Arid Land Research and Management*, 24 (4): 301 - 327.

Shams, K.M.; Tichy, G.; Fischer, A.; Sager, M.; Peer, T.; Bashar, A. y Filip, K. 2010. Aspects of phytoremediation for chromium contaminated sites using common plants *Urtica dioica*, *Brassica napus* and *Zea mays*. *Plant and Soil*, 328: 175-189.

Su, Y.H.; McGrath, P. y Zhao, F.J. 2010. Rice is more efficient in arsenite uptake and translocation than wheat and barley. *Plant and Soil*, 328: 27-34.

## Chapter 2

---

### Assessment of field portable X-ray fluorescence spectrometry for the *in situ* determination of heavy metals in soils and plants



This chapter reproduces the article accepted for publication:

Gutiérrez-Ginés MJ, Pastor J, Hernández AJ. 2013. *Environmental Science: Processes & Impacts*. DOI:10.1039/C3EM00078H.

## **Assessment of field portable X-ray fluorescence spectrometry for the *in situ* determination of heavy metals in soils and plants**

### **Abstract**

In soil pollution studies, large numbers of soil samples collected at random need to be processed and analyzed to determine their heavy metal contents. This study was designed to assess the use of a field portable X-ray fluorescence (FPXRF) spectrometry system for the *in situ* determination of heavy metal levels in both soil and plant samples. First, we optimised the method using 84 reference soil standards and soil samples from known polluted sites. The optimised method was then used to determine heavy metals at three abandoned mine sites and two sealed landfills in central Spain. Given that knowledge of heavy metal levels in plants is important for the ecotoxicological study of these sites, the FPXRF device was also used to determine heavy metals in plants. Our results indicate the acceptable to high quality of the data provided by the system especially for soil samples. The cost-benefits and sustainability of this instrument in relation to other techniques was also examined. The use of the FPXRF system for the study of potentially polluted sites was found to save on costs, time and materials. Results indicate its suitable use for the preliminary screening of heavy-metal polluted sites.

## **Evaluación de la espectrometría portátil de fluorescencia de rayos-X para la determinación *in situ* de metales pesados en suelos y plantas**

### **Resumen**

En los estudios de contaminación del suelo, es necesario recoger y procesar una gran cantidad de muestras edáficas recogidas al azar para determinar su contenido en metales pesados. El presente trabajo se diseñó para evaluar el uso de un equipo portátil de fluorescencia de rayos-X (FRX-P) para la determinación *in situ* de niveles de metales pesados en suelos y plantas. Primero, el equipo se puso a punto con 84 patrones de suelo así como con muestras de suelo procedentes de un emplazamiento contaminado conocido. Posteriormente, el equipo se usó para analizar los metales pesados del suelo en tres emplazamientos de minas abandonadas y dos vertederos sellados del centro de España. Puesto que el conocimiento de los niveles de metales en plantas es importante para estudios ecotoxicológicos en estos emplazamientos, el equipo de FRX-P se utilizó también para determinar los metales pesados en planta. Los resultados indican que la calidad de las medidas realizadas por el equipo es aceptable a alta, sobre todo en las muestras de suelo. También se ha examinado el balance costes-beneficios así como la sostenibilidad de utilizar este aparato en relación a otras técnicas. El uso del equipo FRX-P para el estudio de emplazamientos con suelos potencialmente contaminados puede suponer un ahorro de costes, tiempo y materiales. Los resultados indican que su uso es apropiado para tareas de investigación preliminar de sitios contaminados por metales pesados.

## 1. Introduction

After many years of characterizing sites with heavy-metal polluted soils (abandoned mines and sealed landfills with high concentrations of Al, Fe, Mn, Zn, Cu, Pb, Cd, Ni, Cr and/or As), we have noted tremendous variation in the distribution and concentration of these heavy metals.<sup>1</sup> This has determined the need to collect and analyse large numbers of samples containing from negligible to high levels of metals and to search for an economical, time-saving accurate method for the high throughput screening of polluted soil samples. Here we assess the use of a field portable X-ray fluorescence (FPXRF) spectrometer prompted by the description of the technique reviewed by Kalnicky and Singhvi.<sup>2</sup> The main hypothesis of this work is that the use of such a system to screen topsoil samples in the field will guide the collection of suitable samples for subsequent ecotoxicological studies. The amount of a given heavy metal taken up by plants depends both on its concentration in the soil and on the plant species. Studies examining the accumulation of heavy metals in organisms at the bottom of a food network also require the analysis of large numbers of samples to assess toxicity problems related to the health of an ecosystem affected by this kind of pollution.<sup>3</sup> Therefore, the objectives of this work are: i) optimizing the FPXRF system for heavy metal polluted soils; ii) assessing its performance in the *in situ* and laboratory determination of heavy metal in polluted soils; iii) studying the possibility of using it for the *in situ* analysis of plants; iv) evaluating the convenience of using this system in sites with heavy metals and trace elements that can affect plants.

## 2. Materials and methods

The Niton XLt 792WY FPXRF system is a single unit element analyser of less than 2 Kg weight. The device, consisting of a high resolution Si-PIN detector and a Peltier cooler, detects elements from Cl to U. The excitation source is a low intensity X-ray tube, 40kV, and a Rh anode. Its two rechargeable lithium batteries give it autonomy in the field of 16 hours (8 hours per battery). Besides its use in fieldwork, the instrument is also able to connect to a computer to analyse dry, sieved, ground and pressed samples in the laboratory. It was factory calibrated with international soil



standards to simultaneously determine 22 elements (Ag, As, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, K, Mn, Ni, Pb, Rb, Sb, Sc, Se, Sn, Sr, Ti, V, Zn), though this calibration can be empirically modified.

The general methodology corresponds to each objective. First the system was optimized with soil reference standards and samples of heavy metal polluted soils. Once the system was optimized, it was tested in field and its results were compared with laboratory determinations. Finally, these results encouraged us to study the possibility of using it in fresh and dried plant samples.

### **2.1 Optimising the FPXRF system**

The optimisation procedure consisted of two steps. First we assessed the quality of FPXRF measurements made on 22 elements and when possible improved on the resultant accuracy. We used 48 international soil reference standards, whose metal levels are reported in Govindaraju.<sup>4</sup> Since the heavy metal levels of these standards were in some cases not as high as those found in polluted soils, 36 further soil standards containing high heavy metal concentrations were used. These standards had been prepared in our XRF laboratory for use in a SIEMENS SRS 300 instrument. The heavy metal values of soil standards will be called certified values, although those prepared in our laboratory were not certified.

Next, results were analyzed (precision and detection limits) for different sample preparation methods and measurement times. This time we only considered the elements most frequently found at the study sites that were of known ecotoxicological impact (As, Cd, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Zn). Both reference standards and polluted soil samples were used. The latter were collected at random from previously studied sites.

### **2.2 *In situ* and laboratory determination of heavy metal polluted soils**

Five sites with heavy metal polluted soils, previously studied by our research group, were chosen to test the efficacy of the FPXRF system. Three of these sites were abandoned mine sites (two copper mines and one silver mine) and two were sealed landfills. The three mines fell into disuse 40 to 100 years ago. Presently, their tailings occupy volumes of 3500 m<sup>3</sup> to 25000 m<sup>3</sup> and the sites have not been restored in any way. Soils around the copper mines are mainly copper-polluted but may also

---

contain high levels of other metals. Metals mainly found in the silver mine soils are Zn and Pb. Both the soil pollution and plant communities affected by heavy metals at all three sites had been extensively investigated.<sup>3,5,6</sup>

The two landfills occur in two areas in the south and east of Madrid (Spain) that have recently undergone extensive urban and industrial development. In the 1980s, these landfills were sealed for the first time using rubble and soil from the surroundings to create a layer no deeper than 50 cm. The two areas have not been restored. Both landfills received mixed urban/industrial waste even after their sealing, such that sealing soils show a high variability and concentration of heavy metals. The landfills extend across areas of 50000 and 70000 m<sup>2</sup> respectively, though the most polluted area of the second site is restricted to some 5000 m<sup>2</sup>.<sup>7,8</sup>

The five sites have in the past or recently been used as grazing land for livestock or game so the study of heavy metal uptake by plants is of special interest.<sup>3,5,6,9</sup>

Although 38 samples were collected at random from these sites for the optimization of the system, a complete sampling was made for the *in situ* testing. The sampling effort was designed to represent the known variability in the distribution and concentration of heavy metals, and was in accordance with the previous samplings made in each site<sup>1,3,5-9</sup>. Here, it can be summarized that the topsoil layer (0-10 cm) of each site was subjected to stratified sampling taking into account the topography, the different tailings or landfill slopes and the plant communities growing at the sites. The numbers of sampling points were 32 in the copper mines, 22 in the silver mine and 58 in the landfills. In each selected point, vegetation was withdrawn and FPXRF 60s measurements were made in the soil surface. 5 measurements per point were done in an area about 1 m<sup>2</sup> and the average of them is considered the result for that point. This is the same procedure than that conducted for collecting average soil samples. Soil samples (about 2 kg) were also collected for laboratory analyses. They were dried at room temperature, sieved through a 2 mm mesh, ground in an agate mortar, and analyzed by both FPXRF and inductively-coupled plasma optical emission spectroscopy (ICP-OES) with prior digestion with nitric and perchloric acid in proportion 4:1.<sup>10</sup>

### 2.3 Plant sampling and analysis

Samples of different plant species (roots and shoots) growing at the three mines were collected along the pollution gradient. The species were the dominant ones in each site: *Agrostis castellana* Boiss. & Reut., *Andryala ragusina* L., *Anthoxanthum aristatum* Boiss., *Bromus tectorum* L., *Centranthus calcitrapae* (L.) Dufr., *Corrigiola telephiiifolia* Pourr., *Crepis vesicaria* L., *Dactylis glomerata* L., *Jasione montana* L., *Phleum pratense* L., *Plantago holosteum* Scop., *Plantago lanceolata* L., *Rumex bucephalophorus* L., *Sinapis arvensis* L., *Spergularia rubra* (L.) C. Presl, *Stipa lagascae* Roem. & Schult. and *Thymus zygis* Loefl. ex L. Plants were washed in deionised water, oven dried (48 h, 70°C), ground in a Culatti AG MicroHammer Mill (with a 0,5 mm sieve for shoots and 0,2 mm for roots) and analyzed by ICP-OES after nitric and perchloric acid digestion.<sup>10</sup> Half of each sample was kept for assessment of the FPXRF system. Fewer samples were subjected to ICP-OES than FPXRF, since some sample quantities were insufficient for the two techniques.

### 2.4 Data analysis

Groups of data were compared by linear regression using Microsoft Excel 2007 software.

## 3. Results and discussion

### 3.1 Optimising the FPXRF system

#### 3.1.1 Quality of measurements and improving accuracy

The 84 soil reference standards were used for this study. After subjecting the standards to FPXRF, the relationship between the certified values and the concentrations obtained was used to modify the instrument's calibration factors. As many reiterations of this process as needed were conducted for each element.

However, we considered more than 5 as unworthy according to a result/effort balance. After choosing the best of the 5 calibration factors, standards were measured again, and the regression between certified values and measurements was calculated (accuracy concept according to EPA<sup>11</sup>). This study was performed for each of the 22 elements that the instrument detects. However, the system's accuracy could only be improved for elements for which we had 10 or more standards. Only one standard had a sufficiently high Sb concentration for its detection by the FPXRF

**Table 1** Regression analysis between FPXRF measurements and certified values of soil standards

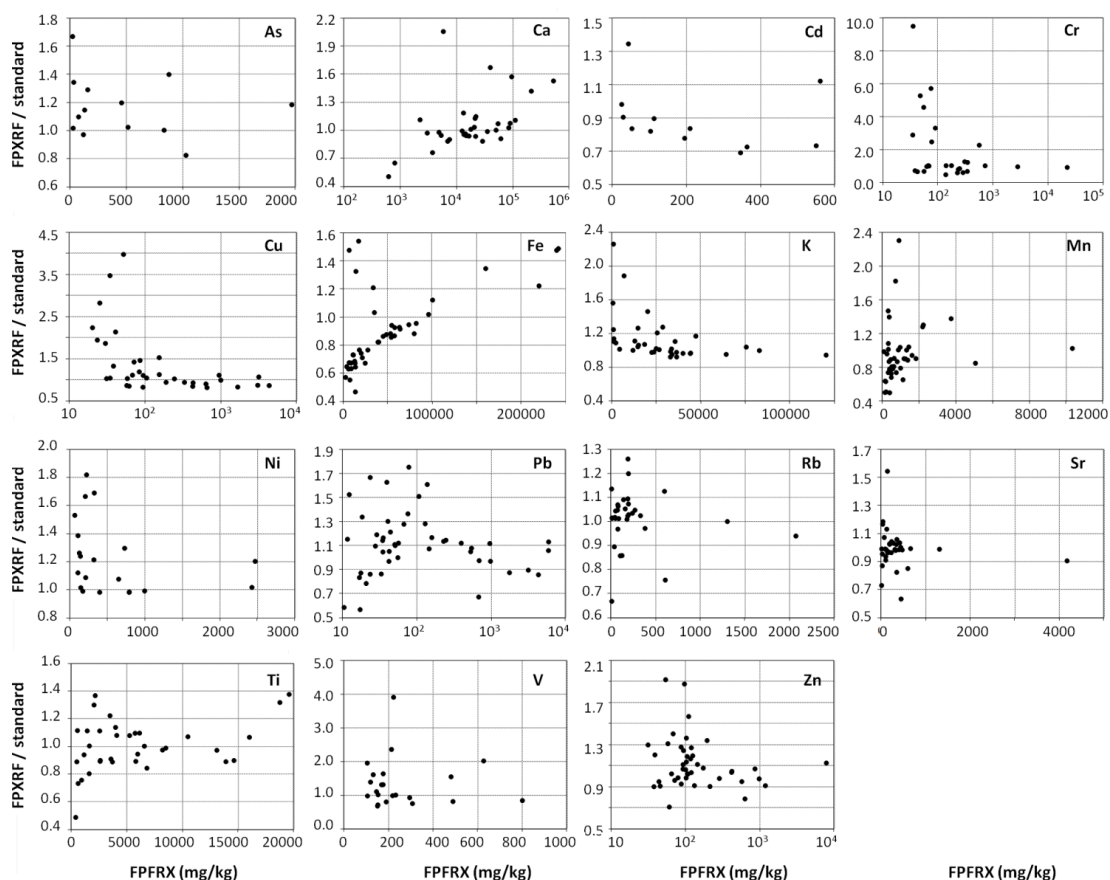
Element	Standard concentration range (mg/kg)	Results of the regression		
		Slope	R <sup>2</sup>	N <sup>a</sup>
As	1 – 1660	0.90	0.955	13
Ca	286 – 395714	0.66	0.983	33
Cd	25 – 750	1.18	0.926	13
Cr	4 – 24000	1.09	0.999	27
Cu	2 – 5000	1.11	0.990	35
Fe	315 – 179550	0.71	0.947	43
K	83 – 127372	1.04	0.991	36
Mn	15 – 10100	0.97	0.970	42
Ni	3 – 2380	0.92	0.985	20
Pb	3 – 5532	0.98	0.984	47
Rb	5 – 2200	1.06	0.992	33
Sr	3 – 4600	1.11	0.993	35
Ti	54 – 16246	0.88	0.942	35
V	2 – 950	0.98	0.744	22
Zn	5 – 6952	0.89	0.997	44

<sup>a</sup> N, number of points in the regression.

system. Corresponding numbers of standards were 3 for Sn, 5 for Se, 6 for Hg and 7 for Ag and Co. Despite these few standards, fairly accurate measurements were obtained for Se and Hg so these could be at least taken as semi-quantitative. For Sn, Ag and Co, FPXRF measures showed no significant correlation with certified values. Although we had sufficient standards for Sc, the poor quality of its measures ( $R^2=0.01$ ) determined this technique is unsuitable for this element.

Table 1 provides the results of the regression analyses performed for the rest of the elements (As, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, K, Mn, Ni, Pb, Rb, Sr, Ti, V and Zn). Since accuracy depends on the metal concentration, the relationship between the FPXRF measurements and certified values (FPXRF/standard) was plotted against the FPXRF measurements in Fig. 1. This figure clearly shows the range over which measurements were more accurate (FPXRF/standard close to 1) and more precise (less scatter).

The regression analysis indicates the fairly high quality of the measurements of these elements. In contrast, Kilbride et al.<sup>12</sup> reported the poor quality of Ni and Cd measurements made using a similar XRF system. The precision of our Ca and V determinations was low so results can only be considered semi-quantitative. For Cr, although its  $R^2$  indicates a strong relationship between FPXRF measurements and certified concentrations, Fig. 1 illustrates that this relationship is attributable to only two samples with a concentration higher than 1000 mg/kg. Those with lower concentrations showed an up to 10-fold difference with respect to the certified value. If we eliminate these two high concentration samples, an  $R^2$  of 0.72 is



**Fig.1** Relationship between FPXRF measurements and certified values (FPXRF/standard) versus the FPXRF measurements (mg/kg). Some abscissa scales are logarithmic.

obtained. The results of the regression analyses between FPXRF measurements and standard values are of considerably higher quality than those reported by Weindorf et al.<sup>13</sup> These authors related FPXRF readings with aqua regia digestion-ICP results, showing  $R^2$  of 0.016 (for Cr) to 0.968 (for Pb). In that work, maximum metal concentrations were much lower than the metal contents of soil standards used in our study. This demonstrates again that the quality of measurements increases in higher metal concentration.

When taking measurements, it must be taken into account that As could give false negative readings even in samples with relatively high concentrations of this element. According to the EPA,<sup>11</sup> interference between As and Pb can modify the detection limits and accuracy of FPXRF measurements when the ratio Pb:As is higher than 10:1 and vice versa.

It should also be considered that Fe measurements have a clear second-order relation with certified standard values. This determines three concentration ranges showing different behaviour: i) a range up to 80000 mg/kg over which the FPXRF system underestimates the Fe concentration; ii) a range 80000 to 110000 mg/kg over which the system provides appropriate measurements, and iii) a range of 110000 mg/kg and higher, over which the system overestimates Fe contents. Due to self-absorption effects, a second-order calibration is needed for XRF Fe determinations. Since this is not possible with the FPXRF system, several calibration curves are recommended for the different concentration ranges.

### *3.1.2 Effects of sample preparation*

To examine how measurements were affected by the sample preparation method, soil samples from 17 points in the landfills and 21 in the abandoned mines were measured right after their collection. Subsequently, these samples were processed in the laboratory as described above. The samples were subjected to FPXRF after drying and sieving (hereafter denoted “sieved” soil samples) and then after also grinding and pressing (hereafter denoted “pressed” soil samples). Measuring fresh samples is closely similar to *in situ* determinations. We checked if there were differences with results on prepared samples. Ground and pressed is the standard preparation for laboratory determination with this system. We considered drying and sieving as an intermediate step.

Measurements on fresh samples were highly comparable to those obtained for the dried samples. In fact, soils of these sites with Mediterranean climate are rather dry in the sampling period (late spring), with a maximum soil moisture about 10 %. According to the instrument’s instructions a water content under 20% does not affect measurements. Results for the “sieved” samples were generally lower than for the “pressed” samples. This may be explained by the smaller particle size of the latter samples.

### *3.1.3 Effects of measurement time*

The measurement time of the FPXRF device can be varied such that the longer the measurement time the better the accuracy and precision. Six determinations of increasing measurement times were made on each of three international standards. Results showed no differences when metal contents were high except for the

**Table 2** Detection limits (mg/kg) of elements in fresh and “pressed” soil samples and soil reference standards with a 60s scanning.

Sample		As	Cd	Cu	Mn	Ni	Pb	Zn
Fresh	M.	36	30	29	-	65	-	-
	Max.	465	91	39	-	416	-	-
Pressed	M.	23	19	17	-	39	-	-
	Max.	175	43	19	-	77	-	-
Standard	M.	18	28	30	56	54	12	19
	Max.	279	70	48	64	128	19	19

<sup>a</sup> M - mean; Max - maximum. The high As detection limit is attributed to Pb interference. Mn, Pb and Zn concentration in soil samples was always higher than detection limit

ensure proper detection. Notwithstanding, only in the case of metals of special interest would it be worth lengthening the measurement time so much. Kilbride et al.<sup>12</sup> considered 120 s as optimal to obtain appropriate accuracy and precision. However, we found that 60 s is sufficient to correctly detect each element in our landfill and mine samples. Higher measurement times could be impractical for field work.

### 3.1.4 Precision study

Three international standards, three “sieved” and three “pressed” landfill samples were used in this study. After taking 12 measurements on each sample, the coefficient of variation (CV) was determined as an indicator of precision. Results varied depending on the concentration of each element. Thus, precision was higher (lower CV) in samples with a higher metal concentration, which are the samples of most interest in pollution studies. Precision for the “pressed” samples was higher than for the “sieved” samples.

### 3.1.5 Detection limits

The detection limits shown in table 2 corresponds to those determined by the system, below which the system does not give a result (<LOD). The detection limits of “sieved” samples are not shown as they are not very different from “pressed” samples. In the landfill soil samples with high Pb concentrations, As could not be detected with a detection limit over 300 mg/kg.

## 3.2 Determination of heavy metals in the topsoil layers of polluted sites

As explained above, metals were determined *in situ* at different points in the five sites and soil samples were collected for subsequent determination in the laboratory.

measurement error calculated by the system. However, for low metal contents, the detection limit improved with increasing measurement time. This means that samples with metal contents near the detection limit should be measured for 120 or 240 s to

**Table 3** Element concentrations (mg/kg) determined by FPXRF in pressed samples from the five sites

Site	As	Cd	Cu	Fe	Mn	Ni	Pb	Zn
Copper mine I (N=22)								
M	67	n.d.	1395	32624	701	55	68	243
sd.	30		1401	7712	257	13	32	98
Max	116		6590	49957	1398	84	169	627
Min	18		123	21094	431	37	19	168
N n.d	0	22	0	0	0	12	0	0
Copper mine II (N=12)								
M	125	n.d.	2905	21688	411	40	77	140
sd.	100		5591	4582	119	4	35	61
Max	319		19432	34328	644	44	168	276
Min	9		25	15538	253	36	40	71
N n.d	3	12	0	0	0	9	0	0
Silver mine (N=20)								
M	394	21	62	34353	677	63	3483	3020
sd.	201		35	10836	407	17	3478	1683
Max	953		162	63728	1908	90	14771	6270
Min	163		26	20864	117	46	372	355
N n.d	0	19	0	0	0	15	0	0
Landfill 1 (N=48)								
M	167	376	791	117514	5470	372	3955	25100
sd.	299	217	1403	230299	11893	382	9363	63984
Max	1163	659	5348	1323623	60475	1442	41543	317097
Min	10	34	17	10592	217	36	19	67
N n.d	11	39	6	0	0	30	0	0
Landfill 2 (N=12)								
M	94	66	283	34386	2650	85	605	736
sd.	158	29	582	70493	5649	60	1712	1348
Max	647	93	4006	340794	22907	241	8118	8116
Min	14	35	28	4519	104	21	14	88
N n.d	4	10	0	0	0	4	0	2

<sup>a</sup> N - number of samples; M - mean; sd.- standard deviation; Max - maximum; Min - minimum; n.d.- not detected; N n.d. - number of samples in which the given element was not detected.

Obviously, *in situ* results are more variable than laboratory ones, as the latter come of a homogenizing process. However, the average of all determinations in each point is not very different from the result in laboratory determinations. In general, determinations of prepared samples are higher than the *in situ* ones. The greatest difference is in Cd, with a mean (and  $\pm$  standard deviation) relationship between *in situ* and laboratory results of  $1.85 \pm 0.25$ . The lowest difference is in Fe ( $1.05 \pm 0.27$ ). Table 3 provides the results of the laboratory tests. The table also reveals the high heterogeneity in heavy metal concentrations shown by each site. The distributions of the different metals and their concentrations at the sites revealed by FPXRF coincide with the results of ICP-OES analyses. The table also shows that the ratio As:Pb was no higher than 1:10, such that interference problems did not arise. The Cu and Ni contents of some samples were not too high, which suggests the low



precision of these measurements. The Fe contents of the mine soils were lower than 70000 mg/Kg, covering the range over which measurements are underestimated. In contrast, the landfill soils showed Fe contents in the ranges suggesting different qualities of measurements. Maximum Zn and Pb levels in samples from the first landfill were extremely high, much higher than those provided by ICP-OES (18136 mg/kg for Pb and 22992 mg/kg for Zn), suggesting the need for a second-order calibration as for Fe. In the study by Kilbride et al.<sup>12</sup>, FPXRF-determined soil metal concentrations were also found to be higher than ICP-OES values but the difference was much smaller.

### 3.3 Efficacy of FPXRF for determining heavy metal levels in plant tissue.

#### 3.3.1 Comparison between ICP-OES and FPXRF results

Since certified plant standards were not available, 74 plant samples (roots and shoots) collected from the abandoned mines containing a wide range of metals, as determined by ICP-OES, were used for this study. As with the soil standards, the assessment of FPXRF measurement quality in this type of matrix was made with plant samples. Each plant sample was divided into two aliquots for ICP-OES and FPXRF.

For the field portable instrument, rather than being acid digested, samples were pressed in the system's devices. After making determinations in the 74 samples, results were correlated with the ICP-OES results and, if necessary, the calibration curve was corrected. The regression results are shown in Table 4. Only elements occurring at sufficiently high concentrations for their FPXRF detection that could be determined by ICP-OES were examined. Measurement time was set at 60 s since we

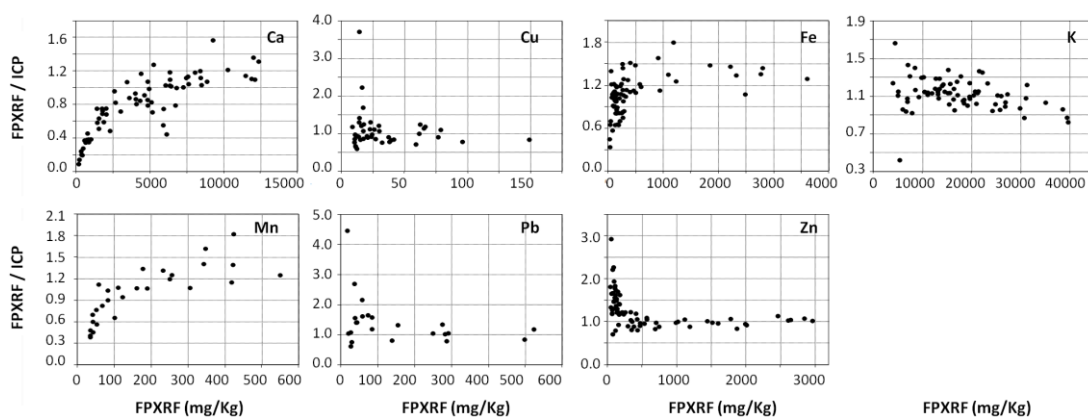
**Table 4** Results of regression analysis between FPXRF and ICP-OES measurements made in plant tissue samples

Element	ICP concentration range (mg/kg)	Regression results		
		Slope	R <sup>2</sup>	N
Ca	1278 - 13793	0.74	0.788	70
Cu	3 - 177	1.14	0.946	44
Fe	37 - 2793	0.74	0.978	73
K	2633 - 48184	1.06	0.936	74
Mn	6 - 439	0.63	0.913	28
Pb	0 - 593	1.04	0.953	23
Zn	17 - 2897	0.99	0.989	73

<sup>a</sup> N - number of points in the regression.

do not consider longer times practical for field work.

The FPXRF results are highly correlated with those provided by ICP-OES. In addition, the calibration curve could be corrected so results were comparable. As observed in the soil samples and in Fig. 2, measurement accuracy was



**Fig.2** Relationship between FPXRF and ICP-OES measurements (FPXRF / ICP) plotted against the FPXRF measurements (mg/kg)

higher for the higher metal concentrations. Good quality Cu, Zn, Pb, K and Fe measurements were obtained when these occurred at the higher concentrations, and values were similar to those provided by ICP-OES (difference less than 20%). Concentrations for Ca and Mn differed considerably between FPXRF and ICP-OES so these results can only be taken as semi-quantitative. Although some plant samples showed high Cd contents when determined by ICP-OES (up to 38.5 mg/kg), FPXRF could not detect this metal, its reported detection limit being 15 mg/kg. This is a major drawback considering the important role of this metal in phytotoxicity and bioaccumulation in food webs.

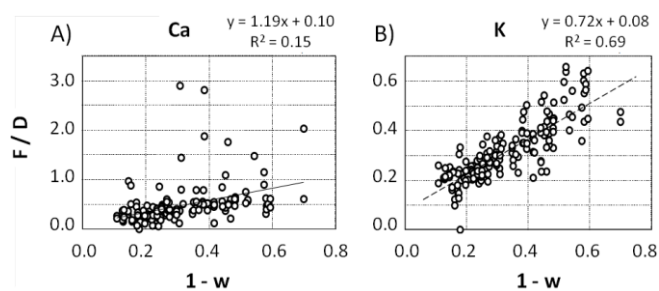
### 3.3.2 FPXRF determinations in fresh plant samples

Determinations were made in 89 fresh plant samples before and after oven drying (48 h, 70 °C). Fresh plant tissue is expected to show lower concentrations of elements due to the important water content of this kind of samples. In fact the average water content is 52 % for grass species and even higher (74 %) for the rest of them. It was expected to find a relation according to the equation:

$$F/D = 1 - w$$

where F means metal concentration in fresh samples, D metal concentration in dry samples and w represents the water content.

This means that the two sets of measurements (F/D) should show the relationship (1-w) represented by a line whose slope is equal to 1. For most metals, however, this relationship was barely detected (see example in Fig. 3A). In addition, when such a



**Fig.3** Checking the equation  $F/D = 1 - w$

relationship did seem to exist (e.g., for K), the slope was not equal to unity, as shown in Fig. 3B. This indicates that the water content of the plant tissue affects the device's measurements, as reported for soils in the instructions.

However, a relationship between measurements made in dry and fresh plants was identified ( $R^2$  ranging from 0.92 for Cu to 0.28 for K). Thus, in situ determinations in plants are possible as long as these aspects are kept in mind and results are taken as semi-quantitative. Nevertheless, it should be emphasized that the lower concentrations recorded in fresh plant samples means that plants with significant heavy metal contents could pass unnoticed.

### 3.3.3 Detection limits

Detection limits in this type of matrix were much lower than those observed for the soil samples and were also lower in fresh than dry plant samples, with the exception of the limits for Ca and Cu (see Table 5). This observation has been attributed to the plant tissue matrix, which is almost transparent to X-rays.<sup>14</sup>

### 3.4 Economic and environmental sustainability of using the FPXRF system

Results obtained in the *in situ* determination of most heavy metals and trace elements that can affect plants (As, Cd, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, and Zn) are very comparable with those obtained in laboratory and by a more frequent technique as ICP-OES. In spite of the shortcomings (low precision, above all in lower concentrations, and high detection limits), it is proven that the system is able to indicate the level of pollutants in a site and delimit pollution hotspots. Although we have tested this system in known sites, we consider that its main potential lies in screening sites whose soils are potentially polluted with heavy metals, in agreement with the claims by Loredó.<sup>15</sup> At this preliminary stage of a pollution study, possible effects of heavy metal pollution according to land use need to be examined. Not only the FPXRF instrument could be useful in unknown potentially polluted sites, but also for monitoring polluted soil remediation measures at a given site. At both

**Table 5** Detection limits (mg/kg) of elements in plant tissue samples

Sample		As	Ca	Cd	Cu	Fe	Mn	Ni	Pb	Zn
Dry	M	4.2	108	16	6.6	30	27	19	4.7	-
	Max	6.7	114	19	8.5	30	36	26	5.9	-
Fresh	M	2.4	263	11	7.4	16	17	14	2.9	5.7
	Max	4.6	264	11	9.1	17	22	15	3.8	6.0

<sup>a</sup> M - mean; Max - maximum; Zn concentration in dry samples was always higher than the detection limit

these stages of research, detecting pollution and its distribution is crucial. Thus, the FPXRF system is an ideal complement to the subsequent selection of samples to be analyzed more thoroughly using laboratory equipment in detailed research and intervention phases. Authors such as Kilbride et al.<sup>12</sup> and Martín et al.<sup>16</sup> have already used similar systems and recommend their use at these stages of research.

Even though the use of laboratory XRF in plants has been reported,<sup>14</sup> we have found no reference to its use for the *in situ* analysis of native plants, but other techniques have been previously investigated for detection in plants of Cd<sup>17,18</sup> and Pb.<sup>18,19</sup> Investigating heavy metal accumulation by plants is expensive and time-consuming since numerous plant samples from different polluted sites need to be analyzed. These studies usually have two objectives: 1) to determine the effects of heavy metals at the base of food webs; and 2) to identify metal accumulating species for phytoremediation purposes. According to Marguí et al.,<sup>14</sup> advantages of XRF over other techniques for plant analyses are its use directly on solid samples, a high throughput and a low cost per determination. Thus, the benefits of a portable device are added to those of XRF. However, the low sensitivity limits the use of this FPXRF to plants with important accumulation capacity.

Before purchasing the FPXRF system, large numbers of plant and soil samples had to be collected, prepared and analyzed to characterize the pollution state of the sealed landfills and abandoned mines examined here. Depending on soil stoniness, samples of some 1-2 kg were collected from each sampling point and transported to the laboratory. These samples were dried and sieved, and aliquots separated for the different tests. Aliquots were previously ground in an agate mortar. For the study of affected native plants, dominant plant species were collected from each sampling point in sufficient quantity for subsequent analyses. The number of plant samples depends on diversity, but from points showing most diversity we collected up to 10

plant samples (20 samples if we separately consider shoots and roots). Each sample was washed in deionised water, oven-dried, ground and acid digested before the ICP-OES determinations. The estimated time needed for processing all the 114 soil samples and 74 plant samples used in this work was more than 1 month. Once samples are prepared, they were sent to the analytical department. The expense of digesting and analysing all samples was about 4800 €. Apart from time and economic costs, it should be considered the consumables used for sample digestion and ICP-OES analyses (e.g., perchloric and nitric acid, mili-Q quality deionised water, filters, standards for ICP-OES calibration, argon etc.), and which will generate waste since they are not reusable.

The *in situ* use of FPXRF or its direct use on fresh samples collected in the field will give a general picture of the distribution and extent of pollution at a given site along with an idea of the most affected plant species by the next day after the field work, incurring minimal expenses. These results would guide the subsequent sampling, paying attention only to the worrying areas. In both landfills (the most polluted ones that we have studied), only 50 % of samples showed heavy metal concentrations over the reference levels. It should also be highlighted that total levels of pollutants do not offer good information about how hazardous those metals and trace elements are for plants or other living beings. It is the bioavailable fraction the important one for the ecotoxicology studies. Total concentration is useful for comparing with reference levels and stating whether the site can be considered polluted or not. Obtaining this information by FPFRX would allow us to focus all our efforts in characterizing the hazard of metals in most polluted areas, for example determining the bioavailable fraction (as the Lakanen and Ervio method<sup>20</sup>) or even by conducting a sequential fractionation (e.g. the optimized BCR method<sup>21</sup>).

#### **4. Conclusions**

When optimising the FPXRF system (Niton XLt 792WY) the general trend emerged that the higher the concentration of metals in soil samples, the higher the precision and accuracy of the system's measurements. In processed soil samples and for longer measurement times, precision improved and detection limits were lower. Our assessment of accuracy using soil reference standards revealed an acceptable to

high measurement quality, depending on the concentration range for As, Cd, Cu, Fe, K, Mn, Ni, Pb, Rb, Sr, Ti and Zn. In contrast, the use of the portable device for Ca, Cr, V, Se and Hg only provides semi-quantitative results. The use of the FPXRF system to determine heavy metals in soils from sealed landfills and abandoned mines generated results that are comparable to those obtained by ICP-OES.

The device's use for *in situ* heavy metal determination in plant tissue was assessed for the first time, though it was only able to identify plants with the highest heavy metal contents, and determinations can only be considered semi-quantitative. Cu, Zn, Pb, K and Fe could be determined with fairly good precision if they occurred at high concentrations in dried plant samples. Ca and Mn could only be semi-quantitatively estimated.

Our cost-benefit study revealed the system to save on costs, time and materials when used for the study of sites potentially polluted with heavy metals. Its use in preliminary research tasks will serve to identify significant areas as well as elements when characterizing the pollution status of a given site. Results in plant tissue indicate the possible use of the FPXRF device to detect plants *in situ* showing a strong capacity to accumulate metals.

### Acknowledgments

This study was funded by project CTM 2008-04827/TECNO from the Spanish Ministry of Science and Innovation, and P2009/AMB-1478A (EIADES Program) from the Community of Madrid. M<sup>a</sup>JGG held an FPU Fellowship awarded by the Spanish Ministry of Education (AP2008-02934). The authors thank Ms. Irene Ranz for their contribution to this work.

### References

1. A.J. Hernández and J. Pastor, in *Soil Contamination Research Trends*, Ed. J. B. Domínguez, Nova Science Publishers, New York, 2008, pp. 51-72.
2. D.J. Kalnichy and R. Singhvi, *J. Hazard. Mater.*, 2001, **83**, 93-112.
3. J. Hernández and J. Pastor, in *Producciones agroganaderas: Gestión eficiente y conservación del medio natural*, Eds. B. De la Roza, A. Martínez-Fernández and A. Carballal, SERIDA, Gijón, Spain, 2005, pp. 955-963.
4. K. Govindaraju, *Geostandard. Newslett.* 1989, XIII.
5. A.J. Hernández and J. Pastor, *Environ. Geochem. Health.*, 2008, **30**, 127-133.

6. J. Pastor, M. J. Gutiérrez-Ginés and A. J. Hernández, in *Aspectos fisiológicos, agronómicos y ambientales de la nutrición mineral en las plantas*, Ed. J.M Estavillo, Universidad del País Vasco, Bilbao, Spain, 2010, pp. 217-223.
7. A.J. Hernández and C. Bartolomé, *Estudio multidisciplinar de vertederos sellados. Diagnóstico y pautas de recuperación*, Servicio de Publicaciones de la Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, Spain, 2010
8. J. Hernández, M. I. Pérez-Leblic, C. Bartolomé, J. Rodríguez, J. Álvarez and J. Pastor, *J. Environ. Manage.*, 2012, **95**, S50-S54.
9. J. Pastor and A. J., *Anales de Biología*, 2002, **24**, 159-167.
10. L. M. Walsh and Soil Science Society of America. *Instrumental Methods for analysis of soils and plant tissue*, Soil Science Society of America, Wisconsin. 1971
11. EPA. *Innovative Technology Verification Report. XRF Technologies for measuring trace elements in soil and sediment. Niton XLT 700 series. XRF Analyzer. Report EPA/540/R-06/004*, United States Environmental Protection Agency, 2006.
12. Kilbride, J. Poole and T.R. Hutchings, *Environ. Pollut.*, 2006, **143**, 16-23.
13. C. Weindorf, Y. Zhu, S. Chakraborty, N. Bakr and B. Huang, *Environ. Monit. Assess.*, 2012, **184**, 217-227.
14. Marguá, I. Queralt and M. Hidalgo, *Trac-Trend. Anal. Chem.*, 2009, **28**, 362-372.
15. J. Loredó, in *Operatividad de la instrumentación en aguas subterráneas, suelos contaminados y riesgos geológicos*, Eds. J. M. Pernía, J. Mulas and P. Fdez.-Canteli, IGME, Madrid, Spain, 2003, pp. 175-184.
16. J. Martín, S. Morales, M. G. Bagur, C. M. Estepa, E. Fernández, M. Diez and J. Aguilar, *III Congreso Ibérico de la Ciencia del Suelo, Évora, Portugal*, 2008, p. 195.
17. K. Abe, K. Nakamura, T. Arao, Y. Sakurai, A. Nakano, C. Suginuma, K. Tawarada and K. J. *Sci. Food Agric.*, 2011, **91**, 1392-1397.
18. H.J. Kim, D.W. Son, J. M. Park, D. Y. Hwang, C. Y. Mo, S. W. Park, G. Kim, J. B. Eun, *Food Sci. Biotechnol.*, 2010, **19**, 1211-1217.
19. M. Barbaferri, R. Pini, A. Ciucci and E. Tassi, *Chem. Ecol.*, 2011, **27**, 161-169.
20. Lakanen and R. Ervio, *Acta Agricultura Fennica*, 1971, **123**, 223-232.
21. K.F. Mossop and C.M. Davidson, *Anal. Chim. Acta*, 2003, **478**, 111-118.

## SUPPLEMENTARY INFORMATION

This document provides extended results and information of the work presented in the main article. Table 1 shows results corresponding to section 3.1.4 *Precision study*. Here, the coefficients of variation of the 12 repeated measurements of three soil reference standards and three samples with different preparations are shown.

**Table 1** Variation of repeated records on the soil samples<sup>a</sup>

Element	Standards		"Pressed" samples		"Sieved" samples	
	Mean CV	Range	Mean CV	Range	Mean CV	Range
As	9	3 - 19	19	13 - 23	20	7 - 37
Cd	2		8	7 - 9	14	5 - 22
Cu	16	5 - 21	6	2 - 12	14	2 - 32
Fe	1	1 - 1	2	2 - 3	5	2 - 10
Mn	8	5 - 13	6	3 - 9	9	5 - 17
Ni	10	4 - 16	17	11 - 23	22	13 - 34
Pb	9	5 - 13	7	2 - 17	11	4 - 27
Zn	11	8 - 13	4	3 - 8	6	4 - 9

<sup>a</sup> CV - coefficient of variation (%); "pressed" - samples sieved, ground and pressed as described in the text

Tables 2 shows the time needed (according to our experience) for sample preparation for ICP-OES analysis. In addition, table 3 presents a list of prices for digesting and analyzing heavy metals in soil and plant samples. Both tables indicate the big expenses of money and time that are necessary for characterizing heavy metal polluted sites by this analytical technique.

**Table 2** Approximate time needed (working days) to prepare soil and plant samples for ICP-OES determination

Soil sample	Drying at room temperature	Task		Total time (days)
		Sieving	Agate mortar grinding	
Copper mine 1 (n=22)	1 (+5 drying)	1.5	1	3.5
Copper mine 2 (n=12)	0.5 (+5 drying)	1	0.5	2
Silver mine (n=20)	1 (+5 drying)	1.5	1	3.5
Landfill 1 (n=48)	2 (+5 drying)	3	2	7
Landfill 2 (n=12)	0.5 (+5 drying)	1	0.5	2
Plant samples	Washing	Oven-drying and weighting	Grinding	
Above-ground (n=63)	2	1.5 (+2 drying)	2.5	6
Roots (n=11)	1	0.5 (+2 drying)	0.5	2

<sup>a</sup> Ssoil drying and sieving time depends on water content, stoniness and soil aggregates.

**Table 3** List of prices for digestion and ICP-OES element determination per soil or plant sample

Task	Price
Acid digestion	4.5 €
Determining 1 <sup>st</sup> element	3.0 €
Determining 2 <sup>nd</sup> and subsequent elements	1.8 €



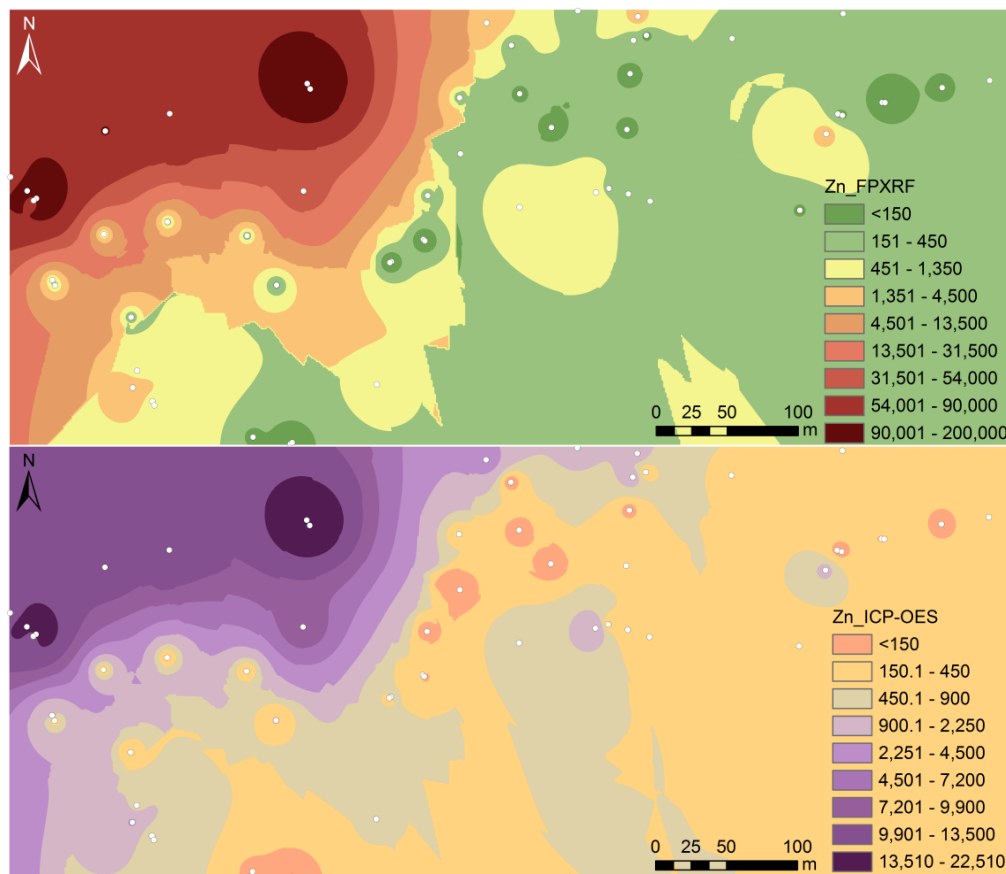
By using this system, we intend to save on cost, time, resources and wastes in the initial characterization of potentially heavy-metal polluted sites. The results were highly comparable to those obtained by ICP-OES, and here we demonstrated it by a comparison of maps where FPXRF and ICP-OES results are spatially represented. Zn and Cu concentration (ICP-OES and FPXRF) data of one of the landfills was used to create a pollution distribution map. The IDW interpolating tool of the ArcMap™ software (v. 9.3.1., ESRI) was used. Data was grouped in increasing levels of element concentrations related with reference limits for soils established by the Spanish law (table 4).

**Table 4** Reference levels of Zn and Cu for soils according to RD 1310/1990<sup>a</sup>.

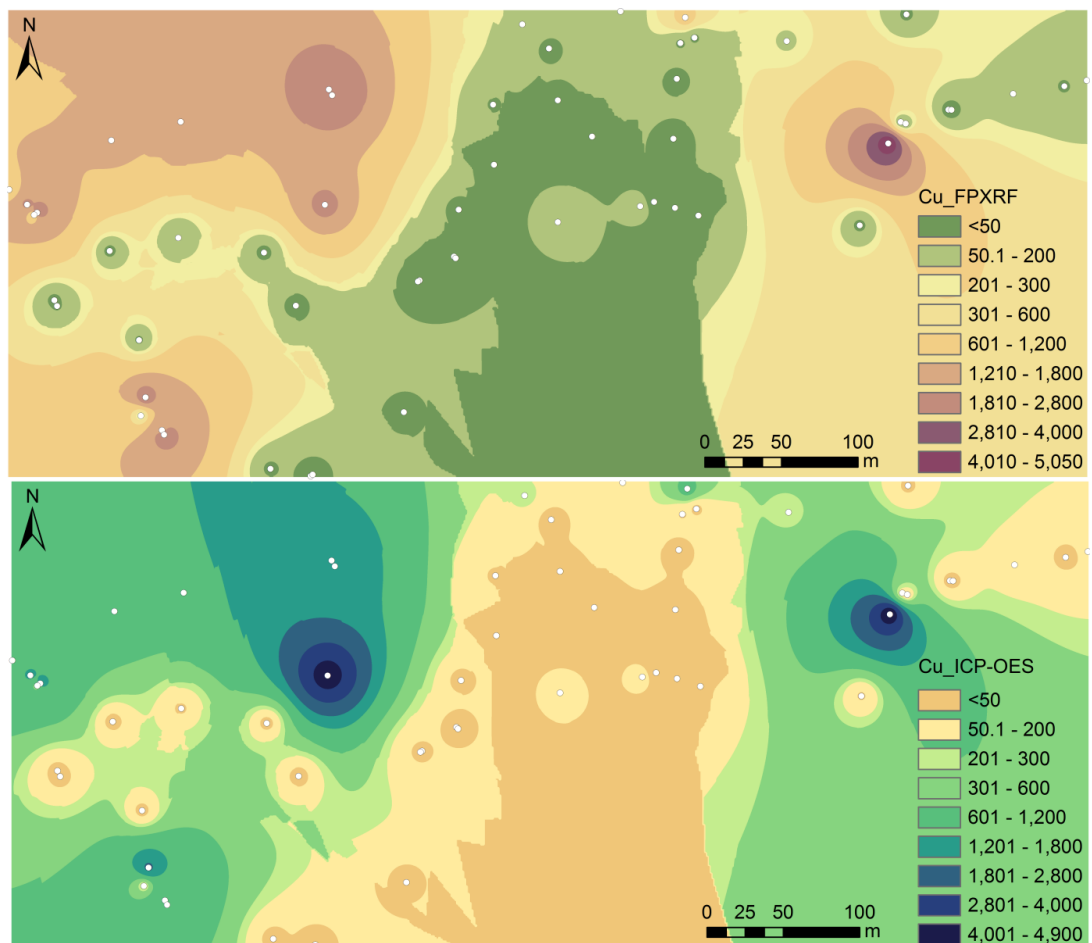
Soil pH	Zn	Cu
pH < 7	150	50
pH > 7	450	210

<sup>a</sup>RD 1310/1990. Real Decreto 1310/1990 de 29 de octubre, por el que se regula la utilización de los lodos de depuración en el sector agrario. Boletín Oficial del Estado del 1 de noviembre de 1990.

**Figure 1** Spatial distribution of Zn in one of the landfills determined by FPXRF (on the top) and by ICP-OES (on the bottom).



**Figure 2** Spatial distribution of Cu in one of the landfills determined by FPXRF (on the top) and by ICP-OES (on the bottom).





## Chapter 3

---

**Implementing the “Gauss Peak Spectra” fitting method to assess the combined effects of heavy metals on the chlorophylls of plants growing in polluted soils**



This chapter reproduces the manuscript:

Gutiérrez-Ginés MJ, Hernández AJ, Pastor J. *Fresenius*

*Environmental Bulletin* (**under review**)

## **Implementing the “Gauss Peak Spectra” fitting method to assess the combined effects of heavy metals on the chlorophylls of plants growing in polluted soils**

### **Abstract**

Natural pigments, including chlorophylls whose central  $Mg^{2+}$  is replaced by a metal ion ( $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  or  $Cd^{2+}$ ), can be detected spectrophotometrically and quantified by the “Gauss peak spectra” (*GPS*) method. Here we assess the use of this method to examine the effects of heavy metal-polluted soils on plants growing in these soils, as an indicator of primary production of terrestrial ecosystems. The *GPS* method was first optimized in native plants collected from abandoned mine sites with several heavy metals in their topsoil layers. Then based on the results of this study, we conducted a bioassay in which a cultivable plant species (*Lupinus albus* L.) was grown in real soils polluted with different heavy metal concentrations, to avoid the effects of factors such as climate, different ecotypes or heavy metal tolerance. According to the metal contents of the leaves of the plants as determined by chemical analyses, the *GPS* method was unable to distinguish between plants affected or not by the soil heavy metals. Neither was a greater chlorophyll effect observed in plants exposed to the higher metal concentrations. Our findings thus indicate that the proposed method is of little use to examine the joint effects of heavy metals on plants growing in polluted soils.

Key words: Abandoned mines, cadmium, copper, Mediterranean grass species, zinc.

## **Aplicación del método “Gauss Peak Spectra” para evaluar el efecto conjunto de metales pesados en clorofilas de plantas creciendo en suelos contaminados**

### **Resumen**

Los pigmentos naturales, incluidas las clorofilas cuyo  $Mg^{2+}$  central es reemplazado por un ion metálico ( $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  o  $Cd^{2+}$ ), pueden ser detectadas espectrofotométricamente y cuantificadas mediante el método Gauss Peak Spectra (*GPS*) en plantas creciendo en cultivos hidropónicos. Esta cuestión ha servido de hipótesis para comprobar este método en especies herbáceas que crecen en suelos contaminados por varios metales pesados. Y, de ser así, poder utilizar los resultados obtenidos como indicador de disminución de la producción primaria de ecosistemas terrestres. El método *GPS* fue primeramente puesto a punto en 12 especies silvestres recogidas de emplazamientos con minas abandonadas que presentan numerosos metales en la capa superficial edáfica. Los resultados obtenidos aconsejaron llevar a cabo un bioensayo en invernadero con *Lupinus albus* L. creciendo en suelos reales contaminados con diferentes concentraciones de metales pesados, para evitar efectos de factores como el clima, existencia de diferentes ecotipos y tolerancia a metales pesados por parte de las especies analizadas procedentes de campo. De acuerdo con los contenidos de metales en hojas de las plantas determinados por análisis químicos, el método *GPS* fue incapaz de diferenciar plantas afectadas o no por los metales pesados del suelo. Este resultado nos permite comprobar que nuestras hipótesis de partida no se cumplen al aplicar este método *GPS* a muestras correspondientes a escenarios reales de contaminación de suelos por un conjunto de metales pesados.

Palabras clave: cadmio, cinc, cobre, especies herbáceas mediterráneas, minas abandonadas.

## 1. Introduction

Although heavy metals produce numerous stress effects on plants [1], an important impact is the inhibition of photosynthesis. In previous bioassays, we have detected chlorosis signs in the leaves of several species grown in heavy metal-polluted soils obtained from landfills and abandoned mines [2-4]. As it is known, the chlorophyll molecule consists of a porphyrin ring with a central  $Mg^{2+}$  and a phytol chain. In the presence of metal ions, this central  $Mg^{2+}$  can be replaced by one of these ions. This substitution prevents light harvesting in affected chlorophylls, leading to reduced photosynthesis [5], and consequently may have an impact on the primary production of affected ecosystems.

Küpper et al. [6,7] designed a spectrophotometric method in which Gaussian peak spectra (*GPS*) are mathematically fitted to a sample absorption spectrum to detect and quantify the effects of heavy metals on the chlorophylls of plants. In the present study, we assessed the use of this method in plants growing in polluted soils with more than one heavy metal. This question led the proposal of the following hypothesis: i) the *GPS* method would serve to distinguish between plants affected or not affected by heavy metals in the soil where they grew, and ii) a greater effect would be detected on the chlorophylls of plants exposed to higher metal levels compared to plants grown in less polluted soils.

## 2. Materials and methods

The *GPS* method was first optimized in 12 native plant species collected from abandoned mine sites with several heavy metals in their topsoil layers. Later, a bioassay with *Lupinus albus* L. growing in real heavy metal polluted soils polluted was conducted in a greenhouse.

### 2.1. Native species collection

Native species were collected from three abandoned mine sites (two copper mines and one silver mine) in the central Iberian Peninsula. The three mines fell into disuse 40 to 100 years ago, and have not been restored in any way. Soils around the copper mines are mainly copper-polluted but may also contain high levels of other metals. Metals mainly found in the silver mine soils are Zn and Pb. Both the soil



pollution and plant communities affected by heavy metals at all three sites have been extensively investigated [8-10].

Given the known heterogeneous distribution of heavy metals at these sites, we selected points of different metal concentrations to collect 52 samples of 12 native plant species. Plant species were selected if they occurred in high frequency at the three mines or if they grew in the most polluted areas of the mine sites (Table 1). For example, *Trifolium striatum* grows in the most polluted areas of one of the Cu mines [8] and *Crepis vesicaria* and *Marrubium supinum* have been found to grow well in the most polluted soils of the Ag mine [10].

## 2.2. Bioassay

We also performed a greenhouse bioassay in which the white lupin (*Lupinus albus* L.) was grown in real soils. The white lupin was chosen since it has been frequently used by us and other authors in studies designed to determine the effects of heavy metal polluted-soils on plants [4,11,12].

Apart from the three mine soils mentioned above, for the bioassay we also used a soil from an abandoned aluminium mine [13] with high Cd, Cr and Ni concentrations and two soils from the layer used to seal a landfill [14] heavily polluted with all the metals determined. Control soil was obtained from an area of central Spain containing Al but lacking heavy metals. Table 2 provides pseudototal and bioavailable levels of metals in all the soils used.

Throughout the text, table, and figures, the soils have been designated according to their main pollutants as CuA, CuB (copper mines), Zn (silver mine) and Al (aluminium mine). The soil from the landfill is referred to as LF. The bioassay

**Table 1.** Plant species analysed by the GPS method. The number of mines where the species appeared is given in parentheses.

Spp. found in more than one mine	Spp. found at more than one point at the same mine site	Spp. found in one mine only
<i>Agrostis castellana</i> Boiss. & Reut. (3)	<i>Arrhenatherum elatius</i> subsp. <i>bulbosum</i> (Willd.) Schübl. & G. Martens	<i>Trifolium striatum</i> L.
<i>Dactylis glomerata</i> L. (2)	<i>Micropyrum tenellum</i> (L.) Link	<i>Crepis vesicaria</i> L.
<i>Corrigiola telephifolia</i> Pourr. (2)	<i>Jasione montana</i> L.	<i>Marrubium supinum</i> L.
<i>Spergularia rubra</i> (L.) C. Presl (2)	<i>Rumex bucephalophorus</i> L. <i>Thymus zygis</i> Loefl. ex L.	

design included 11 treatments plus a control. The treatments were set up using soils collected from different points (indicated by a number) in the four mines and landfill. Five replicates were prepared per treatment and control. Soil samples (average 3 kg) collected from the topsoil layer (0 – 10 cm) at each site were dried at room temperature, sieved through a 2 mm mesh, and manually mixed before their use in the bioassay. An aliquot of 0.5 kg was separated for subsequent analysis. Pots were filled with 0.5 kg of soil and planted with two pregerminated seeds in vermiculite.

The duration of the bioassay was four weeks. Pots were watered daily with deionised water. The plants were monitored weekly to determine plant heights and leaf symptoms, since these are indicators of heavy metal effects on plants [2]. At the end of the bioassay, 1 g samples of leaves collected at random from three replicates per treatment were stored at -20°C for chlorophyll quantification. The remaining leaves were washed with deionised water, oven dried (48 h, 70°C) and weighed.

**Table 2.** Pseudo-total (T) and bioavailable (B) metal concentrations (mg/kg) recorded in the soils used in the bioassay

	Fe		Mn		Zn		Cu	
	T	B	T	B	T	B	T	B
Control	5665	40	65	23	11	2.0	2.3	1.1
CuA 1	26346	158	541	133	265	64	2575	640
CuA 2	28096	88	489	63	129	17	1001	169
CuB 1	20758	70	323	27	145	39	4392	1143
CuB 2	17102	59	261	37	60	5.9	367	53
Al 1	75304	10	2535	44	154	7.3	262	13
Zn 1	30953	60	477	150	2282	325	53	5.9
Zn 2	27019	60	282	69	2193	336	54	4.5
Zn 3	24166	71	380	72	1640	265	38	4.2
Zn 4	32784	88	438	88	706	128	32	2.8
LF 1	78940	173	6291	134	41063	10309	1713	183
LF 2	111709	135	1706	72	5045	962	802	112
	Pb		Cd		Cr		Ni	
	T	B	T	B	T	B	T	B
Control	2.8	2.6	0.0	0.0	4.4	0.2	2.6	0.3
CuA 1	70	24	9.4	5.2	14	0.3	20	0.9
CuA 2	48	8.6	2.4	1.2	29	0.2	17	0.5
CuB 1	90	37	4.5	1.5	6.5	0.2	3.0	0.3
CuB 2	28	8.3	0.0	0.0	4.7	0.2	3.4	0.3
Al 1	30	2.1	60	32	329	0.7	264	1.8
Zn 1	2031	322	11	2.9	7.4	0.2	18	2.3
Zn 2	2865	761	11	3.2	5.2	0.2	16	2.1
Zn 3	2111	600	7.8	2.5	7.4	0.2	14	1.6
Zn 4	881	258	0.0	0.0	7.4	0.2	16	0.7
LF 1	26391	8086	322	120	267	5.4	72	3.2
LF 2	1954	1016	31	17	190	3.7	143	3.1

### 2.3. Optimisation and use of the GSP method

The GPS method created by Küpper et al. [6] and later expanded and improved [7] has been well described by its authors. The method is based on the description of the absorption spectrum of each leaf pigment by a series of Gaussian peaks. The absorption spectrum of a sample is then fitted by a linear combination of these “Gauss peak spectra”, including automatic corrections. The method is thus able to quantify the pigments in a leaf from their absorption spectra, provided these pigments have been modelled in the method. For vascular plants, the method is able to detect chlorophylls *a* and *b*, Zn-, Cu- or Cd- substituted chlorophylls *a* and *b*, pheophytins *a* and *b* and 8 carotenoids. Although the authors validated the GPS method using *Thlaspi fendleri* grown in hydroponic culture, here we tested its use in plants grown in heavy metal-polluted soils.

In an effort to maintain the nomenclature of the authors of the method, normal chlorophylls are designated Chl or [Mg]Chl, and chlorophylls with a central Zn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> or Cd<sup>2+</sup> replacing the native Mg<sup>2+</sup> ion are denoted [Zn]Chl, [Cu]Chl or [Cd]Chl respectively. Chls refers to both chlorophyll *a* and *b*. Although carotenoids were also detected, they were not taken into account in our assessment of the method. The term “affected Chls” is used for any chlorophyll whose central Mg<sup>2+</sup> has been replaced by any metal.

Samples of about 1 g of leaves and green parts were collected at random from several specimens per native plant species at each sampling point. For the lupins of the, 1 g samples were cut from two random individuals per pot as three replicates of each of the five treatments (soils). Samples were kept on ice until storage at -20°C.

The optimisation procedure was conducted on native plants. First we used 100 mg of each sample, but these had to be often diluted to avoid an absorbance greater than 1.5 units (method requirement), so we decided to use 50 mg samples. After weighing 50 mg of each sample, pigments were extracted in 100% acetone in a porcelain mortar with the help of sea sand. The extract was filtered through a 0.45 µm filter. The acetone extracts of the plant specimens were placed in paired quartz cells (optical path 10 mm) and absorbance measured in a Perkin-Elmer double-beam UV/vis spectrophotometer model λ16, 0.25 nm bandwidth, in the region 350-750

nm. When absorbance was higher than 1.5 units, the sample was diluted. The spectrum of each leaf extract was normalized to its maximum absorbance.

The normalized spectra obtained were subjected to the *GPS* fitting procedure using the Sigmaplot 10 programme. Resultant pigment concentrations in  $\mu\text{M}$  were expressed per gram of fresh sample ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ ) and as the percentage of affected Chl in a given sample.

The authors of the *GPS* method provide an equation for [Mg]Chls (“non stressed”), and three further equations incorporating the corresponding terms for [Zn]Chls (“stressed by Zn”), [Cu]Chls (“stressed by Cu”) or [Cd]Chls (“stressed by Cd”). They also recommend adding to the initial equation as many terms as pigments are expected in the sample. Given the soils used here are usually polluted with more than one heavy metal and that plants take up several of these, we established a fifth equation including terms for [Zn]Chl *a*, [Zn]Chl *b*, [Cu]Chl *a*, [Cu]Chl *b*, [Cd]Chl *a* and [Cd]Chl *b* and designated this equation “stressed by three metals”. According to the results obtained for the native plants using these five equations, we only used the equation “stressed by three metals” for the lupin samples.

#### **2.4. Determinations made in soils and plants**

Pseudototal (prior acid extraction, [15]) and bioavailable metal contents (prior ammonium acetate and EDTA extraction [16]) were determined in the bioassay soils by plasma emission spectroscopy (ICP-OES, Perkin-Elmer 4300DV).

Metal contents were also determined by ICP-OES with prior acid extraction [15] in the native plants and white lupins after washing in deionised water, oven drying (48 h, 70°C) and grinding.

The chlorophyll contents of the lupin leaves stored at -20°C were determined by HPLC according to the method of Masuda et al. [17].

#### **2.5. Data analysis**

Given the non-normal distribution of the data, Spearman’s coefficient was used to assess correlations between the heavy metal contents of plants and percentages of Zn-, Cu- or Cd-affected chlorophylls.

Data derived from the bioassay were compared by analysis of variance (ANOVA) and post hoc multiple comparison testing (Bonferroni test or Dunnett’s T3 test when there was no homoscedasticity).

All statistical tests were performed using SPSS 19 software for Windows.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Results obtained in the native plants

The five equations were applied to the absorbance spectra obtained for each of the 52 native plant extracts. Table 1 shows the native plant species analysed by the *GPS* method. Among the pigments analysed, only the Chl results were taken into account.

Results indicate that the central  $Mg^{2+}$  in Chl *b* was rarely replaced by any of the metals. In only 3/52 extracts was Chl *b* found to be affected by one of the metals using the three separate equations, and this occurred only in 1/52 when we used the equation “stressed by three metals”. According to the three equations for Zn, Cu and Cd incorporation by chlorophylls, 35/52 extracts showed [Zn]Chl *a*, 33/52 showed [Cu]Chl *a*, and only 4/52 showed [Cd]Chl *a*. However, the equation assessing stress due to three metals provided different results such that 18 extracts showed [Zn]Chl *a*, 28 showed [Cu]Chl *a*, and 11 showed [Cd]Chl *a*.

According to Küpper et al. [7] one of the major limitations of the *GPS* method is that equations sometimes lack terms for the pigments present in the extracts under test. This will generate errors or it will not be possible to fit the *GPS* to the sample spectrum. We observed this by comparing the results for [Zn]Chls, [Cu]Chls and [Cd]Chls obtained using the five different equations in samples of *Spergularia rubra*, *Agrostis castellana* and *Jasione montana* growing at different points of the three mines. In all these cases, the  $R^2$  of equation “stressed by three metals” was higher than that provided by the other four equations. In the case of *Rumex bucephalophorus*, its absorption spectrum could only be fitted in 2 of the 8 samples analyzed. We propose that the reddish colour of young stems of this plant reflects the presence of a pigment whose corresponding term is not included in the *GPS* equation.

---

In a further analysis, we examined correlations between the metals detected in leaves by ICP-OES and the percentage of Chl *a* affected by these metals separately using the results of each equation. Given the few samples in which Chl *b* was affected by any metal, this pigment was not considered.

The “stressed by Zn” equation was only used on data obtained for the samples collected at the silver mine, where Zn and Pb are the main metals present. Results were incoherent in that no relationship was detected between Zn concentration and percentage [Zn]Chl *a*.

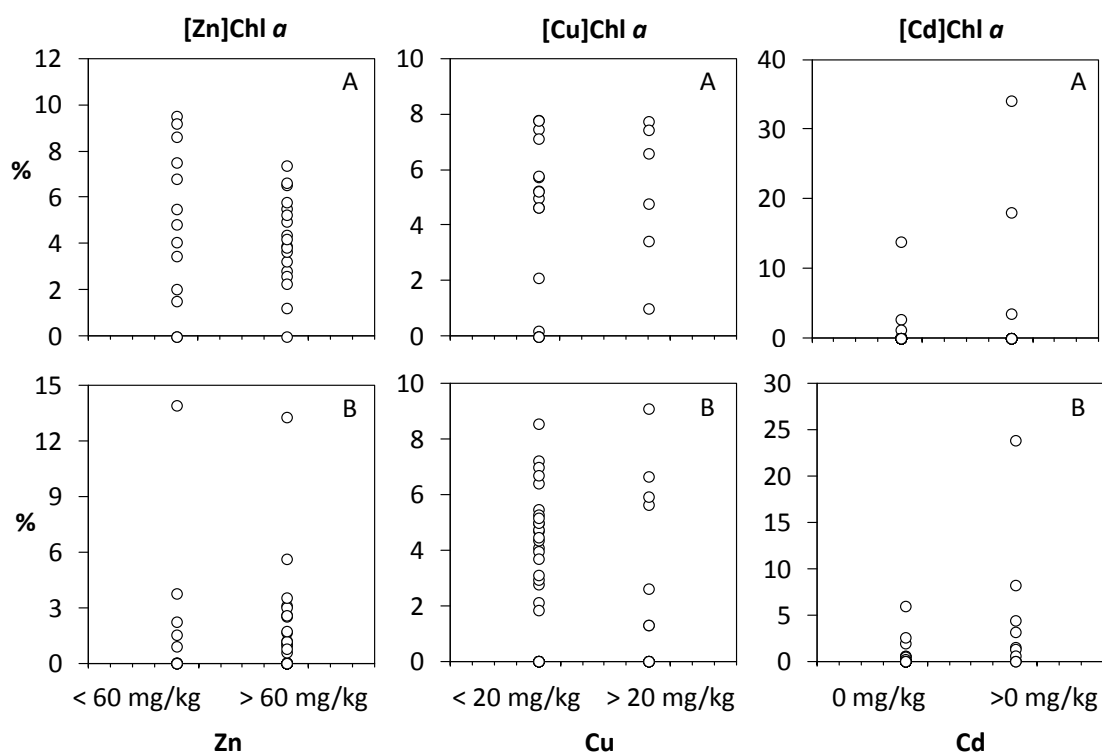
Küpper *et al.* suggest the possibility that if a pigment present in an extract not considered by the equation has a similar spectrum to another of the extract’s pigments, this will lead to erroneous results. Since other bivalent metal ions found in the plants, such as Pb and Ni, are able to substitute the central Mg<sup>2+</sup> ion in Chl *a* [5], we suggest that some of our samples contained more pigments than the corresponding terms included in the equation. We therefore decided to only include samples in which Zn was the only metal found in leaves or in which no appreciable amount of any metal was found. However, this strategy failed to improve the correlation coefficient.

Similarly, when we considered the results obtained for [Cu]Chl *a* and [Cd]Chl *a*, no correlations with the amounts of the corresponding metals determined in the plants were detected. When we used the “stressed by three metals” equation, data for samples containing a metal other than Zn, Cu or Cd were eliminated. However, again no significant correlations were observed. Thus, our second working hypothesis that we would be able to detect greater chlorophyll effects in plants exposed to more heavy metal pollution was not proven.

Next we considered the possibility that the *GPS* method would be able to distinguish between affected and non affected plants. To this end we stratified the plant samples into two categories: a) those with low metal contents in their leaves considered reference levels, and b) those with higher metal concentrations. Although a Zn concentration in leaves under 300 mg/kg is not considered toxic [18], we used 60 mg/kg of Zn as the limit for the two categories since this was the highest Zn concentration detected in the leaves of plants collected from soils where this metal was present at reference levels. The limit used for Cu was 20 mg/kg, and for

Cd, we divided the plants into those with or without Cd. As described above, the equations separately considering each heavy metal were only used on samples known to contain the corresponding metal alone or no metal at all. We then compared the percentages of affected Chls between the two groups but no difference was detected (Fig. 1).

Thus, our starting hypotheses were not fulfilled. We attribute this to the most important limitation described by Küpper et al., i.e., the presence in the extracts of pigments with similar absorption spectra in the measurement range (350-750 nm). In tests performed by Küpper et al., [Cd]Chl *a* and [Mg]Chl *a* could not be clearly distinguished when both were present in the same sample. According to our results, we consider that this problem affects all heavy-metal substituted Chl *a*'s, making it impossible to differentiate plants affected or not by pollution when growing in soils containing several metals.



**Fig. 1.** Scatterplot showing percentages of affected Chls in the samples grouped as “reference” or “metal containing” according to the leaf metal concentration data (mg/kg). Top row (A), results arising from the three separate equations for the corresponding three heavy metals. Bottom row (B), results arising from the “stressed by three metals” equation.

Plants may have numerous tolerance mechanisms to heavy metal stress [19]. These mechanisms depend on the plant species as well as adaptation of the ecotype to the hostile environment. Although this does not really explain the detection of affected Chl in our reference plants, it may explain why no relationship was observed between heavy metal accumulation and the percentage of affected Chl. Our bioassay was designed to control the factors driving anti-stress mechanisms such that only one plant species was exposed to different amounts of pollution. Since we used a commercial cultivable species, heavy metal adaptation was not expected.

### 3.2. Results obtained in the white lupin

The heights and dry weights recorded in the bioassay indicated that the lupins grew best in the soils control, CuB2 and Zn4. Decreasing plant growth in different treatments followed this order: CuB2, Zn4, Control > Zn3 > Al1 > LF2, CuA2, CuB1, LF1, CuA1, Zn2, Zn1. The most affected lupins were those grown in the other copper mine soils, in the most Zn- and Pb-polluted soils of the silver mine, and in the soils of the landfill. These were the soils where the highest heavy metal concentrations were found and the sites at which lupins took up the higher quantities of metals in their leaves (Table 3). Although plants grown in the Al mine soil (Al1) showed no major growth problems, they showed earlier signs of chlorosis than the rest of the plants. Thus, we expected worse effects on Chls in these plants (i.e., reduced production or increased Mg<sup>2+</sup> substitution) whereas we anticipated no such effects on the lupins growing in the control, CuB2 and Zn4 soils.

Figure 2 reveals reduced Chl concentrations, as determined by HPLC, in plants grown in the most polluted soils in relation to plants showing no metal toxicity symptoms. The GPS method indicated a similar trend, though the Chl concentrations detected by this method were clearly lower than those provided by HPLC. In contrast, the Zn-, Cu- or Cd-substituted chlorophylls ([Zn]Chls, [Cu]Chls, [Cd]Chls) determined by the GPS method (Fig. 3) were not coherent. Since no heavy metal-substituted Chl *b* was detected, all the results refer to Chl *a*. We expected to find some correlation, albeit weak, between leaf metal concentrations and the percentages of affected Chls. Above all, we predicted that control plants and those with low metal concentrations would show no heavy metal-substituted Chls. Thus, in clear contrast with our predictions, [Zn]Chl *a* was not detected in plants grown in



**Table 3.** Heavy metal contents (mean and *standard deviation*, mg/kg) recorded in the lupins grown in the different soils. Different letters in each column indicate significant (95%) differences between treatments.

Treatment	Fe	Mn	Zn	Cu	Pb	Cd	Cr	Ni
Control	117 ab 10	713 d 44	27 ab 6.1	7.3 ab 1.2	0.0 0.0	0.0 0.0	1.9 abc 0.9	0.0 0.0
CuA 1	94 ab 27	257 abc 45	53 b 3.6	68 de 4.3	0.0 0.0	0.0 0.0	2.6 c 0.2	0.0 0.0
CuA 2	82 ab 15	385 abcd 78	56 ab 7.1	105 e 8.5	0.0 0.0	0.0 0.0	2.5 c 0.1	0.0 0.0
CuB 1	86 a 0.7	187 abc 13	34 ab 0.3	49 abcde 10	0.0 0.0	0.0 0.0	3.2 bc 0.1	0.0 0.0
CuB 2	106 ab 11	795 cd 106	34 a 3.4	35 bc 5.2	0.0 0.0	0.0 0.0	1.2 ab 0.1	0.0 0.0
Al 1	105 ab 15	660 abcd 457	28 ab 10	17 abc 3.6	0.0 0.0	0.0 0.0	3.2 abc 1.2	3.0 5.1
Zn 1	89 ab 3.1	283 abc 26	1170 abcd 75	19 abcd 6.4	6.7 9.5	0.6 0.8	3.3 abc 1.4	4.1 5.8
Zn 2	73 ab 8.5	294 abc 67	1253 abcd 191	14 abc 3.4	0.0 0.0	0.5 0.9	3.5 abc 1.0	2.4 4.2
Zn 3	73 ab 19	484 bcd 58	1219 d 147	6.9 a 2.7	0.5 0.8	2.0 3.4	1.4 a 0.1	0.0 0.0
Zn 4	140 ab 21	1178 269	162 c 16	8.9 ab 1.4	0.0 0.0	0.0 0.0	1.3 a 0.1	0.0 0.0
LF 1	284 ab 363	133 ab 77	367 abcd 375	23 abc 7.6	61 101	0.7 1.2	3.5 abc 1.6	0.0 0.0
LF 2	71 b 2.0	147 a 34	96 abc 26	25 c 1.1	0.0 0.0	0.0 0.0	2.8 c 0.1	0.0 0.0

soils heavily polluted with Zn (Zn1 and Zn2) and these plants showed high Zn contents in their leaves while it did appear in control plants. Similarly, [Cu]Chl *a* was detected in every plant yet control plants showed the higher percentages of this substituted Chl. More expectedly, [Cd]Chl *a* was mostly detected in plants grown in the landfill soils where Cd is found in large amounts and this metal was also detected in the leaves of these lupins.

### 3.3. Assessment of the GPS method for its use in plants exposed to more than one heavy metal

The authors of the GPS method describe their procedure as rapid and inexpensive for the quantification of more than a dozen pigments in a crude extract, making it suitable for high-throughput screening applications [7]. In effect, the method has been successfully used to quantify Chls in *Crassula helmsii* [20] and *Thlaspi caerulescens* [21]. However, plant species were always exposed in hydroponic culture to a single metal. Our findings indicate the method is ineffective for assessing the combined effects of heavy metals on plants grown in real polluted

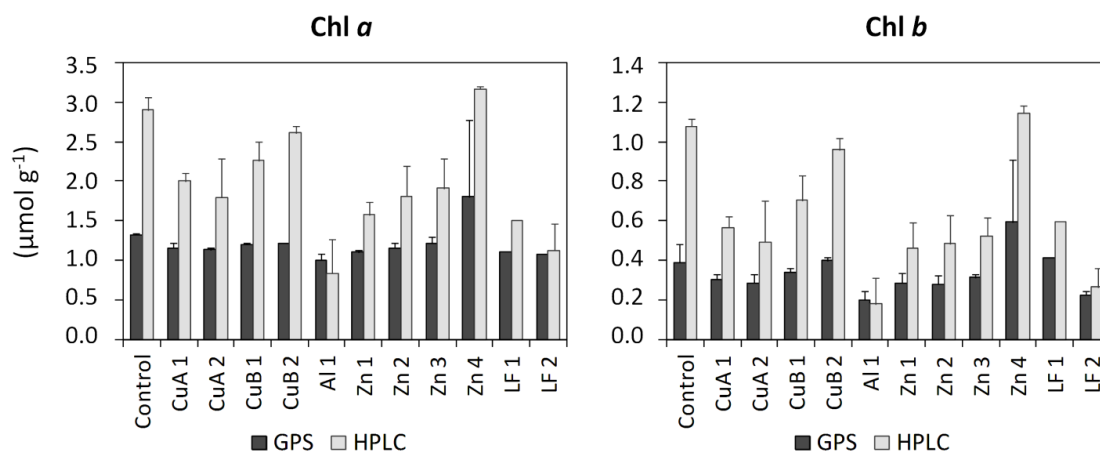


Fig. 2. Concentrations ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ ) of Chl a and Chl b determined by HPLC versus the GPS method

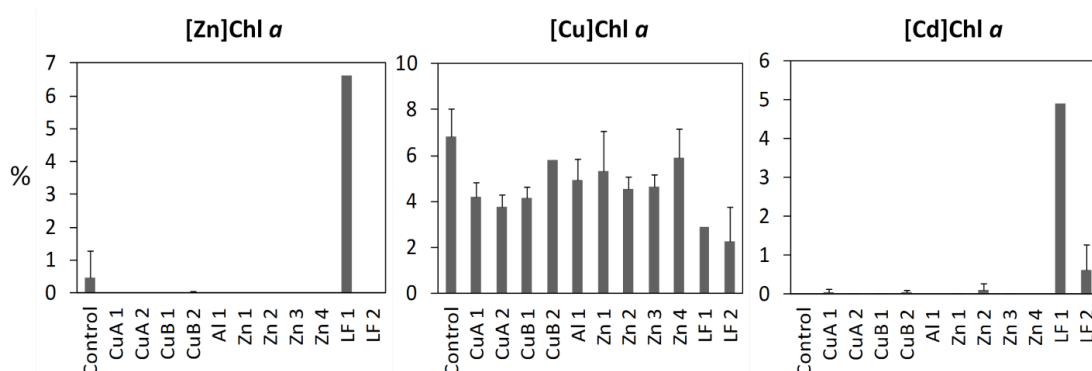


Fig. 3. Percentages of Chl a with  $\text{Mg}^{2+}$  replaced by Zn, Cu or Cd in the different treatments

soils. Not even when it is applied for testing a bioassay in controlled conditions, as that conducted with *L. albus*.

## 4. Conclusions

We optimized the GPS method with 12 native plant species from Mediterranean environment collected from sites with heavy metal polluted soils. The results obtained with these native plants and with white lupin grown in real soils polluted with various heavy metals, unfortunately, indicate its inability to differentiate plants whose chlorophylls are affected by polluted soils. Therefore, it is not advisable to use this method as an indicator of decrease of primary production of terrestrial ecosystems by the combined action of heavy metals.

## Acknowledgements

This study was funded by Projects CTM 2008-04827/TECNO from the Spanish Ministry of Science and Innovation, and P2009/AMB-1478A, EIADES Program of the Community of Madrid. Gutiérrez-Gines MJ was supported by an FPU Fellowship awarded by the Spanish Ministry of Education (AP2008-02934). The authors thank the Research Technicians Luis Cuadra and Elena Fernández for their contribution to this work.

## References

- [1] Liphadzi, M.S. and Kirkham, M.B. (2006) Physiological Effects of Heavy Metals on Plant Growth and Function. In: Huang, B. (Ed.) Plant-environment interactions. Taylor & Francis, New York, 243-269.
- [2] Gutiérrez-Ginés, M.J., Pastor, J. and Hernández, A.J. (2010) Effect of heavy metals from mine soils on *Avena sativa* L. and education strategies. Fresenius Environmental Bulletin 19, 2083- 2086.
- [3] Hernández, A.J., Alexis, S., Fernández-Pascual, M. and Pastor, J. (2006) Estudio de la nutrición mineral de *Phaseolus vulgaris* L. en suelos de cultivo que contienen metales pesados. In: Lamsfus, C. (Ed.) Nutrición Mineral. Aspectos fisiológicos, agronómicos y ambientales. Universidad Pública de Navarra, Pamplona, 573-580.
- [4] Pastor, J., Hernández, A.J., Prieto, N. and Fernández-Pascual, M. (2003) Accumulating behaviour of *Lupinus albus* L. growing in a normal and a decalcified calcic luvisol polluted with Zn. Journal of Plant Physiology 160, 1457–1465.
- [5] Küpper, H., Küpper, F. and Spiller, M. (1996) Environmental relevance of heavy metal-substituted chlorophylls using the example of water plants. Journal of Experimental Botany 47, 259-266.
- [6] Küpper, H., Spiller, M. and Küpper, F.C. (2000) Photometric Method for the Quantification of Chlorophylls and Their Derivatives in Complex Mixtures: Fitting with Gauss-Peak Spectrum. Analytical Biochemistry 286, 247-256.
- [7] Küpper, H., Seibert, S. and Paraneswaran, A. (2007) Fast, Sensitive, and Inexpensive Alternative to Analytical Pigment HPLC: Quantification of Chlorophylls and Carotenoids in Crude Extracts by Fitting with Gauss Peak Spectrum. Analytical Chemistry 79, 7611-7627.
- [8] Hernández, A.J. and Pastor, J. (2005) Incidencia conjunta de metales pesados en pastos de vacuno ubicados en el entorno de una mina abandonada en la sierra de Guadarrama. In: De la Roza, B. et al (Eds.) Producciones agroganaderas: Gestión eficiente y conservación del medio natural. SERIDA, Gijón, 955-963.
- [9] Hernández, A.J. and Pastor, J. (2008) Relationship between plant biodiversity and heavy metal bioavailability in grasslands overlying an abandoned mine. Environmental Geochemistry and Health 30, 127-133.
- [10] Pastor, J., Gutiérrez-Ginés, M.J. and Hernández, A.J. (2010) Contenidos de metales en plantas y estudio de la generación de lixiviados en una antigua mina de plata con contenidos elevados de Zn y Pb. In: Estavillo, J.M. (Ed.) Aspectos fisiológicos, agronómicos y

ambientales de la nutrición mineral en las plantas. Universidad del País Vasco, Bilbao, 217-223.

[11] Castaldi, P., Santona, L. and Melis, P. (2005) Heavy metal immobilization by chemical amendments in a polluted soil and influence on white lupin growth. *Chemosphere* 60, 365-371.

[12] Martínez-Alcalá, I., Clemente, R. and Bernal, M.P. (2009) Metal availability and chemical properties in the rhizosphere of *Lupinus albus* L. growing in a high-metal calcareous soil. *Water, Air, & Soil Pollution* 201, 283-293.

[13] Hernández, A.J., Alexis, S. and Pastor, J. (2007) Soil degradation in the tropical forests of the Dominican Republic's Pedernales province in relation to heavy metal contents. *Science of the Total Environment* 378, 36-41.

[14] Hernández, A.J., Pérez-Leblic, M.I., Bartolomé, C., Rodríguez, J., Álvarez, J. and Pastor, J. (2012) Ecotoxicological diagnosis of a sealed municipal landfill. *Journal of Environmental Management* 95, S50-S54.

[15] Walsh, L.M. and Soil Science Society of America. (1971) *Instrumental Methods for analysis of soils and plant tissue*. Soil Science Society of America, Wisconsin.

[16] Lakanen, E. and Ervio, R.A. (1971) Comparison of eight extractants for the determination of plant available micronutrients in soils. *Acta Agricultura Fennica* 123, 223-232.

[17] Masuda, T., Polle, J.E.W. and Melis, A. (2002) Biosynthesis and distribution of chlorophyll among the photosystems during recovery of the green alga *Dunaliella salina* from irradiance stress. *Plant Physiology* 128, 603-614.

[18] Kabata-Pendias, A. and Mukherjee, A.B. (2007) *Trace Elements from Soil to Human*. Springer-Verlag, Berlin and Heidelberg.

[19] Hall, J.L. (2002) Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany* 53, 1-11.

[20] Küpper, H., Götz, B., Mijovilovich, A., Küpper, F.C. and Meyer-Klaucke, W. (2009) Complexation and toxicity of copper in higher plants. I. Characterization of copper accumulation, speciation, and toxicity in *Crassula helmsii* as a new copper accumulator. *Plant Physiology* 151, 702-714.

[21] Küpper, H., Götz, B., Mijovilovich, A., Küpper, F.C. and Meyer-Klaucke, W. (2009) Complexation and toxicity of copper in higher plants. II. Different Mechanisms for copper versus cadmium detoxification in the copper-sensitive cadmium/zinc hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* (Ganges Ecotype). *Plant Physiology* 151, 715-731.



# Chapter 4

---

**Integrated approach to assessing the effects of soils polluted with heavy metals on a plant population**



This chapter reproduces the published article:  
Gutiérrez-Ginés MJ, Pastor J, Hernández AJ. 2012.  
*Ecotoxicology*, 21: 1965–1978.

## **Integrated approach to assessing the effects of soils polluted with heavy metals on a plant population**

### **Abstract**

This study addresses the effects of soil polluted with more than one heavy metal in a grass species. A 16-week bioassay with *Avena sativa* L. was conducted in microcosms using soils from two abandoned mines in central Spain that contained levels above World Health Organization (WHO) reference limits for soils of more than three heavy metals. Pollution effects were examined at cell, tissue, organ, plant and population levels. For this purpose, dry weight, maximum height and number of leaves were determined; leaf tissues were observed by low temperature scanning electron microscopy; the metal contents of roots and shoots were determined by plasma emission spectroscopy and their distribution in different tissues was analyzed by X-ray microanalysis using an environmental scanning electron microscope. The results explain the accumulation and translocation of soil metals by this plant species; their effects in cells, tissues and growth of plants; and allow inference on population effects. The discussion of the methodological approach leads us to propose a valid protocol to assess the effects of a set of heavy metals present in the topsoil of polluted sites on a plant population. We recommend its use for an ecotoxicological diagnosis and risk analysis of similarly polluted sites.

Key words: ecotoxicologic assessment, bioassays, Cu, Zn, Pb, *Avena sativa*.



## Un enfoque integrado para evaluar los efectos de los suelos contaminados por metales pesados en una población vegetal

### Resumen

En este trabajo se estudian los efectos de los suelos contaminados por más de un metal pesado en una especie gramínea. Se llevó a cabo un bioensayo en microcosmos de 16 semanas con *Avena sativa* L., usando suelos provenientes de dos minas abandonadas del centro de España que contenían al menos tres metales pesados en concentración mayor los niveles de referencia de la Organización Mundial de la Salud. Los efectos de esta contaminación se examinaron a nivel celular, tisular, de órganos, individuos y finalmente población. Para ello, se determine el peso seco, la altura máxima y el número de hojas de los individuos; los tejidos foliares se observaron en un microscopio electrónico de barrido a bajas temperaturas; los contenidos de metales en partes aéreas y raíces se determinaron por espectroscopía de emisión por plasma y su distribución en los diferentes tejidos se analizó mediante microanálisis de rayos-X usando un microscopio electrónico de barrido ambiental. Los resultados explican la acumulación y traslocación de los metales del suelo en esta especie vegetal; sus efectos en células, tejidos y crecimiento de los individuos; y permiten inferir efectos a nivel de población. La discusión de la metodología conduce a proponer un protocolo válido para evaluar el efecto conjunto de metales pesados de la capa superficial edáfica en una población vegetal. Podemos recomendar su uso para diagnósticos ecotoxicológicos y análisis de riesgos de emplazamientos con similares problemas de contaminación.

Palabras clave: evaluación ecotoxicológica, bioensayos, Cu, Zn, Pb, *Avena sativa*

## 1. Introduction

Pollution causes soil degradation, which may lead to a decline in its main functions: biomass production and recycling of nutrients, thus affecting its ecosystems. Impacts on these ecosystems depend on the bioavailability of pollutants to their autotrophic components. Pollutants, as ecosystem stressors, can produce effects at different organization levels, from behaviour or physiological responses of individuals to changes in structure and function of ecosystems (Hernandez and Pastor 2008b). Obviously, the parameters and techniques used for the assessment of these effects depend on the studied level, as explained in Römbke and Moltmann (1996). In spite of the variety of responses and relationships between them, studies addressing this issue have focused only on chemically analyzing plants and soils or measuring plant dry weight as indicators of toxicity (e.g. Ebbs and Kochian 1998; Lombi et al. 2001; Pastor et al. 2003). Other studies have attempted to localize metals in plants using electron microscopy techniques (Broadhurst et al. 2004; Fernando et al. 2006). Most of these studies have been conducted on hydroponic cultures and rarely have microcosms been set up using soils from real scenarios. However, far from finding one pollutant as the only cause of pollution on a site, it is relatively common to find sites polluted with more than one heavy metal, even mixed with organic pollutants, and with several affected ecosystems (Hernández et al. 2009).

The main objective of this study was to find a combination of techniques that would generate enough data within a reasonable time period (a few months) to allow (1) the assessment of the effects (accumulation, translocation and phytotoxicity) of topsoil heavy metals on a plant population, and (2) to discuss an effective protocol for the evaluation of effects of polluted soils on a plant species at different organization levels, from cell to population.

Our approach was based on prior knowledge of soil metal levels and their impacts on plants grown in these soils (Hernández and Pastor 2008a; Pastor and Hernández 2008; Pastor et al. 2003; 2010). The impacts of such levels of pollutants were determined at both the plant population and cell levels through an integrated study

of plant variables such as dry weight, metal contents of shoots and roots and electron microscopy observation.

## **2. Materials and methods**

### **2.1. Bioassay is a proper tool for the objective of this work**

In the context of managing sites with dangerous chemical substances, bioassays can be defined as the exposure of biological indicators to environmental samples collected in the field (in this case, soils) aimed at detecting the presence of toxicity and/or identify the toxic effects produced on resident species (Hernández and Pastor 2008a). According to Verhoef and Van Gestel (1995), this method can also be applied to determine the bioavailability of pollutants in soils as an indication of the potential risk for higher trophic levels. Therefore, bioassays were regarded as an important and convenient tool to test the combination of chosen techniques for the assessment of effects of soil polluted by a set of heavy metals on a plant population. Of all types of bioassays, those which are conducted in microcosms were chosen as suitable for studying interspecific interactions (Römbke and Moltmann 1996), and so effects at population level. To study these effects we tried the protocol shown in table 1, later improved in the discussion.

### **2.2. Selecting the soil source and plant species for the bioassay**

For our bioassays, we selected the soils of two abandoned mines in central Iberian Peninsula. The problems faced by these sites have been described elsewhere (Hernández and Pastor 2005; 2007; Pastor et al. 2003; 2007; 2010). One of these sites was an old copper mine in the Sierra de Guadarrama (Garganta de los Montes, Madrid) abandoned around 40 years ago, whose current landfill amounts to 3500 m<sup>3</sup> approximately. The second site was a silver mine in the province of Toledo that ceased operation in the 1980s, excavated to a depth of 150 m, producing a total volume of landfills of around 25000 m<sup>3</sup>. At both sites, topsoils contain varying amounts of various heavy metals.

Two criteria were used to select these soils: they should contain high levels of at least one heavy metal and significant amounts of other heavy metals. Al and Mn contents were also taken into account since they can have toxic effects in acid soils.

**Table 1.** Discussed protocol for the performance and assessment of a bioassay for the study of effects of polluted soils on a plant population

<b>Characteristics of the bioassay</b>		
Layout:	Microcosm	
Soil source:	Different polluted points of the studied site	
Soil preparation:	As little as possible: try to keep soil structure and seed bank	
Tested plant:	Chosen by the researcher depending on the purposes	
Population density:	Number of seeds depending on their size	
Duration:	Life cycle of the tested plant	
<b>Assessment of effects of polluted soils in the plant population</b>		
Organization level	Technique or variable measured	Identified effects
Population	Monitoring:	
	- cover of seed bank plants	Viability of the population Infer possible competition
Individual	- number of produced seeds	Viability of the population Ability of reproduction
	- height	Changes in the evolution of growth
	- number of leaves	
	- degree of chlorosis	Symptoms in leaves
	Dry weight	Changes in growth
Cell and tissue	ICP-OES analysis	Metal accumulation capacity
		Translocation
	LTSEM	Possible tolerance mechanisms
		Changes in cell/tissue structure
	EDS/BSED microanalysis	Localization of metals in different tissues
	Translocation of metals	
		Possible exclusion mechanisms

Table 2 shows that soils chosen for the bioassay contained more than 5 metals whose concentrations were higher than the reference limits for soil defined by the WHO. For As, we used the Dutch reference limit (20 mg kg<sup>-1</sup>). Limits for Al and Mn were soil levels above 20,000 and 300 mg kg<sup>-1</sup> (considered above normal according to our own data). Soil 0, used as control, was also chosen as a degraded soil by loss of fertility instead of heavy metal pollution, as can be seen in table 3. It was an agricultural degraded soil obtained from a cropland in the same area as the polluted soils.

Since Zn and Pb were the main metal pollutants in soils from the silver mine, these soils are hereafter referred to as Zn/Pb co-polluted soils although other metals are also present. Similarly, soils from the copper mine are referred to as Cu polluted soils. Soils were collected from an average sample (about 3,5 kg) taken at random from the topsoil layer (0-15 cm) at each site.

Choice of plant species was based on the following criteria: (i) a rapidly and easily growing crop species generating sufficient biomass over a relatively short period,

**Table 2.** Al, Fe, Mn and As and other heavy metal (mg kg<sup>-1</sup>) contents of the soils used for the bioassays. n.d. not detected.

Soil	Al	Fe	Mn	Zn	Cu	Pb	Ni	Cr	Cd	As
Soil 0	5926	4914	113	12	5.7	n.d.	1.4	n.d.	n.d.	n.d.
<u>Silver mine</u>										
Soil 1	34595	19605	300	2410	32	1215	16	2.0	9.0	239
Soil 2	30556	25228	329	1983	36	1742	14	2.3	5.4	281
Soil 3	25515	47875	2375	5095	85	3855	36	2.0	25.5	326
<u>Copper mine</u>										
Soil 4	39784	31081	564	133	971	126	17	2.2	2.8	35.5
Soil 5	28265	23813	825	362	2725	152	14	2.4	13.3	51.5
WHO ref levels			-	140	36	50	35	100	1.0	-

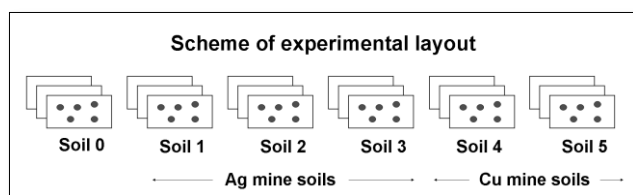
**Table 3.** Soil pH, organic matter (%), nitrogen (%) and available K, Ca, Na and Mg (mg 100g<sup>-1</sup>) contents of the soils.

Soil	pH	OM	% N	K	Ca	Na	Mg
Soil 0	5.9	0.82	0.05	12.3	24	1.0	4.5
<u>Silver mine</u>							
Soil 1	6.3	9.0	0.43	41.0	229	1.0	14.6
Soil 2	5.4	2.9	0.09	11.0	231	1.0	10.6
Soil 3	7.2	9.7	0.41	27.5	261	1.0	16.6
<u>Copper mine</u>							
Soil 4	5.2	4.7	0.23	19.4	55	0.8	5.8
Soil 5	5.7	15.7	0.67	26.5	167	1.0	16.5

(ii) a crop species cultivated in the area, similar to some of the native genera found on these sites, (iii) seeds available in sufficient quantity. *Avena sativa* L. is a crop grass species used mainly as forage. Considering crop extension, it is the second most important grass in our country. As most crop species, it is easy to germinate and plant. Although maximum production occurs at low pH, it adapts to various soil types. Also, a similar native uncultivable species is found in the chosen sites (*Avena barbata*); nonetheless, this species is not eligible, as different adapted ecotypes can be present in every site. As a result, *Avena sativa* L. is an appropriate species for our criteria, and seeds were easily obtained from a crop planted for several years on the farm where control soil was collected from.

### 2.3. Experimental layout and set up

All collected soils were transferred to the laboratory where they were dried at room temperature. An aliquot of each soil used in the bioassay was analysed in order to determine its properties. Soil organic matter, pH, and N content were determined as described by Hernández and Pastor (1989). Pseudo-total metal contents of soils were determined by inductively coupled plasma-optical emission spectroscopy (ICP-OES, Perkin-Elmer 4300DV) following HNO<sub>3</sub> and HClO<sub>4</sub> digestion at a 4:1 ratio (Walsh



**Fig. 1.** Experimental layout of the bioassays in which *Avena sativa* L. was grown in polluted soils from abandoned mine sites containing several heavy metals

and SSSA, 1971). X-ray fluorescence (Siemens SRS 300) was used to determine soil As concentrations. Soil exchangeable Ca, K, Na and Mg levels were determined by ICP-OES with prior extraction

using ammonium acetate.

When used for the microcosms, soils were not sieved to avoid disrupting soil aggregates and losing the seed bank, though large stones were removed. Thereby, we intended to reproduce natural conditions of soils. The microcosms were set up in 19 cm length, 14 cm width and 10 cm depth pots, filled with 1 kg of soil. A grid was placed at a distance of 1cm from the bottom of the pot in order to collect leaching. Five oat seeds were germinated in Petri dishes and a growth chamber and then sown in each pot as three replicates per treatment (fig 1). The experiment was continued for 16 weeks in a greenhouse at controlled conditions (17.4°C – 24.5°C and 70 – 80% humidity). The photoperiod varied from 11/13 h to 9/15 h (day/night), with a mean daily total PAR of  $23.7 \pm 5.8 \text{ mol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ . Microcosms were watered with 100 ml of deionised water everyday.

#### 2.4. Measurement of plant growth and development

Dry weight was recorded at the end of the experiment as one effect at individual scale. But we also tried to measure development of growth along the experiment, so it was necessary to establish variables which were easy enough to measure without implying the alteration of the bioassay. So, throughout the experiment, the number of leaves and maximum height of oats were monitored at three different times. Baseline values of 3 cm height and 2 leaves were taken, being the average for the planted oat seedlings.

Leaf symptoms, ability to be fruitful and cover of seed bank plants were also observed. These plant variables were then assessed for signs of heavy metal toxicity as described in Hernández et al. (2012).

## 2.5. Metal concentration in plant parts and distribution in different tissues

The localization of metals in different plant tissues was carried out by an environmental scanning electron microscopy (SEM). At the end of the experiment, three fragments of leaves and roots were picked at random from each treatment and kept in paper bags at room temperature to dehydrate them before observation in the Impact-S INSPECT environmental SEM. Some 8 to 10 pieces of the dry fragments were cut and adhered to the instrument's aluminium stubs using conductive carbon tape, and introduced in the low-vacuum chamber. The top three pieces in each sample holder were observed using the backscattered electron detector (BSED/SEM). The lighter shades of these images, indicative of their different compositions, were selected for microanalysis using the energy dispersive X-ray detector (EDS/SEM) (Analytical-Inca Oxford Instruments). These microanalyses did

**Table 4.** Means and (standard deviations) of the macronutrients, and Fe and Mn contents (mg kg<sup>-1</sup>; % N) of oat roots and shoots grown in the different soils.

Soils	N	Ca	Mg	P	K	Na	Fe	Mn
<b>Roots</b>	***	*	*	**	*		***	**
Soil 0	-	1345 a (574)	413 a (163)	852 bc (246)	5262 ab (1068)	258 (100)	1473 a (403)	133 a (29)
Soil 1	1.18 b (0.08)	5243 b (2556)	750 abc (168)	1433 c (614)	6332 bc (572)	246 (10)	2628 ab (2212)	704 b (461)
Soil 2	-	2776 b (723)	603 ab (192)	466 a (105)	5017 ab (920)	452 (249)	12374 c (2091)	487 b (91)
Soil 3	0.56 a (0.07)	3929 b (218)	622 ab (18)	636 ab (42)	5708 ab (340)	243 (45)	5785 b (1616)	1396 c (529)
Soil 4	-	3298 b (520)	1138 c (400)	388 a (74)	7773 c (365)	1306 (1.5)	3186 ab (1718)	401 b (143)
Soil 5	-	3965 b	956 bc	n.d	4091 a	3001	2786	846
<b>Shoots</b>	***		***	** (KW)	* (KW)	** (KW)	*	***
Soil 0	0.60 ab (0.27)	5721 (875)	1547 a (183)	7686 (1280)	22972 (852)	715 (30)	263 bc (94)	369 a (53)
Soil 1	1.06 b (0.42)	11842 (7471)	1488 a (568)	4368 (1466)	22152 (8013)	224 (112)	134 a (68)	278 a (145)
Soil 2	0.82 ab (0.22)	13638 (6079)	2576 b (463)	1732 (407)	23897 (1924)	590 (145)	305 c (64)	1306 c (188)
Soil 3	0.51 a (0.37)	11095 (4925)	1726 a (218)	1401 (980)	26492 (2312)	318 (75)	178 ab (72)	444 a (63)
Soil 4	2.28 c (0.01)	11335 (145)	3221 bc (54)	1455 (102)	11548 (1117)	1399 (237)	260 abc (25)	1212 bc (20)
Soil 5	-	14203 (1752)	3272 c (363)	960 (33)	7286 (390)	6458 (458)	155 ab (55)	944 b (94)

-: not analysed, n.d: not detected. Different letters in a column indicate significantly different means (p<0.05). The ANOVA and Kruskal-Wallis (KW) results are shown as \* (p<0.05), \*\* (p<0.01) and \*\*\* (p<0.001).

not consider C and O levels. In total, 28 plant tissue pieces were observed. 390 microanalyses were performed on them.

The remaining materials, shoots (leaves and stems) and roots separately, were washed with deionised water and oven-dried at 70 °C for 48 hours before measuring dry weights. Vegetal samples were grinded, digested with HNO<sub>3</sub> and HClO<sub>4</sub>, and analyzed by ICP-OES to determine metal contents.

## 2.6. Observation of cell and tissue effects

Electron microscopy observation of hydrated samples was chosen to study the effects at cell and tissue level. Before the end of the bioassay, a fragment of fresh oat leaf collected at random from each treatment was subjected to low-temperature scanning electron microscopy (LTSEM) using a DSM 960 Zeiss microscope. The sample preparation and observation procedure was that described by De Los Ríos et al. (1999).

## 2.7. Data analysis

The area between cells was quantified in LTSEM pictures using the image processor ImageJ (Rasband 1997-2011). This area was divided by mesophyll area in the picture and expressed as %. This % as well as plant variables (dry weights, number of leaves and maximum heights) and element levels in roots and shoots were compared between treatments by analysis of variance (ANOVA) and LSD multiple range test. Data whose variances were significantly different or did not fit a normal distribution were log transformed. When log transformation was insufficient, non-parametric Kruskal-Wallis (KW) test was used.

A bioaccumulation index ( $[\text{metal}]_{\text{plant}} \cdot [\text{metal}]_{\text{soil}}^{-1}$ ) was calculated from the ICP-OES data. This index was correlated with soil pH and Zn, Pb, and Cu concentrations using Pearson's coefficient when log transformation of data was able to equalize variances, or using the non-parametric Spearman coefficient when this was not the case. Only Zn, Pb and Cu were chosen for this analysis, being the only three metals presenting important differences in concentration between soils and between oats.

All statistical tests were performed using SPSS19 software (SPSS 2010). The level of significance was set at  $p < 0.05$ .



### 3. Results

#### 3.1 Measurement and observation of growth and symptoms

Variables indicating oat growth (dry weight, maximum height increase and number of leaves increase) showed significantly lower values in oats planted in Cu polluted soils compared to the remaining soils (maximum height increase was even negative in the last measurement). In contrast, the oats grown in the Zn/Pb co-polluted soils showed growth that was similar to or even surpassed that of the control plants (figs 2 and 3). In addition, in the Cu polluted soils, oats presented signs of leaf chlorosis and were incapable of fruiting, unlike oats grown in the Zn/Pb polluted soils. The behaviour of the plants grown from the seed bank was not too different than that of

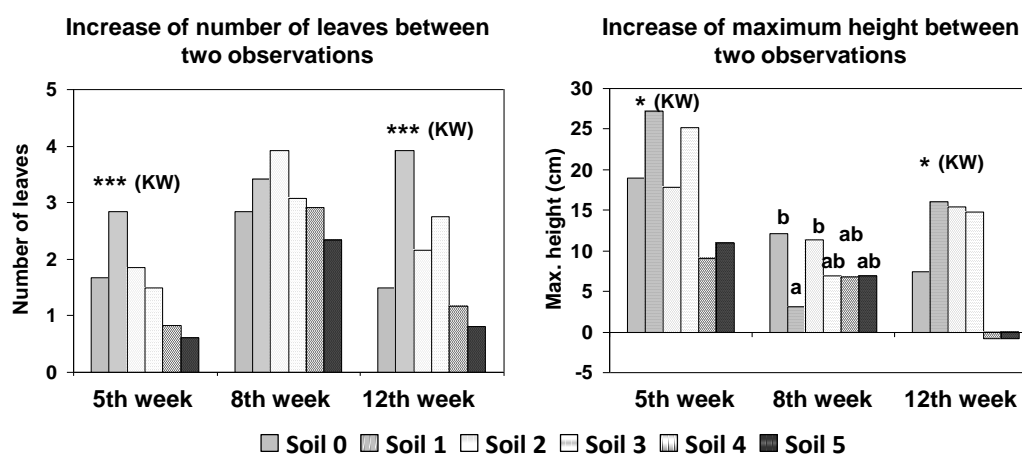


Fig 2. Increases in the number of leaves and maximum heights (cm) recorded between two consecutive time points. Different letters indicate significant ( $p < 0.05$ ) differences between treatments. KW: Kruskal-Wallis test indicating a significance of \*\*\* ( $p < 0.001$ ) or \* ( $p < 0.05$ ).

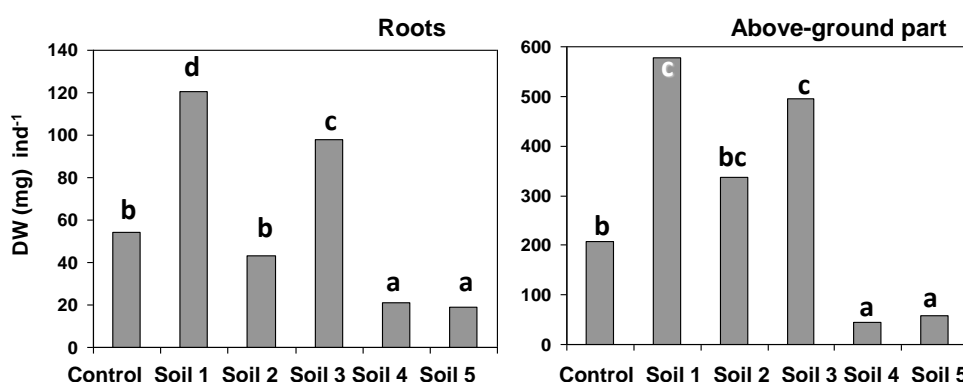


Fig. 3. Dry weights (mg) of shoots or roots per plant and significant ( $p < 0.05$ ) differences between treatments.

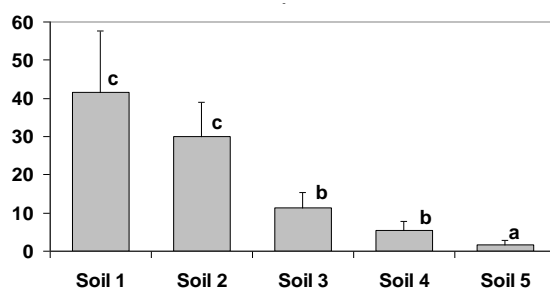
the oats (fig 4). Plant cover values were significantly higher for the Zn/Pb co-polluted soils than for Cu polluted soils. Despite the large amount of seed bank vegetation, oats grown in Zn/Pb soils seemed not to compete with these. Plant cover for soil 0 (crop soil) is not shown since this soil had no natural seed bank.

### 3.2. Metal uptake and location in different tissues

The results of ICP-OES analyses are provided in tables 4 and 5. In all cases, metals are mostly retained by roots. And they correspond to those found in higher concentration in each soil. Thereby, oats grown in Zn/Pb co-polluted soils present significant higher levels of these metals in roots, although this difference is not as evident in shoots. The same is observed in the case of Cu. Other important metals present in both roots and shoots are Cd, Cr and Ni in all polluted soils, and As in roots of oats planted in soils 2 and 3. Although Al in soil 0 is much lower than that in mine soils, its concentration in control shoots is significantly higher.

As explained before, soil 0 is a degraded soil by loss of fertility, so the concentration of organic matter and macronutrients is much lower in this soil compared to mine soils. This is also evidenced in plants, as levels of Ca, Mg and K is lower in roots of oats grown in soil 0. This difference is not that high in shoots.

Bioaccumulation indices (fig 5) are not the same for all elements and soils. Thus, correlation coefficients calculated for Zn, Pb and Cu reveal negative relationships between the bioaccumulation indices of these elements in shoots and their concentrations in soils (Pearson  $r$  values of  $-0,76$ ,  $-0,71$  and  $-0,71$  respectively), and between the bioaccumulation index for Zn and soil pH ( $r = -0,97$ ). This relationship



**Fig 4.** Plant cover (%) for all species from the seed bank present in week 12 (means, standard deviations and significant ( $p < 0.05$ ) differences between groups).

is also found in roots but with less significance, except for Pb in roots, where the relationship is positive.

To complement this type of evaluation, EDS/SEM microanalysis was used to track the distribution of heavy metals in the different root or leaf tissues. However, since the

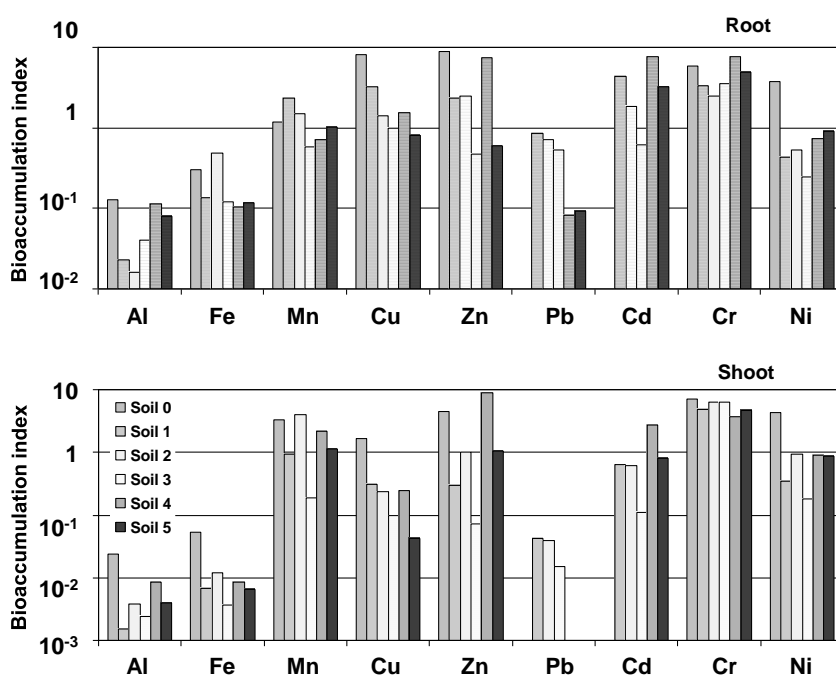


Fig. 5. Bioaccumulation indices ( $[\text{metal}]_{\text{plant}} \cdot [\text{metal}]_{\text{soil}}^{-1}$ ) calculated for the roots and shoots of oats grown in the different polluted soils

Table 5. Means and (standard deviations) of Al, As and other heavy metals (mg kg<sup>-1</sup>) detected in the roots or shoots of oats grown in the different soils.

Soils	Al	Zn	Cu	Pb	Cd	Cr	Ni	As
<b>Roots</b>		***	***	* (KW)	*			
Soil 0	750 (506)	108 a (53)	46 a (14)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	14 (21)	5.3 (9,1)	0.0 (0,0)
Soil 1	784 (532)	5572 c (2737)	102 b (37)	1052 (675)	39 b (21)	7,9 (1,8)	7,0 (3,2)	0,0 (0,0)
Soil 2	488 (170)	4894 c (3614)	51 a (27)	1251 (209)	10 a (3)	5,9 (1,5)	7,4 (4,4)	110 (100)
Soil 3	1042 (1030)	2418 bc (1409)	85 ab (24)	2047 (401)	16 a (4,4)	8,5 (2,0)	8,8 (0,7)	
Soil 4	4532 (2600)	983 b (730)	1521 c (134)	10 (15)	21 ab (0,6)	18 (4,7)	12 (0,3)	0,0 (0,0)
Soil 5	2280	220	2201	12	44	12	13	0,0
<b>Shoots</b>	***	* (KW)	* (KW)	* (KW)	** (KW)		**	
Soil 0	140 c (36)	53 (60)	9.5 (3.6)	0.0 (0.0)	0.2 (0.3)	17 (3.9)	6.1 a (5.0)	0.0 (0.0)
Soil 1	52 a (27)	729 (532)	9.9 (6.0)	51 (44)	5.8 (4.3)	12 (6.7)	5.5 a (3.7)	0.0 (1.0)
Soil 2	114 bc (18)	2040 (435)	8.6 (6.1)	68 (38)	3.4 (0.7)	15 (3.9)	13 b (1.6)	0.0 (0.0)
Soil 3	61 ab (47)	370 (41)	8.4 (6.0)	58 (32)	2.8 (0.9)	13 (5.1)	6.4 a (1.0)	0.0 (0.0)
Soil 4	344 d (47)	1192 (1404)	237 (56)	0.0 (0.0)	7.6 (2.0)	8.9 (0.1)	15 b (1.0)	0.0 (0.0)
Soil 5	113 abc (66)	383 (148)	117 (13)	0.0 (0.0)	11 (1.3)	10 (2.3)	12 b (2.6)	0.0 (0.0)

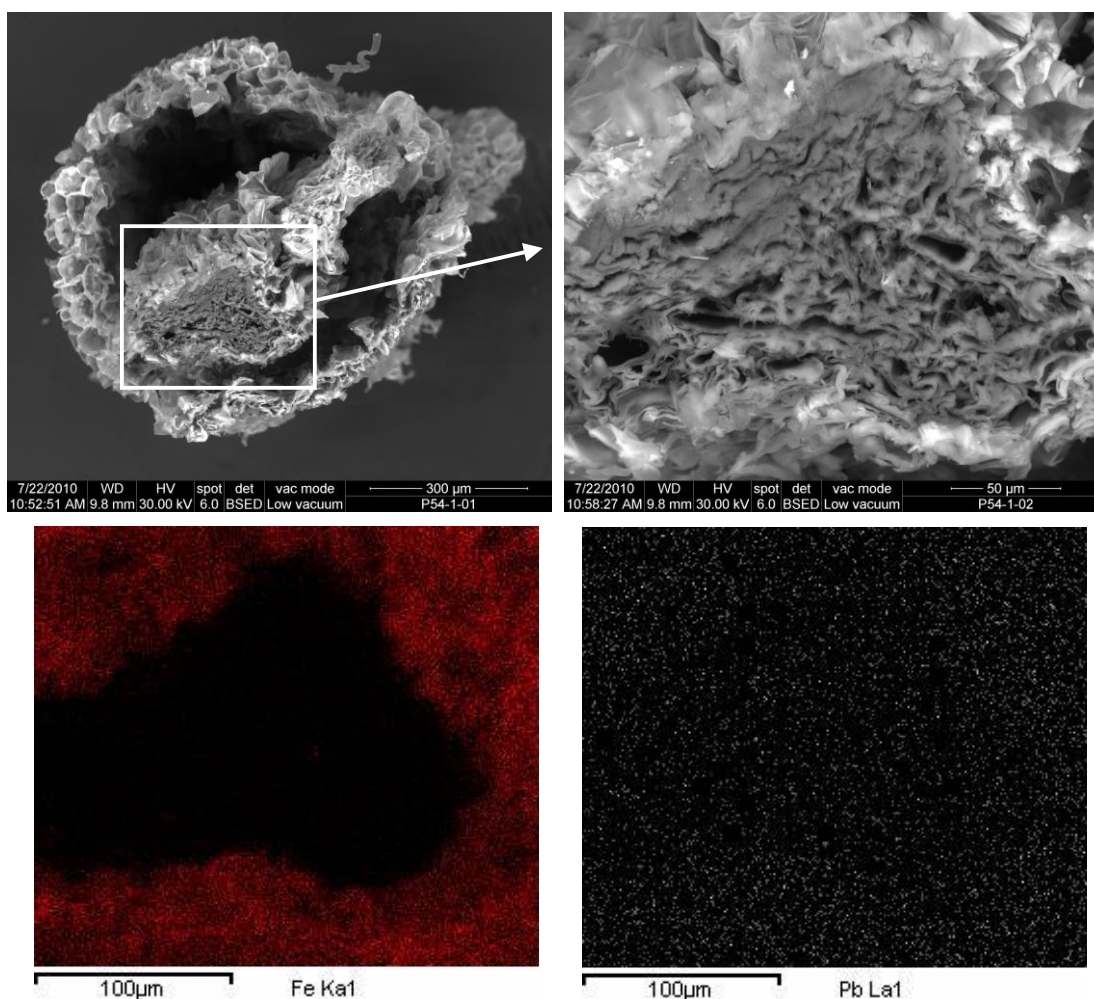
Different letters in a column indicate significantly different means ( $p < 0.05$ ). The ANOVA and Kruskal-Wallis (KW) results are shown as \* ( $p < 0.05$ ), \*\* ( $p < 0.01$ ) and \*\*\* ( $p < 0.001$ ).

**Table 6.** Microanalytical observations (%) conducted on the roots in which the given metal appears. n: number of observations in a given area of the root. Total: percentage of observations in which any of the metals appeared.

Soil	Root zone	n	Total	Al	Fe	Mn	Zn	Cu	Pb
Soil 0	Cortex	9	100	100	100	0	0	0	0
	Endodermis	3	0	0	0	0	0	0	0
	Vascular tissue	2	0	0	0	0	0	0	0
Soil 1	Endodermis	9	0	0	0	0	0	0	0
	Vascular tissue	19	16	16	16	0	5	0	5
Soil 2	Cortex	26	100	23	100	0	19	0	100
	Endodermis	7	100	29	100	0	29	0	57
	Vascular tissue	7	100	0	100	0	0	0	14
Soil 3	Cortex	7	43	14	43	29	29	0	29
	Endodermis	1	0	0	0	0	0	0	0
	Vascular tissue	9	11	0	11	11	11	0	0
Soil 4	Cortex	13	85	54	54	0	0	85	0
	Endodermis	2	100	50	0	0	0	100	0
	Vascular tissue	8	63	0	0	0	0	63	0
Soil 5	Cortex	10	100	100	90	0	0	100	0
	Endodermis	4	100	75	0	0	0	100	0
	Vascular tissue	6	50	0	17	0	0	33	0

**Table 7.** Microanalytical observations (%) conducted on the leaves in which the given metal appears. n: number of observations in a given area of the leaf. Total: percentage of observations in which any of the metals appeared.

Soil	Leaf zone	n	Total	Al	Fe	Mn	Zn	Cu	Pb
Soil 0	Epidermis	21	19	10	4.8	4.8	0	0	0
	Mesophyll	14	43	0	36	21	0	0	0
	Vascular tissue	11	18	0	18	9.1	0	0	0
Soil 1	Epidermis	16	0	0	0	0	0	0	0
	Mesophyll	17	0	0	0	0	0	0	0
	Vascular tissue	14	26	0	0	0	21	7.1	0
Soil 2	Epidermis	16	0	0	0	0	0	0	0
	Mesophyll	12	8.3	0	8.3	8.3	0	0	0
	Vascular tissue	8	50	0	38	38	12	0	0
Soil 3	Epidermis	18	28	17	17	0	5.6	17	6
	Mesophyll	12	0	0	0	0	0	0	0
	Vascular tissue	17	71	0	0	41	71	6	0
Soil 4	Epidermis	19	5.3	0	5.3	0	0	0	5.3
	Mesophyll	16	12	0	0	0	6.3	0	0
	Vascular tissue	11	9.1	0	0	0	9.1	0	0
Soil 5	Epidermis	6	0	0	0	0	0	0	0
	Mesophyll	9	11	0	0	0	0	11	0
	Vascular tissue	11	9	0	9	0	0	0	0



**Fig. 6.** Distributions of Fe and Pb in the central zone of an oats root grown in soil 2. Top photographs are BSE/SEM images; and bottom photographs are EDS/SEM element distribution maps.

samples viewed were dehydrated, structures could not be accurately distinguished and only main tissues were identified: cortex, endodermis and vascular tissues in roots, and epidermis, mesophyll and vascular tissues in leaves. Most of the elements detected using this technique are nutrients: Mg, K, Ca, Na, Si, S, P and Cl in different proportions. In some observations, Fe, Al, Mn, Zn, Cu and Pb are also detected. These elements are not evenly distributed in tissues; rather they appear in small areas or as deposits.

Tables 6 and 7 indicate the numbers of microanalytical EDS/SEM observations needed to detect some of the micronutrients and toxic elements present in oats. It is easier to find these elements in roots than in leaves (in 64% of the observations at least one metal was detected in roots versus 18% in leaves). This finding is consistent with ICP-OES analyses, in which higher metal concentrations are

observed in roots than in shoots. However, it is only through EDS/SEM that we are able to localize metals within the root, mainly in the cortex and endodermis, with fewer metals reaching the vascular tissues. In plants grown in soil 2, the distribution of Fe and Pb in roots is so evident that the presence of the two heavy metals can be mapped to illustrate this (fig 6).

Localization of metals in leaves is not as obvious as in roots, as it is difficult to find evident deposition sites. The clearest distribution pattern is that shown by Zn in the leaves of oats grown in Zn/Pb co-polluted soils, in which this metal mostly appears in the vascular tissues.

Tables 8 and 9 show the average metal concentrations in the plant root or shoot tissues in which the corresponding metal is detected. These concentrations are expressed as % weight, and do not include C and O. These results are not always

**Table 8.** Means and (standard deviations) of metal concentrations (% weight) in the root areas in which some metal was detected by EDS/SEM.

Soil	Me	Cortex	Endoder.	Vascular tissue
Soil 0	Fe	7.7 (3.0)	0	0
	Al	17 (2.3)	0	0
Soil 1	Fe		0	22 (30)
	Al		0	11 (12)
	Zn		0	4.4
	Pb		0	3.4
Soil 2	Fe	74 (18)	52 (37)	34 (18)
	Al	8.8 (4.1)	1.9 (0.1)	0
	Zn	1.9 (1.4)	1.1 (0.3)	0
	Pb	6.0 (1.8)	4.0 (0.8)	6.0
Soil 3	Fe	30 (14)	0	0.9
	Mn	8.3 (9.8)	0	0.7
	Al	8.2	0	0
	Zn	10 (5.3)	0	26
	Pb	15 (12)	0	0
Soil 4	Fe	11 (5.5)	0	0
	Al	14 (7.1)	21	0
	Cu	12 (8.4)	16 (9.7)	9.5 (9.0)
Soil 5	Fe	8.7 (2.7)	0	29
	Al	23 (5.0)	8.1 (3.0)	0
	Cu	4.8 (7.9)	12 (5.7)	9.3 (3.2)

**Table 9.** Means and (standard deviations) of metal concentrations (% weight) in the leaf areas in which some metal was detected by EDS/SEM.

Soil	Me	Epidermis	Mesophyll	Vascular tissue
Soil 0	Fe	5.0	11 (17)	1.5 (0.3)
	Mn	4.6	7.0 (7.0)	1.0
	Al	6.3 (5.7)	0	0
Soil 1	Zn	0	0	5.9 (6.0)
	Cu	0	0	1.0
Soil 2	Fe	0	2.2	3.2 (2.3)
	Mn	0	1.3	1.8 (0.6)
	Zn	0	0	2.7
Soil 3	Fe	12 (10)	0	0
	Mn	0	0	3.6 (1.6)
	Al	5.0 (4.9)	0	0
	Zn	1.2	0	5.2 (4.5)
	Cu	1.1	0	1.5
Soil 4	Pb	4.6	0	0
	Fe	3.6	0	0
	Zn	0	10	4.5
Soil 5	Cu	2.5	0	0
	Fe	0	0	2.3
Soil 5	Cu	0	2	0

consistent with our metal presence-absence data (tables 6 and 7), nor do they always indicate where these metals are mainly concentrated. For example, it can be seen that Pb is mostly found in the cortex, yet its concentration is not greater in this tissue than in vascular tissues of the roots of oats grown in soil 2. The same applies to Cu in oat plants grown in soils 4 and 5, in which it is easier to find this metal in the cortex and the endodermis, and yet its concentrations are similar or even higher in vascular tissues. In leaves, however, interpretations of both types of data are not very different, as Zn is more easily found in vascular tissues and at higher concentrations.

### 3.3. Observations and measurement of cell and tissue changes

The LTSEM images in figs 7, 8 and 9 reveal negative cell and tissue effects of metals present in the soil, while no tissue abnormalities or cellular disorganization were observed in the control oat leaves. The morphological alterations detected were slightly cohesive cells and large spaces between cells in the mesophyll (figs 8 and 9a). The leaf cells of oats grown in the Cu polluted soils had numerous vacuoles (fig 9c), more than the control oat cells. Another feature observed in the leaves of oats grown in polluted soils, lacking in the leaves of control oats, was the presence of vesicles outside the cells (figs 8b and 9d). As structure of mesophyll tissue is maybe the least evident qualitative observation, the differences in cohesion between cells were quantified by measuring the intercellular space in relation to the total

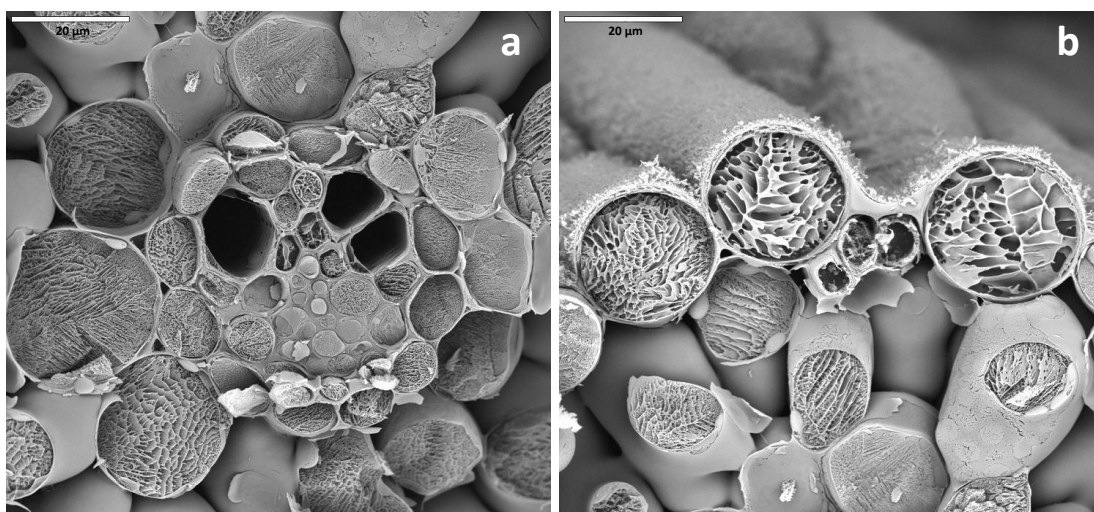


Fig. 7. LTSEM images of the leaves of oats grown in soil 0.

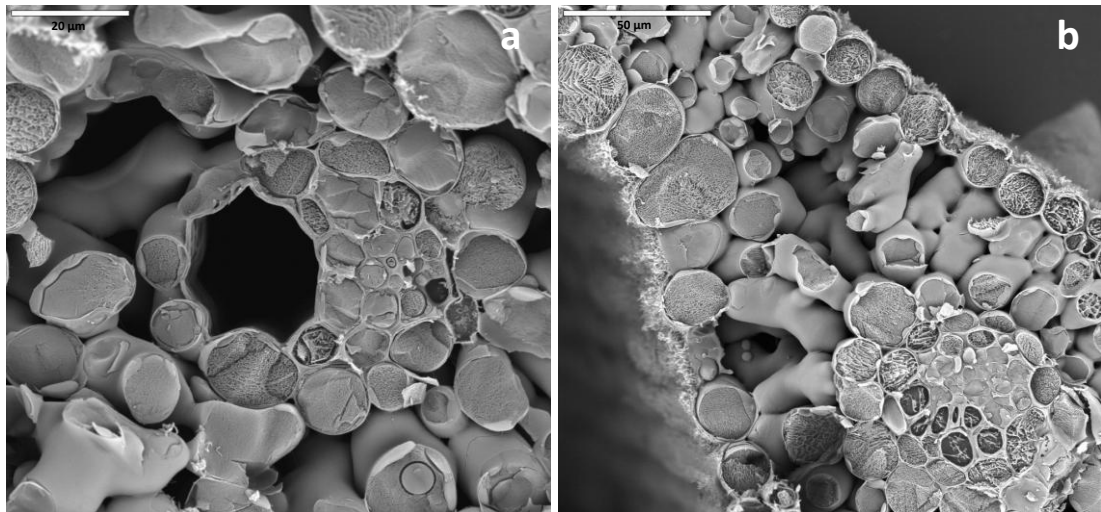


Fig. 8. LTSEM images of leaves of oats grown in the Zn/Pb co-polluted soils.

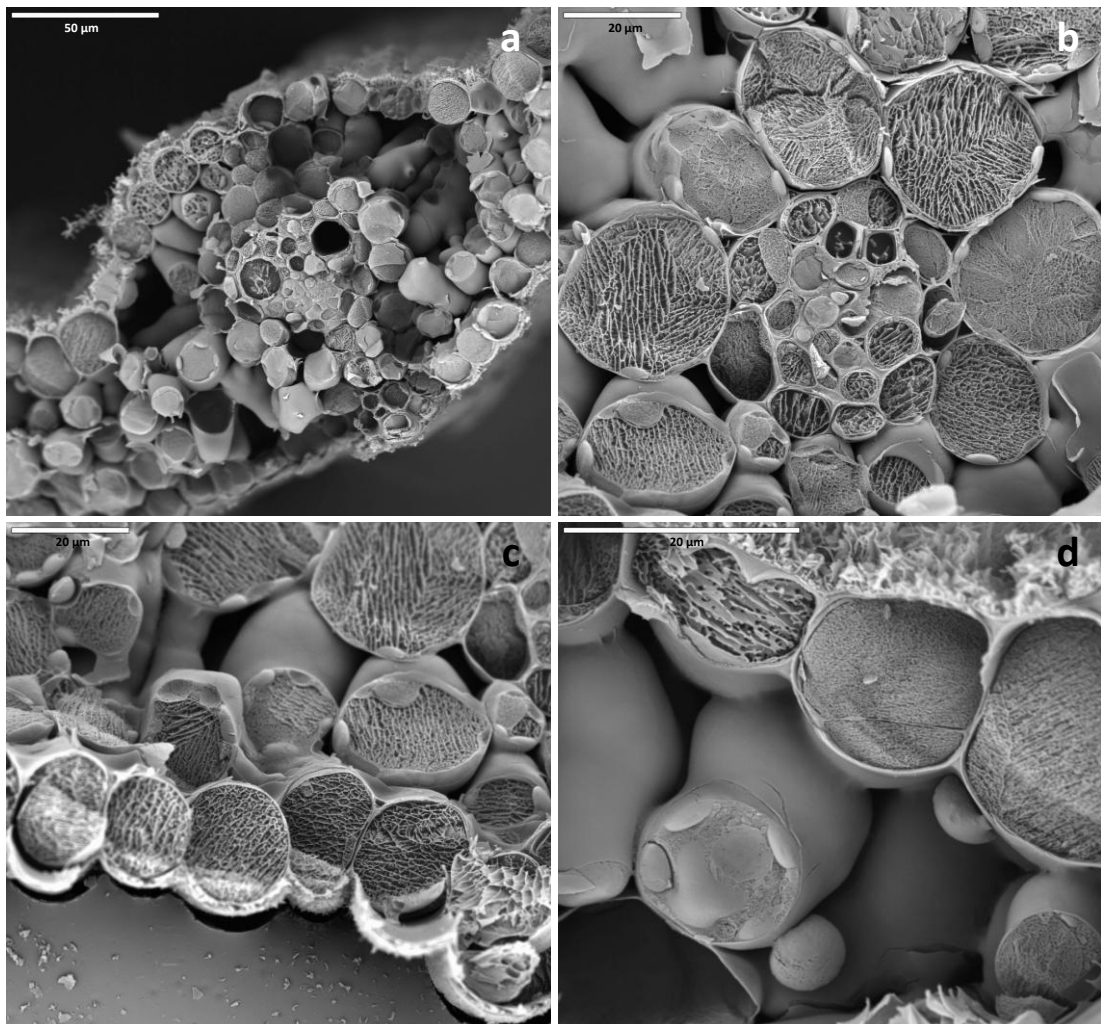


Fig 9. LTSEM images of the leaves of oats grown in Cu polluted soils



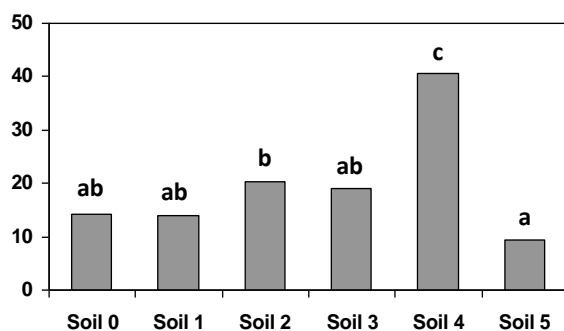


Fig 10. Space between cells in relation to the total mesophyll area, expressed as %.

mesophyll area, and expressed as % (fig 10). It can be noticed that the extreme situations are both in Cu polluted soils, where the tissue is both the most compacted and the most lax (the least space and the greatest space between cells respectively).

## 4. Discussion

### 4.1. Effects of the joint action of soil heavy metals on a plant population

Collectively, these results provide information on how the oat plants mobilize metals, and what effects they produce in plant tissues and growth. When both water and dissolved minerals are absorbed by roots in the rhizoderm, they may follow two ways: (1) move through the cell walls of the cortex to migrate to the endodermis (apoplastic circulation) according to a gradient, so it occurs passively and nothing regulates it directly; or (2) get in the rhizoderm cell by carriers and circulate through the endoplasmatic reticulum, which is continuous from cell to cell by the plasmodesmata (symplastic circulation). The first carriers need energy, so it occurs actively. In the U cells of endodermis, all that circulates through the apoplastic route must rejoin the cell interior via carriers, which means active transport (Bannister 1976; Leclerc 2003). In the same way, metals could enter the roots and move through the cortex through both symplastic and apoplastic transport. However the second one can be considered the cause of the higher presence of metals found in this part of the root. The endodermis, from where only the symplastic transport occurs, acts as a barrier against the entry of metals into vascular tissues and thus the rest of the plant. It seems evident that some metals which are micronutrients as Zn and Cu, move more readily through the endodermis than others. The non essential metal, Pb, is strongly retained in the cortex, and very rarely accesses the vascular tissues.

It can be assumed that this is the main cause of the difference between the metal concentrations in roots and shoots. In addition, it can explain why the difference

between root and shoot metal concentration is much higher in Pb and Fe than in Zn and Cu. This fact can be regarded as a tolerance mechanism of exclusion of toxic metals. Although this is shared by many other species (e.g. Duarte et al. 2010; Zhang et al. 2010), some others seem to behave in the opposite way (Adesoduns et al. 2010).

In spite of this presumed tolerance mechanism, metals are not completely excluded and some amounts of them reach shoots. This fact is not clearly visible by environmental SEM, where only the main metals in high concentration are detected. However ICP-OES analysis show the important concentration of all metals in shoots of oats, above all Zn and Pb in oats grown in Zn/Pb co-polluted soils and Cu in oats over Cu polluted soils, but other relevant toxic metals are also present, like Cd and Ni. These data show that oats can accumulate significant amounts of metals, as previously reported (Hernández-Allica et al. 2008), even more than the native plants of these two places (Hernández and Pastor 2005; Pastor et al. 2010).

The bioaccumulation indices showed that this accumulation capacity is different in different soils and in different metals. It is well known that pH is an important factor in the bioavailability of metals; however, in this experiment, only in the case of Zn the correlation between pH and bioaccumulation index is significant. The significant negative relationships between the bioaccumulation indices of Zn, Pb and Cu and their concentrations in soils could reveal a maximum amount of a given metal that oats can accumulate regardless of its concentration in the soil. It may explain why the metal concentrations in shoots do not reflect differences between treatments as greatly as differences in metal concentrations between soils.

Metals that reach shoots (metabolically the most active part of the plant) can produce or induce both tolerance mechanisms and, when not sufficient, toxic effects in oats. Chen et al. (2009), for example, described alteration in vascular cells when exposing fern to increasing concentrations of Hg, and Hall (2002) suggested that the transport of metal ions into the vacuole may be a mechanism of tolerance to metals, and described increased vacuolation in cells of *Festuca rubra* when this plant was subjected to stress due to Zn. In the case of our results, increase in the number of vacuoles and the formation of vesicles outside the cells may be tolerance mechanisms. Of course, these mechanisms do not seem to be enough protection for oats grown in Cu polluted soils, regarding the effects observed in them.

As the whole mesophyll in grass species is spongy, normal space between cells can be attributed to those oats grown in soil 0 and 1, where they grew best. In that case the strongest effects were shown by oats grown in Cu polluted soils, which present the most unstructured tissues (the most compact and the most lax). Liphadzi and Kirkham (2006) stated that Cu is able to reduce the volume and amount of mesophyll cells. While these effects were not very coherent when calculated from our LTSEM images, we could see the differences in the spaces between cells as explained before. And even though the effects are the opposite in both cases, it does not seem random that both are oats grown in Cu polluted soils. Oats grown in both Cu polluted soils (soil 4 and 5) are also the plants with the lowest growth and the worst symptoms. In fact, the growth of these oats was much lower than that of the rest of oats grown in control and Zn/Pb co-polluted soils throughout the experiment, as it is shown by monitoring the number of leaves and maximum height. The dry weigh of shoots and roots is also much lower. Furthermore, only leaves of oats grown in Cu polluted soils were chlorotic. According to Liphadzi and Kirkham (2006), this metal can induce iron chlorosis by reducing this nutrient in leaves. This is in accordance with reports by other authors related to Cu effects on plants. Thus, among others, we could cite Guo et al. (2010), who reported lethal effects of Cu on maize plants grown in acid soils to which 200 mg kg<sup>-1</sup> of this metal had been added and a 50% reduction in plant growth when the soil Cu concentration was 62 mg kg<sup>-1</sup>.

Hence, we demonstrate that oats are more affected by Cu polluted soils, but it is not possible to assign only Cu as the cause of these effects. In fact, Cu is the most important metal in this scenario, but other metals are also in high levels in shoots of oats grown in those soils, as Cd and Ni. And also Zn is present in high quantity in oats grown in soil 4.

In the opposite situation we can assess the results of growth and development of oats grown in Zn/Pb co-polluted soils. All the parameters measured at individual level showed an even better behaviour of oats planted in Zn/Pb polluted soils than control ones. In these cases, the observed effects at cell and tissue level (vesicles outside cells and high metal accumulation in cortex of roots) may indicate enough tolerance mechanisms to avoid strong effects in growth and development.

Sometimes, rather than being a consequence of toxicity, poor plant growth may be more the outcome of deficient soil nutrient conditions. In fact, some elements are well considered toxic because they inhibit nutrient uptake and the two effects produce similar symptoms (Bannister 1976; Leclerc 2003). By this bioassay we demonstrate that in soils with a level of pollution tolerable by plants, the soil nutrient status is a factor as important as pollution in the assessment of the effects of soils in the growth and development of plants.

Oats grown in Cu polluted soils managed to survive, even if their growth and weight were diminished. However, an oat population in these sites would be extinguished, as none of the plants were able to be fruitful, leading to lack of reproduction and new generations. On the contrary, an oat population in Zn/Pb co-polluted soils is feasible, due to the large growth and the ability of reproduction. In addition, these plants did not seem to be in competition with the high cover of plants from seed bank. Nevertheless, the accumulation capacity of oats in shoots might mean a risk for higher trophic levels, as it is an edible species of great value. Several studies have shown that animals reflect the concentration of toxic elements when they graze on plants growing in polluted soils (eg. Madejón et al. 2009). In the Zn/Pb co-polluted soils (where it could be a viable population), Mn and Zn concentrations in shoots were between 8 and 40 times greater than WHO limits for food, Pb was 40 times, Cd 10 to 25 times and Cu 3 times higher than these limits.

#### **4.2. Proposal of a protocol for the assessment of effects of polluted soils on a plant population**

Our work reveals that to better understand the behaviour of a plant species under stress caused by heavy metals, it is necessary to use a protocol with a combination of techniques to measure different variables at various organization levels. An example of this is the work by Rossini et al. (2010), who examined the effects of Cu on *Erica andevalensis* using different stress indicators at the plant, tissue, cell and physiological levels, and were able to infer the strategies used by this species under Cu stress.

The microcosm design is considered appropriate as natural soil conditions were simulated, and most of the plant species found in field studies in these sites (Hernández and Pastor 2008a) seemed to appear in our pots. We think that

bioassays in microcosm are fundamental to study and understand the problem of sites with polluted soils, as they are the intermediate step between laboratory and field experiments. The duration of the bioassay was not exactly known in advance, and was determined by the life cycle of oat plants, because we consider fruiting, and so reproduction, an important process to assess both individual and population effects.

All the techniques and methods used to evaluate the effects of polluted soils in the oat population were complementary; the shortcomings of ones could even be more or less filled by others. This is the case, for example, of EDS/BSED microanalyses that only detected major metals in tissues, so minor ones, like As, Cr, Ni were not found. However, all of them could be accurately quantified by ICP-OES in roots and shoots, and since this method is commonly used for this purpose, results are easily comparable to those of other works, or reference levels. With both techniques the uptake and traslocation of metals from soils to roots and shoots can be easily understood.

The LTSEM images offer the possibility to observe the cells and tissues in real condition of hydration, but this is what prevents the accurate measurement of metals. These images allow the observation of qualitative characteristics of cells and their distribution in tissues. In addition, an image processor allows a quantitative assessment of those observations. We decided to do these observations between the 10<sup>th</sup> and the 11<sup>th</sup> week of the experiment, when the plants had grown enough and presented visible effects, such as reduced growth and chlorosis of leaves. We feared that these effects could get worse, to an extent when no observation could be done (necrosis or death). This is why we did not dare to wait until the end of the experiment to do the observations.

Dry weight is, as expected, a very good indication of plant growth in the different treatments, and is a feature commonly used to evaluate the toxicity of polluted soils (Pastor et al. 2003; Astolfi et al. 2004). But it is the monitoring what makes us evaluate the process and the development through time. Although studies in ecotoxicology usually focus on a single endpoint at a standardized exposure time, toxicity is truly a process in time. Ignoring this can lead to severe bias in environmental risk assessment (Baas et al. 2010). Taking into account the

importance of assessing the effects of polluted soils in plants through time, we suggest for further experiments, to increase the number of observations up to one each week or each two weeks. The important effects that can be proved and inferred by the observation of chlorosis and fruiting make us recommend trying to quantify them in future experiments. For example, the produced seeds can be counted and weighed, and the degree of chlorosis can be classified into a gradient. The development of plants from seed bank can also be monitored throughout the experiment as they can interfere in the tested plant growth.

Collectively, all the techniques constitute a suitable protocol for the ecotoxicological diagnosis of a site with heavy metal polluted soils, which discussed and improved as explained above can be summarized in table 1. The proposed approach can be considered complementary to that described in similar studies on sealed landfills (Hernández et al. 2012) as well as a tool to implement risk analysis. The methods used are also in line with those mentioned in SCOPE-53 to evaluate the effects of chemicals on ecosystems (Linhurst et al. 1995). Of course, the discussed protocol is not closed and new parameters and techniques, such as physiological measurements (eg. chlorophyll content), can be included to increase the amount of information, depending on the expectations and desired objectives. Finally, we would like to stress that bioassays in controlled conditions are essential to address the health of ecosystems, provided soils from real pollution scenarios are used. It is crucial to carry out integrated studies at different scales to better understand the processes by which pollutants interfere in growth and development of plant species and populations.

Finally, it must be considered that integrating is not synthesizing. However, the interdependence nexus between different pieces of knowledge is a common characteristic of both activities. Synthesis does not require mobilization of the elements to be synthesized aiming towards action. This is, nevertheless, a characteristic of integration. And, in the case of ecotoxicologic assessment, it is important for predicting realistic actions for ecologic restoration of a site with polluted soils.

## 5. Conclusions

The main conclusion drawn from this study is that the integrated approach has been successful for its purposes. On the one hand, the combination of techniques served to detect and explain the effects in oats of heavy metal pollution of soils used in the bioassay at different organization levels. In this way, the oats grown in Cu polluted soils showed effects at cell and tissue levels that can be interpreted as tolerance mechanisms against metals accumulated by these plants (exclusion of metals by endodermis, increase in number of vacuoles and vesicles outside the cells). However, other effects at cell level (different cohesion between cells) and at individual level (decrease in growth, lack of fruiting, chlorosis) may indicate insufficiency of the tolerance mechanisms, which could lead to extinction of population in these sites. On the contrary, oats grown in Zn/Pb co-polluted soils presented effects at cell and tissue levels (greater presence of metals in the cortex and vesicles outside the cells) that may constitute sufficient tolerance mechanisms to avoid major effects at individual level. In this case it was proved that nutrition status of soils can be as important as pollution to assess plant growth.

On the other hand, the study and discussion of the methodology lead to the proposal of a protocol based on the used techniques (monitoring of growth and symptoms, chemical analysis, electron microscopy observations), that could be valid for the study of effects of a set of soil heavy metals in a plant species from cell and tissue levels to population level. The use of microcosms with natural soils allows studying these effects in fairly similar conditions to those of real scenarios, which is essential to address the health of ecosystems.

### Acknowledgements

This study was funded by the projects CTM 2008-04827/TECNO of the Spanish Ministry of Science and Innovation; and P2009/AMB-1478A of the EIADES Program of the Community of Madrid. MJGG was supported by a FPU fellowship from the Spanish MEC (AP2008-02934).

## References

Adesodun JK, Atayase MO, Agbaje TA, Osadiaye BA, Mafe OF, Soretire AA (2010) Phytoremediation Potentials of Sunflowers (*Tithonia diversifolia* and *Helianthus annuus*) for Metals in Soils Contaminated with Zinc and Lead Nitrates. *Water Air Soil Pollut* 207:195–201

- Astolfi S, Zuchi S, Passera C (2004) Effects of cadmium on the metabolic activity of *Avena sativa* plants grown in soil and hydroponic culture. *Biol Plantarum* 48:413-418
- Bannister P (1976) *Introduction to Physiological Plant Ecology*. Blackwell, Oxford
- Baas J, Jager T, Kooijman B (2010) Understanding toxicity as processes in time. *Sci Total Environ* 408:3735–3739
- Broadhurst CL, Chaney RL, Angle S, Mangel TK, Erbe EF, Murphy CA (2004) Simultaneous Hyperaccumulation of Nickel, Manganese, and Calcium in *Alyssum* Leaf Trichomes. *Environ Sci Technol* 38:5797-5802
- Chen J, Shiyab S, Han FX, Monts D, Waggoner CA, Yang Z, Su Y (2009) Bioaccumulation and physiological effects of mercury in *Pteris vittata* and *Nephrolepis exaltata*. *Ecotoxicology* 18:110–121
- De Los Ríos A, Ascaso C, Wierzchos J (1999) Study of lichens with different state of hydration by the combination of low temperature scanning electron and confocal laser scanning microscopies. *Int Microbiol* 2:251-257
- Duarte B, Caetano M, Almeida PR, Vale C, Caçador I (2010) Accumulation and biological cycling of heavy metal in four salt marsh species, from Tagus estuary (Portugal). *Environ Pollut* 158:1661-1668
- Ebbs SD, Kochian LV (1998) Phytoextraction of Zinc by Oat (*Avena sativa*), Barley (*Hordeum vulgare*), and Indian Mustard (*Brassica juncea*). *Environ Sci Technol* 32: 802-806
- Fernando DR, Batianoff GN, Baker AJ, Woodrow IE (2006) In vivo localization of manganese in the hyperaccumulator *Gossia bidwillii* (Benth.) N. Snow & Guymmer (Myrtaceae) by cryo-SEM/EDAX. *Plant Cell Environ* 29: 1012-1020
- Guo XY, Zuo YB, Wang BR, Li JM, Ma YB (2010) Toxicity and accumulation of copper and nickel in maize plants cropped on calcareous and acidic field soils. *Plant Soil* 333:365–373
- Hall JL (2002) Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J Exp Bot* 53: 1-11
- Hernández AJ, Pastor J (1989) Técnicas analíticas para el estudio de las interacciones suelo-planta. *Henares. Revista de Geología* 3: 67-102
- Hernández AJ, Pastor J (2005) Incidencia conjunta de metales pesados en pastos de vacuno ubicados en el entorno de una mina abandonada en la Sierra de Guadarrama. In: De La Roza B, Martínez-Fernández A, Carballal A (eds) *Producciones agroganaderas: Gestión eficiente y conservaciones del medio natural*, SERIDA, Gijón, pp 955-963
- Hernández AJ, Pastor J (2007) Ecosystems health and geochemistry: concepts and methods applied to abandoned mine sites. In: Loredo J (ed) *The 23rd International Applied Geochemistry Symposium (IAGS 2007)*, Universidad de Oviedo, Oviedo, pp 219-231
- Hernández AJ, Pastor J (2008a) Relationship between plant biodiversity and heavy metal bioavailability in grasslands overlying an abandoned mine. *Environ Geochem Health* 30: 127-133



Hernández AJ, Pastor J (2008b) Validated approaches to restoring the health of ecosystems affected by soil pollution. In: Domínguez JB (ed) *Soil Contamination Research Trends*, Nova Science Publishers, New York, pp 51-72

Hernández AJ, Gutierrez MJ, Pastor (2009) Ecology and health in risk analysis of polluted soils. In: Brebbia CA (ed) *Environmental Health Risk*, WIT Press, Southampton, pp 257-268

Hernández AJ, Bartolomé C, Pérez-Leblic MI, Rodríguez J, Álvarez J, Pastor J (2012) Ecotoxicological diagnosis of a sealed municipal landfill. *J Environ Manage* 95:S50-S54

Hernández-Allica J, Becerril JM, Garbisu C (2008) Assessment of the phytoextraction potential of high biomass crop plants. *Environ Pollut* 152: 32-40

Leclerc JC (2003) *Plant Ecophysiology*. Science Publishers Inc, New Hampshire

Linhurst RA, Bourdeau PH, Tardiff R (1995) SCOPE-53. *Methods to assess the effects of Chemical on Ecosystems*, John Wiley & Sons Ltd., New York

Liphadzi MS, Kirkham MB (2006) Physiological Effects of Heavy Metals on Plant Growth and Function. In: Huang B (ed) *Plant-environment interactions*, Taylor & Francis, New York, pp 243-269

Lombi E, Zhao FJ, Dunham SJ, McGrath SP (2001) Phytoremediation of Heavy Metal-Contaminated Soils: Natural Hyperaccumulation versus Chemically Enhanced Phytoextraction. *J Environ Qual* 30:1919-1926

Madejón P, Domínguez M, Murillo JM (2009) Evaluation of pastures for horses grazing on soils polluted by trace elements. *Ecotoxicology* 18:417-428

Pastor J, Hernández AJ (2008) La restauración en sistemas con suelos degradados: estudios de casos en vertederos, escombreras y emplazamientos de minas abandonadas. In: Millán R, Lobo C (eds) *Contaminación de Suelos: Tecnologías para su recuperación*, CIEMAT, Madrid, pp 539-560

Pastor J, Gutiérrez-Maroto A, Hernández AJ (2003) Biomarcadores a nivel de una comunidad de pasto y de una población herbácea forrajera para suelos contaminados por cobre. *Anales de Biología* 25: 103-108

Pastor J, Hernández AJ, Prieto N, Fernández-Pascual M (2003) Accumulating behaviour of *Lupinus albus* L. growing in a normal and a decalcified calcic luvisol polluted with Zn. *J Plant Physiol* 160: 1457-1465

Pastor J, Martín-Aparicio A, Gutiérrez-Maroto A, Hernández AJ (2007) Effects of two chelating agents (EDTA&DTPA) on the autochthonous vegetation of a soil polluted by Cu, Zn and Cd. *Sci Total Environ* 378: 114-118

Pastor J, Gutiérrez-Ginés MJ, Hernández AJ (2010) Contenidos de metales en plantas y estudio de la generación de lixiviados en una antigua mina de plata con contenidos elevados de Zn y Pb. In: Estavillo JM (ed) *Aspectos fisiológicos, agronómicos y ambientales de la nutrición mineral de las plantas*, Universidad del País Vasco, Bilbao, pp 217-223

Rasband WS (1997-2011) ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>

Römbke J, Moltmann J (1996) Applied ecotoxicology, CRC Press, Boca Raton

Rossini S, Mingorance MD, Valdés B, Leidi EO (2010) Uptake, localisation and physiological changes in response to copper excess in *Erica andevalensis*. *Plant Soil* 328: 411–420

SPSS for Windows. Version 19.0. 2010. Spss, Inc. and IBM Company

Verhoef HA, van Gestel AM (1995) Methods to Assess the Effects of Chemicals on Soils. In: Linfhurst RA, Bourdeau PH (eds) SCOPE 53. Methods to Assess the Effects of Chemicals On Ecosystems. John Wiley & Sons Ltd., New York, pp 223 – 257

Walsh LM, Soil Society of America (1971) Instrumental Methods for analysis of soils and plant tissue, Soil Science Society of America, Wisconsin, VII, 334

Zhang X, Xia H, Li Z, Zhuang P, Gao B (2010) Potential of four forage grasses in remediation of Cd and Zn contaminated soils. *Bioresource Technol* 101: 2063–2066



## Capítulo 5

---

### **Metodología de estudio para la revegetación de vertederos de residuos sólidos urbanos sellados con suelo**



Trabajo en preparación. No obstante, la parte correspondiente al estudio del caso expuesto en este trabajo ha sido aceptado como capítulo del libro "Soil Pollution" bajo el título **The complexity of polluted soils of sealed landfills: case study in Mediterranean environment** (Pastor J, Gutiérrez-Ginés MJ, Bartolomé C. and Hernández AJ). Ed. Intech-Open Science. Así mismo, los resultados correspondientes al bioensayo que también se muestra en este capítulo han sido aceptados para presentarse en el 9th Iberian and 6th Iberoamerican Congress on Environmental Contamination and Toxicology, Valencia, Julio 2013: **Study of Hg in soil cover of sealed urban landfills and its toxic impact in *Lupinus albus* L. grown in landfill soils with high levels of this trace element** (M<sup>a</sup>. J. Gutiérrez-Ginés, A. J. Hernández, R. Millán, & J. Pastor).

## **Methodology for studying the revegetation of municipal solid waste landfills sealed with soil**

### **Abstract**

The impact caused by municipal solid waste landfills (MSWL) in adjacent ecosystems needs to be restored. A plant cover is also necessary for stabilizing the sealing and avoiding its dispersion. Thus, it is appropriate to study the natural plant colonization of those landfills that were sealed with soil from their surroundings. Having received mixed wastes (municipal, industrial and inert) makes it difficult to develop a plant cover.

The characteristics of MSWL sealed with soil in Mediterranean environment, which have been studied for 20 years, are explained in this chapter. We focus on a real case to deduce the central methodological issues that should be considered in revegetation of landfills of this environment or in any other. Research is based on (i) relationship between geo-edaphic factors and sealing cover-natural vegetation; (ii) the study of spontaneous plant cover; (iii) eco-chemical relations of plant species that grow on MSWL (mineral nutrition, toxicity and salinity). The work concludes with the most suitable ecological theory that may be applied for managing this problem.

## **Metodología de estudio para la revegetación de vertederos de residuos sólidos urbanos sellados con suelo**

### **Índice**

1. Introducción
2. Metodología empleada
  - 2.1 Síntesis del perfil de vertederos de residuos sólidos urbanos (VRSU) en ambiente Mediterráneo
  - 2.2 Estudio de caso: el vertedero de Getafe (Madrid)
  - 2.3 Material y métodos de análisis
3. Resultados
  - 3.1 Estudio del caso del vertedero de Getafe (Madrid)
    - 3.1.1 Análisis de la composición de la capa superficial edáfica de sellado: parámetros vinculados a la erosión, a la fertilidad, a la salinidad, a la toxicidad por metales y a compuestos orgánicos
    - 3.1.2 Comunidades herbáceas desarrolladas en taludes y principal área de descarga de lixiviados superficiales
    - 3.1.3 Bioensayos para el estudio de la toxicidad producida por la acción conjunta de metales pesados, elementos-traza, salinidad y compuestos orgánicos, de los suelos del vertedero de Getafe
  - 3.2 Ejes de integración para el estudio de la revegetación de VRSU
    - 3.2.1 Relaciones entre factores geo-edáficos y cubiertas de sellado-vegetación espontánea
    - 3.2.2 Métodos para el estudio de la cubierta vegetal colonizadora: inventarios, estudio autoecológico de las especies colonizadoras, atributos biológicos de las especies y relaciones eco-químicas
4. Aspectos recapitulativos
  - 4.1 Los vertederos como sistemas emergentes en el paisaje
  - 4.2 Cubiertas vegetales que puedan restaurar la acción conjunta erosión-contaminación

Bibliografía consultada y referencias

## 1. Introducción

El fuerte incremento habitacional e industrial que experimentó la humanidad en el último tercio del pasado siglo, generó cantidades ingentes de residuos urbanos e industriales, que fueron llevados a vertederos sin ser separados ni tratados. A medida que algunos países alcanzaban un determinado desarrollo económico, se incrementaba la preocupación por el estado de esos vertederos sellados sin ningún tipo de control. De igual modo, otros países de economías emergentes, así como otros situados en entornos de pobreza, presentan en la actualidad multitud de basureros con problemas análogos a los encontrados en nuestro país. Todos ellos introducen en los diferentes entornos donde se ubican cantidades relevantes de contaminantes, que afectan al aire, a los suelos y a los recursos hídricos. Sin duda, la revegetación de los vertederos, no solo contribuye a remediar el impacto visual que producen las montañas de basura en un paisaje, sino que es imprescindible para que la contaminación que se sigue produciendo una vez clausurado no se siga difundiendo a otros ecosistemas del entorno.

En de este trabajo pretendemos presentar el perfil de vertederos de residuos sólidos urbanos (VRSU) sellados con suelo en ambiente mediterráneo estudiados en Hernández y Bartolomé (2010), profundizando en el análisis de un caso concreto para deducir lo que podríamos considerar los ejes metodológicos que deberían tenerse en cuenta en la revegetación de los mismos tanto para este tipo de territorio, como en cualquier otro tipo de entorno.

De todas formas, este capítulo contiene una buena parte de la investigación realizada durante más de 20 años, por lo que se trata más bien de un trabajo de sistematización. No por ello deja de resultarnos interesante, dado que sin esa investigación previa, habría sido difícil plantear nuevos objetivos en relación a una realidad que puede ser estudiada desde cualquier ciencia medioambiental, como pudimos comprobar en un trabajo anterior<sup>1</sup>. Sin embargo, al tratarse de resultados de revegetación para ambientes mediterráneos, y de vertederos clausurados con

---

<sup>1</sup> “Estudio de emplazamientos con suelos que sufren el efecto conjunto de erosión-contaminación para su restauración ecológica” (Memoria de la beca de Iniciación a la Investigación concedida por la Universidad de Alcalá en su programa de 2008)



suelos propios de este tipo de territorio, consideramos que no todo el contenido del capítulo puede ser de alcance internacional. Esta es la razón fundamental por la que se presenta todo el trabajo expuesto en español, si bien parte del mismo ya está en fase de publicación como se muestra al principio del capítulo.

## 2. Metodología empleada

### 2.1. Síntesis del perfil de vertederos de residuos sólidos urbanos (VRSU) en ambiente mediterráneo

Numerosos vertederos del centro de la Península Ibérica sellados con suelo entre los años 80 y 90 del pasado siglo han sido ampliamente descritos en Hernández y Bartolomé (2010) desde una perspectiva interdisciplinar. Los esfuerzos se han centrado en investigar los contaminantes que presentan las cubiertas edáficas de sellado en 20 vertederos, así como algunos factores que influyen en la difusión de la contaminación, con el fin de obtener pautas para remediar el impacto ambiental que ocasionan (fig 1).

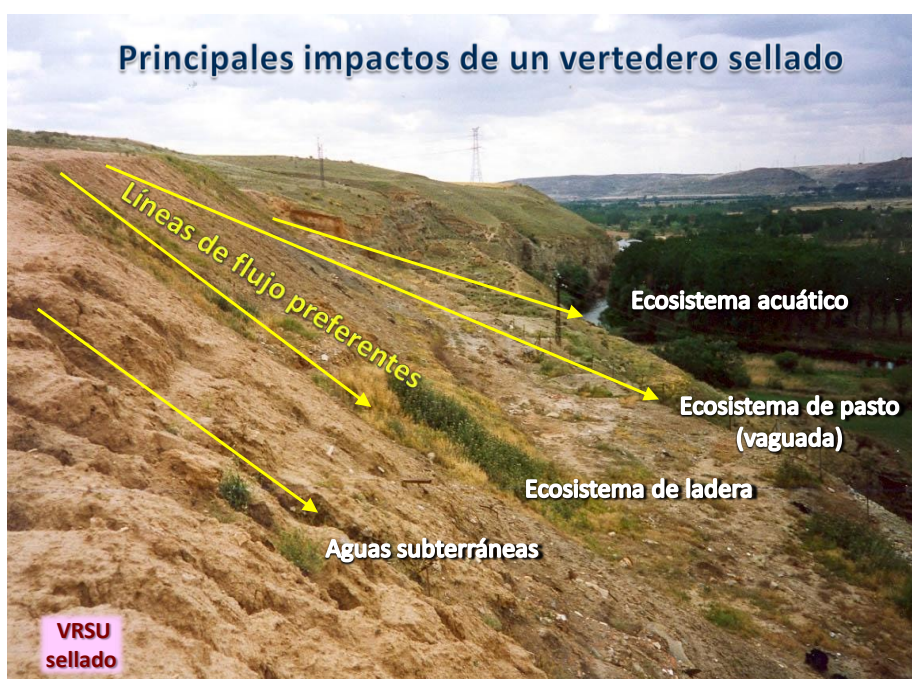


Fig. 1. (Fuente: Hernández y Pastor, 2008)

En dicha figura se pueden visualizar los principales impactos (no solamente es de tipo visual), ocasionados por un vertedero sellado con suelo (VRSU de Mejorada del Campo, Madrid). El más importante de los impactos producidos está vinculado a la contaminación causada por el efecto de los lixiviados, tanto superficiales como profundos, producidos por la infiltración del agua de lluvia y la escorrentía superficial. Este hecho afecta especialmente a los ecosistemas ubicados en las principales áreas de descarga de los lixiviados, es decir, al pie de los taludes de los vertederos, en los que se encuentran zonas húmedas que suelen ser pastoreadas por animales domésticos y fauna silvestre. Pero también afecta a cultivos (especialmente de cereal, como la cebada), que hemos podido comprobar que acumulan metales pesados (datos no publicados) y que se siembran bien en el propio vertedero (generalmente en sus plataformas) o en sus áreas de descarga de lixiviados superficiales. Por otra parte, la contaminación puede difundirse a otros ecosistemas acuáticos del entorno, como son los ríos sobre los que parecen “colgar” estas montañas de residuos, o en otros casos a arroyos que sirven de vehículo para la exportación de los contaminantes al exterior.

En cualquier caso, esta situación hace difícil la estabilidad de comunidades vegetales que se establecen en estos escenarios, bien por mecanismos de colonización o de revegetación. En un principio se pensaba que el mayor problema de estos vertederos residía en la salinización de los suelos del propio vertedero, así como de aquellos de los ecosistemas del entorno que están afectados por el mismo. Sin embargo, más recientemente los resultados referidos a metales pesados y elementos traza, así como a compuestos de naturaleza orgánica, se han sumado al diagnóstico de la contaminación de los suelos con los que fueron sellados. Una de las principales razones estriba en que la práctica totalidad de los VRSU sellados son de carácter mixto, es decir que no solamente contienen residuos urbanos sino también industriales. Sin embargo nos seguiremos refiriendo a VRSU por diferenciarlos de aquellos que en la actualidad solamente reciben residuos industriales.

En relación a la revegetación de los vertederos que ya han sido clausurados o que se está realizando en momentos actuales, se ha hecho necesario estudiar con mayor detalle la distribución de contaminantes en la capa superficial edáfica, debido a la

continua percepción de grandes áreas de suelos donde no crecen las plantas o, por el contrario, existe buena cobertura vegetal pero muy baja diversidad. Con el fin de poder aportar resultados referidos a esta problemática, optamos por centrarnos en un estudio de caso.

## 2.2. Estudio de caso: el vertedero de Getafe (Madrid)

Nos hemos centrado en el estudio de un vertedero clausurado concreto situado en la Comunidad de Madrid, que presenta uno de los escenarios más complejos de emplazamientos con vertederos sellados con suelo observado en el territorio centro peninsular, y que a la vez resulta ser muy frecuente en muchos vertederos estudiados en esa Comunidad (Hernández y Bartolomé, 2010). Se trata del vertedero localizado en el término municipal de Getafe (Madrid), descrito por vez primera en Adarve (1993, fig 2), quien señalaba las características generales que resumimos a continuación.

Cuando se describió en 1993 ocupaba una superficie de unos 70.000 m<sup>3</sup>. Después de dos décadas, y tras la continua deposición de residuos, esta superficie ha aumentado. Mediante una imagen aérea de Google Earth (Google Inc, 2013) y un programa de tratamiento de imágenes (ImageJ, Rasband 1997–2011), hemos podido

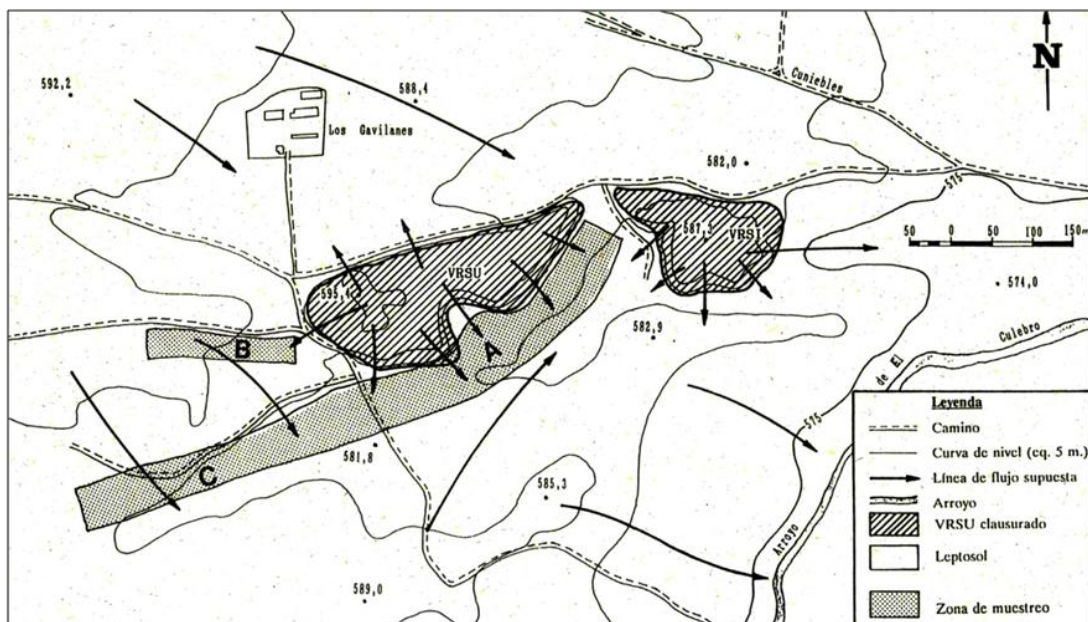


Fig 2. Representación de las principales líneas de flujos superficiales en el emplazamiento del vertedero de Getafe según Adarve (1993)

calcular su superficie aproximada en unos 95.000 m<sup>2</sup>.

La continua deposición de residuos y sus posteriores recubrimientos son los responsables de la compleja morfología del vertedero. De forma visual, corresponde a un cerro de cima plana elevándose en una llanura, como se muestra en la fotografía tomada durante el último muestreo realizado en la primavera de 2009 (fig 3).

En el emplazamiento, así como mediante imágenes aéreas, se puede apreciar que el vertedero está dividido en tres partes. Por la observación de su evolución desde el primer sellado, se ha podido saber que la parte situada al oeste se corresponde con



**Fig 3.** Imagen de la totalidad del vertedero en la primavera de 2009.



**Fig 4.** Representación de las zonas más importantes del vertedero y localización de los sitios de recogida de muestras del suelo de sellado. Imagen Google Earth de fecha 8/3/2007, coordenadas UTM: X=442599 Y=4459459, 30T. Los números corresponden al orden en que fueron recogidas las muestras de suelo

deposición de residuos urbanos (VRSU), mientras que la parte central y la oriental se corresponde con deposición de inertes y residuos industriales, y que hemos llamado escombreras, como se muestra en la figura 4. La cima plana corresponde a las plataformas del VRSU y escombreras. Estas últimas son completamente planas y uniformes, mientras que la de VRSU es más heterogénea con montones de residuos y carriles para vehículos. La morfología de cerro confiere a este vertedero una particularidad respecto a otros vertederos: a pesar de mantener los elementos de tipificación general descritos por Pastor y Hernández (2007) para vertederos sellados (con plataforma, taludes y áreas de descarga), el vertedero de Getafe tiene taludes alrededor de la totalidad de su superficie y por lo tanto con la máxima variedad orientaciones (en los 360°). Esos autores contabilizaron en 12 el número total de los mismos entre 2006 y 2007, con alturas entre 10-20 m, y pendientes del 50% (fig 5a). Su forma es más bien recta, y varios de ellos están superpuestos.



**Fig 5.** Taludes (A y B) y principal área de descarga del vertedero de Getafe (C)

Muchos muestran signos de erosión, sobre todo en regueros, que en ocasiones dejan al descubierto los residuos (fig 5B).

Hay tres áreas de descarga de lixiviados principales al sur y oeste del vertedero. La más occidental coincide con un humedal. Las dos que se encuentran al sur de las escombreras forman láminas de agua poco profundas en los meses más lluviosos, que se secan rápidamente en cuanto cesan las precipitaciones a finales de primavera. En estas áreas de descarga, así como en la parte baja de los taludes pastan y beben rebaños de ovejas (fig 5C).

### **2.3. Material y métodos de análisis**

En los epígrafes abordados en relación al estudio de caso, se mencionan los métodos y técnicas empleados, con el fin de proporcionar un mejor seguimiento de los diferentes aspectos considerados. Así mismo, en el apartado dedicado a dos bioensayos en condiciones experimentales también se describe su correspondiente diseño, métodos y técnicas realizadas, con el fin de presentar de forma unitaria los resultados.

La información recogida a partir del estudio del VRSU de Getafe, la obtenida mediante los ensayos experimentales, así como la consultada de la gran mayoría de los trabajos que figuran en las referencias bibliográficas –y que cumplen a su vez de antecedentes para este trabajo– ha sido sistematizada en unos ejes de integración alrededor de los cuales giran los contenidos que se exponen de forma sintética, pero que nos aproximan a tener una imagen holística de la temática que nos ocupa.

## **3. Resultados**

### **3.1. Estudio de caso del vertedero de Getafe (Madrid)**

*3.1.1. Análisis de la composición de la capa superficial edáfica de sellado del vertedero: parámetros vinculados a la erosión, a la fertilidad, a la salinidad, a la toxicidad por metales y a compuestos orgánicos*

Para comprender la colonización de las plataformas y taludes, ha sido preciso conocer los parámetros edáficos que están más vinculados con la vegetación de los mismos, surgida en gran parte del banco de semillas de los suelos de sellado. Se ha realizado así un muestreo estratificado (plataformas del vertedero y escombreras

adosadas, taludes de ambos sistemas y principales áreas de descarga de lixiviados superficiales) de la capa superficial del sellado. 57 muestras medias de suelo se recogieron con una azada y se trasladaron al laboratorio, donde se secaron a temperatura ambiente y se tamizaron (<2 mm). En ellas se han determinado los parámetros según las técnicas que mencionamos en los siguientes apartados. Como se puede comprobar en la figura 4, las zonas de muestreo correspondientes a los puntos 27 al 31, que se recogieron en el área de descarga más oriental señalada mediante un círculo de líneas discontinuas, corresponden a montones de residuos vertidos directamente sobre el área de descarga más oriental, y sin ningún tipo de tratamiento ni cobertura. Aunque estas muestras no corresponden a la cubierta edáfica de sellado, se decidió recogerlas con el fin de evaluar el posible efecto de estos residuos en los suelos del área de descarga. En las tablas no se mostrarán sus resultados, al no tratarse de cubiertas edáficas, pero sí se comentará su posible efecto en la zona sobre la que los depositaron. Los resultados de los análisis efectuados se presentan a continuación.

a) Parámetros vinculados a la erosión del suelo

La percepción de signos de erosión en los taludes del vertedero nos llevó a estudiar y cuantificar este fenómeno, debido al importante efecto que el tamaño de partículas y la pérdida de ciertas fracciones puede suponer para el enraizamiento de las especies vegetales.

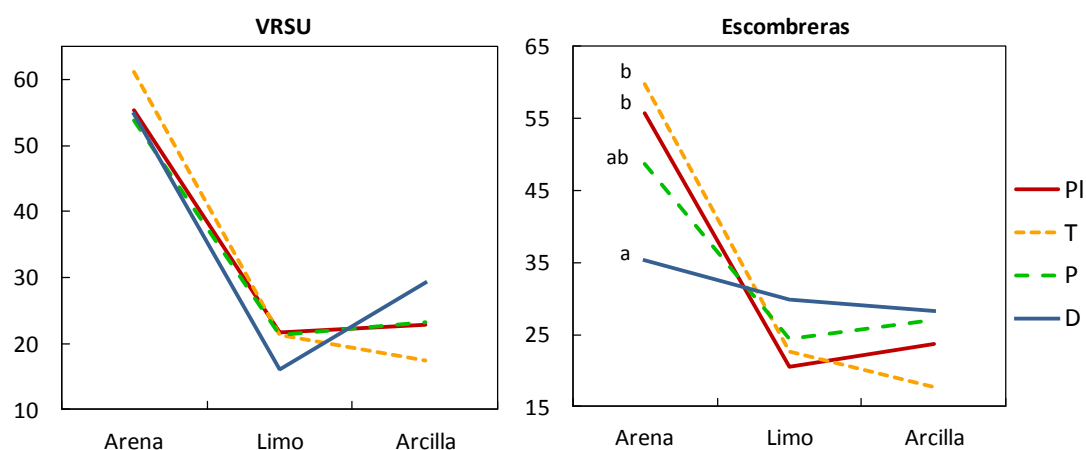
La técnica tradicional de Bouyoucos para la determinación de las fracciones arena, limo y arcilla se aplicó a la totalidad de las 57 muestras (fig 6). Por otro lado, se utilizó el equipo Mastersizer-S que analiza el tamaño de las partículas mediante la dispersión y difracción de un haz de luz láser al atravesar una suspensión de la muestra. La descripción de esta técnica, la preparación de las muestras, así como resultados preliminares para este vertedero se muestran en el libro de Hernández y Bartolomé (2010). Aquí se muestran los resultados obtenidos para 43 del total de suelos recogidos y que fueron seleccionados para estudiar el tipo de partículas que pueden perderse por la erosión (tabla 1).

En el libro mencionado ya se indicaron diferencias significativas en varias fracciones de arena fina entre el suelo de cobertura del VRSU y el de las escombreras. Un análisis discriminante realizado con el conjunto de resultados por ambas técnicas

indica la capacidad de los resultados para clasificar las muestras entre VRSU y escombreras. Por esos motivos hemos decidido presentar los resultados de estas dos partes del vertedero por separado (fig 6). La gran desviación típica de los datos hace que sólo sean significativas las diferencias en la fracción arena en escombreras. Sin embargo, sí se observa una tendencia de acumulación de arcilla en partes bajas del VRSU y escombrera (pie de taludes y áreas de descarga).

Aunque los resultados obtenidos por ambas técnicas utilizadas para el análisis granulométrico son difícilmente comparables, ya que la primera indica porcentaje en peso y la segunda porcentaje en volumen, ambas coinciden en que es en las escombreras adosadas al vertedero donde las diferencias entre partes más altas, taludes y partes más bajas son más marcadas. Así, en la tabla 1 se muestran las diferentes fracciones granulométricas analizadas en las zonas de plataforma, taludes y áreas de descarga. En escombreras los resultados indican un arrastre de arenas finas desde taludes hacia las partes más bajas, y una acumulación por tanto de arenas gruesas en los mismos. Aunque sin ser significativas, también se observan diferencias en el resto de fracciones.

El suelo de cubrición del VRSU, a pesar de los fuertes signos de erosión percibidos, estos datos no parecen indicar de forma tan evidente que exista un arrastre de partículas desde las partes altas a las bajas de los taludes y áreas de descarga. Es

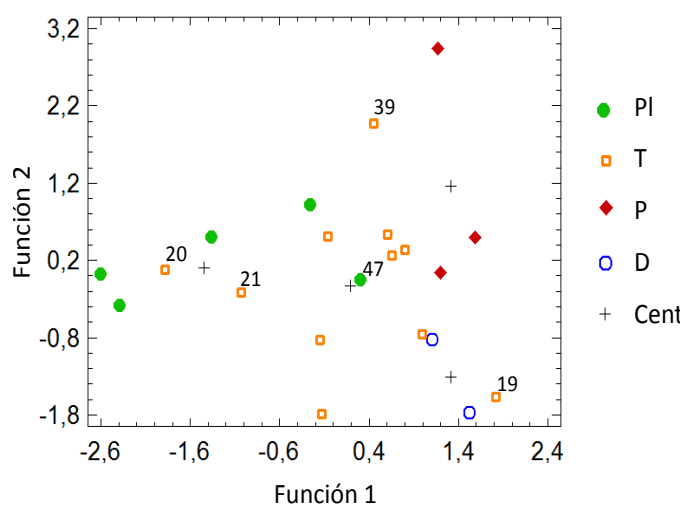


**Fig 6.** Media de los porcentajes de cada fracción textural determinada mediante la técnica de Bouyoucos en muestras de plataforma (PI), taludes (T), pie de taludes (P) y áreas de descarga (D) del VRSU y escombreras. Letras diferentes indican diferencias significativas entre parámetros granulométricos de los suelos de cubrición y los de las escombreras del VRSU (Bonferroni, 95%)



**Tabla 1.** Media (M) y desviación típica (dt) de los porcentajes de cada fracción granulométrica en distintas partes del VRSU y escombreras

Zona		Rangos tamaño partículas (mm)							
		Arcilla <0,002	Limo 0,002-0,02	Arena fina A 0,02-0,05	Arena fina B 0,05-0,1	Arena fina C 0,1-0,2	Arena media 0,2-0,5	Arena gruesa 0,5-1	Arena muy gruesa 1-3,2
<i>VRSU</i>									
Plataforma	M	0,34	1,93	2,69	7,64	13,7	16,4	23,8	33,4
	dt	0,23	0,65	1,39	4,28	6,72	3,10	9,05	14,5
Talud	M	0,46	3,12	3,32	8,85	14,0	14,8	16,7	38,6
	dt	0,50	2,28	0,64	2,06	3,4	3,51	7,65	13,9
Pie de talud	M	0,76	3,87	3,59	9,15	14,3	16,2	13,8	38,4
	dt	0,65	2,81	0,64	1,87	1,81	3,95	1,55	3,84
Área descarga		0,35	2,30	4,43	11,9	17,6	15,6	13,0	34,8
<i>Escombreras</i>									
Talud	M	0,20	1,72	3,10	8,89 a	14,5 a	13,3	14,2 b	44,1
	dt	0,25	0,62	1,37	4,14	6,21	3,8	2,92	15,8
Pie de talud	M	0,34	2,30	4,45	12,9 ab	20,1 ab	16,7	12,9 ab	30,4
	dt	0,23	0,45	1,02	3,27	5,03	5,4	1,79	14,5
Área descarga	M	0,26	2,76	5,78	16,0 b	22,9 b	17,8	9,73 a	24,8
	dt	0,21	1,08	2,30	4,95	3,42	1,30	2,20	10,2



**Fig 7.** Representación de funciones discriminantes calculadas a partir de resultados de Mastersizer en muestras de VRSU, para agrupación de las mismas en plataforma (PI), taludes (T), pie de taludes (P) y áreas de descarga (D).

posible que esto se deba a la clasificación hecha *a priori* de cada punto de muestreo dentro de los grupos Plataforma, Talud, Pie de talud, y Área de descarga, ya que muchos de ellos pueden presentar particularidades que hagan que su granulometría se parezca más a la de otra zona.

Para profundizar en estas posibilidades se realizó un análisis discriminante, para

clasificar mejor cada muestra dentro de cada agrupamiento. Este análisis no produce funciones discriminantes significativas, pero sí demuestra la hipótesis que hemos planteado. Así, en la figura 7 se señalan aquellos puntos que no se clasifican correctamente mediante este método. Las muestras 20 y 21 que se parecen más a

---

aquellas de plataforma, se recogieron en la parte más horizontal de un talud superpuesto, como se puede comprobar en la figura 4. La muestra 47 de la plataforma, se recogió en un pequeño talud entre los más recientes montones de residuos, por lo que se parece más aquellas recogidas de taludes. La muestra 19 se recogió en una parte de talud desprovista de vegetación, con lo que puede producirse una acumulación de material erosionado. Finalmente, la muestra 39, que también se recogió en un talud, muestra más similitud con las recogidas en las partes bajas de taludes, pero su inclusión en este grupo empeora los resultados de este análisis.

El análisis de estos resultados indica la heterogeneidad de situaciones incluso en un mismo talud, aumentando la complejidad para entender la colonización de la vegetación, que puede variar en pequeñas manchas dependiendo de estas variaciones a pequeña escala. Suponiendo una nueva clasificación de estas muestras, se clasificarían adecuadamente el 95 % de las muestras, y el valor de significación de la primera función discriminante sería 0,0006. Aún así hemos decidido conservar la clasificación original para referirnos a los siguientes análisis que se exponen a continuación

#### b) Parámetros de fertilidad para las plantas

En las 57 muestras edáficas se han analizado los parámetros relacionados con la fertilidad de los suelos por su importancia para la vegetación. El pH en agua y pasta saturada, el porcentaje de materia orgánica por oxidación por dicromato potásico, el contenido de nitrógeno total Kjeldahl, así como las concentraciones pseudototales (mediante extracción con ácidos nítrico y perclórico en ratio 1:4) y cambiables (mediante extracción con acetato amónico pH 7) de Ca, K, Na y Mg, y pseudototal y biodisponible de P, y P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, se han determinado mediante los procedimientos descritos en Hernández y Pastor (1989).

Los resultados de todas las determinaciones en cada una de las muestras se exponen en las tablas 2 y 3. Se ha preferido reflejar la totalidad de los resultados para resaltar la gran variabilidad que existe de cada uno de los parámetros. El pH es bastante constante, de carácter básico, con una media de 7,9, pero que oscila entre 7,0 y 8,5, debido al carácter alcalino de los suelos del entorno que presumiblemente se han utilizado para el sellado del vertedero. La comparación de la distribución de todas

**Tabla 2.** pH, materia orgánica (%), nitrógeno (%), concentración pseudototal (T) de elementos nutrientes ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) y porcentaje cambiante (B) en muestras recogidas en el VRSU.

Punto	pH	M.O.	N	Ca		K		Na		Mg		P		P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>
				T	B	T	B	T	B	T	B			
<i>Plataforma</i>														
Get-23	8,5	2,9	0,09	61566	6	1729	5	923	2	7111	3	205	0	130
Get-24	8,0	1,2	0,06	5483	66	8855	4	244	5	4869	6	598	7	240
Get-45	8,1	1,3	0,08	7345	30	6892	4	223	4	7085	4	553	3	100
Get-46	7,8	1,4	0,08	15253	28	11362	7	276	6	22144	4	542	8	260
Get-47	8,3	1,8	0,10	14890	22	10051	3	257	5	11553	4	569	4	110
Get-48	7,9	1,5	0,10	9818	34	9400	5	218	7	11036	5	462	7	150
<i>Talud</i>														
Get-6	7,5	4,0	0,05	6627	27	2495	5	86	16	1316	7	70	0	40
Get-8	8,1	0,92	0,05	42871	9	3600	7	355	6	10842	2	32	0	50
Get-11	8,2	2,5	0,12	42156	12	6790	12	337	16	7992	4	542	4	300
Get-16	7,8	2,2	0,12	46571	14	4478	14	502	12	5795	5	317	0	110
Get-17	8,0	2,3	0,06	57028	8	2524	10	604	6	6123	6	132	0	45
Get-18	8,2	2,8	0,18	38558	9	3262	9	760	15	6124	7	113	0	15
Get-19	7,6	1,2	0,19	11643	27	8270	4	241	15	6617	8	441	0	60
Get-20	7,8	1,4	0,09	4051	59	11010	5	243	6	6765	9	547	9	240
Get-21	7,9	0,55	0,05	8366	41	7671	4	222	7	5506	8	494	8	200
Get-22	8,1	0,92	0,06	7296	53	9209	4	254	5	5810	5	590	6	190
Get-39	8,1	1,1	0,05	25150	8	4800	4	350	6	8250	3	50	0	20
<i>Pie talud</i>														
Get-3 A	7,9	0,90	0,06	3969	53	6902	7	221	27	6222	7	258	10	140
Get-3 F	7,6	2,1	0,09	5922	46	7492	6	214	18	10126	5	258	14	200
Get-9	8,2	1,2	0,06	42176	10	3206	7	467	5	4391	4	106	0	60
Get-10	8,2	0,92	0,03	29893	9	4759	4	339	5	5086	5	137	0	20
Get-37	7,8	3,7	0,17	10122	41	8360	8	224	9	4598	7	429	19	320
Get-38	7,8	2,3	0,11	14063	35	5774	5	215	32	4861	11	444	9	200
<i>Área descarga</i>														
Get-2 A	7,7	6,2	0,29	13490	39	7245	10	324	52	9071	6	279	9	140
Get-2 F	7,8	7,8	0,37	28560	21	6702	9	252	34	8336	7	366	12	220
Get-4 A	7,5	3,8	0,13	12337	20	3570	12	162	26	3884	5	10	0	1050
Get-4 F	7,8	3,8	0,10	11135	19	3468	8	177	32	3577	8	8	0	70
Get-7	7,5	5,6	0,25	37831	33	7442	3	308	32	7953	10	276	0	115

las variables entre VRSU y escombreras no muestra diferencias significativas en ningún caso, siendo todas ellas muy variables en los dos casos.

c) Metales pesados y elementos traza que pueden causar toxicidad en las plantas

Aunque en trabajos anteriores se han mostrado algunos resultados preliminares de esta problemática de contaminación por metales pesados, así como por compuestos orgánicos y salinidad (Hernández y Pastor, 2008; Hernández y Bartolomé, 2010; Hernández et al, 2012; Pastor y Hernández, 2008), hemos querido profundizar en esta línea mediante el análisis de un mayor número de muestras. Para ello, 57 muestras de suelo se han analizado mediante espectrometría de emisión por plasma (ICP-OES) para determinar el contenido pseudototal (previa extracción con ácidos nítrico y perclórico en relación 4:1, Walsh y SSSA, 1971) y biodisponible (extracción

**Tabla 3.** pH, materia orgánica (MO, %), nitrógeno (N, %), concentración pseudototal (T) de elementos nutrientes (mg kg<sup>-1</sup>) y porcentaje cambiante (B, %) en muestras recogidas en las escombreras.

Punto	pH	M.O.	N	Ca		K		Na		Mg		P		P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>
				T	B	T	B	T	B	T	B	T	B	
<i>Plataforma</i>														
Get- 49	8,1	1,7	0,11	13588	24	7139	7,3	102	15	10111	5,0	613	3,1	18
Get- 50	7,6	1,6	0,12	10910	38	7464	7,4	120	11	9279	3,6	297	11	1171
Get- 51	7,8	2,2	0,10	14428	23	9093	4,6	134	8,4	10778	2,1	873	5,6	66
Get- 52	7,8	0,80	0,04	5342	42	6711	3,2	106	11	6411	3,8	283	4,2	12
Get- 53	7,7	2,3	0,10	15831	21	7671	8,3	97	12	7853	2,6	580	12	54
<i>Talud</i>														
Get- 13	8,3	1,5	0,08	26245	16	2653	16	187	11	3343	6,3	106	21,1	30
Get- 15	7,7	1,2	0,09	16589	50	7331	4,9	198	8,2	4009	6,6	249	4,4	8603
Get- 32	7,8	0,71	0,05	63966	14	6989	33	238	12	7583	4,9	261	3,2	4008
Get- 40	8,1	0,98	0,04	14200	28	7550	2,8	250	5,9	10350	2,3	350	3,8	264
Get- 42	8,2	0,24	0,03	9617	35	3704	4,5	158	16	4643	3,6	289	12	26
<i>Pie talud</i>														
Get- 12	7,9	1,4	0,07	10790	37	7968	3,6	214	7,0	7278	9,2	423	3,7	144
Get- 14	8,0	1,0	0,06	17651	27	3658	6,6	127	11	3126	9,0	68	0,0	159
Get- 33	7,9	1,4	0,09	17519	27	7125	6,1	190	6,7	5067	6,3	536	5,9	72
Get- 34	7,0	2,5	0,13	31469	17	7942	4,7	248	22	6187	6,9	469	4,7	790
Get- 35	7,9	1,2	0,08	25913	19	8208	4,7	173	12	7176	7,3	428	5,3	44
Get- 41	7,9	1,1	0,10	24281	20	8442	4,4	246	6,4	8838	1,4	593	19	25903
Get- 43	8,0	0,76	0,05	72211	6	7503	3,4	246	5,9	10099	3,4	362	8,4	993
Get- 44	7,9	1,3	0,07	17827	19	7959	3,0	315	13	5894	4,8	253	3,8	287
<i>Área descarga</i>														
Get- 1 A	7,7	4,2	0,20	72005	34	4234	4,8	1281	74	8466	22	177	10	5918
Get- 1 F	7,7	2,0	0,11	43501	21	7456	4,1	292	19	7316	2,7	265	6,3	3830
Get- 5	7,3	5,8	0,24	25041	30	8150	7,5	412	40	11338	3,4	449	6,3	3305
Get- 25	8,0	2,6	0,12	15164	28	8552	5,9	310	27	5753	9,5	407	5,3	74
Get- 26	7,8	1,1	0,07	64650	9	6624	3,2	198	15	6081	5,2	240	4,2	819
Get- 36	7,5	5,6	0,30	34429	25	9961	5,4	306	27	8024	7,5	498	2,8	4245

-: no analizado

con acetato amónico + EDTA según Lakanen y Ervio, 1971) de Al, Mn, Zn, Cu, Pb, Cr y Ni. Además ha sido posible analizar la concentración total de As mediante fluorescencia de rayos X en 48 muestras, y la concentración total de Hg mediante el equipo Advanced Mercury Analyser (AMA-254, LECO Company, Czeck Republic) según Millán et al. (2006) en 34 muestras seleccionadas entre las 57.

En las tablas 4 y 5 se muestra la concentración de metales y otros elementos traza detectados en las muestras de la cubierta edáfica de sellado y áreas de descarga del vertedero. La concentración de Al en vertedero varía entre 8123 y 50747 mg kg<sup>-1</sup>, y el Mn entre 205 y 7432 mg kg<sup>-1</sup>. En las escombreras el rango de concentración es mayor para el Al y menor para Mn. Debido al carácter básico de los suelos, estos elementos no se consideran peligrosos para las poblaciones vegetales y no nos referiremos a ellos en la exposición de los resultados analíticos.

**Tabla 4.** Concentración pseudototal (T) de metales y otros elementos traza ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) y porcentaje que se encuentra biodisponible (B) en muestras recogidas en el VRSU.

Punto	Zn		Cu		Pb		Cd		Cr		Ni		As	Hg
	T	B	T	B	T	B	T	B	T	B	T	B		
<i>Plataforma</i>														
Get-23	9491	23	4593	3	4421	50	93	35	531	0,9	231	1,1	271	11
Get-24	137	20	14	18	19	70	0,0		3,2	2,2	8,7	1,5	n.d	0,0
Get-45	148	2,1	9	13	28	8,2	0,0		7,3	0,6	5,6	4,1	14	-
Get-46	147	2,1	38	17	35	48	0,0		2,2	2,3	12	4,0	22	-
Get-47	126	3,8	12	14	11	43	0,0		4,7	1,1	9,9	3,4	n.d	-
Get-48	175	5,3	43	16	22	40	0,0		18	0,6	21	3,4	n.d	-
<i>Talud</i>														
Get-6	640	22	1916	21	132	29	0,0		256	0,1	35	2,5	119	0,3
Get-8	13029	27	1055	8,1	12689	23	185	34	269	1,7	86	1,9	282	4,0
Get-11	3247	20	240	11	579	51	10	67	154	0,6	43	2,0	n.d	0,5
Get-16	10777	25	748	9,3	5734	38	142	41	150	3,0	42	2,6	n.d	3,0
Get-17	17416	26	1313	8,5	12612	28	308	37	242	1,5	60	2,2	n.d	4,9
Get-18	22992	28	1804	9,4	18136	30	306	36	298	1,8	80	3,7	685	4,2
Get-19	5190	25	125	14	1198	47	29	52	40	3,3	15	2,6	n.d	0,2
Get-20	1085	2,6	18	9,4	106	12	0,3	64	9,8	0,5	9,0	0,9	12	0,0
Get-21	129	9,0	11	21	18	37	0,0		3,5	1,4	7,0	1,7	13	0,0
Get-22	168	9,3	14	20	25	53	0,0		9,1	0,8	8,8	1,8	23	0,0
Get-39	17830	76	1445	20	12555	68	190	60	587	2,2	210	2,5	492	-
<i>Pie talud</i>														
Get- 3 A	61	2,2	9	14	18	59	0,0		2,3	12	5,1	9,2	-	-
Get- 3 F	69	4,6	31	6,2	8	40	0,0		9,2	3	5,2	7,0	-	-
Get-9	12632	25	1181	10	7179	37	257	48	236	2,4	90	2,1	306	2,4
Get-10	15184	33	1493	13	10085	48	155	42	504	2,2	206	2,2	n.d	3,3
Get-37	559	66	20	25	28	61	0,0		3,8	4,7	8,5	5,9	15	0,0
Get-38	108	18	15	24	23	65	0,0		15	1,0	7,4	6,7	19	0,0
<i>Área descarga</i>														
Get- 2 A	528	17	36	27	117	36	0,0		6,6	6	8,6	5,1	-	-
Get- 2 F	366	14	35	18	64	28	0,0		5,7	5	7,3	5,5	-	-
Get- 4 A	577	19	882	27	149	29	0,0		110	0	156	1,5	-	-
Get- 4 F	477	19	1260	26	139	19	0,0		153	0	213	1,5	-	-
Get-7	2417	33	151	27	290	48	2,5	86	9,5	3,4	34	8,9	54	0,3
Ref. (pH>7)	450		210		300		3		150		112		29*	1,5

n.d: no detectado, -: no analizado. Niveles de referencia para suelos con pH básico según RD1310/1990, \*niveles de As según referencias holandesas.

Se comprueba que los puntos con mayor concentración de todos los elementos se encuentran en taludes del VRSU, aunque existen algunos otros con alta contaminación en otras zonas del vertedero. La heterogeneidad en la concentración de estos contaminantes es alta, y también su distribución espacial en el vertedero es irregular (como muestran los mapas de distribución de Zn y Cu en el capítulo 2 de esta memoria). Sin embargo, se cumple que los puntos más contaminados, lo están por todos los elementos a la vez. También es muy variable el porcentaje de la cantidad de contaminante que se encuentra en forma biodisponible. A pesar de ser poco móvil, el Pb presenta porcentajes altos de biodisponibilidad. El Cd también

**Tabla 5.** Concentración pseudototal (T) de metales y otros elementos traza (mg kg<sup>-1</sup>) y porcentaje que se encuentra biodisponible (B) en muestras recogidas en las escombreras.

Punto	Zn		Cu		Pb		Cd		Cr		Ni		As	Hg
	T	B	T	B	T	B	T	B	T	B	T	B		
<i>Plataforma</i>														
Get-49	10	0,0	13	21	0,0		0,0		1,8	0,0	5,4	0,0	n.d	-
Get-50	17	0,0	21	23	22	54	0,0		3,4	0,0	7,8	0,0	n.d	-
Get-51	13	0,0	17	19	0,0		0,0		2,4	0,0	6,5	0,0	n.d	-
Get-52	9	0,0	14	18	0,0		0,0		3,6	0,0	8,0	0,0	12	-
Get-53	13	0,0	14	29	0,0		0,0		6,8	0,0	7,7	0,0	15	-
<i>Talud</i>														
Get-13	1261	18	783	7,0	164	35	0,0		378	0,1	223	1,2	42	0,8
Get-15	159	15	34	14	28	48	0,0		17	0,7	12	3,3	29	0,0
Get-32	166	11	40	54	24	42	0,0		14	3,8	11	3,4	26	0,1
Get-40	120	35	15	14	15	86	0,0		3,5	3,4	5,0	6,6	14	-
Get-42	72	12	10	9,2	10	43	0,0		6,7	1,5	4,1	7,1	n.d	-
<i>Pie talud</i>														
Get-12	1123	2	83	14	129	10	0,0		10	1,2	25	2,6	25	0,0
Get-14	341	16	266	11	64	32	0,0		94	0,1	75	1,6	22	0,2
Get-33	146	19	29	14	26	56	1,2	90	7	2,5	8,8	3,5	22	0,0
Get-34	224	18	28	22	48	40	1,5	3,6	10	1,9	12	4,4	37	0,1
Get-35	76	4,8	14	18	11	33	0,9	24	13	1,2	9,1	3,2	31	0,0
Get-41	1259	1,3	38	13	148	7,6	1,4	26	9,1	1,2	11	4,1	21	-
Get-43	226	2,8	22	5,4	24	12	0,0		1,1	9,1	10	2,2	100	-
Get-44	1869	10	73	21	215	54	3,5	67	18	0,9	22	3,6	30	-
<i>Área descarga</i>														
Get- 1 A	238	23	18	32	57	43	0,0		2,9	12	4,6	9,0	-	-
Get- 1 F	74	4,0	13	19	17	22	0,0		1,5	18	6,4	5,2	-	-
Get-5	252	65	56	31	66	41	0,0		10	0,1	8,3	5,2	31	0,2
Get-25	171	13	25	19	44	45	0,0		5,7	3,3	10	4,0	27	0,4
Get-26	126	8,1	63	8,5	83	32	0,0		24	1,0	16	2,0	36	0,2
Get-36	904	35	68	41	152	62	1,7	11	9,2	2,8	14	7,5	40	0,6
Ref. (pH>7)	450		210		300		3		150		112		29*	1,5

n.d: no detectado, -: no analizado. Niveles de referencia para suelos con pH básico según RD1310/1990, \*niveles de As según referencias holandesas.

presenta gran biodisponibilidad. Zn y Cu son los que más variabilidad presentan. Cr y Ni son los metales con menores niveles de concentración.

Aparte del estudio de la biodisponibilidad de elementos traza mediante el método de Lakanen y Ervio (1971), se decidió realizar un estudio más exhaustivo sobre la biodisponibilidad de metales en las muestras edáficas. Para ello se realizó una extracción secuencial mediante el método BCR optimizado por Mossop y Davidson (2003). La extracción secuencial indica la fracción de cada metal que es biodisponible (F1: intercambiable), reducible (F2: ligada a los oxihidróxidos), oxidable (F3: ligada a la materia orgánica) y residual (F4). Puesto que es en VRSU donde se localizan los puntos de mayor concentración de este tipo de contaminantes, se seleccionaron 5 sitios que representaran zonas plataforma, taludes y áreas de descarga con variable

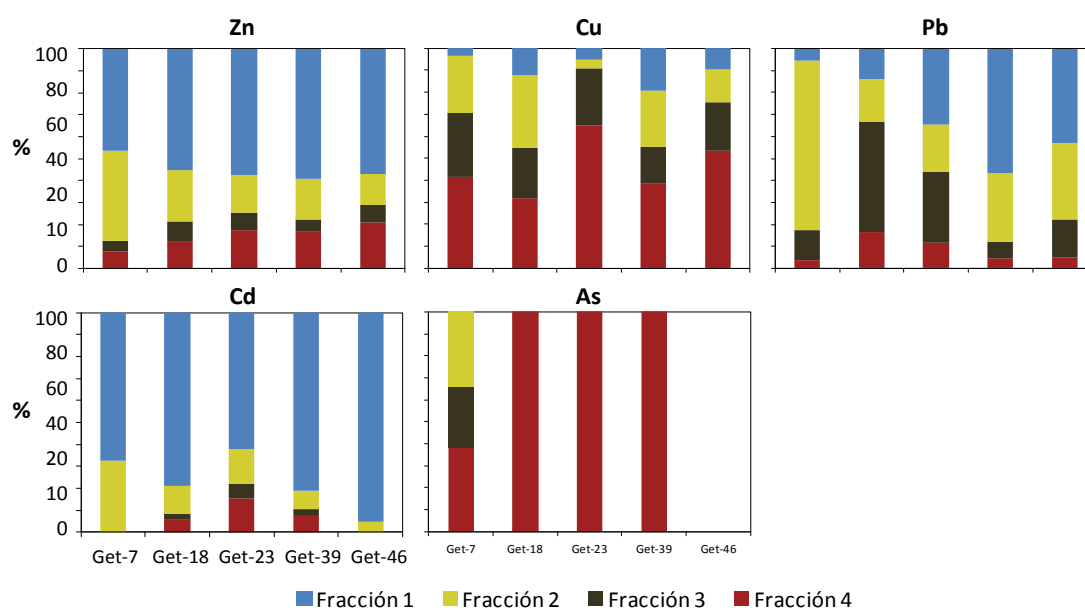


Fig 8. Porcentaje del contenido de metales que se encuentra en cada fracción

Tabla 6. Concentración total de metales ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) en los suelos seleccionados para el fraccionamiento secuencial.

Suelo		Zn	Cu	Pb	Cd	As
Get-7	humedal	1425	102	278	3	16
Get-18	talud	127529	1441	19500	364	32
Get-23	plataforma	33446	2042	11057	106	10
Get-39	talud	76120	1272	20032	223	14
Get-46	plataforma	610	41	182	2	0

contenido de elementos traza para tomar muestras para este estudio. Los sitios se seleccionaron en función de la distribución conocida de metales, y por lo tanto se ha conservado la numeración del lugar en el que se recogieron. En la tabla 6 se

muestra la concentración total de cada metal en cada muestra, calculada mediante la suma de todas las fracciones. En la figura 8 se representan los porcentajes de cada metal que se encuentran en cada fracción.

Los análisis efectuados nos permiten hacer las siguientes consideraciones. Cd y el Zn son, en general, los que presentan el mayor porcentaje de metal en la fracción biodisponible. El caso del Cd es preocupante debido a la alta concentración de este elemento en los suelos estudiados. Esta apreciación sobre la alta biodisponibilidad del Cd ya la indicó Liphazdi y Kirkham (2006). El As presenta un porcentaje residual más alto, lo que es interesante pues disminuye su peligrosidad. La fracción biodisponible de Cu es bastante baja, y el resto de fracciones varían en función de los suelos. El comportamiento de Pb es más irregular entre los distintos suelos. En

general la fracción residual es baja. La fracción de la materia orgánica es variable siendo mayor en el punto 18. La fracción biodisponible es muy alta en el punto 39, lo que resulta preocupante debido a la alta concentración de este elemento en este punto.

Claramente la presencia en concentraciones muy altas de elementos traza y metales pesados es un problema para el establecimiento de poblaciones vegetales, empeorado por el hecho de que los puntos de mayor contaminación coinciden además con zonas de fuerte pendiente. De hecho, en campo se comprueba que las zonas correspondientes a las muestras 17 y 18, así como 10 y 39, son taludes desnudos en los que el recubrimiento vegetal es prácticamente nulo, en comparación con las zonas circundantes. Esta circunstancia es una gran dificultad para la revegetación del vertedero estudiado.

#### d) Salinidad

Puesto que la salinidad se ha descrito como uno de los principales impactos sobre poblaciones vegetales y animales de los vertederos sellados del centro peninsular (Hernández et al, 1999; Pastor et al, 1993; Pastor y Hernández, 2008), así como de vertederos de otros ambientes (Cheng y Chu, 2007; Fatta et al, 1999; Kalčíková et al, 2012; Tatsi y Zouboulis, 2002), se ha querido profundizar en esta problemática en el caso de este vertedero. En la totalidad de las muestras recogidas de VRSU y escombreras se ha determinado la conductividad eléctrica, así como la concentración de los aniones  $F^-$ ,  $Cl^-$ ,  $NO_2^-$ ,  $NO_3^-$ ,  $PO_4^{3-}$  y  $SO_4^{2-}$ , mediante cromatografía iónica previa extracción según los métodos descritos en Hernández et al. (1999). Los resultados se muestran en las tablas 7 y 8. Del mismo modo que ocurre con el resto de propiedades químicas del suelo, los puntos de mayor salinidad se distribuyen muy irregularmente tanto en los suelos de cubrición del vertedero como de las escombreras.

Mediante un Análisis de Componentes Principales de forma separada en VRSU y escombreras, se ha podido comprobar que la conductividad eléctrica está relacionada con  $Cl^-$  y  $SO_4^{2-}$  en el caso de VRSU y además con  $F^-$ ,  $Na^+$ ,  $NO_3^-$  en el caso de escombreras. La distribución de los puntos en los nuevos ejes de coordenadas parece indicar que la salinidad aumenta en las áreas de descarga tanto de VRSU como de escombreras. Para comprobar esta tendencia se ha realizado un análisis de



**Tabla 7.** Conductividad eléctrica ( $\mu\text{S cm}^{-1}$ ) y concentración de aniones ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) en muestras de suelos del vertedero.

Puntos	C.E.	F <sup>-</sup>	Cl <sup>-</sup>	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
Plataforma							
Get- 23	132	5,5	4,6	1,4	5,4	0,0	26
Get- 24	107	1,8	8,1	1,6	5,2	2,1	11
Get- 45	114	2,6	12	1,5	3,3	2,1	8,5
Get- 46	161	7,4	8,5	1,1	5,3	2,3	31
Get- 47	116	2,4	8,9	1,7	7,6	1,6	10
Get- 48	113	2,6	13	1,6	3,7	3,1	8,0
Talud							
Get- 6	175	2,8	6,4	0,7	3,0	0,0	147
Get- 8	317	19	6,0	1,4	17	0,0	398
Get- 11	159	7,6	7,7	1,0	3,6	0,0	41
Get- 16	1853	10	38	1,3	70	0,0	4063
Get- 17	587	14	10	1,4	22	0,0	592
Get- 18	985	31	121	2,6	193	0,0	635
Get- 19	1329	13	32	2,0	1152	0,0	691
Get- 20	154	1,6	5,2	1,3	38	2,2	15
Get- 21	171	2,5	6,3	0,9	94	0,9	91
Get- 22	157	1,7	4,9	1,1	15	1,1	123
Get- 39	366	18	8,6	3,0	41	0,0	214
Pie talud							
Get-3A	270	3,2	33	1,2	28	0,0	96
Get-3F	340	1,6	30	1,5	110	5,4	67
Get- 9	212	18	8,7	1,3	13	0,0	139
Get- 10	237	17	5,3	1,1	12	0,0	194
Get- 37	391	1,5	27	1,0	112	0,0	65
Get- 38	369	4,2	60	1,3	7,3	0,0	656
Área descarga							
Get-2A	1490	3,8	135	2,9	93	2,0	1938
Get-2F	1960	1,6	77	1,5	0,0	0,0	3322
Get-4A	1490	3,7	125	1,9	148	2,9	1647
Get-4F	1500	2,9	43	1,0	34	0,0	1729
Get- 7	1878	10	85	1,3	20	1,0	4866

**Tabla 8.** Conductividad eléctrica ( $\mu\text{S cm}^{-1}$ ) y concentración de aniones ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) en muestras de suelos de las escombreras.

Puntos	C.E.	F <sup>-</sup>	Cl <sup>-</sup>	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
Plataforma							
Get-49	135	1,5	6,6	0,0	0,0	5,2	18
Get-50	826	1,1	3,2	2,4	0,0	0,0	1171
Get-51	169	1,7	8,3	0,0	0,0	5,0	66
Get-52	60	2,4	2,9	2,6	0,0	2,8	12
Get-53	206	1,2	5,1	2,6	0,6	8,0	54
Talud							
Get-13	170	7,3	7,2	0,8	18	0,0	30
Get-15	1719	3,7	4,4	0,8	12	0,0	8603
Get-32	2360	9,4	6,9	1,0	67	0,0	4008
Get-40	299	2,8	5,1	1,0	3,8	0,0	264
Get-42	99	3,0	7,9	1,5	4,3	1,8	26
Pie talud							
Get-12	90	0,0	1,1	0,0	0,0	0,0	144
Get-14	193	4,2	15	1,9	13	0,0	159
Get-33	327	2,5	13	1,0	143	0,0	72
Get-34	744	3,8	56	1,5	21	1,5	790
Get-35	198	2,7	13	2,1	37	2,8	44
Get-41	1716	1,9	4,8	1,2	19	0,0	25903
Get-43	877	2,1	3,6	1,0	11	0,0	993
Get-44	384	4,4	46	1,4	5,0	0,0	287
Área descarga							
Get-A	8220	8,6	7570	0,0	495	0,0	5918
Get-1F	2350	2,9	199	2,3	29	0,0	3830
Get- 5	2180	3,8	260	2,0	201	0,0	3305
Get-25	280	3,3	35	1,9	24	0,0	74
Get-26	709	6,0	12	1,5	60	0,0	819
Get-36	2500	5,2	69	3,6	43	0,0	4245

ANOVA de las variables conductividad eléctrica y Cl<sup>-</sup> en las distintas áreas del vertedero. Sólo en el caso del VRSU ambos parámetros son significativamente mayores en áreas de descarga. Aunque los datos parecen indicar este mismo hecho en escombreras, la desviación típica es tan grande que estadísticamente no se aprecia esta diferencia. La máxima salinidad registrada, con una conductividad eléctrica de 17290  $\mu\text{S cm}^{-1}$ , fue en una de las muestras correspondientes a la deposición en el área de descarga más oriental. Lo que puede conllevar una contaminación de los suelos de aquella área.

**Tabla 9.** Concentración máxima de contaminantes orgánicos encontrada en suelos del vertedero de Getafe ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) y máximos permitidos según la legislación española

Contaminante	Conc. max	Ref*
<u>PAHs</u>		
Naftaleno	0,23	1
Acenafteno	0,04	6
Fluoreno	0,09	5
Antraceno	0,46	45
Fluoranteno	2,59	8
Pireno	2,03	6
1,2-benzantraceno	0,99	0,2
Criseno	1,11	20
Benzo(b)fluoranteno	1,85	0,2
Benzo(k)fluoranteno	0,89	2
Benzo(a)pireno	1,56	0,02
Indeno-1,2,3-(cd)pireno	1,63	0,3
Dibenzo(a,h)antraceno	0,14	0,03
<u>Insecticidas</u>		
Alfa-HCH	0,01	0,01
Beta-HCH	0,27	0,01
Gamma-HCH	0,48	0,01
Hexaclorobenceno	0,04	0,01
Endosulfan	0,07	0,6
p,p'-DDE	0,02	0,6
<u>HC</u>		
Conc. total	3408	50
Conc. Aromáticos	335	
Conc. Alifáticos	3073	
<u>Fenoles</u>		
Fenol	0,05	7
Cresoles	0,02	4
2,4,6-triclorofenol	0,01	0,9
Pentaclorofenol	0,01	0,01
<u>PCBs</u>		
	3,05	0,01

(\*Ref, máximos permitidos según RD9/2005)

**Tabla 10.** Concentración de hidrocarburos ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) en puntos de VRSU y escombreras

VRSU Punto	HC	Escombreras Punto	HC
<i>Plataforma</i>			
Get-23	901		
Get-24	78		
<i>Talud</i>			
Get-6	2423	Get-13	215
Get-8	93	Get-15	52
Get-11	230	Get-32	33
Get-16	62		
Get-17	63		
Get-18	3408		
Get-19	95		
Get-20	33		
Get-21	42		
Get-22	78		
Get-39	87		
<i>Pie talud</i>		<i>Pie talud</i>	
Get- 3 A	13	Get-12	174
Get- 3 F	13	Get-14	169
Get-9	92	Get-33	52
Get-10	154	Get-34	19
Get-37	33	Get-35	22
Get-38	26		
<i>Área descarga</i>		<i>Área descarga</i>	
Get- 2 A	5,1	Get- 1 A	7,5
Get- 2 F	5,1	Get- 1 F	7,5
Get- 4 A	854	Get-5	67
Get- 4 F	854	Get-25	24
Get-7	123	Get-26	18
		Get-36	36
Ref.	50	Ref.	50

### e) Compuestos orgánicos

La contaminación por compuestos orgánicos resulta también una preocupación en los estudios de vertederos sellados ya que, a medida que numerosos compuestos se han prohibido debido a su peligrosidad, su deposición en vertederos ha ido aumentando (no siempre de forma controlada), por lo que se han detectado en

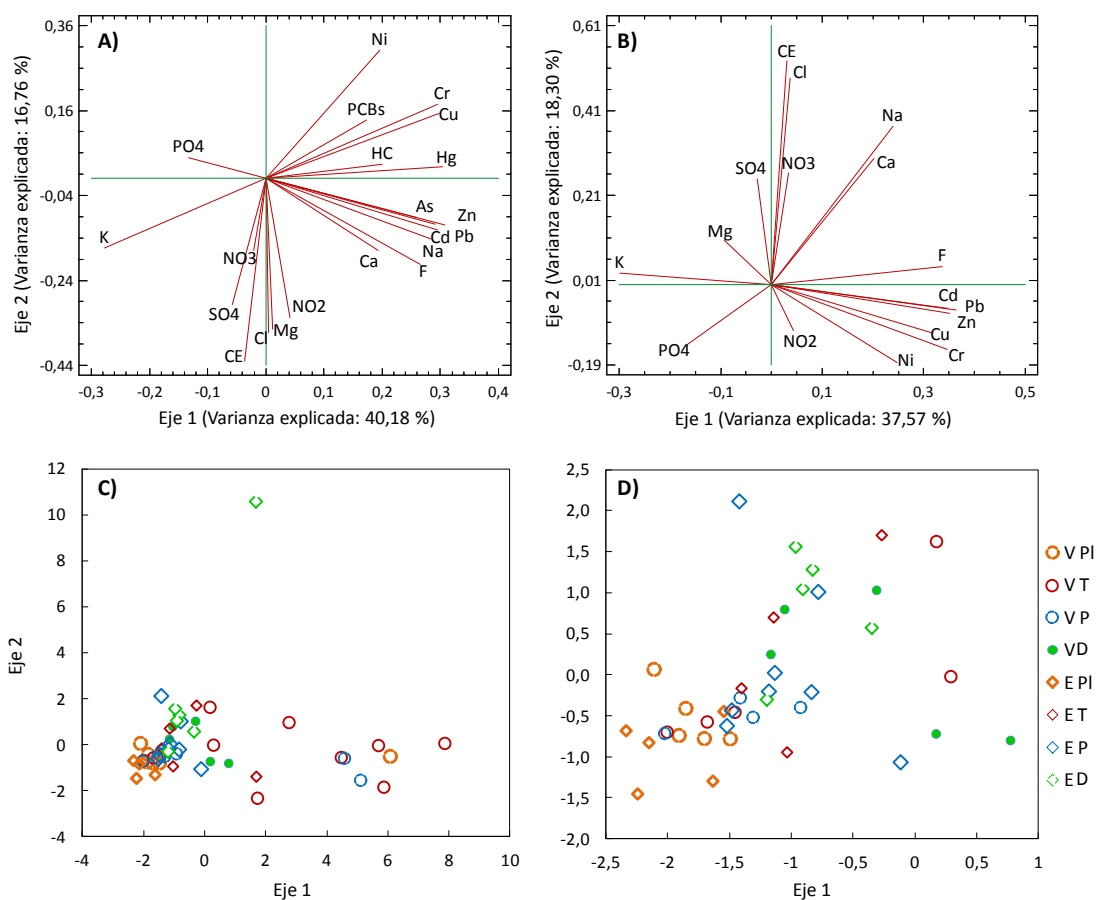
numerosos ecosistemas afectados por los mismos (Weber et al., 2011). Nuestro equipo ha estudiado la presencia de numerosos contaminantes orgánicos en varios vertederos sellados, incluyendo el del caso que nos ocupa. Los compuestos orgánicos determinados en suelos y las técnicas utilizadas son: hidrocarburos totales mediante espectrometría infrarroja (UNE 77307); insecticidas organoclorados y bifenilos policlorados mediante cromatografía de gases (ISO 10382); hidrocarburos aromáticos policíclicos por cromatografía de gases (ISO 18287) y fenoles por cromatografía de gases (U.S. E.P.A 3550B, U.S. E.P.A 3650B and U.S. E.P.A 8401). La descripción de estas técnicas y su puesta a punto se muestran en Hernández y Bartolomé (2010).

Se comprueba en la tabla 9 la gran variedad de contaminantes orgánicos que se pueden encontrar en este vertedero. Sin embargo, los que presentan mayor peligrosidad por encontrarse en concentraciones superiores a las permitidas, y ampliamente distribuidos en el emplazamiento, son los hidrocarburos totales, los PCBs, los hidrocarburos poliaromáticos (PAHs) con mayor número de anillos y algunos insecticidas clorados. En general los puntos más contaminados por este tipo de contaminantes coinciden con los que están también más contaminados por metales pesados.

Ya que los hidrocarburos totales se han detectado en todos los puntos en los que se han analizado (43) en diferentes concentraciones, se ha querido mostrar estos resultados en la tabla 10 para reflejar (del mismo modo que con los anteriores problemas de contaminación) la heterogeneidad encontrada de concentración y distribución.

#### f) Estructura edáfica del material de sellado del vertedero y sus escombreras adosadas

Mediante un análisis de componentes principales (PCA) hemos querido conocer la estructura de las variables químicas del suelo en el conjunto del vertedero y la distribución de las muestras en esos nuevos ejes. En la figura 9A) se comprueba que el primer eje está muy relacionado positivamente con la contaminación por metales pesados y compuestos orgánicos, aunque también se encuentra en ese grupo de variables el Na y el F, y está muy negativamente relacionado con la fertilidad (K y compuestos de fósforo). El segundo eje está más relacionado con la salinidad, muy



**Fig 9.** Análisis de componentes principales con el conjunto de variables químicas del suelo y representación de los puntos en los nuevos ejes de coordenadas. A) PCA con el conjunto de las variables, N = 29, B) PCA sin As, Hg, hidrocarburos y PCBs para poder aumentar el número de casos a N = 52, C) representación de los 52 puntos en los nuevos ejes creados por el PCA de la figura B), D) representación que corresponde a un “zoom” del gráfico C) entre los valores -2,5 y 1 en abscisas y -2 y 2,5 en ordenadas. V, VRSU; E, escombreras; PI, plataformas; T, taludes; P, pie de taludes; D, áreas de descarga.

representada, aparte de por la conductividad eléctrica, por cloruros, sulfatos, nitratos y nitritos y el Mg. Al eliminar del análisis los compuestos orgánicos y elementos traza (Hg y As) (fig 9B), el análisis no varía de forma importante, manteniendo la primera componente muy relacionada positivamente con metales pesados y negativamente con el K. Y la segunda componente más relacionada con salinidad, en este caso la conductividad eléctrica más relacionada con cloruros que con otros aniones.

Esto confirma lo que se ha comentado anteriormente, de que a pesar de la heterogénea distribución de contaminantes, los puntos más contaminados lo están

por todos los contaminantes a la vez. La representación de los puntos en los nuevos ejes (fig 9C y 9D) permite visualizar que en los lugares donde se presenta mayor contaminación por metales pesados corresponden a taludes del VRSU y el punto con más salinidad a escombreras. Las zonas menos contaminadas tanto por metales como por salinidad corresponden en ambos casos a las plataformas, con la excepción de solo una muestra correspondiente a la plataforma del VRSU.

### 3.1.2 Comunidades herbáceas desarrolladas en taludes y principal área de descarga de lixiviados superficiales

La plataforma muestreada del VRSU corresponde al último sellado de residuos, incluso posterior a la plataforma de la primera escombrera que fue adosada, en la que resultaron ser abundantes en el inventario realizado al comienzo de la primavera de 2009, las especies de *Ornithopus compressus*, *Anchusa azurea*, *Cerastium glomeratum*, *Capsella bursa-pastoris*, *Lamium amplexicaule*, así como otras especies de los géneros *Ortiga*, *Sinapis* y *Fumaria*.

Los taludes presentan una cobertura que difiere según sus diferentes tipos de orientación. Así, las zonas soleadas están cubiertas por una comunidad anual de un solo estrato, que presenta plantas de bajo porte como *Calendula arvensis*, *Bromus rubens*, *Centaurea melitensis*, *Malva parviflora*, *M. pusilla*, *Eruca sativa* y *Herniaria hirsuta*, entre otras. Se observan también pequeñas manchas de cardos en las partes inferiores de los mismos y en los canales dejados por los flujos de agua de las precipitaciones (*Cardus bougeanus*, *C. tenuiflorus* y *Sylibum marianum*). Las manchas de cardos son más fácilmente distinguibles todos los taludes de orientación norte ya que los cubren prácticamente.





Las comunidades vegetales de los taludes del vertedero, así como de sus escombreras adosadas han evolucionado poco en los últimos años, que han sido dominadas por especies pioneras de la sucesión vegetal (Alvarez-Jiménez y Bartolomé, 2010). Sin embargo, estas cubiertas vegetales de colonización han ayudado a estabilizar el sellado del vertedero formando una fina capa de humus. Probablemente, los procesos metanogénicos asociados a estos sistemas emergentes han evitado la germinación y enraizamiento de especies más tardías en la sucesión ecológica. En las zonas más bajas de los taludes del vertedero cuya escorrentía superficial vierte a los suelos del humedal, estas comunidades están acompañadas de otras especies de pastos como tréboles (*Trifolium scabrum*, *T. pratense*), además de *Medicago rigidula*, y gramíneas como la grama (*Cynodon dactylon*), *Poa bulbosa* y *Bromus hordaceus*, que las hacen ser muy apetecidas por el ganado ovino que las pasta, a pesar de su dudosa calidad como resultado de las condiciones de contaminación del suelo.

La zona más cercana al humedal, alberga comunidades vegetales con especies capaces de tolerar la salinidad de los suelos, tales como *Juncus acutus*, *Spergularia media*, *Sonchus crassifolius*, *Plantago marítima*, *Sphenopus divaricatus*, *Parapholis incurva*, *Galium parisiense* y *Minuartia hybrida*. Todas estas especies son típicas de suelos salinos con falta de horizonte superior de materia orgánica (el suelo del humedal tiene un 5% de M.O.).

Otro importante factor que incide sin duda en el recubrimiento vegetal es la alta densidad de conejos que se alimentan de algunas de sus raíces o destruyen la capa sellada edáfica para sus madrigueras debido a la poca cohesión que presentan las partículas del suelo. (Véase al respecto la figura 5)

### 3.1.3. Bioensayos para el estudio de la toxicidad producida por la acción conjunta de metales pesados, elementos-traza, salinidad y compuestos orgánicos de los suelos del vertedero de Getafe

Se realizaron dos bioensayos con dos suelos del vertedero de Getafe que contenían tanto metales pesados y elementos traza como compuestos orgánicos. El primer bioensayo pretendía comprobar el comportamiento de *Lupinus albus* L. frente a la contaminación conjunta que presentaban los suelos. Con el segundo bioensayo se quería estudiar el efecto de la contaminación en la siembra conjunta de una leguminosa y una gramínea (*Phaseolus vulgaris* L. y *Zea mays* L.) ya que a las habas les gusta crecer en semi-sombra y encontrar un apoyo o tutor, que se lo resuelve el maíz.

Los suelos del vertedero se seleccionaron entre aquellos que tuvieron evidente problema de metales pesados, elementos-traza y compuestos orgánicos. Se recogieron los suelos en cantidad suficiente para rellenar 5 macetas de 0,5 kg en el primer bioensayo y tres macetas de 1 kg en el segundo. Se secaron a temperatura ambiente, no se tamizaron para evitar perder la estructura original del suelo, pero se retiraron las piedras mayores de 2 cm aproximadamente. Se realizaron en los suelos los mismos análisis descritos en el apartado de caracterización de la contaminación. El suelo control corresponde a un suelo de cultivo del centro peninsular sin presencia de metales pesados.

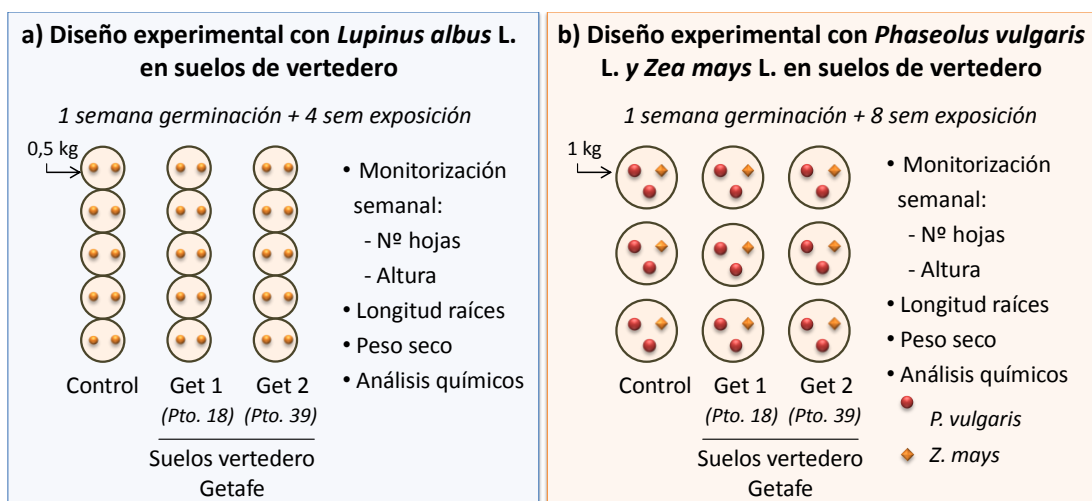


Fig 10. Diseños de los dos experimentos llevados a cabo con suelos recogidos en el VRSU de Getafe

En el caso de los dos bioensayos las semillas de las tres especies se germinaron previamente en placas Petri y cámara de crecimiento durante una semana. Se dispusieron dos plantas de las especies de leguminosas en cada maceta, y una de la gramínea según el esquema de la figura 10. Ambos bioensayos se llevaron a cabo en invernadero (poner Tª y humedad), el primero con una duración de 4 semanas. Para el segundo, sin embargo, preferimos esperar a la fructificación de *P. vulgaris*, y por lo tanto duró 8 semanas. Durante ese tiempo se regaron con agua desionizada a diario, y se realizó una monitorización semanal de altura de las plantas, número de hojas y síntomas posibles de toxicidad percibidos

Al finalizar cada bioensayo, se midió la longitud de la raíz principal y la presencia de nódulos en el caso de las leguminosas y la longitud máxima de las raíces del maíz. Se separaron raíces, partes aéreas, hojas y flores o frutos en el caso de las leguminosas, y raíces y partes aéreas en el caso del maíz. Se lavaron con agua desionizada, se secaron en estufa (70°C, 48 h) y se determinó el peso seco. Las muestras vegetales se molieron en molinillo y se digirieron en ácidos nítrico y perclórico en proporción 4:1, para la determinación de metales y elementos traza mediante ICP-OES (Walsh and SSSA, 1971).

Los resultados de los análisis de los suelos de vertedero (tablas 11, 12 y 13) evidencian de nuevo lo explicado en secciones anteriores. La concentración de metales pesados resulta preocupante, superándose los niveles de referencia hasta 400 veces en Zn,

**Tabla 11.** Contenidos pseudo-totales (T) y biodisponibles (B) de elementos nutrientes, metales mayoritarios y traza en suelos usados en los bioensayos (mg kg<sup>-1</sup>)

Suelo		Ca	K	Na	Mg	Al	Fe	Mn	Zn	Cu	Pb	Cd	Cr	Ni	As
Control	T	8986	4066	150	5532	20656	13117	162	24	9,5	8,2	0,0	5,4	6,8	<10
	B	3264	341	8,3	138	45	16	78	2,2	1,9	4,1	0,0	0,0	0,0	
Get 1	T	33250	3653	663	11213	15363	53288	9338	57618	1349	19684	276	259	65	611
	B	2813	102	195	690	90	160	136	6402	231	6526	121	5,9	3,9	
Get 2	T	29469	3852	283	7575	11988	98138	4625	55725	1270	12519	125	464	200	306
	B	2074	170	9,4	178	104	169	80	4073	173	4239	58	10	5,4	
<b>Ref.</b>	<b>T</b>								<b>140</b>	<b>36</b>	<b>85</b>	<b>0,8</b>	<b>100</b>	<b>35</b>	<b>29</b>

**Tabla 12.** pH, % de N y materia orgánica (M.O), conductividad eléctrica (µS·cm<sup>-1</sup>) y contenido (mg·kg<sup>-1</sup>) de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> y aniones en los suelos usados para los bioensayos.

Suelo	pH	N	M.O.	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	C.E.	F <sup>-</sup>	Cl <sup>-</sup>	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
Control	7,43	0,13	1,89	42	86	1,3	11	1,1	7,8	14	39
Get 1	8,02	0,044	0,74	6,0	1290	19	158	7,2	398	0,0	991
Get 2	8,05	0,048	2,08	6,0	237	8,9	4,3	4,1	40	0,0	105



**Tabla 13.** Compuestos orgánicos de los suelos de vertedero por encima del nivel de referencia ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) y otros detectados en concentración menor que la referencia

Concentración superior al nivel de referencia		Detectados < ref	
Get 1	Get 2	Get 1	Get 2
Hidrocarburos totales: 67,4	Hidrocarburos: 96,0	Fenol	Fenol
Benzo(b)fluoranteno: 0,87	Benzo(b)fluoranteno: 1,06	Endosulfán	Endosulfán
Indeno-1,2,3-(cd)pireno: 0,33	Indeno-1,2,3-(cd)pireno: 0,64		
	1,2-benzantraceno: 0,33		
	Benzo(a)pireno: 0,71		

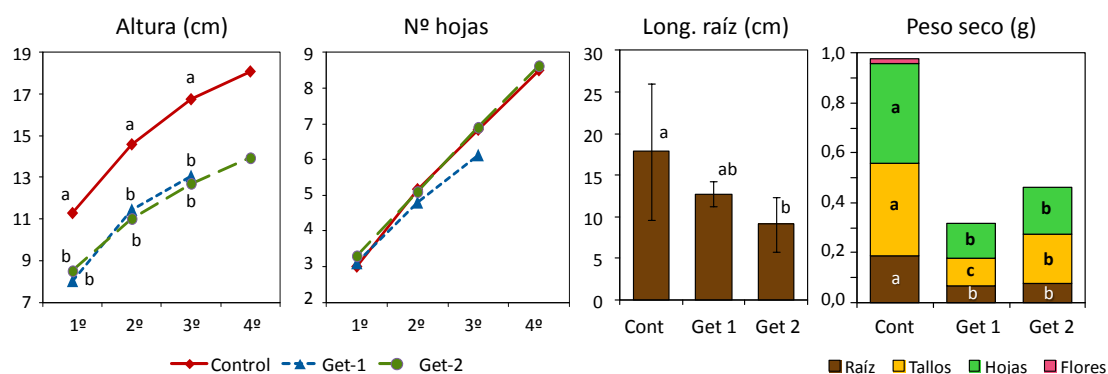
200 veces en Pb y Cd, 36 veces en Cu, 20 veces en As, 6 veces en Ni y el doble en Cr. Además de estas concentraciones totales tan elevadas, la fracción biodisponible también es de destacar y varía desde el 2% de la concentración total en el caso del Cr, hasta el 50% en el caso del Cd. A parte de los metales, la salinidad en los suelos de vertedero es alta, y en el caso del suelo Get-1 es incluso mucho mayor que en Get-2, con una conductividad eléctrica 6 veces mayor. Esta mayor conductividad eléctrica puede deberse, como se muestra en los análisis, por una concentración sobresaliente de sodio, magnesio, fluoruros, cloruros, nitratos y sulfatos.

También es de destacar la presencia de varios compuestos orgánicos pertenecientes fundamentalmente a las familias de hidrocarburos totales, e hidrocarburos poliaromáticos (PAHs), aunque también se detectan en concentración menor que la de referencia, fenol y un pesticida. El problema de este tipo de contaminación es mayor en el suelo 2 que en el suelo 1.

Los resultados del primer bioensayo mostraron una disminución evidente en el crecimiento de *L. albus* expuesto a los suelos de vertederos respecto al control. Esto se evidenció en todos los parámetros medidos (altura, longitud de las raíces y peso seco), excepto en el número de hojas (fig 11). Aunque el número de hojas fuera aproximadamente similar, las hojas de *L. albus* crecidos en suelo Get-2 mostraron fuertes síntomas de clorosis, las de aquellos del suelo Get-1 además presentaron fuerte necrosis hasta la muerte de prácticamente todas en la 3ª semana (fig 12). Las raíces de *L. albus* crecido en Get-1 eran de mayor longitud que aquellas del tratamiento Get-2 (aunque estas diferencias no fueran significativas). Sin embargo esta relación es opuesta en el caso del peso seco. Esto puede corresponderse con la delgadez de las raíces en el tratamiento Get-1. Sólo las raíces de *L. albus* control



**Fig 11.** Comparación plantas de lupino en cada uno de los tratamientos



**Fig 12.** Resultados de la monitorización de altura y número de hojas a lo largo del bioensayo con *Lupinus albus*, longitud de las raíces y peso seco de raíces, tallos, hojas y flores en los distintos tratamientos. Letras diferentes indican diferencia significativa al 95% entre tratamientos.

presentaron nódulos, y sólo algunas de estas plantas lograron florecer.

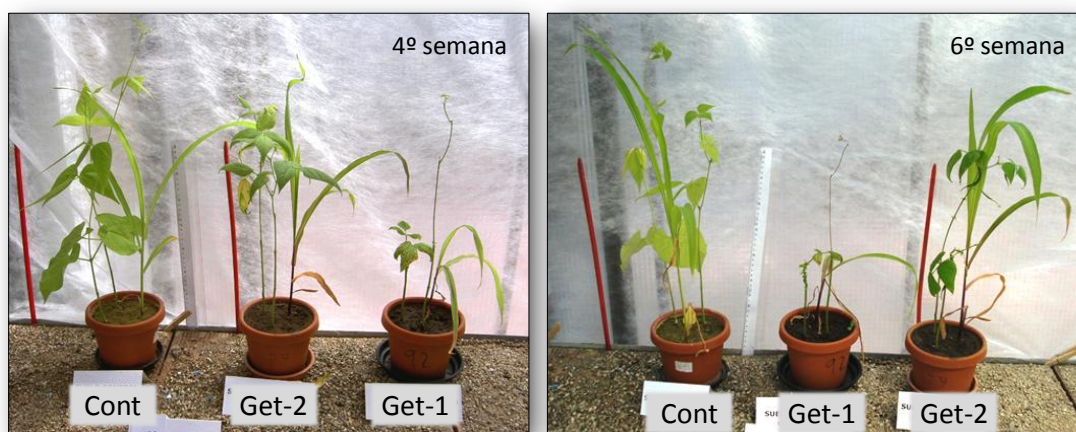
Respecto a la acumulación de metales pesados (tabla 14), se comprueba que es mucho mayor en las raíces. Si se compara entre tratamientos de vertedero, las raíces reflejan el grado de concentración de los suelos, de manera que los elementos que son mayores en suelo Get-1 (Zn, Pb, Cd) también son mayores en las raíces de *L. albus* crecido en ese suelo. La excepción es el Cu, que siendo mayor en suelo Get-1 es mayor en las raíces del tratamiento Get-2. Estas diferencias, aunque existen, son menos evidentes en tallos, y vuelven a ser mayores en hojas. Los análisis indican que una cierta cantidad de metales se pueden transportar a las hojas, donde finalmente se acumulan (menor concentración en tallos que en hojas). La gran

**Tabla 14.** Contenido de nutrientes y metales (mg/kg) en frutos, hojas, tallos y raíces de *Lupinus albus* en los distintos tratamientos

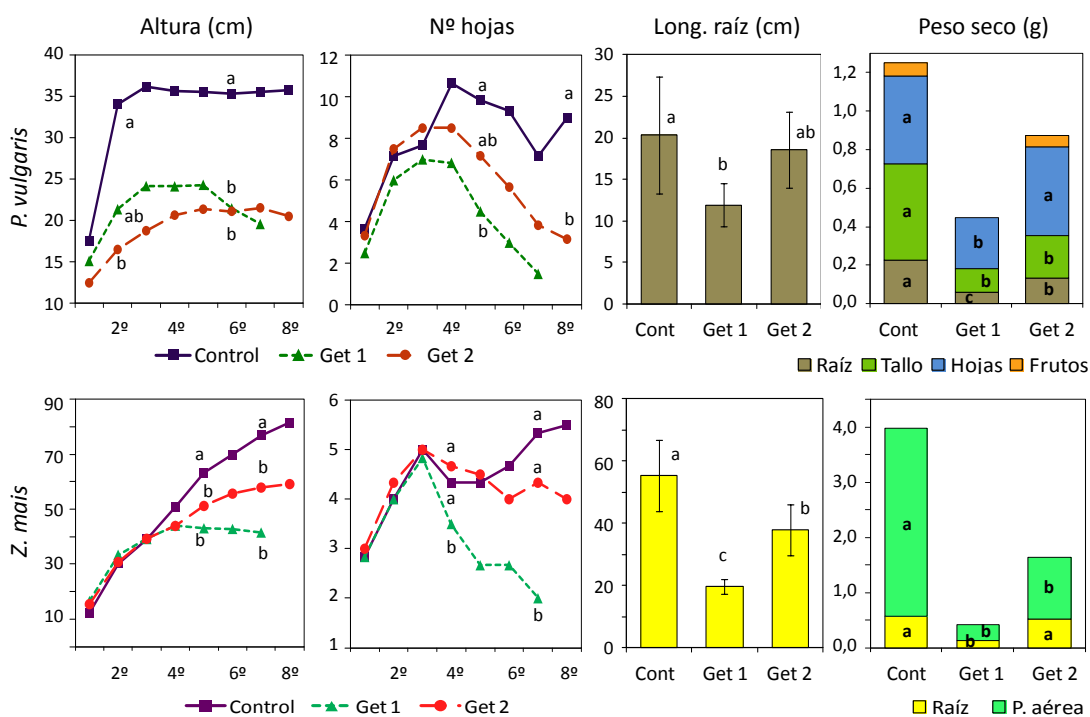
Tratamiento		Ca	K	Mg	Na	P	Al	Fe	Mn	Zn	Cu	Pb	Cd	Cr	Ni
<i>Hojas</i>															
Control	M	18951	33129	3910	481	1683	96	96	584	16	13	3,8	0,0	4,9	2,0
	dt	2259	6297	589	140	226	79	14	127	3,2	4,7	0,6	0,0	1,4	0,1
Get 1	M	10594	17843	15730	8087	2837	64	284	133	367	23	61	0,7	3,5	0,0
	dt	318	1323	453	99	194	23	363	77	375	7,6	101	1,2	1,6	0,0
Get 2	M	14832	17506	7581	602	2394	48	71	147	96	25	0,0	0,0	2,8	0,0
	dt	2523	2517	1339	178	179	15	2,0	34	26,3	1,1	0,0	0,0	0,1	0,0
<i>Tallos</i>															
Control	M	8519	38679	1854	939	2601	69	81	44	14	15	5,2	0,0	4,8	1,4
	dt	317	6654	180	56	355	22	16	32	3,3	6,3	1,2	0,0	1,6	0,1
Get 1	M	4041	44655	10717	10668	4266	37	63	39	94	12	0,0	0,0	1,1	0,0
	dt	371	964	797	515	389	8,9	16	49	16	2,5	0,0	0,0	0,4	0,0
Get 2	M	7200	24031	7563	1702	2361	42	91	12	51	13	0,0	0,0	4,3	0,0
	dt	494	7756	838	326	586	7,0	33	1,8	18	1,3	0,0	0,0	0,3	0,0
<i>Raíz</i>															
Control	M	8605	8970	3457	564	1519	4201	1827	72	32	44	7,3	0,0	11	5,3
	dt	1821	3514	737	96	317	777	155	20	7,0	14	1,0	0,0	1,1	0,6
Get 1	M	4861	29048	18231	23623	1985	754	2443	311	5016	102	806	38	23	3,3
	dt	113	861	193	1747	132	148	430	59	429	4,3	93	1,6	1,9	0,3
Get 2	M	37796	14386	24235	6431	1330	1338	6436	129	2128	201	320	16	27	15
	dt	904	433	910	243	95	281	3044	17	413	19	56	0,9	3,2	0,4

diferencia de salinidad entre los suelos del vertedero, también parece evidenciarse por la cantidad de Na absorbido por estas plantas, alcanzando valores extremos en todas las partes (tanto raíz como tallo y hojas) las plantas crecidas en el suelo Get-1.

De forma general *P. vulgaris* y *Z. mays* se comportaron igual que *L. albus*, de manera que presentaron peor crecimiento en los suelos de vertedero en relación al control, siendo más evidente esta disminución en suelo Get-1 (fig 13 y 14). En la altura, *P. vulgaris* presentó diferencias significativas desde la segunda semana de exposición, mientras que *Z. mays* no presentó diferencias hasta la semana 5<sup>a</sup>. En el número de hojas de *P. vulgaris*, se pueden ver diferencias, aunque no significativas, desde la 4<sup>o</sup> semana, cuando el número de hojas de los tratamientos de vertedero empiezan a disminuir. En el caso de *Z. mays* también es en la 4<sup>o</sup> semana cuando muestra diferencias significativas en el número de hojas. Las variables longitud de las raíces y peso seco, es en el caso de ambas especies, las que muestran mayores diferencias respecto al control y entre los dos suelos de vertedero. En el caso de *P. vulgaris*, es de especial importancia el hecho de que en la 7<sup>a</sup> semana se hubieran



**Fig 13.** Comparación del aspecto de individuos de *P. vulgaris* y *Z. mays* en los diferentes tratamientos en la 4ª y la 6ª semana.



muerto todos los individuos de esta especie en el suelo Get-1, mientras que todos los que crecieron en suelo Get-2 consiguieron fructificar. Esta es la diferencia más importante que ha caracterizado el comportamiento de esta especie en los dos suelos de vertedero.

El comportamiento de estas especies respecto a la acumulación de metales (tablas 15

**Tabla 15.** Contenido de nutrientes y metales (mg kg<sup>-1</sup>) en frutos, hojas, tallos y raíces de *Phaseolus vulgaris* en los distintos tratamientos

Tratamiento		Ca	K	Mg	Na	P	Al	Fe	Mn	Zn	Cu	Pb	Cd	Cr	Ni
<i>Frutos</i>															
Control		11200	24068	3636	36	3478	15	98	21	78	16	0,0	0,0	0,0	0,0
Get 2		10194	24431	3466	45	2576	48	85	16	126	15	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Hojas</i>															
Control	M	37329	8316	3531	45	1456	61	120	127	31	13	0,0	0,0	0,0	3,0
	dt	3114	1097	302	32	251	12	10	29	3,5	2,8	0,0	0,0	0,0	5,3
Get 1	M	11228	22354	6869	50	3238	59	168	56	254	20	0,0	0,0	0,0	0,0
	dt	295	5976	202	11	43	2,8	50	8,9	76	2,3	0,0	0,0	0,0	0,0
Get 2	M	28602	18041	4899	31	1187	70	168	92	474	16	0,0	1,9	0,0	0,0
	dt	869	1648	358	5,0	149	32	38	22	78	2,1	0,0	3,2	0,0	0,0
<i>Tallo</i>															
Control	M	15268	16591	2278	55	2127	39	52	8,0	18	9,5	0,0	0,0	0,0	0,0
	dt	2221	1086	446	32	75	19	22	6,1	1,8	1,9	0,0	0,0	0,0	0,0
Get 1	M	5743	64905	4281	1382	914	84	137	40	404	19	5,5	0,0	0,0	0,0
	dt	1057	1188	1374	1332	428	30	42	5,7	21	1,7	9,5	0,0	0,0	0,0
Get 2	M	14552	38087	3808	134	766	44	66	17	558	13	37	5,9	0,0	0,0
	dt	2878	7717	719	76	112	13	14	8,6	147	1,2	35	0,9	0,0	0,0
<i>Raíz</i>															
Control	M	16440	11323	4204	137	1326	2418	1435	44	101	16	0,0	0,0	3,2	0,0
	dt	2359	1934	79	31	172	895	515	16	43	2,8	0,0	0,0	5,5	0,0
Get 1		6653	23624	4901	8158	115	891	2615	416	4135	214	1034	34	36	0,0
Get 2	M	13742	11285	4513	485	454	1759	3421	283	3656	202	1588	30	53	5,7
	dt	493	5934	724	170	75	644	1208	81	939	53	45,6	4,2	5,4	9,8

**Tabla 16.** Contenido de nutrientes y metales (mg/kg) en partes aéreas y raíces de *Zea mays* en los distintos tratamientos

Tratamiento		Ca	K	Mg	Na	P	Al	Fe	Mn	Zn	Cu	Pb	Cd	Cr	Ni
<i>Parte aérea</i>															
Control	M	5054	38851	1490	24	2501	21	81	51	31	7,6	0,0	0,0	4,9	0,0
	dt	1173	4000	300	7,2	834	7,6	9,3	12	5,9	0,8	0,0	0,0	2,6	0,0
Get 1	M	8989	47075	11404	257	502	96	193	92	2363	34	60,3	3,8	9,1	2,1
	dt	1188	8199	772	115	207	41	52	27	468	8,1	26,3	4,3	7,3	5,1
Get 2	M	8745	35108	3632	28	357	18	77	83	1117	15	73,2	1,2	4,6	0,0
	dt	971	5443	321	12	167	3,4	12	25	209	2,5	37,9	2,9	1,0	0,0
<i>Raíz</i>															
Control	M	5258	21477	1651	149	1574	2522	1862	86	124	14	0,0	0,0	7,2	0,8
	dt	1269	3375	197	33	261	462	620	33	42	2,3	0,0	0,0	2,3	2,2
Get 1	M	4643	11316	4779	8315	165	1015	2782	485	6034	257	995	27	37	8,1
	dt	637	3967	1434	2971	126	342	515	145	492	5,2	311	2,0	16	7,3
Get 2	M	4961	18681	3162	966	235	1315	4776	271	4095	179	772	29	44	8,7
	dt	1421	2341	440	201	115	335	3785	62	777	33	119	5,0	8,5	7,6

y 16) es en general diferente al mostrado por *L. albus*. En este caso, sobre todo en el caso de *P. vulgaris*, la concentración de todos los metales es mayor en raíces, pero al contrario de lo que ocurría con *L. albus*, la concentración es mayor en tallos que en hojas, lo que indica que esta especie tiene más dificultades para translocar los metales. Como consecuencia, la marcada diferencia de concentración de metales en

---

las raíces entre los tratamientos Get-1 y Get-2, va desapareciendo en tallos, y apenas existe en hojas. En el caso de *Z. mays*, esta diferencia en partes aéreas es más marcada. El caso del Na, que tan evidente era en *L. albus*, en *P. vulgaris* también desaparece la diferencia de este elemento en las hojas, aunque es muy evidente en las raíces. *Z. mays* sí que muestra mayor concentración de este elemento en partes aéreas cuando crece en Get-1 respecto a Get-2.

Resulta sorprendente que las respuestas de las tres especies sean tan distintas entre los suelos Get-1 y Get-2 (sobre todo el ya comentado caso de *P. vulgaris*), ya que la concentración de metales no es excesivamente diferente entre los dos suelos, y la contaminación por orgánicos es mayor en Get-2. Sólo Cd y As presentan mayor concentración en Get-1 que en Get-2. La fracción biodisponible sí es mayor en todos los metales en Get-1 que en Get-2. A pesar de esta mayor concentración de metales biodisponibles, creemos que la gran diferencia de respuestas de las especies entre los dos suelos se debe fundamentalmente a la enorme diferencia de salinidad que existe entre los dos suelos. Como ya se ha comentado anteriormente, la conductividad eléctrica del suelo Get-1 es 6 veces mayor que en Get-2, causada principalmente por el extremado aumento en Get-1 de cloruros (36 veces mayor), nitratos (10 veces mayor) y sulfatos (9 veces mayor), pero también contribuyen sodio (2 veces mayor), magnesio (1,5 veces mayor) y fluoruros (2 veces mayor). Aunque no se han analizado estos aniones en las plantas, la diferencia de la concentración de Na tanto en raíces como en partes aéreas de las tres especies entre los dos tratamientos es evidente.

De las dos leguminosas, parece que el *L. albus* es más sensible a este tipo de contaminación. *P. vulgaris* presenta evidentemente menor crecimiento en el suelo Get-2, pero la diferencia respecto al control no es tan marcada como en el caso de *L. albus*. De hecho, el peso seco de las hojas de *P. vulgaris* es menor en Get-2 que en control, pero no de forma significativa. Además, *L. albus* empieza a mostrar efectos significativos en cuanto a la toxicidad manifestados en la altura de las plantas desde la primera semana, y *P. vulgaris* a partir de la segunda. Sin embargo, aunque la altura y el peso seco parezcan indicar mejor comportamiento de *P. vulgaris*, los síntomas en las hojas de esta especie fueron mayores y anteriores que en el caso de *L. albus*. De este modo, *P. vulgaris* en la 4ª semana presentaba clorosis generalizada

en todas las hojas de plantas en Get-2, y necrosis en varias hojas, mientras que las hojas de *L. albus*, al finalizar el experimento mostraban clorosis, pero no necrosis. *Z. mays* presenta una disminución importante del peso seco de la parte aérea en los suelos de vertedero respecto al control, pero en peso seco en las raíces no es significativamente diferente en Get-2 respecto a Get-1. Las diferencias en la altura de las plantas de esta especie no se empiezan a notar hasta la 5ª semana de exposición.

### **3.2. Ejes de integración para el estudio de la revegetación de VRSU**

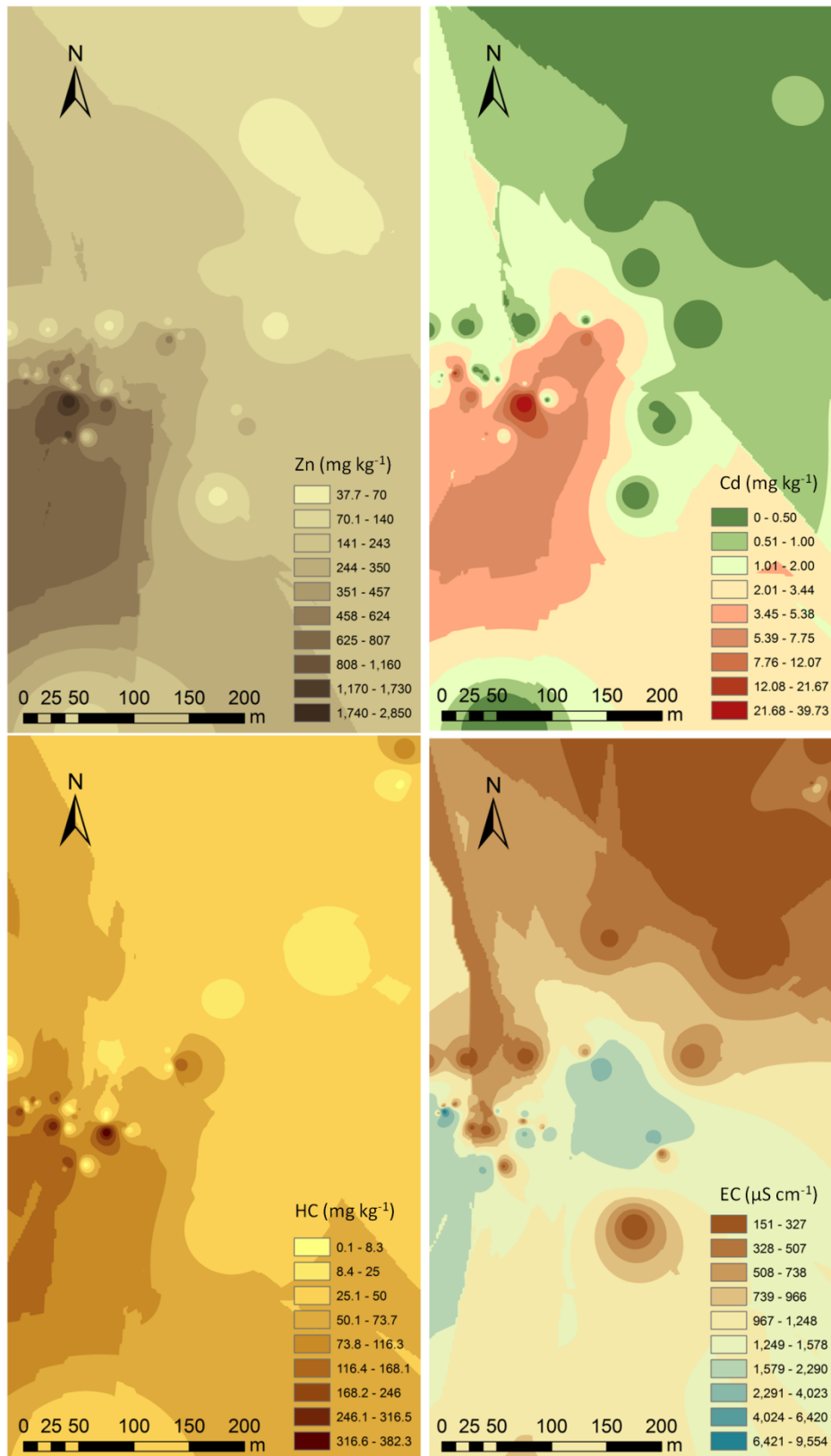
Como se indicaba en el apartado de la metodología empleada para este trabajo, hemos integrado la información en tres ejes alrededor de los cuales consideramos que giran lo que podemos denominar el protocolo necesario en orden a una planificación realista de la revegetación de VRSU. Como se podrá observar en los siguientes apartados, dicho protocolo está basado en el análisis de la vegetación que ha surgido del banco de semillas de los suelos con que fueron sellados los VRSU en la zona centro de la Península Ibérica.

#### *3.2.1. Relaciones entre factores geo-edáficos y cubiertas de sellado-vegetación espontánea*

Sin lugar a dudas, los factores más limitantes para lograr una cobertura vegetal estable han sido los continuos cambios de uso del vertedero después de su primer sellado, así como la escasez de material edáfico del sellado y las fuertes pendientes de sus taludes provocando erosión de elementos finos y dejando en superficie muchos residuos sin ningún tipo de transformación.

Además, los parámetros físicos, especialmente la baja permeabilidad y la elevada inestabilidad estructural de los suelos de cubrición, contribuyen de forma importante a las desfavorables condiciones físicas para el crecimiento vegetal en la cubierta del vertedero. La salinidad y un contenido local elevado de algún metal y compuesto orgánico, indican problemas puntuales de toxicidad que dificultan igualmente los procesos de recuperación de la vegetación aunque ya estuviese implantada.

Las figura 15 ilustra la distribución de metales frecuentes, conductividad y compuestos orgánicos en un vertedero. Esta situación de heterogeneidad en la superficie edáfica de un VRSU condiciona las técnicas de revegetación si se quiere poner solamente una especie, así como las labores de hacer una siembra por igual en todo él.



**Fig 15.** Mapas de distribución de contaminantes del vertedero de Torrejón. Realizados mediante la herramienta de interpolación IDW del programa ArcMap™ (v. 9.3.1., ESRI)



Sin duda, los resultados expuestos son indicativos de las dificultades que entraña la revegetación de vertederos, independientemente que haya sido cubierto con unos u otros tipos de suelo.

### 3.2.2. Métodos para el estudio de la cubierta vegetal colonizadora

#### a) Inventarios

Las diferencias morfológicas de los vertederos no permiten aplicar un único método de muestreo de las comunidades vegetales asentadas en los VRSU sellados. No obstante, los inventarios florísticos en 20 vertederos de la zona centro peninsular ubicados en diferentes tipos de sustratos (granitos y gneis, arcosas, yesos, calizas y margas), así como los muestreos fitoecológicos realizados mediante la disposición al azar de cuadrículas de 1 m<sup>2</sup> en las diferentes áreas percibidas (plataformas, taludes y principales áreas de descarga de lixiviados de escorrentía superficial), proporcionan datos importantes acerca de las especies que son capaces de geminar a partir del banco de semillas de los suelos de cubrición. La tabla 17 muestra un ejemplo del procedimiento realizado. Recubrimiento de cada especie y abundancia han sido los parámetros más frecuentemente utilizados.

**Tabla 17.** Ejemplo de inventario de especies herbáceas en cuatro cuadrículas de 1 m<sup>2</sup> del vertedero de Torrejón (dos en taludes y dos en la plataforma). La abundancia se muestra mediante cruces.

	Talud		Plataforma	
	Sitio 1	Sitio 3	Sitio 2	Sitio 4
Recubrimiento (%)	87	82	94	58
Especies				
<i>Bromus hordeaceus</i> L.	+	+	+++	
<i>Hordeum murinum</i> L.	++	++	+	+
<i>Poa bulbosa</i> L.			+	++
<i>Bromus rubens</i> L.	+		+	+
<i>Bromus diandrus</i> ROTH.		+		
<i>Sylibum marianum</i> (L.) GAERTN.	++	++		
<i>Cardaria draba</i> (L.) DESV.	++	++		
<i>Plantago lagopus</i> L.			+	++
<i>Plantago coronopus</i> L.			+	+
<i>Medicago polymorpha</i> L.	++			
<i>Galium tricorutum</i> DANDY	+	+		
<i>Phoeniculum vulgare</i> MILL.	+			
<i>Malva sylvestris</i> L.		+		
<i>Cerastium glomeratum</i> THUILL.		+		
<i>Senecio vulgaris</i> L.				+
<i>Sanguisorba minor</i> SCOP.				+
<i>Erodium cicutarium</i> (L.) L'HÉR. EX AITON			+	
<i>Carthamus lanatus</i> L.			+	
Musgo	-	-	-	++

---

En el trabajo de Pastor y Hernández (2002), se dice que en vertederos de la Comunidad de Madrid, ubicados sobre arcillas fueron inventariadas cerca de 300 especies, y unas 170 en los vertederos sobre granitos. En aquellos sobre substratos calizo-margosos aparecen cerca de 230 especies y en el ubicado sobre yesos unas 100. Las gramíneas son las especies más representadas, en cuanto a diversidad en los vertederos sobre granitos y yesos, y las compuestas en los vertederos arcillosos y "calizo-margosos". La tercera familia en importancia son las leguminosas y a continuación cariofiláceas y crucíferas.

Puede resultar también de utilidad recurrir a la información fitosociológica de los inventarios. Como ejemplo, puede observarse en la tabla 18 los tipos de comunidades vegetales de los vertederos estudiados en la Comunidad de Madrid; quedarían clasificadas como comunidades ruderales y nitrófilas.

Del mismo modo, resulta muy importante el conocimiento de comunidades vegetales de referencia para interpretar la vegetación de los vertederos clausurados, que para el caso del ejemplo aludido pueden consultarse en Pastor y Hernández (2010-b).

La cubierta vegetal que ha colonizado los VRSU estudiados no llega a presentar estrato arbustivo, aunque pasen 20 años como en el caso de un vertedero que no ha sido reutilizado nuevamente para deposición de vertidos (fig 16).

#### b) Estudio autoecológico de las especies colonizadoras

Otro método de estudio debe estar vinculado al conocimiento de la autoecología de especies herbáceas que crecen en taludes de carretera de los mismos entornos donde se presentan los vertederos, al ser considerados sistemas análogos especialmente en orden a los mecanismos de la sucesión ecológica implícita en el proceso de la revegetación. Pero también para poder conocer aquellas especies que pueden ser más afines en relación a detener la erosión o pérdida de elementos finos del suelo (Hernández y Pastor, 2008-b). Después, hay que pasar a estudiar el comportamiento de muchas de estas especies frente a la contaminación por la salinidad y los metales pesados que presentan los vertederos.

**Tabla 18** . Clases fitosociológicas y características de las especies que las componen en VRSU de la zona centro de la Península ibérica

Phytosociological class	Main characteristics
9. ISOETO-NANOJUNCETEA Br.-Bl. & Tüxen ex Westhoff, Dijk & Passchier 1946	- Pioneer annual and dwarf perennial ephemeral isoetid communities on periodically flooded bare soils
12. PHRAGMITO-MAGNOCARICETAE Klika in Klika & V. Novák 1941	- Swampy, fenny, lacustrine and riverine helophyte communities dominated by perennial graminoids, sedges, forbs and herbs of fresh and brackish waters
20. JUNCETEA MARITIMI Br.-Bl. in Br.-Bl. Roussine & Nègre 1952	- Perennial grasslands growing on coastal and inland temporary wet or inundated salt marshes
34. ARTEMISIETEA VULGARIS Lohmeyer, Preising & Tuxen ex von Rochow 1951	- Perennial and tall biennial forbs, grasses and thistle pioneer ruderal and nitrophilous sunny communities growing on rich soils.
37. PEGANO-SALSOLETEA Br.-Bl. & O. Bolós 1958	- Nitrophilous or halo-nitrophilous dwarf scrub communities, including anthropogenic alloctonous shrubby vegetation
38. POLYGONO-POETEA ANNUAE Rivas Martinez 1975	- Annual pioneer ephemeral and exceptionally small creeping perennial nitrophilous anthropozoogenic heavy trodden communities of urban and rural paths
39. STELLARIETEA MEDIAE Tüxen, Lohmeyer & Preising ex von Rochow 1951.	-Annual ephemeral weeds, ruderal, nitrophilous and semi-nitrophilous communities
39A. Stellarienea mediae	-Cultivated field weed communities
39B. Chenopodio-Stellarienea Rivas Goday 1956	-Ruderal, nitrophilous and seminitrophilous communities.
39e. Thero-Brometalia (Rivas Goday&Rivas Martinez ex Esteve 1973) O. Bolós 1975	-Subnitrophilous Mediterranean annual ephemeral grassland-like spring blooming communities.
39f. Sisymbrietalia officinalis J. Tüxen in Lohmeyer & al. 1962 em. Rivas-Martinez, Fernández-González & Loidi 1991	- Nitrophilous and temperate annual ephemeral grassland-like. Path, roadside and rural often trampled communities
40. GALIO-URTICETEA Passarge ex Kopecký	- Perennial hemycryptophyte and climbing tall herbs of nitrified wood fringes and other semi-shaded anthropogenic biotope communities.
41. CARDAMINO HIRSUTAE-GERANIETEA PURPUREI (Rivas-Martínez, Fernández-González & Loidi 1999) Rivas-Martínez, Fernández-González & Loidi classis nova, stat. Nov.	- Annual spring and summer ephemeral internal and external shrub fringes slightly nitrified semi-shaded communities, growing on rich organic nutrient soils.
43. TRIFOLIO-GERANIETEA Müller 1962	- Semi-shaded perennial herb communities of scarce moisture external fringe woodlands. Calcareous or mesoeutrophic rich soils in temperate submediterranean central Iberian territories.
50. TUBERARIETEA GUTTATAE (Br.-Bl. in Br.-Bl., Roussine & Nègre 1952) Rivas Goday & Rivas Martínez 1963 nom. mut. Propos.	- Therophytic grasslands. Pioneer spring and early summer ephemeral plant acidophilous or calcifugous communities, dominated by non nitrophilous annual short herbs and grasses, but localized only in dry or initial soils, mostly in submediterranean or step territories.
51. FESTUCO-BROMETEA Br.-Bl. & Tüxen ex Br.-Bl. 1949	- Perennial xerophytic and mesophytic grasslands. Anthropogenic grazed baso-neutrophilous or slightly acidophilous mesophytic or slightly xerophytic nutrient rich-pastures largely covered by perennial grasses.
54. POETEA BULBOSAE Rivas Goday & Rivas Martínez in Rivas-Martinez 1978	- Western Mediterranean oceanic thermo- to supramediterranean upper semiarid to humid pastures, grazed and manured, dominated by dwarf perennial grasses and other nutritious prostrate chamaephytes.....
56. LYGEO-STIPETEA Rivas-Martinez 1978 nom. Conserv. Propos.	- Mediterranean perennial basophilous xerophytic tall bunchy dense or short open grasslands.
57. STIPO GIGANTAE-AGROSTIETEA CASTELLANAE Rivas-Martínez, Fernández-González & Loidi 1999	- Silicicolous perennial grasslands rich in endemics, serial of <i>Quercus rotundifolia</i> and other <i>Quercus</i> natural potential forest communities.
59. MOLINIO-ARRHENATHERETEA Tüxen 1937	- Mesophile to wet often manured meadows and pasture communities on deep and moist soils, widely spread by grazed and anthropic activities

c) Atributos biológicos de las especies

Otro método empleado con fines de revegetación de los vertederos es el estudio las características relacionadas con las fases vegetativas y regenerativas de las especies que colonizan espontáneamente las cubiertas edáficas. Así, se han estudiado tanto la *duración del ciclo vital* (atributo de la fase vegetativa) que hace referencia a la longevidad de las especies y al período más extenso de crecimiento vegetativo, así como también los parámetros *inicio de la floración* y la duración de la misma, atributos relacionados con la fase regenerativa, ya que la mayor plasticidad en los momentos de la floración y la fructificación es una característica que confiere a las especies una mayor capacidad de respuesta en medios con perturbaciones impredecibles, como es el caso de los VRSU . En el trabajo de Hernández et al. (2002), se muestra muy detalladamente este estudio para aquellos vertederos situados en la *facies* Madrid, si bien hacemos extensivas aquellas características que son comunes a otros ubicados en otros sustratos de ambiente mediterráneo.

Las características alusivas a la fase vegetativa están muy relacionadas con la perturbación del hábitat. Puede decirse que, en general, las plantas de “ciclo corto” dependen para su supervivencia de la posibilidad de encontrar áreas desnudas. A este grupo pertenece el 48,1 % de las especies inventariadas (la mayoría Poáceas). Siguiendo en porcentajes de abundancia se encontrarían las perennes policárpicas, con un 18,14 % de las especies inventariadas, tales como *Ononis spinosa* o *Sanguisorba*



**Fig 16.** Aspecto de la vegetación de la parte baja del talud del vertedero de Móstoles (Madrid) en junio, y de la única retama presente en el talud después de 20 años de su clausura a finales de marzo.

*minor*, más vinculadas a las áreas bajas de los taludes del vertedero. En general, nos encontramos con un mayor nº de especies que han formado un banco de semillas permanente o con capacidad de dispersión por el viento, propias de los lugares sometidos a perturbaciones impredecibles, así como una buena proporción de especies con capacidad de florecer en cualquiera de los meses de primavera-verano, con períodos de floración prolongados. Ello explica el que contribuyan a ese potencial de respuesta frente a la perturbación. Todas estas características son propias de las denominadas “malas hierbas” de los cultivos, que están muy adaptadas a una alta frecuencia de perturbación mecánica.

Por otro lado, los procesos relacionados con la *fase regenerativa* tienen especial importancia en los medios sometidos a continuas perturbaciones, en los que la mortandad de las plantas es muy elevada y la supervivencia de los propágulos es por lo tanto esencial. Las especies anuales constituyen la forma biológica más adaptada y frecuente en estos medios, siendo la semilla la casi única conexión entre generaciones.

Generalizando estas cuestiones, podemos decir que los parámetros vegetales considerados como muy importantes en relación a poder mantener una cobertura vegetal en el vertedero sellado con suelo son: éxito en la germinación, tolerancia a heladas tempranas, producción de semilla, hábito de crecimiento que favorezca la protección horizontal del suelo y facilidad para la dispersión de semillas.

### *3.2.3. Relaciones eco-químicas de especies vegetales que crecen en emplazamientos de vertederos clausurados de ambiente mediterráneo*

Teniendo en cuenta muchos de los trabajos que figuran en la bibliografía, así como los resultados expuestos en el estudio de caso anteriormente, podemos centrar las relaciones eco-químicas de las poblaciones vegetales que colonizan un VRSU, así como de aquellas que son afectadas por las escorrentías superficiales de sus taludes en dos grandes grupos: las relaciones de la nutrición mineral ligadas a la toxicidad y las del estrés provocado por la salinidad.

La nutrición mineral de especies prioritarias en vertederos pastados por ovinos es importante para aquellos vertederos sellados con suelos ácidos por lo general. En el trabajo de Pastor et al. (2012), se muestra el estudio realizado al respecto con especies pascícolas de VRSU de la provincia de Madrid. El análisis se ha realizado

---

para un total de 8 especies de gramíneas correspondientes a 6 géneros distintos y 16 especies de leguminosas de un total de 5 géneros de las especies más abundantes y más consumidas por el ganado ovino: *Aegylops geniculata*, *A. triuncialis*, *Bromus rubens* y *B. hordaceus*, *Cynodon dactylon*, *Dactylis glomerata*, *Holcus lanatus* (en partes bajas de taludes) y *Lolium rigidum*; las especies de *Trifolium* son las leguminosas mejor representadas en estos vertederos, especialmente en los ubicados en territorio arcósico, aunque en estos últimos también crecen especies de *Medicago* (*M. minima*, *M. sativa*, *M. rigidula*, *M. polymorpha*) junto a *Ononis spinosa* y *Coronilla scorpiodes*. Los resultados se compararon con los obtenidos en las mismas especies de los pastos considerados como referentes.

Existen muy pocas diferencias en las concentraciones de nutrientes en las partes áreas de las especies estudiadas en uno y otro escenario. No obstante, destacan los mayores contenidos de Zn en las gramíneas de vertederos y los niveles de N y Ca son más elevados en esas especies cuando crecen en pastos no perturbados considerados de referencia. No ocurre lo mismo con las leguminosas, algo más abundantes en pastos que en vertederos, donde existen pocas diferencias, aunque se observa que los niveles de Zn y el Mn son mayores cuando crecen en estos últimos.

La nutrición mineral de las especies puede estar por tanto afectada por los **metales** presentes en el suelo. Tanto la deficiencia en aquellos que son oligoelementos, como el exceso de los mismos, ocasionan problemas para el ganado que pasta, especialmente la toxicidad debido a la bioacumulación de los metales. Ya hemos aludido a la distribución heterogénea de ellos en el suelo de cobertura de un vertedero, siendo muy dependiente a escalas locales de la naturaleza del residuo enterrado en cada punto del mismo. A su vez, las zonas de descarga de aguas que discurren por el interior del vertedero actúan como canalizadores de la contaminación, constituyéndose con frecuencia en intensos focos de contaminación por la gran cantidad de componentes tóxicos que llegan a arrastrar y contribuyendo a la dispersión de contaminantes, potencialmente a todas aquellas zonas donde el agua freática sea capaz de llegar.

La delgadez del sustrato de sellado, especialmente cuando éste se ha realizado de manera deficiente, es otra característica que puede facilitar el acceso de las raíces de las plantas a las capas más tóxicas del suelo, además de ser por sí mismo un factor

que dificulta la colonización espontánea, especialmente cuando se emplean sustratos minerales con escasez o ausencia de materia orgánica y nutrientes.

Sin duda, una de las características importantes con respecto a las relaciones ecoquímicas de la vegetación en un vertedero clausurado, es la relacionada con la **salinidad** de los suelos de los vertederos. Especialmente cloruros, que presentan los suelos desnudos de vegetación, así como las diferencias de salinidad que mostraban diferentes zonas de los mismos a lo largo de los primeros años de la colonización, condujo al estudio de las relaciones entre la salinidad y las especies con el fin de poder comprender el comportamiento ecológico de las mismas y poder aplicar dicho conocimiento a la restauración de los vertederos. El método empleado para este estudio ha sido la aplicación de la técnica conocida como “perfiles ecológicos”. La descripción de la misma puede encontrarse en el trabajo de Estalrich (1994).

Con relación a los **cloruros solubles**, las especies de Gramíneas (*B. rubens*, *B. hordaceus*, *B. tectorum*, *Gaudinia fragilis*, *Hiordeum murinum*), y Leguminosas (*T. tomentosum*, *Lathyrus angulatus*) crecen en los suelos de vertederos que presentan un contenido elevado de los mismos; mientras que otras especies de estas familias crecen preferentemente en suelos con contenidos bajos, y lo hacen peor, o no crecen, en los suelos con contenidos más elevados en cloruros (*Vulpia ciliata*, *Avena barbata* y *Desmazeria rigida*, y los tréboles *T. campestre*, *T. glomeratum* y *T. striatum*).

*Hirschfeldia incana*, *Polygonum aviculare*, *Reseda lutea*, *Juncus bufonius*, *Spergularia rubra* y en menor grado *Plantago coronopus*, prefieren los suelos con contenidos elevados de **sulfatos**, mientras que *Silene gallica*, *Silene colorata*, *Erodium cicutarium*, *Sanguisorba minor* y *Rumex acetosella* prefieren los suelos con valores medio-bajos, pero especialmente destacan por su rechazo a los suelos con contenidos más elevados de estas sales. Solamente *Crepis capillaris* prefiere suelos con sulfatos elevados y es bastante indiferente a los suelos con valores medios y bajos de este anión. Realmente son *Hordeum murinum* y *Bromus rubens* las especies que más destacan en vertederos con suelos que presentan los contenidos elevados de sulfatos, seguidos por *Vulpia ciliata* y *Bromus tectorum*. Hacia los valores medios y medio-bajos se inclinan *Cynosurus echinatus*, *Cynodon dactylon* y *Vulpia myuros*. De las Leguminosas prefiere los valores elevados de sulfatos *Medicago polymorfa*, seguida de *Trifolium cernuum*. Entre las Compuestas destaca por su preferencia por los

contenidos elevados y por los contenidos medio-bajos *Centaurea melitensis*, y por los contenidos medio-bajos, *Hypochoeris glabra*, *Spergularia rubra*, *Juncus bufonius*, y *Diploaxis virgata* prefieren también contenidos elevados de sulfatos.

Respecto a los contenidos de **sodio cambiabile** de los suelos, en el rango que presentan los suelos de los vertederos y los suelos de referencia de su entorno, los perfiles ecológicos ponen de manifiesto la clara preferencia de *Hordeum murinum*, *Vulpia myuros* y *Bromus tectorum* por los suelos con contenidos elevados de sodio. *Desmazeria rigida* y *Cynosurus echinatus* prefieren suelos con contenidos medios y rechazan los suelos de contenidos más elevados; *Crepis capillaris*, *Carduus tenuiflorus* y *Anacyclus clavatus* muestran una discreta preferencia por los suelos con contenidos de sodio elevados. Sin embargo, *Hirschfeldia incana* y *Polygonum aviculare*, seguidas de *Spergularia rubra*, *Diploaxis virgata* y *Plantago coronopus*, soportan bien contenidos elevados de Na en los suelos, mientras que *Silene colorata* se decanta claramente por los suelos con contenidos bajos y rechaza los de contenidos elevados de sodio.

Así, podemos resumir que las especies *Hordeum murinum*, *Bromus rubens*, *Bromus tectorum*, *Desmazeria rigida*, *Medicago polymorpha*, *Carduus tenuiflorus*, *Chondrilla juncea*, *Hirschfeldia incana*, *Polygonum aviculare*, *Juncus bufonius* y *Reseda lutea*, son capaces de crecer en suelos de vertederos con valores elevados de conductividad eléctrica. Por ello estas especies pueden intervenir en la revegetación de estos suelos en los taludes, generalmente de fuertes pendientes, “salinizados” y en las “zonas de descarga” de muchos de los vertederos, y así contribuir a reducir la generación de lixiviados contaminantes, evitando que puedan llegar a los cursos de agua y a los cultivos y pastos frescos, situados en el entorno.

## 4. Aspectos recapitulativos

### 4.1. Los vertederos como sistemas emergentes en el paisaje

La terminología utilizada para este epígrafe la hemos tomado de Hernández y Pastor (2008), y es que las montañas que hemos levantado de basuras y residuos industriales se pueden considerar como nuevos sistemas emergentes en el paisaje. Y este tipo de paisaje es el más frecuentemente encontrado en las zonas periféricas de los núcleos urbanos. No obstante, los autores citados han considerado que estos



escenarios brindan una oportunidad a la investigación con miras a la restauración ecológica del impacto ambiental que producen los VRSU.

Nos planteamos poder restaurar el impacto generado por el propio vertedero en los ecosistemas del entorno donde se ubica; pero también proveerlo de una cubierta vegetal que ayude a estabilizar el sellado de residuos, y poder conseguir que dicho sistema no se desmorone diseminando dichos residuos. Por esta razón resulta procedente estudiar la colonización natural de vertederos sellados con suelos de sus respectivos entornos, aunque contengan residuos de origen mixto (urbanos, industriales e inertes) y que por ello implique muchas dificultades a la cubierta vegetal.

Aún teniendo en cuenta que la restauración de ecosistemas degradados es un tema de realidad sistémica, la operatividad de dicho enfoque epistemológico estriba en que los ecosistemas son sistemas dinámicos, que evolucionan y co-evolucionan con la actividad humana, si bien aludiendo siempre a su estabilidad, término utilizado frecuentemente con relación a la respuesta de un ecosistema a la perturbación. Nos enfrentamos así a la complejidad que resulta de la implicación de las cuestiones propias de la sucesión ecológica secundaria (debida al banco de semillas que tiene el suelo del sellado), interactuando con la sucesión primaria del “ecosistema vertedero”. No solo hay que restaurar el impacto de un vertedero como hemos dicho, sino que hay que recuperar el propio sistema vertedero en sí.

Por todo lo cual, los VRSU pueden ser considerados un nuevo tipo de ecosistemas en donde coinciden la sucesión primaria con la secundaria, presentando por tanto un gran interés para la aplicación de la ciencia ecológica, ya que proporcionan un escenario real adecuado para la investigación acerca de las pautas que podemos seguir tanto para la restauración de los ecosistemas degradados y contaminados, como son los escenarios aludidos. Pero también, pueden aportarnos conocimiento de especies vegetales indicadoras de los variados tipos de contaminación que existen en ellos, así como de especies que pueden ser idóneas para la revegetación mediante cubiertas vegetales adecuadas y no simplemente de incorporación de una “pantalla verde” al finalizar el sellado de un vertedero.

La teoría ecológica más aplicable para la restauración del impacto ambiental de vertederos sellados se enmarca en el estrés y estrategias ecológicas de especies

herbáceas. Resulta eficaz en este caso tener en cuenta la clasificación de las estrategias de la historia de la vida de las plantas según Grime, ya que combina la intensidad de la perturbación con la intensidad del estrés (Ursic et al., 1997; Hernández y Pastor, 2008). Así, las “especies competidoras” responden mejor para aquellos sistemas en las que las intensidades de las perturbación y el estrés son bajas; cuando el estrés es débil, pero la perturbación es fuerte, pueden ser las especies “ruderales”; y las “estrés-tolerantes”, cuando hay mucho estrés y poca perturbación; la estrategia para cuando ambas características son muy altas, no es viable.

No obstante, no podemos olvidar que diferentes tipos de ecosistemas responden a una misma perturbación de distinta forma y/o, que un determinado ecosistema puede responder de varias maneras a distintos tipos de perturbaciones, así como la enorme variabilidad y aleatoriedad ambiental y otras formas irreductibles de incertidumbre asociadas (Urcelai, 1997). Tampoco podemos obviar que en todo tema concerniente a la adaptación ecológica, se parte del hecho de una investigación basada en comparaciones “entre hábitats” y “entre poblaciones”, sobre sujetos seleccionados con lazos muy parecidos. Esta cuestión es necesaria a la hora de elegir especies idóneas para la revegetación y la fitorremediación de suelos degradados, como sería el caso de “ecotipos adaptados”.

#### **4.2. Cubiertas vegetales que puedan restaurar la acción conjunta erosión-contaminación**

Desde el punto de vista científico, este tipo de escenario que son los vertederos clausurados, no solo ha permitido poder ahondar lo que se ha denominado el binomio erosión-contaminación, que es el caso más frecuente de los mismos en relación al impacto ambiental y no contemplado prácticamente nada en la bibliografía internacional, sino en que las especies que se utilicen en la revegetación deberán poder presentar una respuesta adecuada a este binomio. Es por ello que encontramos imprescindible disponer de estudios autoecológicos, así como de especies autóctonas y comerciales que puedan adaptarse a estas circunstancias concretas.

Una investigación contextualizada al respecto es necesaria para la revegetación de VRSU en los determinados entornos donde se ubican. Y, en cualquier caso

deberíamos inclinarnos por utilizar más de una especie, con el fin de proporcionar una cubierta pluriespecífica, más afín al comportamiento de una comunidad natural y sujeta a los principios sucesionales. Es decir, cubiertas herbáceas y no arbóreas si se quiere respetar ese principio ecológico.

Por último, en la figura 17 se presenta una visión global del protocolo metodológico considerado importante para la revegetación de VRSU.

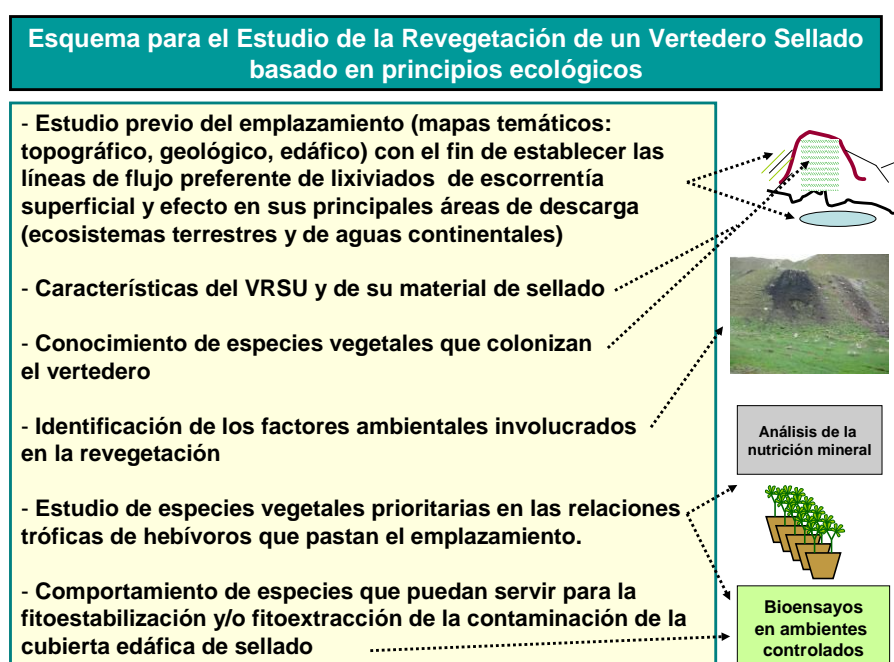


Fig 17

### Agradecimientos

Al Programa EIADES de la Comunidad de Madrid (P2009/AMB-1478) MJGG fue financiada por la beca FPI del la Universidad de Alcalá. Agradecemos especialmente a la Dra. Carmen Bartolomé su apoyo constante en la determinación de especies vegetales y revisión de los inventarios.

### Bibliografía consultada y referencias

Adarve MJ. 1993. Análisis de la incidencia ambiental de vertederos de residuos sólidos urbanos en aguas, suelos y especies vegetales de zonas de descarga. Tesis Doctoral, Universidad de Alcalá.

Adarve MJ, Rebollo LF. 1993-a. Análisis preliminar de la contaminación de las aguas subterráneas en el entorno de un vertedero sellado de residuos sólidos urbanos en Alcalá de

- Henares (Madrid). En: Problemática Geoambiental y Desarrollo. Ed. Sociedad Española de Geología Ambiental y Ordenación del Territorio. pp. 205-214.
- Adarve MJ, Rebollo LF. 1993-b. Incidencia ambiental de un vertedero sellado de residuos localizado en Móstoles (Madrid) sobre la composición natural de las aguas subterráneas. *Geogaceta*, 13: 3-6.
- Adarve MJ, Hernández AJ, Pastor J, Urcelay A, Oliver S. 1993. Ecotoxicological effect of landfill leachates on mediterranean plants. In: *Environmental toxicology: Hazards to the environment and man in the Mediterranean region*. SECOTOX-ENEA-Instituto Superiori di Sanita. ISTISAN, 30: pp. 81-85.
- Adarve MJ, Hernández AJ, Sánchez AJ, Rebollo LF. 1994-a. La contaminación de las aguas subterráneas por lixiviados de un vertedero sellado de residuos sólidos urbanos localizado en Torrejón de Ardoz (Madrid). En: *Agua y Medioambiente* Ed. TIASA, Madrid. pp. 162-170.
- Adarve MJ, Pastor J, Rebollo LF, Hernández AJ. 1994-b. Incidencia de un vertedero con residuos industriales sobre las aguas subterráneas y el suelo de su entorno. *Comunicaciones Técnicas IIº Congreso Nacional del Medio Ambiente*, 4. Madrid. pp. 115-130.
- Adarve MJ, Hernández AJ, Pastor J, Oliver S. 1994-c. Contribución de los vertederos de residuos sólidos urbanos a la salinización y nitrificación del suelo sobre sustratos básicos. En: *Suelos Contaminados*. vol. II. Ed. Eusko Jaurlaritza, IHOBE, Vitoria-Gazteiz. pp. 21-24
- Adarve MJ, Hernández AJ, Pastor J. 1995. Degradación química de suelos de la Comunidad de Madrid por la incidencia de dos vertederos de residuos sólidos urbanos. En: *Degradación y Conservación de suelos*. Ed. Departamento de Edafología. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. pp. 13-21.
- Adarve MJ, Rebollo L, Hernández AJ. 1996. Ensayos experimentales del flujo del agua y la distribución de la conductividad eléctrica en perfiles de la zona no saturada próximos a un vertedero de residuos sólidos urbanos. *Geogaceta*, 20: 1311-1314
- Adarve MJ, Hernández AJ, Gil A, Pastor J. 1998. B, Zn, Fe and Mn content in four grassland species exposed to landfill leachates. *J. Environmental Quality*, 27: 1286-1293.
- Cheng CY, Chu LM. Phytotoxicity data safeguard the performance of the recipient plants in leachate irrigation. 2007. *Environ Pollut*. 145(1):195-202.
- Eduljee G. 1998. Assessment of Risks to Human Health from Landfill of Household Wastes. *Issues in Environmental Science and Technology*, 9: 113-135.
- Google Inc. (2013) Google Earth, version 7.0.3.8542.
- Fatta D, Papadopoulos A, Loizidou M. A study of the landfill leachate and its impact on the groundwater quality of the greater area. 1999. *Environ Geochem Health*, 21:175-90.
- Estalrich E. 1994. Estudio ecológico de taludes de carretera. Tesis Doctoral, Universidad de Alcalá.

Estalrich E, Hernández AJ, Aranda L, Pastor J. 1997. Estudio de factores edáficos relacionados con la erosión y escorrentía en taludes de fuerte pendiente; ensayos de revegetación. *Edafología*, 2: 161-167.

Hernández AJ, Pastor J. 1989. Técnicas analíticas para el estudio de las interacciones suelo-planta. Henares. *Revista de Geología*, 3: 67-102

Hernández AJ, Adarve MJ, Rebollo LF, Urcelay A, Pastor J. 1993-a. Water flows in ecological systems disturbed by landfills. In: *Ecotoxicology and Environmental Chemistry. A Global Perspective*. Ed. SETAC. Commissions of the European Communities, Lisboa. pp. 252-254.

Hernández AJ, Pastor J, Urcelay A, Adarve MJ. 1993-b. Estudio de procesos ecológicos en vertederos de residuos sólidos urbanos. *Actas IVª Jornadas de la Asociación Española de Ecología Terrestre*. Alicante. pp. 76-77.

Hernández AJ. 1994. Restauración del impacto ambiental de vertederos. En *Contribución a la Educación Ambiental: El tratamiento de los residuos urbanos*. J. B. Álvarez y A. Polo (comp.). Cuadernos del ICE, 11. Ediciones de la Universidad Autónoma de Madrid. pp. 35-47.

Hernández AJ, Adarve MJ, Pastor J. 1998-a. Some impacts of urban waste landfills on Mediterranean soils. *Land Degradation & Development*, 9: 21-33.

Hernández AJ, Adarve MJ, Gil A, Pastor J. 1998-b. Soil salinization from landfill leachates: effects on the macronutrient content and plant growth of four grassland species. *Chemosphere*, 38: 1693-1711

Hernández AJ, Pastor J. 2000. La revegetación de vertederos de residuos urbanos basada en principios ecológicos. Péfaur. J. (Ed.) 2000. En: *Ecología Latinoamericana*. Ed. Publ. Univ. Los Andes. Cons. Publ.- CDCHT, Mérida (Venezuela). pp. 449-455.

Hernández AJ, Pastor J. 2000. Pasos metodológicos involucrados en la fitorrestauración de vertederos clausurados de residuos sólidos urbanos. *Comunicaciones Técnicas V Congreso Nacional del Medio Ambiente*. Ed. Colegio Oficial de Físicos: 11pp

Hernández AJ, Urcelay A, Pastor J. 2002. Características químicas de suelos y características importantes de las fases vegetativa y regenerativa de especies colonizadoras de vertederos sellados en relación a barbechos y pastos del territorio arcósico. En: C. Chocarro. et al. (eds.) *Producción de pastos, forrajes y céspedes*. Ediciones de la Universidad de Lleida. pp. 153-158.

Hernández AJ, Pastor J. 2004. Incidencia del Zn de suelos contaminados de la región central sobre comunidades herbáceas de pastizales. *Pastos y Ganadería Extensiva*. B. García Criado et al. (eds). Ed. SEEP. pp. 179-184.

Hernández AJ, Pastor J. 2008. Validated Approaches to Restoring the Health of Ecosystems Affected by Soil Pollution In Chapter 2: *Soil Contamination Research Trends*, Nova Science Publishers, Inc., Hauppauge, NY USA. pp. 51-72.

Hernández AJ, Pastor J. 2008. La restauración ecológica de ecosistemas degradados: marcos conceptuales y metodologías para la acción. En *Contaminación de Suelos. Tecnologías para su Recuperación*. R. Milán y C. Lobo (eds) Ed. CIEMAT. pp. 61-82.

- Hernández AJ, Pastor J. 2008. La restauración en sistemas con suelos degradados: estudio de casos en agroecosistemas mediterráneos y taludes de carretera En Contaminación de Suelos. Tecnologías para su Recuperación. R. Millán y C. Lobo (eds) Ed. CIEMAT. pp. 545-564.
- Hernández AJ, Bartolomé C, Álvarez J, Pastor J. 2008. Comunidades vegetales de antiguos vertederos sellados pastados por ovinos: caracterización botánica y suelos En Pastos, clave en la gestión de los territorios. P. Fdez. Rebollo et al. (Eds.) Ed. Consejería de Agricultura y Pesca, Junta de Andalucía. pp. 143-149.
- Hernández AJ, Bartolomé C (eds). 2010. Estudio multidisciplinar de vertederos sellados. Diagnóstico y pautas de recuperación. Ed. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares.
- Hernández AJ, Pérez-Leblic MI, Bartolomé C, Rodríguez J, Álvarez J, Pastor J. 2012. Ecotoxicological diagnosis of a sealed municipal landfill. *Journal of Environmental Management*, 95: S50-S54
- Kalčíková G, Zagorc-Končan J, Zupančič M, Žgajnar Gotvajn A. 2012. Variation of landfill leachate phytotoxicity due to landfill ageing, *JOURNAL OF CHEMICAL TECHNOLOGY AND BIOTECHNOLOGY*, 87 (9): 1349-1353.
- Lakanen E, Ervio R. 1971. A comparison of eight extractants for the determination of plant available micronutrients in soils. *Acta Agricultura Fennica*, 123: 223-232.
- Millán R, Gamarra R, Schmid T, Sierra MJ, Quejido AJ, Sánchez DM, Cardona AI, Fernández M, Vera R. 2006. Mercury content in vegetation and soils of the Almadén mining area (Spain). *Science of The Total Environment*, 368 (1): 79-87.
- Mossop KF, Davidson CM. 2003. Comparison of original and modified BCR sequential extraction procedures for the fractionation of copper, iron, lead, manganese and zinc in soils and sediments. *Analytica Chimica Acta* 478 (2003) 111-118
- Pastor J, Adarve MJ, Urcelay A, Hernández AJ. 1990. Aproximación al estudio del impacto de los residuos urbanos sobre el medio natural y social. *Actas I Congreso Internacional de Química de la ANQUE, "Residuos Sólidos y Líquidos: su mejor destino-Solid and Liquid Wastes: their Best Destination"* vol I. pp. 57-64.
- Pastor J, Urcelay A, Hernández AJ, Adarve MJ, García A. 1992. Estudio comparado de características edáficas en vertederos sellados con materiales arcósicos y suelos del entorno. *Libro de Conferencias plenarias y Comunicaciones III Congreso Nacional Ciencia del Suelo*, Pamplona 21-24 sep. Ed. SECS. pp. 576-580
- Pastor J, Alía M, Hernández AJ, Adarve MJ, Urcelay A, Antón FA. 1993. Ecotoxicological studies on effects of landfill leachates on plants and animals in Central Spain. *The Science of the Total Environment*, suppl 1993: 127-134.
- Pastor J, Urcelay A, Oliver S, Hernández AJ. 1993-a. Impact of Municipal Waste on Mediterranean Dry Environments. *Geomicrobiology Journal*, 11: 247-260.
- Pastor J, Alía M, Hernández AJ, Adarve MJ, Urcelay A, Antón FA. 1993-b. Ecotoxicological studies on effects of landfill leachates on plants and animals in Central Spain. *The Science of the Total Environment*, 140: 127-134

Pastor J, Urcelay A, Adarve MJ, Hernández AJ, Sánchez A. 1993-c. Aspects of contamination produced by domestic waste landfills on receiving waters in Madrid province. In: Environmental Pollution. Science, Policy, Engineering. Nath, B. et al. (eds). European Centre for Pollution Research. London. pp. 254-261.

Pastor J, Urcelay A, Hernández AJ, García A. 1993-d. Investigations on the revegetation problems of landfill soils in a semiarid environment. In: Integrated Soil and Sediment Research: A Basis for Proper Protection. H.J.P. Eijsackers and T. Hamers (eds.). Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. pp. 323-326.

Pastor J, Hernández AJ, Adarve MJ, Urcelay A. 1993-e. Chemical characteristics of sedimentary soils in the Mediterranean environment: a comparison of undisturbed and disturbed soils. Applied Geochemistry. Sp. Is. 2: 195-198.

Pastor J, Urcelay A, Oliver S, Hernández AJ. 1994. Impacto antrópico de los residuos urbanos en ambientes mediterráneos xéricos del centro de España. En: Biogeoquímica de Ecosistemas. J.F. Gallardo (Ed.). Ed. Junta de Castilla-León. pp. 275-282.

Pastor J, Hernández AJ. 1999. Fitorrestauración en vertederos RSU: Ensayos, Metodologías y Resultados. En: Fitorrestauració de Sòls contaminats. Ed. ICEA. Institut d'Estudis Catalans, Barcelona. pp. 56-60.

Pastor J, Hernández AJ. 2000. Pasos metodológicos involucrados en la fitorrestauración de vertederos clausurados de residuos urbanos. V Congreso Nacional del Medio Ambiente. Comunicaciones técnicas: 55.0-55.11 Ed. Colegio Oficial de Físicos.

Pastor J, Hernández AJ. 2001a. Difficulties encountered in the phytoremediation of uncontrolled landfills in Madrid area. In: Phytoremediation of trace elements in contaminated soils and waters (with special emphasis on Zn, Cd, Pb, and As). COST Action 837. Ed. European Commission, UCM-UAM, Madrid. pp. 48-49.

Pastor, J. y Hernández A. J. 2001b.-Estudio del carácter nitrófilo de las especies de comunidades vegetales pastadas por ganado ovino, vinculado a procesos de antropización. En Biodiversidad en Pastos: 161-167 Ed. Generalitat Valenciana y Cibio

Pastor J, Hernández AJ .2002-a. Estudio de suelos de vertederos sellados y de sus especies vegetales espontáneas para la fitorrestauración de suelos degradados y contaminados del centro de España. Anales de Biología, 24: 159-167.

Pastor J, Hernández AJ. 2002-b. Evaluation of the suitability of two grass species for phytoremediation of contaminated soils from landfills under field and experimental conditions. In: Rubio, J.L. et al. (eds.). Man and Soil at the Third Millennium. Ed. Geoforma, Valencia. pp. 1687-1701.

Pastor J, Hernández AJ. 2004. Evaluating the response of plant community to Zn polluted soil as a basis for the revegetation/remediation of polluted sites. Fourth International Conference on Land Degradation. Cartagena, Murcia, Spain 12-17 Septiembre. CD

Pastor J, Hernández AJ. 2007-a. Evaluación de la complejidad de vertederos-cubierta edáfica y suelos de las áreas de descarga en relación a la revegetación y la fitorremediación. En:

---

Tendencias Actuales de la Ciencia del Suelo. N. Bellinfante y A. Jordán (eds.), Junta de Andalucía, Sevilla. pp. 947-953.

Pastor J, Hernández AJ. 2007-b. Biogeoquímica en vertederos clausurados en la zona centro de la Península Ibérica. VI Congreso Ibérico de Geoquímica, Portugal. pp. 430-433.

Pastor J, Hernández AJ. 2008. Multi-functional role of grassland systems in the ecological restoration of mines, landfills, roadside slopes and agroecosystems: soil protection, increasing biodiversity and ecophysiological strategies for combating the water deficit. *Options Méditerranéennes*, 79: 103-107

Pastor J, Hernández AJ. 2010a. Pastizales del occidente de la Comunidad de Madrid, su importancia como referentes para acciones de recuperación de sistemas degradados. En: *Pastos: fuente natural de energía*. Ed. Universidad de León.

Pastor J, Gutiérrez-Ginés MJ, Hernández AJ. 2012. Composición nutricional de especies de vertederos sellados con suelos ácidos pastados por ovinos. Libro de Comunicaciones XIV Simposio Hispano-Luso de nutrición Mineral de las Plantas. Ed Universidad Autónoma de Madrid. pp. 357- 363.

Pastor J, Hernández AJ. 2012. Heavy metals, salts and organic residues in old solid urban waste landfills and surface waters in their discharge areas: Determinants for restoring their impact. *Journal of Environmental Management*, 95: S42-S49.

Pastor J, Hernández AJ. 2012. Modelos contaminación suelo - respuestas plantas: resultados en taludes y escombreras de emplazamientos mineros, de vertederos sellados y de cultivos en bosques tropicales talados. En *Evaluación y recuperación de emplazamientos degradados y/o contaminados*. R. Millán y C. Lobo (eds.). Ed. CIEMAT. pp. 603- 641.

Rasband WS (1997–2011) ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>

RD 9/2005. Real Decreto 9/2005 de 14 de enero, por el que se establece la relación de actividades potencialmente contaminantes del suelo y los criterios y estándares para la declaración de suelos contaminados. Boletín Oficial del Estado del 18 enero 2005.

Tatsi AA, Zouboulis AI. A field investigation of the quantity and quality of leachate from a municipal solid waste landfill in a Mediterranean climate (Thessaloniki, Greece). 2002. *Advances Environ Research*, 6: 207-19.

Urcelai A. 1997. Estructura de sistemas herbáceos mediterráneos sometidos a la acción antrópica y posibles mecanismos de resiliencia. Tesis Doctoral, Universidad de Alcalá

Urcelai A, Pastor J, Oliver S, Sánchez A, Hernández AJ. 1993.- Use of herbaceous species in land reclamation of dumps areas in Central Spain. In: *Aire-Residuos, Proc. III Congreso de Ingeniería Ambiental*. Bilbako Nazioarteko Erakustazoka, Bilbao. pp. 524-532.

Urceali A, Pastor J, Hernández AJ. 1994. Los contaminantes inorgánicos de suelos de vertederos de RSU en relación a los organismos vivos. En: *Suelos Contaminados, Vol. II*: Ed. Eusko Jaurlaritza, IHOBE, Vitoria-Gazteiz. pp. 17-20.



Ursic KA, Kenkel NC, Larson DW. 1997. Revegetation dynamics of cliff faces in abandoned limestone quarries. *Journal of Applied Ecology*, 34: 289-303

Vidic T, Jogan N, Drobne D, Vilhar B. 2006. Natural revegetation in the vicinity of the former lead smelter in Zerjav, Slovenia. *Environmental Science and Technology*, 40: 4119-4125.

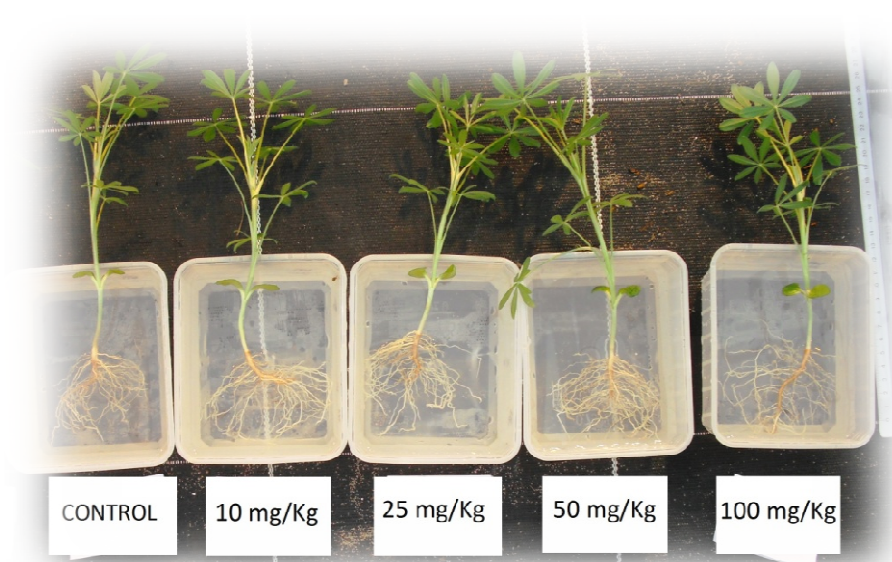
Walsh LM, Soil Society of America (1971) *Instrumental Methods for analysis of soils and plant tissue*, vol VII. Soil Science Society of America, Wisconsin

Weber R, Watson A, Forter M, Oliaei F. Persistent organic pollutants and landfills - a review of past experiences and future challenges. 2011. *Waste Manag Res.*, 29: 107-121

## Chapter 6

---

### Phytoremediation of co-polluted soils by organic compounds and heavy metals: bioassays with *Lupinus luteus* L. and associated endophytic bacteria



This chapter reproduces the manuscript:  
Gutiérrez-Ginés MJ, Hernández AJ, Pastor J. *Journal of  
Environmental Management* (**submitted**)

---

## Phytoremediation of co-polluted soils by organic compounds and heavy metals: bioassays with *Lupinus luteus* L. and associated endophytic bacteria

### Abstract

In Central Iberian Peninsula, there are old sealed landfills with soils co-polluted by several heavy metals (Cu, Zn, Pb, Cd, Ni, As, Cr, Fe, Al, Mn) and organic pollutants of different families (hydrocarbons, polycyclic aromatic hydrocarbons, polychlorinated biphenyls, pesticides and other organochlorinated compounds, phenols and volatile compounds), as is the case of study in this work. Therefore, we focus on the study of phytoremedial plants that can deal with this type of complex pollution, not only species that tolerate the joint effect of soil heavy metals and organics, but also those that can take advantage of associated bacteria to get an efficient degradation of organic compounds. This work exposes the study carried out with *Lupinus luteus* and its endophytes in two greenhouse experiments: A) growing in benzo(a)pyrene (BaP) artificially polluted substrate, B) using real landfill co-polluted soils. Endophytes of roots and shoots were isolated in both bioassays. Plant growth promoting tests and organic pollutant tolerance and degradation tests were conducted with all strains isolated in bioassay A), and with those that demonstrated to be pure cultures of bioassay B). Thus, the selected landfill is described, as well as isolation and test procedures. Results indicate that plants did not show toxicity symptoms when exposed to BaP, but they did when grown in landfill soils. Some endophytes demonstrated plant growth promoting capacity and tolerance to BaP and other organic compounds (diesel and commercial PCB mixtures). Few strains could even have the capacity of metabolizing those organic pollutants. The general decrease of plant growth promoting capacity in those strains isolated of experiment with landfill soils, compared with those of the bioassay with BaP, may point out that lupin endophytes are not adapted to metal concentration in roots and shoots, cannot grow and, therefore, most of isolated root endophytes must have colonized root tissues from soil. Even though preliminary degrading tests have demonstrated promising results (with some strains with potential of using organic pollutants as sole carbon source), those are not conclusive, and further exhaustive degradation assays should be necessary.

Key words: landfills, benzo(a)pyrene, PCBs, diesel

## **Fitorremediación de suelos contaminados conjuntamente por compuestos orgánicos y metales pesados: bioensayos con *Lupinus luteus* L. y bacterias endófitas asociadas**

### **Resumen**

En el centro de la Península ibérica existen antiguos vertederos sellados con suelos contaminados conjuntamente por varios metales pesados (Cu, Zn, Pb, Cd, Ni, As, Cr, Fe, Al, Mn) y contaminantes orgánicos de varias familias (hidrocarburos, hidrocarburos aromáticos policíclicos, bifenilos policlorados, pesticidas y otros compuestos organoclorados, fenoles y compuestos orgánicos volátiles). Nos enfrentamos por lo tanto al conocimiento de plantas fitorremediadoras que puedan hacer frente a este tipo de contaminación compleja. Así pues, especies que no solo puedan tolerar la acción conjunta de metales en el suelo, sino que puedan favorecerse de bacterias asociadas para obtener una degradación eficiente de los compuestos orgánicos.

Este trabajo presenta el estudio realizado con *Lupinus luteus* L. y sus bacterias endófitas mediante dos bioensayos en invernadero: (A) creciendo en un sustrato contaminado artificialmente con BaP, (B) utilizando suelos reales de vertedero. En los dos bioensayos se aislaron las bacterias endófitas de la parte aérea y raíces. A todas las cepas aisladas en el experimento (A), y a aquellas que demostraron ser cultivos puros en el experimento (B), se les realizaron tests de promoción de crecimiento de las plantas.

Se describe tanto el vertedero seleccionado para este estudio, como los protocolos realizados para el aislamiento de las bacterias y los tests efectuados. Los resultados muestran que las plantas no mostraron síntomas de toxicidad cuando se expusieron a BaP, pero sí cuando crecieron en suelos de vertedero. Algunas cepas bacterianas demostraron capacidad de promover el crecimiento de las plantas y tolerancia a BaP y otros contaminantes orgánicos (gasoil y mezclas comerciales de PCBs). Un menor número de cepas parecen tener capacidad de metabolizar estos compuestos orgánicos. La disminución general de la capacidad de incentivar el crecimiento de las plantas del grupo de cepas aisladas en el experimento con suelos de vertedero respecto a aquellas aisladas de lupinos del experimento con BaP, puede indicar que las bacterias endófitas de esta especie de lupino, al no estar adaptadas a las condiciones de concentración de metales encontradas en raíces y partes aéreas, no pudieron desarrollarse bien y, por lo tanto, la mayoría de las endófitas aisladas han colonizado los tejidos radiculares desde el suelo. Aunque los tests preliminares de degradación hayan producido resultados prometedores, demostrando el potencial de algunas cepas bacterianas de usar los contaminantes como única fuente de carbono, no los podemos considerar concluyentes y futuros experimentos de degradación más exhaustivos son necesarios.

Palabras clave: benzo(a)pireno, gasoil, PCBs, vertederos.

## 1. Introduction

The studies carried out for 30 years on sealed landfills in the Iberian Peninsula (Pastor et al., 1993; Hernández et al., 1998; Hernández and Bartolomé, 2010) have revealed an important problem of salinity, heavy metal and organic co-pollution. This affects edaphic sealing of both landfills and surrounding soils. The relative importance of each kind of pollution varies greatly between locations (Pastor and Hernández, 2012). However, as it is shown in cited works, there are some cases in which this problem is extremely acute, since there are areas where heavy metal concentrations are much higher than allowed levels, besides the presence of different families of organic pollutants.

The work of our research group, which aimed for recovery of these sites, has been focused on phytoremediation with wild or commercial herbaceous species, and has always taken into account their response to metals (Adarve et al., 1998; Pastor and Hernández, 2002; Hernández et al., 2012) or salinity (Hernández et al., 1999). Less frequent work has been related to the effect of these polluted soils on microorganisms (Pérez-Leblic et al., 2012) or nematofauna (Urcelai et al., 2000). Hence, we research plants able to deal with the complex soil pollution of landfills with heavy metals and organic pollutants.

Whitfield Åslund et al. (2007) focused on the role of the plant itself during phytoremediation by testing different plant species for their phytoremediation potential of organic polluted soils. By contrast, Meng et al. (2011) realized that biodegradation plays a more important role than plant uptake in phytoremediation, although their work is based on plants. It is known that working only with plants is in clear disadvantage in comparison with considering also the plant-associated microorganisms for two main reasons (Burken, 2003): i) being photoautotrophic, plants do not rely on organic molecules as a source of energy or carbon. By consequence, unlike microorganisms, during evolution plants were not under selective pressure to develop the capacity to degrade chemically recalcitrant molecules, leading to a much more limited spectrum of chemical structures they can metabolize; ii) to avoid build-up and potential toxicity to sensitive organelles, plant metabolism of organic molecules (other than photosynthates) consists of general

transformations to more water-soluble forms, and sequestration processes. By contrast, microbial metabolism often ends with the organics being converted into CO<sub>2</sub>, water and cellular biomass.

Therefore, it could be stated that plants rely on their associated microorganisms in order to obtain a more efficient degradation. On the other hand, plants themselves have a positive effect on the microbial degradation of organic pollutants (Chekol et al., 2004) since the rhizosphere is a favourable habitat for proliferation of microorganisms (Olson et al., 2003). However, if a soil, polluted by organics, is also polluted by heavy metals, remediation studies become very complicated. The presence of heavy metals can provoke toxicity and inhibit plant and microorganism growth, as well as a broad range of microbial processes, including the degradation of organic pollutants (Sandrin and Maier, 2003). Weyens et al. (2009a and b) explain how plant-associated bacteria (rhizosphere and/or endophytes) can favour the phytoremediation of this kind of co-polluted sites, by both stimulating the plant growth and degrading the organic compounds of soils.

The foregoing considerations led to study the possibility of using the endophytes associated to legume species growing in soils with this type of co-pollution. Research on sealed landfills of Community of Madrid over recent years (Hernández and Bartolomé, 2010), indicates that this sites are suitable to study this remediation strategy, which is the objective of this work.

## **2. Material and methods**

### **2.1 Study area**

The sealed landfill in Torrejón de Ardoz municipality (40° 26' N, 3° 28' W, Madrid, Spain) is one of the landfills with most acute pollution problems, among those studied in recent years. The exploitation of this landfill was uncontrolled, receiving both industrial and urban wastes. It was sealed for the first time in 1982 with a layer of debris and surrounding soils (loam-limestone substrate). This layer was under 50 cm thick and did not modify the existing slopes with up to 80% gradient and 4-5 m height. Subsequently, it keeps receiving sporadic waste of various kinds. The area is about 70,000 m<sup>2</sup>. The base of the landfill is a discharge area of an unconfined aquifer,

where both landfill lixiviates and underground local fluxes arrive (Hernández and Bartolomé, 2010).

After the sealing, this landfill has not been subjected to any kind of restoration. However, the cover soil, originally bare, has been progressively colonized by spontaneous wild vegetation. These herbaceous species vary significantly in the different areas of the landfill depending on factors like location in flat areas (platform), slopes (according to slope and aspect) or discharge areas; as well as sealing soil stoniness (with more or less debris and fragments of inert wastes), humidity and the high variability in the composition of pollutants (Hernández et al., 2008).

## 2.2 Sampling and soil analysis

A random sampling in platforms and slopes was conducted. 35 topsoil (0-15 cm) average samples were collected with a hoe. Later, 12 more samples were collected in the area where the highest pollutant concentrations were found, according to test results in the first samples. They were dried at room temperature for a week with occasional manual mixing and sieved through a 2 mm mesh. The determinations made in each sample were pH in slurry, organic matter by potassium dichromate reduction, total Kjeldahl nitrogen, electrical conductivity,  $P_2O_5$  concentration and soluble anion concentrations by ionic chromatography (Dionex 4500) according to the protocols described by Hernández and Pastor (1989). Element concentrations were analysed by plasma emission spectroscopy (ICP-OES). Exchangeable Ca, K, Na and Mg were analysed after a digestion by ammonium acetate at pH 7, as well as pseudo-total concentrations of Cu, Zn, Pb, Cd, Ni, Fe and Mn after nitric and perchloric acid digestion (Walsh and SSSA, 1971). Arsenic (As) was determined by XRF and Hg by the Advanced Mercury Analyser (AMA-254, LECO Company, Czech Republic) according to Millán et al. (2006). Total hydrocarbons were determined by infrared spectrophotometry following the UNE 77307, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by gas chromatography (ISO 18287), polychlorinated biphenyls (PCBs) and organochlorine insecticides by gas chromatography (ISO 10382) and phenols by gas chromatography (EPA Method 8401, Soil Quality).



### 2.3 Experimental layout, setup, monitoring and harvest

Two experiments were carried out. The first one (A) aimed to assess the response of *Lupinus luteus* L. and its endophytes to increasing benzo(a)pyrene (BaP) concentrations. This pollutant is highly hazardous and one of the most widely spread in the landfill. The objective of the second bioassay (B) was to study the behaviour of this species as well as its endophytes growing in real soils collected from the landfill. A scheme of the experimental layout is shown in Fig 1.

This legume species was chosen since it had been already used as a model in remediation bioassays with soils co-polluted by metals and organics (Barac et al., 2004; Weyens et al., 2010a; 2011). The (commercially available) *Lupinus luteus* L. seeds were surface sterilized for 20 min at room temperature in a solution containing 1% active chloride (w/v, added as a NaOCl solution) and supplemented with 1 drop Tween 80 (Merck) per 100 ml solution. After surface sterilization, seeds were rinsed 3 times in sterile tap water and soaked overnight in the last rinsing water. Seeds for bioassay (A) were germinated and grown in perlite saturated with

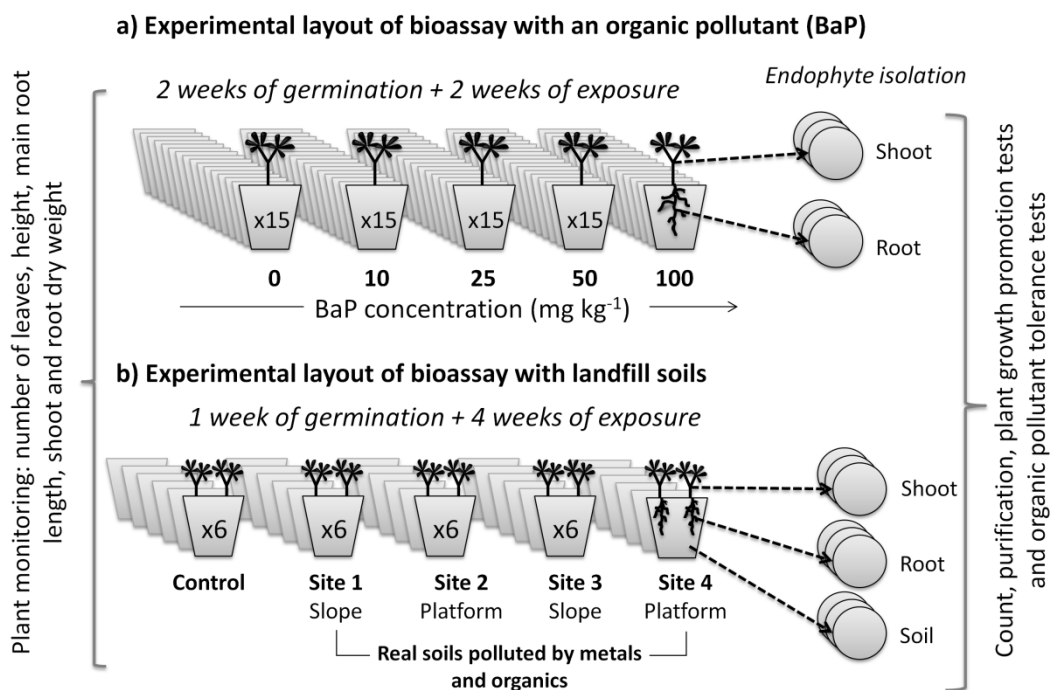


Fig. 1. Scheme of experimental layouts

---

half strength Hoagland's nutrient solution (Barac et al., 2004) for 2 weeks. Those used in bioassay (B) were germinated in vermiculite for 1 week and watered with deionised water.

For the first bioassay (A), BaP was artificially added to calibrated sand substrate. The final concentrations were 0, 10, 25, 50 y 100 mg kg<sup>-1</sup>. BaP stock solutions were prepared with 75 mg, 187 mg, 375 mg and 750 mg of BaP (Sigma, ≥96% HPLC) respectively in 200 ml of acetone. They were added to 1 kg of sand and mixed mechanically for 10 min. Acetone was allowed to evaporate for 24 h with occasional manual mixing. Later, it was added to the rest of the sand and mixed manually 15 more min. Pots were filled with 0.5 kg of substrate. One pre-germinated lupin seedling was planted in each pot. There were 15 replications for each condition. Besides the non-exposed control, a control condition with only 200 ml acetone was included. This bioassay lasted 2 weeks.

In the second bioassay (B), soils collected in four sites of the landfill were used. The 4 kg soil samples were collected from the topsoil layer (0-10 cm). As pollution was previously known, sites were chosen to correspond to an approximate gradient of pollution by heavy metals and with presence of various organic compounds. They were also selected in such a way that they represent both slopes and flat areas. In each site, an estimation of plant cover was made and bare areas were avoided. Soils were immediately transferred to the greenhouse to fill the 0.5 kg pots where 2 pre-germinated lupin seedlings were planted. Control soil with a neutral-basic pH was collected in a farm land in the central Iberian Peninsula. 6 replicates per treatment were set up. Bioassay was conducted for 4 weeks.

Both bioassays were carried out in the greenhouse (17.4°C - 24.5°C and 70% - 80% humidity). A weekly monitoring of shoot height and number of leaves was performed. Both parameters are indicators of toxic effects (Gutiérrez-Ginés et al., 2012). In the end of the bioassays, plants that were not used for bacteria isolation or biochemical analyses, were harvested, root length was measured, and shoots and roots were washed with deionised water, oven-dried (70°C, 48 h) and weighted. Samples of lupins grown in landfill soils were grounded in a grinder IKA-WERKE Yellow Line A10, and digested with nitric and perchloric acid and elements were

determined by ICP-OES (Perkin-Elmer 4300DV) according to Walsh and SSSA (1971).

The capacity of some stress-related enzymes (involved in anti-oxidative defense) was analysed in plants from bioassay (A). For this, during harvest of the experiment, 6 plants at random from control and 100 mg kg<sup>-1</sup> BaP treatments were collected. The roots and shoots were separated and immediately snap-frozen with liquid nitrogen before storage at -80°C. Frozen tissues were homogenized in ice-cold 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.8) containing 1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol and 4% insoluble polyvinylpyrrolidone (1 ml buffer per 100 mg fresh weight), and afterwards the homogenate was squeezed through a nylon mesh and centrifuged for 10 min at 20,000 g and 4 °C. The enzyme capacities of catalase (CAT, EC 1.11.1.6), guaiacol peroxidase (GPOD, EC 1.11.1.7) and superoxide dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) as marker enzymes for oxidative stress (Vangronsveld and Clijsters, 1994) were measured spectrophotometrically in the supernatant at 25 °C. CAT and GPOD activities were determined at 240 nm and 436 nm respectively according to Bergmeyer et al. (1974). Analysis of SOD activity was based on the inhibition of cytochrome C and measured at 550 nm (McCord and Fridovich, 1969). The results were expressed in units g<sup>-1</sup> fresh weight.

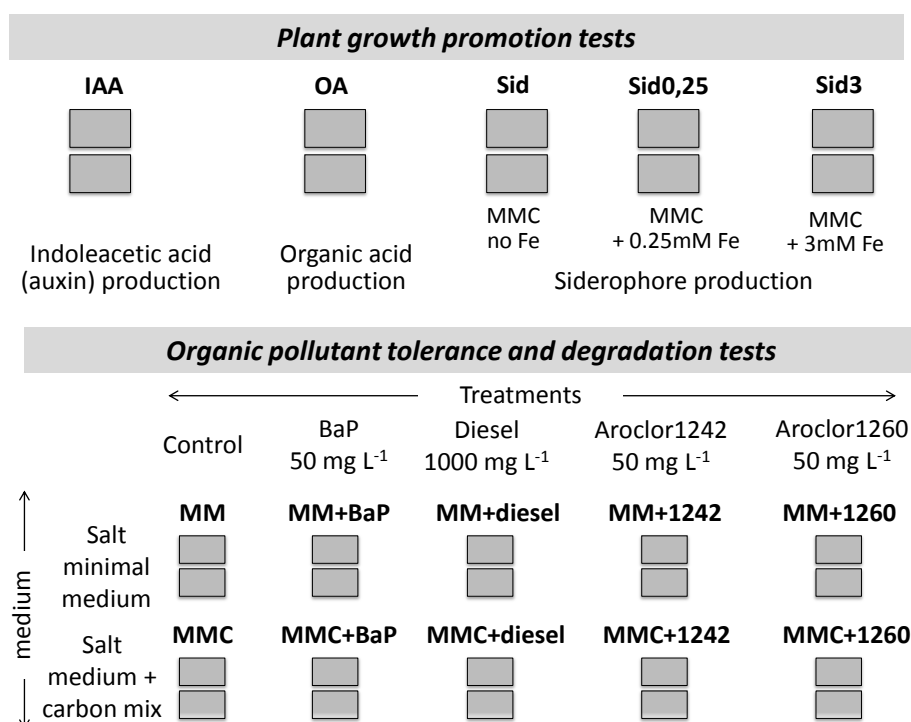
#### **2.4 Endophyte isolation and preliminary tests for assessing their fitoremediation potential**

Endophytes of lupin shoots and roots were isolated from an average of 3 random replicates of selected treatments. Control and 100 mg Kg<sup>-1</sup> BaP treatments were selected in bioassay (A) and the 4 treatments corresponding to landfill soils in the bioassay (B). In experiment (A), bacteria were isolated in the end of the bioassay, 4 weeks after germination. On the contrary, in experiment (B), bacteria were also isolated during the fourth week after germination, although the bioassay continued with the rest of replicates for one more week. Isolation and purification of bacteria strains were performed following the protocols described in Barac et al. (2004). In case of bioassay (B) soil bacteria were also isolated in order to get more information. Colony Forming Units were counted in each treatment and plant part, and were related to fresh weight. In the case of isolated bacteria from bioassay (B), a Gram staining was performed and cultures were observed under optical microscope in

order to check the purity of cultures and describe the bacteria. Not every culture purified from a single colony demonstrated to be pure.

The two main media used for isolating, incubating and making the tests described below were i) a general rich medium described in Mergeay et al. (1985) and ii) a salt minimal medium (Schlegel et al., 1961) that can be prepared with or without carbon mix (MMC or MM respectively).

All isolated strains from bioassay (A) and those that demonstrated to be pure cultures in bioassay (B) were subjected to plant growth promotion tests (Fig 2). The auxin indole acetic acid (IAA) production was assessed by the Salkowsky reaction based on the Mayer (1958) method. Organic acid production (leading to solubilisation of soil phosphates, making them available for plants) was assessed by the alizarin red S pH indicator, according to Cunningham and Kuiack (1992). The production of siderophores (which bind  $\text{Fe}^{+3}$  ions, making them more available for plants) was detected by CAS solution, based on Schwyn and Neilands (1987). All these modified methods are described in Weyens et al. (2012).



**Fig. 2.** Scheme of the test battery on isolated bacterial strains

Tolerance and use of organic pollutants as sole carbon source was tested for every strain. BaP was tested in strains from bioassay (A), while diesel, Aroclor 1242 and Aroclor 1260 were tested in strains from bioassay (B). As it will be explained in the results section, hydrocarbons and PCBs are considered the main organic pollutants. We consider that the commercial mixtures of hydrocarbons (diesel) and PCBs (Aroclor 1242 and 1260) are appropriate representatives of the organic pollution found in landfill soils. Although BaP is also present in these soils in significant concentrations, it was not used in tests of strains from bioassay (B) due to the results observed in the strains from bioassay (A). The tests represented in Fig 2 were carried out in duplicate in 96-well plates. The salt minimal medium with or without carbon source was used in these tests as shown in Fig 2. Stock solution of BaP was prepared with dimethyl sulfoxide (DMSO), and those of Aroclor 1242 and Aroclor 1260 (EPA reference standards), with acetone. They were sterilized by filtration (0.22  $\mu\text{m}$ ) and added to media to obtain final concentrations of 50 mg L<sup>-1</sup>. Commercial diesel was also sterilized by filtration and added directly (1  $\mu\text{L}$ ) to the 96-well plates, to obtain a final concentration of 1000 mg L<sup>-1</sup>.

Strains growing in general rich medium were washed three times with a sterile buffer solution (MgSO<sub>4</sub> 10 mM) in order to withdraw the carbon from the bacterial suspension. This final suspension was used to inoculate 10  $\mu\text{L}$  in each mL of testing medium. Plates were incubated for 7 days at 28°C and 150 rpm. The sixth day, Iodonitrotetrazolium chloride (INT) was added to the cultures in concentration of 0.01% v/v. The 7<sup>th</sup> day, purple colour indicates organism growth (Hayashi et al., 2003).

## 2.5 Data analysis

All datasets were statistically analyzed using ANOVA and post hoc multiple comparison testing (Bonferroni). When homoscedasticity was not possible, the more robust statistical Welch and T3 of Dunnett for multiple comparison were used. Calculations were performed with SPSS 19. Zn, Cd and total hydrocarbon soil concentration data, as well as electrical conductivity were used to create four pollution distribution maps. The IDW interpolating tool of the ArcMap™ software (v. 9.3.1., ESRI) was used.

### 3. Results

#### 3.1 Characterization of soil pollution in Torrejón landfill

Tests on the 47 soil samples confirm the problem of soil pollution caused by heavy metals as well as organic pollutants, apart from the salinity, common to most landfills. pH is quite homogeneous along the site, with values of 6.8 to 7.9 (table 1). Salinity is evidenced by up to 10230  $\mu\text{S cm}^{-1}$  of electrical conductivity. Maximum concentrations of anions are 13.2  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , 422  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , 126  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , 2674  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , 30,9  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  and 7132  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  of  $\text{F}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  and  $\text{SO}_4^{2-}$  respectively. Table 1 shows metal concentrations in analyzed soils and the soil reference levels of Spanish law (RD 1310/1990, BOE, 1990). Cr only surpasses the reference levels in two samples with concentrations of 391 and 162  $\text{mg kg}^{-1}$ . The percentage of metal content that is bioavailable is also presented. Despite the high heavy metal concentration, the bioavailability is heterogeneous in different points. Cd is especially dangerous, as its bioavailable fraction is over 60 % in most sites, and even higher than 90 % in some of them.

Increasing the complexity of this landfill problem, table 2 shows the great variety of organic pollutants detected at some points. Although all families of organic pollutants can be found throughout the landfill, total hydrocarbons, PCBs and PAHs are the ones that mostly contribute to this kind of pollution. Their concentrations are higher than the reference limits in half of the analysed soil samples.

The heterogeneous distribution of main pollutants in this site (Zn and Cd concentration, total hydrocarbon concentration and electrical conductivity) are shown in Fig 3.

#### 3.2 Responses of *Lupinus luteus* L. to BaP and landfill soils

Lupin plants grown in increasing BaP concentrations did not evidence toxicity in any case. Growth was similar in all treatments (Fig 4 and 5). Monitoring results suggested that effects might only be found at physiological level. Only catalase capacity in roots was significantly lower in control compared with BaP treatment (Fig 6).

**Table 1.** Pseudo-total content ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) of metals and bioavailable fraction (in parentheses, %) in landfill soils

Site	Cu	Zn	Pb	Cd	Ni	Fe	Al	Mn
1	1473 (10)	2873 (9.3)	3004 (31)	2.1 (36)	105 (1.4)	176869 (0.1)	8618 (0.3)	1312 (3.5)
2	225 (31)	1073 (58)	218 (36)	41 (56)	114 (11)	17820 (1.0)	22321 (0.4)	563 (20)
3	449 (23)	1557 (55)	599 (35)	5.9 (63)	68 (13)	22685 (0.7)	21618 (0.5)	290 (13)
4	437 (48)	518 (32)	69 (37)	10 (64)	186 (9.6)	23927 (0.8)	27846 (0.1)	1386 (30)
5	416 (26)	877 (25)	402 (33)	11 (50)	53 (2.8)	15186 (0.3)	11981 (1.0)	271 (12)
6	189 (29)	601 (49)	194 (45)	0.8 (0.0)	40 (13)	14803 (0.7)	27261 (1.3)	255 (18)
7	195 (59)	212 (35)	34 (49)	4.1 (87)	96 (16)	19548 (1.0)	34659 (0.1)	582 (35)
8	285 (50)	811 (53)	194 (38)	2.6 (51)	39 (16)	19786 (0.9)	26661 (0.2)	240 (21)
9	748 (44)	488 (28)	239 (38)	n.d.	71 (6.6)	33644 (0.2)	24638 (0.2)	230 (18)
10	68 (27)	335 (53)	204 (37)	3.1 (64)	17 (7.6)	18306 (0.2)	22988 (0.8)	224 (15)
11	520 (13)	89 (19)	43 (27)	1.0 (99)	12 (5.9)	14693 (0.1)	31017 (0.8)	211 (33)
12	671 (22)	140 (31)	453 (48)	1.0 (99)	6.7 (5.3)	8669 (0.2)	14304 (0.8)	147 (23)
13	204 (15)	297 (40)	256 (13)	3.8 (51)	33 (6.7)	26035 (0.4)	21756 (0.1)	232 (21)
14	3721 (29)	532 (57)	255 (87)	n.d.	24 (8.9)	11586 (0.3)	21972 (1.2)	193 (20)
15	147 (51)	232 (28)	57 (37)	1.3 (85)	19 (7.8)	18824 (0.2)	22670 (0.2)	202 (24)
16	167 (15)	740 (14)	671 (35)	n.d.	17 (2.7)	26106 (0.3)	14519 (0.8)	283 (17)
17	127 (33)	519 (38)	158 (42)	n.d.	22 (10)	25267 (0.3)	20871 (0.6)	257 (12)
18	133 (25)	425 (44)	567 (20)	0.4 (0.0)	19 (3.7)	22287 (0.2)	13328 (0.8)	257 (18)
19	95 (29)	241 (24)	624 (49)	n.d.	16 (6.2)	14885 (0.3)	25449 (0.9)	293 (26)
20	41 (22)	220 (61)	36 (39)	n.d.	69 (1.0)	14162 (0.3)	17760 (0.5)	236 (33)
21	84 (31)	126 (20)	121 (26)	1.8 (76)	13 (6.7)	14066 (0.2)	20759 (0.1)	180 (22)
22	38 (19)	146 (21)	54 (29)	2.2 (31)	14 (5.1)	10129 (0.2)	17135 (0.5)	263 (21)
23	137 (20)	92 (40)	37 (45)	17 (33)	7.9 (11)	12920 (0.2)	23720 (0.1)	154 (33)
24	53 (21)	138 (35)	214 (20)	n.d.	11 (6.2)	18529 (0.2)	18554 (0.1)	154 (20)
25	137 (5.4)	135 (13)	48 (10)	2.2 (0.0)	18 (7.9)	20437 (0.2)	26503 (0.1)	179 (15)
26	110 (28)	361 (29)	74 (29)	n.d.	11 (5.6)	15759 (0.2)	20660 (0.0)	162 (19)
27	29 (88)	86 (72)	20 (89)	6.8 (13)	17 (10)	11175 (0.3)	19870 (0.1)	124 (27)
28	32 (25)	120 (90)	21 (43)	2.1 (12)	10 (11)	12771 (0.4)	20637 (0.1)	176 (28)
29	137 (36)	137 (16)	47 (29)	n.d.	6.4 (6.6)	13794 (0.1)	18752 (0.2)	165 (17)
30	30 (17)	308 (60)	49 (21)	n.d.	8.9 (6.7)	10022 (0.3)	12984 (1.0)	224 (38)
31	61 (25)	111 (32)	31 (32)	n.d.	19 (8.3)	16720 (0.2)	24769 (0.1)	159 (21)
32	25 (32)	69 (20)	47 (20)	n.d.	4.7 (8.3)	10458 (0.1)	14492 (0.2)	101 (16)
33	28 (31)	60 (17)	15 (34)	0.4 (97)	8.2 (4.4)	10609 (0.1)	19163 (0.9)	146 (20)
34	23 (27)	64 (17)	25 (56)	n.d.	7.5 (7.2)	14258 (0.2)	17476 (0.9)	219 (34)
35	13 (18)	53 (14)	7.0 (47)	n.d.	9.5 (4.8)	13682 (0.4)	16226 (0.6)	252 (34)
36	23 (22)	141 (14)	29 (24)	n.d.	9.3 (3.7)	11177 (0.1)	16144 (0.7)	144 (17)
37	20 (8.6)	79 (6.6)	17 (14)	n.d.	15 (2.3)	22691 (0.6)	34108 (0.2)	407 (26)
38	23 (26)	110 (46)	22 (54)	n.d.	7.0 (5.6)	13157 (0.4)	22502 (0.5)	226 (16)
39	18 (24)	49 (16)	8.7 (39)	n.d.	7.5 (4.5)	9838 (0.1)	20220 (0.4)	175 (16)
40	21 (56)	61 (15)	15 (43)	n.d.	9.1 (4.9)	12404 (0.1)	26712 (0.4)	186 (18)
41	32 (41)	85 (24)	13 (54)	n.d.	11 (5.4)	13419 (0.1)	31256 (0.5)	192 (26)
42	30 (35)	56 (14)	20 (22)	n.d.	10 (4.9)	13528 (0.2)	30132 (0.6)	154 (31)
43	33 (18)	111 (7.5)	19 (27)	n.d.	20 (3.0)	30370 (0.1)	48879 (0.3)	357 (22)
44	30 (13)	100 (5.5)	17 (22)	n.d.	19 (2.7)	28130 (0.3)	52505 (0.3)	427 (31)
45	8.2 (24)	38 (14)	4.2 (108)	n.d.	6.4 (5.9)	9676 (0.1)	20816 (0.6)	167 (25)
46	9.5 (24)	38 (12)	11 (56)	n.d.	13 (5.1)	10990 (0.1)	20551 (0.6)	251 (42)
47	14 (26)	57 (30)	16 (42)	n.d.	7.2 (7.4)	12200 (0.2)	20533 (0.1)	147 (35)
Ref. pH > 7								
	210	450	300	3	112			

*Although this figure is included in the manuscript submitted for publication, in this chapter is not shown to avoid being redundant with figure 15 of chapter 5.*

**Fig 3.** Distribution maps of Cu and Zn concentration, total hydrocarbon concentration (HC) and electrical conductivity (EC).

Table 2. Organic pollutants detected in soil samples.

Family	Pollutant	Max conc (mg kg <sup>-1</sup> )	Ref (mg kg <sup>-1</sup> )	N (>ref)	Pollut (<ref)	N (det)
Phenols	Pentachlorophenol	0,58	0,01	7 / 25	Phenol	11 / 25
					2-chlorophenol	
					Cresols	
					2,4-dichlorophenol	
					2,4,5-trichlorophenol	
2,4,6- trichlorophenol						
Insecticides	Alfa-HCH	0,01	0,01	1 / 31	Gamma-HCH	15 / 31
					Endosulfan	
					p,p'-DDE	
					Dieldrin	
					p,p'-DDD	
Hydrocarbons	Totals	397	50	15 / 31		
	Aliphatics	363				
	Aromatics	44				
PCB	Total	4,1	0,01	13 / 31		
PAH	Naphthalene	2,9	1	9 / 31	Acenaphthene	31 / 31
	1,2-benzanthracene	1,5	0.2	2 / 31	Fluorene	
	Benzo(b)fluoranthene	2,7	0.2	2 / 31	Anthracene	
	Benzo(a)pyrene	2,4	0.02	12 / 31	Fluoranthene	
	Inden-1,2,3-(cd)pyrene	1,3	0.3	2 / 31	Pyrene	
	Dibenzo(a,h)anthracene	0,2	0.03	3 / 31	Chrysene	
Volatiles					Benzo(k)fluoranthene	
					Ethylbenzene	3 / 4
					m+p-xylenes	
					o-xylene	
					toluene	
				trichlorethylene		

Max conc, maximum pollutant concentration found (mg kg<sup>-1</sup>); Ref, reference levels according to the Spanish law RD2005 (BOE 2005); N (>ref), number of soil samples with pollutant concentration higher than reference limit; Pollut (<ref), detected compounds with concentration lower than reference; N (det), number of samples where any pollutant of that family was detected.

On the contrary, lupins grown in landfill soils showed development problems compared with control ones. This was evidenced by plant height and number of leaves in last exposure week as well as root length (Fig 4 and 5). Characteristics of soils used in this bioassay are shown in tables 3 and 4. There was a gradient of heavy metal and organic pollution in those soils, being 1 and 2 the least polluted and 4 the most. Cd was the exception to this gradient, as its concentration was the highest in soil 1. These unsuitable growing conditions were reflected by lesser plant



cover in site 4 compared with the other three sites. In spite of this pollution gradient, lupins did not demonstrate significant growth differences between landfill soil treatments. Only root length seemed to reflect this gradient, although neither of those differences were statistically significant.

Unlike the first bioassay, lupins grown in landfill soils started to show chlorosis symptoms after a few days of exposure. After the first week, leaves started to curl at the edges and have necrotic parts. In the end of the experiment, necrosis was generalized and some leaves died in all treatments. The lack of vigour and leaf symptoms were the most obvious signs of toxicity. Despite the different metal pollution level, no difference in the degree of toxicity between treatments was observed. For this reason, it is conceivable that organic compounds induce toxicity, even at low concentration.

Metal concentration in roots of yellow lupin reflects the soil metal gradient, except in the case of Cd, whose concentration is higher in roots of those plants grown in the soil with the lowest amount (site 2) (Table 5). This gradient in metal concentration in

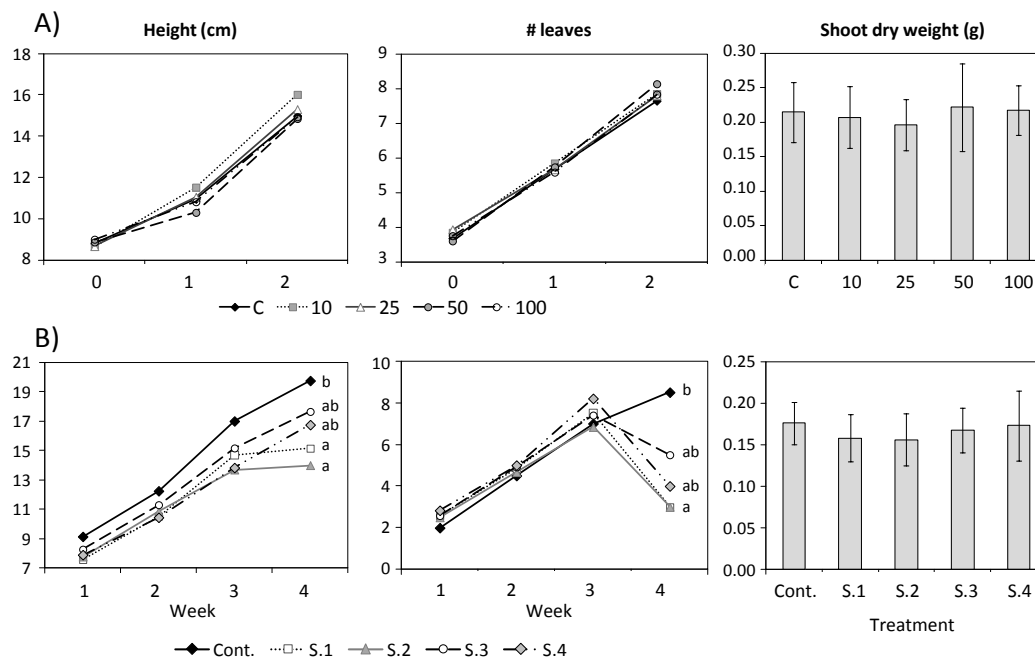


Fig. 4. Height and number of leaves throughout the two bioassays and shoot dry weight. On top (A) results of bioassay with BaP, at the bottom (B) results of bioassay with landfill soils. Different letters in graphics indicate significant differences (95 %) between treatments. Error bars show standard deviation.

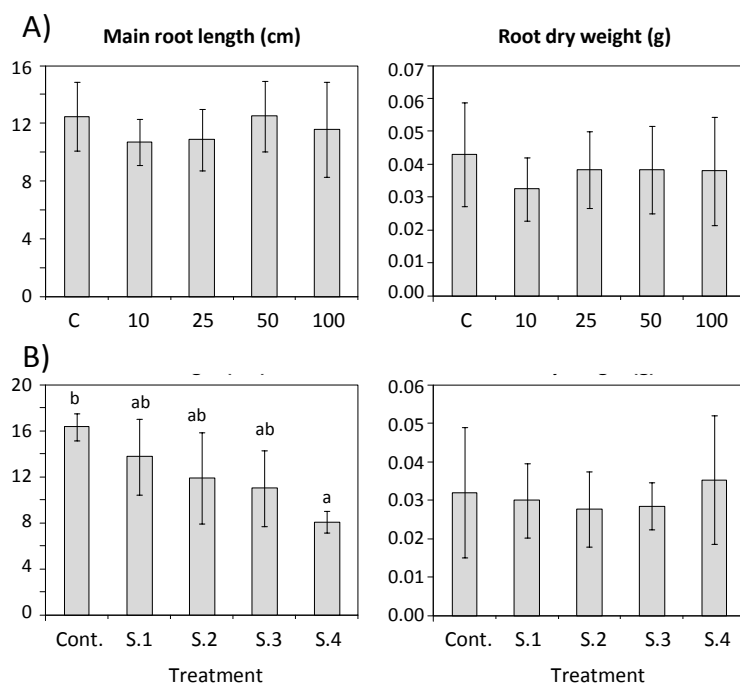


Fig 5. Root length (cm) and dry weight (g). On top (A) results of bioassay with BaP, at the bottom (B) results of bioassay with landfill soils. Different letters in graphics indicate significant differences (95 %) between treatments.

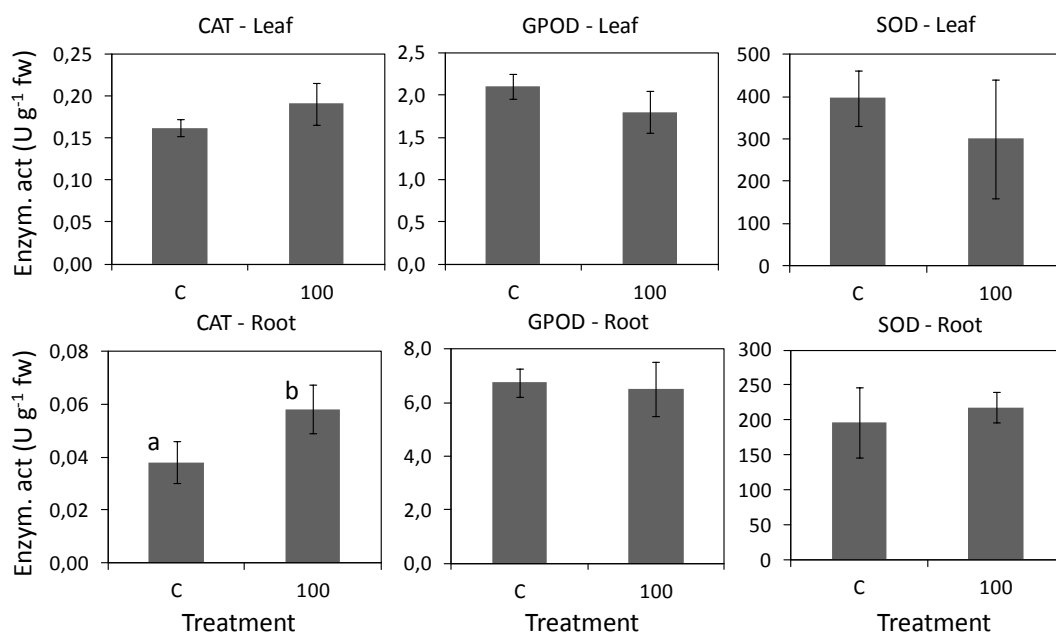


Fig 6. Catalase (CAT), guaiacolperoxidase (GPOD) and superoxide dismutase (SOD) activities in leaves and roots of lupins grown in control and 100 mg kg<sup>-1</sup> BaP treatments. The error bars show standard deviation. Different letters mean significant differences (95%).

Table 3. pH, organic matter (O.M, %), nitrogen (%), P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, exchangeable Ca, Na, K and Mg, pseudo-total (T) and bioavailable (B) contents of metals and other traces of elements (mg kg<sup>-1</sup>) in landfill soils used in the bioassay. Plant cover (Co, %) in sites where soils were collected.

Treat.	Co	pH	O.M	N	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	Ca	K	Mg	Na	Cu	Zn	Pb	Cd	Cr	Ni	As	Hg
C	-	7.4	1.9	0.13	42	3264	341	138	8.3	T 10 B 1.9	24 2.2	8 4	0.0 0.0	5.4 0.0	6.8 0.0	<15	-
S-1	94	7.6	4.0	0.22	46	5250	566	158	7.7	T 137 B 27	92 37	37 17	17 5.6	9.2 0.2	7.9 0.9	16	1.2
S-2	87	7.7	5.3	0.25	12	5839	348	194	16	T 84 B 26	126 26	121 31	1.8 1.3	15 0.4	13 0.9	<15	1.4
S-3	82	6.8	9.8	0.55	99	4287	413	345	38	T 285 B 142	811 426	194 74	2.6 1.3	31 0.7	39 6.2	<15	1.2
S-4	58	7.7	4.2	0.21	16	3436	243	110	16	T 1473 B 150	2873 266	3004 928	2.1 0.7	391 4.9	105 1.5	379	0.2

Table 4. Organic pollutant concentration (mg kg<sup>-1</sup>). Only those pollutants with concentration higher than maximum allowed in soils by Spanish law are shown. HC, total hydrocarbons.

Soil	HC mg kg <sup>-1</sup>	PCB mg kg <sup>-1</sup>	Phenols mg kg <sup>-1</sup>	Insecticides mg kg <sup>-1</sup>	PAH mg kg <sup>-1</sup>
S-1	54		0.02	Pentachlorophenol ( <i>p,p'</i> -DDD)	0.06
S-2	251	0.17		Dieldrin	1.4
S-3	274	0.19		Dieldrin	2.7
S-4	317	0.07	0.03	Pentachlorophenol	2.9 0.77 0.45

Table 5. Metal contents (mg kg<sup>-1</sup>) in *L. luteus* grown in landfill soils. Mean ± standard deviation. Different letters in each column and each plant part indicate significant differences (95 %).

Treat.	Cu	Zn	Pb	Cd	Cr	Ni	Al	Fe	Mn
<i>Leaves</i>									
C	20 ± 2.0 a	52 ± 5.5 a	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0 a	5.2 ± 1.0 a	0.0 ± 0.0	59 ± 14	89 ± 21	21 ± 9.0
S-1	22 ± 4.0 a	75 ± 7.9 a	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.4 ab	6.0 ± 0.2 ab	0.0 ± 0.0	83 ± 34	89 ± 13	11 ± 3.1
S-2	28 ± 4.2 ab	92 ± 4.6 a	0.0 ± 0.0	1.1 ± 0.3 b	6.3 ± 0.4 ab	0.0 ± 0.0	43 ± 16	66 ± 6.9	14 ± 3.8
S-3	29 ± 3.0 ab	219 ± 36 b	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0 a	6.8 ± 0.3 ab	0.0 ± 0.0	57 ± 21	103 ± 11	27 ± 22
S-4	36 ± 4.7 b	179 ± 17 b	3.9 ± 6.7	0.0 ± 0.0 a	7.5 ± 0.2 b	0.0 ± 0.0	44 ± 16	184 ± 126	28 ± 14
<i>Stems</i>									
C	22 ± 4.3	37 ± 7.0 a	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0 a	7.0 ± 1.1	0.0 ± 0.0	217 ± 40 b	198 ± 39 b	17 ± 4.6
S-1	31 ± 5.7	102 ± 45 ab	5.9 ± 10	3.6 ± 0.5 b	10 ± 2.2	0.0 ± 0.0	217 ± 39 b	177 ± 39 ab	20 ± 4.8
S-2	30 ± 6.3	67 ± 1.3 a	0.0 ± 0.0	4.1 ± 0.8 b	9.2 ± 2.8	0.0 ± 0.0	102 ± 10 a	81 ± 9.7 a	9.6 ± 1.9
S-3	24 ± 4.2	166 ± 20 b	0.0 ± 0.0	0.7 ± 0.6 a	8.3 ± 0.3	0.0 ± 0.0	132 ± 30 ab	115 ± 20 ab	12 ± 2.9
S-4	33 ± 7.5	152 ± 27 b	18 ± 11	0.3 ± 0.4 a	8.5 ± 0.5	0.0 ± 0.0	70 ± 17 a	186 ± 52 b	24 ± 9.3
<i>Roots</i>									
C	30	71	0.0	0.0	18	8.4	8699	4429	147
S-1	40	84	7.4	9.9	17	11	9697	4491	83
S-2	54	116	31	13	16	8.1	5838	3077	66
S-3	122	553	49	5.0	23	18	4459	2807	101
S-4	346	666	697	5.9	37	14	2147	8212	194

Table 6. Nutrient contents (mg kg<sup>-1</sup>) in *L. luteus* grown in landfill soils. Mean  $\pm$  standard deviation. Different letters in each column and each plant part indicate significant differences (95 %).

Treat.	Ca	Mg	Na	K
<i>Leaves</i>				
C	10919 $\pm$ 1705	a 4286 $\pm$ 199	ab 493 $\pm$ 88	a 40618 $\pm$ 2832
S-1	12305 $\pm$ 2313	ab 3879 $\pm$ 210	a 566 $\pm$ 190	a 43210 $\pm$ 4150
S-2	17294 $\pm$ 2292	b 5111 $\pm$ 58	c 2419 $\pm$ 197	c 48943 $\pm$ 2765
S-3	13127 $\pm$ 2366	ab 4807 $\pm$ 324	bc 1413 $\pm$ 178	b 39993 $\pm$ 3135
S-4	15538 $\pm$ 1925	ab 4945 $\pm$ 260	bc 1934 $\pm$ 332	bc 49003 $\pm$ 2349
<i>Stems</i>				
C	12372 $\pm$ 2342	5747 $\pm$ 542	a 1284 $\pm$ 279	a 55661 $\pm$ 5060
S-1	11084 $\pm$ 2246	5891 $\pm$ 271	ab 1203 $\pm$ 504	a 57002 $\pm$ 6581
S-2	15228 $\pm$ 1996	7261 $\pm$ 237	ab 5123 $\pm$ 1755	b 56106 $\pm$ 849
S-3	13700 $\pm$ 2401	7946 $\pm$ 1090	b 5235 $\pm$ 433	b 52583 $\pm$ 6473
S-4	12739 $\pm$ 3164	6063 $\pm$ 977	ab 4659 $\pm$ 118	b 53050 $\pm$ 5832
<i>Roots</i>				
C	7101	8636	2347	16791
S-1	8912	6595	2104	13876
S-2	10671	8429	5035	10639
S-3	7553	8261	3714	8197
S-4	7180	8203	5854	10628

roots decreases in stems and leaves, although it still exists. Heavy metals usually inhibit the uptake of nutrients, being one important reason of their toxicity (Bannister 1976; Leclerc 2003). However, as the plant's nutritional state (shown in table 6) does not appear to be related to pollution levels, this does not seem to apply to these plants.

### 3.3 Results with endophyte bacteria

Cultivable endophytes were isolated from lupin plants in both experiments (tables 7 and 8). In experiment (A), with BaP, the amount of colonies in root and shoots was lower in BaP treatment than in control plants, but the number of different strains was lower in control. 45 bacterial strains from roots and shoots in both treatments were isolated. In experiment (B), with landfill soils, soil cultivable bacteria as well as root endophytes were isolated. Unlike the results in the first bioassay, shoot endophytes were not found. Bacteria might have had difficulties in colonizing leaf tissues in such bad condition, due to the observed toxicity. There seems to be no relation between (1) the number of colonies and of different strains and (2) the treatment. The uppermost quantity of colonies and different strains was in roots and soil from site 3, where the organic matter percentage, as well as nitrogen and phosphorous concentration in soil are the highest (table 3). Number of colonies and different strains were higher in soils than in roots at sites 1,2 and 3, but this was not

Table 7. Colony forming units (cfu g<sup>-1</sup>), numbers of strains of endophytes of *L. luteus* grown in increasing BaP concentrations and numbers of strains that resulted positive in plant growth promoting tests and BaP tolerance and degradation tests.

Treatment	Plant part	cfu g <sup>-1</sup>	# strains	Plant growth promoting			BaP tolerant	Possible BaP degrader
				IAA	OA	Sid		
Control	Aérea	9,6 x10 <sup>3</sup>	12	6	5	6	10	0
	Raíz	7,3 x10 <sup>5</sup>	8	5	5	5	8	1
100	Aérea	1,7 x10 <sup>3</sup>	14	7	6	6	14	0
	Raíz	3,3 x10 <sup>5</sup>	11	5	7	9	11	1

Table 8. Colony forming units (cfu g<sup>-1</sup>), numbers of strains of endophytes of *L. luteus* grown in landfill soils and percentages of strains that resulted positive in plant growth promoting tests and tolerance and degradation tests.

Treatment		cfu g <sup>-1</sup>		# strains	Plant growth promoting		
		24 h	7 d		IAA	OA	Sid
S-1	Shoot	-	-	-	-	-	-
	Root	3,7 x10 <sup>4</sup>	9,6 10 <sup>5</sup>	14	22	0	11
	Soil	4,4 x10 <sup>5</sup>	6,9 10 <sup>6</sup>	17	0	0	0
S-2	Shoot	-	-	-	-	-	-
	Root	4,3 x10 <sup>4</sup>	2,5 10 <sup>5</sup>	11	22	11	22
	Soil	3,9 x10 <sup>5</sup>	8,0 10 <sup>6</sup>	17	25	0	0
S-3	Shoot	-	-	-	-	-	-
	Root	2,8 x10 <sup>5</sup>	5,4 10 <sup>6</sup>	18	8	0	8
	Soil	1,8 x10 <sup>6</sup>	1,7 10 <sup>7</sup>	23	25	6	6
S-4	Shoot	-	-	-	-	-	-
	Root	1,8 x10 <sup>5</sup>	4,9 10 <sup>6</sup>	16	7	7	0
	Soil	1,0 x10 <sup>5</sup>	5,2 10 <sup>6</sup>	11	12	12	12

Treatment		Tolerant			Possible degrader		
		Gasoil	A.1242	A.1260	Gasoil	A.1242	A.1260
S-1	Root	100	80	100	20	0	20
	Soil	50	50	66	50	0	25
S-2	Root	66	30	50	0	0	0
	Soil	100	100	100	33	0	33
S-3	Root	88	88	88	30	11	11
	Soil	100	89	100	22	0	0
S-4	Root	67	83	100	17	0	0
	Soil	100	100	100	25	25	25

observed at site 4. 127 different strains were isolated in this bioassay. The amount of different cultivated actinobacteria strains decreased in most polluted soils. 4 strains were found in soil 1 and 1 in soil 4. These organisms were never found in roots. Bacilli with spores, probably of *Bacillus* genera, were found in all soil and root samples, although they were more frequent in the former. Both gram-positive and gram-negative cocci and bacilli were also found, being gram-negative bacilli more frequent in roots than in soils.

Plant growth promoting tests, as well as tolerance and BaP degrading potential tests, were performed to all the strains isolated in the bioassay (A) (table 7). Table shows the number of strains that resulted positive in the indicated tests. The amount

---

of strains with the ability of promoting plant growth is high, in fact 40/45 were positive in any test, and 6 of them (13 %) were positive in all tests. The strains named as “BaP tolerant” are those that grew in MMC+BaP medium. Those named as “potentially BaP degrader” grew in MM+BaP medium without or hardly growing in MM medium. In this case, the strain may use the pollutant as a sole carbon source, but we cannot consider this result as definitive. Since no bacteria were inoculated in lupins of this experiment, bacteria originated from seeds or were exogenous of substrate, and thus not adapted to medium with this pollutant. Therefore, it was expected to find low tolerance to BaP, and rarely to find strains growing in BaP as a sole carbon source. However, almost all strains (96 %) were tolerant to this pollutant, since they grew in media enriched with BaP. Two strains grew in a medium with BaP as sole carbon source, hardly growing in salt medium without carbon. Results show no difference between strains isolated from non polluted and polluted treatments.

Not all strains isolated of experiment (B) grew after the glycerol stock. In addition, only pure cultures were used in tests. That is why, in table 8, the percentages of strains being positive in any test is presented. The plant growth promoting strains greatly decrease in comparison with those isolated in the first bioassay. In this case, the maximum percentage of growth promoting strains in each treatment is 25 %, and only 1 (gram-negative bacillus) was positive in all of them. Due to the age of the landfill soil sealing (about 30 years), tolerance of strains to chosen pollutants (diesel, Aroclor 1242 and Aroclor 1260) was expected. We were also hopeful of finding any strain able to grow in medium with pollutants as sole carbon source. Percentage of strains tolerant to any pollutant is very high. With the exception of treatment with soil 1, percentage of tolerant strains is higher in those isolated from soil than in those isolated from roots. It can also be highlighted the numbers of strains with degrading potential. In this experiment, 9 strains grew in medium with any pollutant as sole carbon source without growing in salt medium without any carbon. This fact was more evident in the case of diesel. For this reason, these strains may have the ability to metabolize any of these organic pollutants. 2 of them are actinobacteria, the rest of them are gram-positive bacilli or coccobacilli from soils and roots.

## 4. Discussion

### 4.1 Response of yellow lupin and its endophytes to pollution conditions

Tolerance of lupin and its endophytes to BaP exposure, even at the highest concentration of 100 mg kg<sup>-1</sup>, suggests that the bioavailability of this pollutant is very low. In fact, the high octanol-water partition coefficient ( $\log K_{ow} = 6.04$ ) indicates that it is retained in substrate particles or in cell walls. In this way, BaP is not able to get in the plant or affect its metabolism. The review of Juhasz and Naidu (2000) indicates that high molecular weight PAHs are considered genotoxic and those with lower molecular weight can cause acute toxicity. That is why effects could have been possibly observed in next generations. In spite of those considerations, other authors did prove negative effects of this compound in plants. Wittig et al. (2003) showed a decrease in growth of poplar cuttings exposed to 10 mg kg<sup>-1</sup> BaP. Li et al. (2006) also demonstrated that dry weight of vetiver roots grown in soils with 100 mg kg<sup>-1</sup> of this pollutant was lower than that of control plants. The latter authors, as well as Tao et al. (2004) detected BaP in plant tissues when grown in soils polluted with BaP and other organic compounds. This indicates that this compound is available under certain conditions, even if their physicochemical characteristics indicate otherwise. The work of Tao et al. also showed that it can move along the plant, as it was detected in shoots. In fact, Olson et al. (2003) mention some plant roots can segregate surfactant compounds that increase the water solubility of organic pollutants.

In experiment with real landfill soils polluted by heavy metals and organic compounds, lupins did suffer an effect in their growth, even in those soils with the lowest level of pollution. This fact may indicate what has been emphasized in recent years: the complex relationship between pollution and soil characteristics significantly influences the toxicity on organisms. This has been proved in soils polluted only by metals (Gutiérrez-Ginés et al., 2012), or only by organics (Labud et al., 2007). In addition, apart from the kind of pollution and soil properties, experimental conditions in controlled bioassays should also be kept in mind, as shown by Efroymsen et al. (2004) in the case of hydrocarbons.

The general decrease of plant growth promoting capacity in those strains isolated of experiment with landfill soils, compared with those of the bioassay with BaP, may

point out that lupin endophytes are not adapted to metal concentration in roots and shoots, cannot grow and, therefore, most of isolated root endophytes must have colonized root tissues from soil.

Even though preliminary degrading tests have demonstrated promising results (with some strains with potential of using organic pollutants as sole carbon source), those are not conclusive. Further exhaustive degradation assays (like those described by Atlas and Bartha, 2002) should be necessary to corroborate and quantify these observations. In fact, 2 strains of the first bioassay grew in MM+BaP having hardly grown in MM may indicate the use of this pollutant as sole carbon source. However, it is difficult to assure this ability in a bacterium, as (up to our knowledge) this has never been described before. In any case, the fact of isolating 9 strains with organic pollutant degrading potential, three of which could also promote plant growth, encourages us to perform further experiments of phytoremediation of co-polluted soils. The screening tests for identifying bacteria with potential of using pollutants as sole carbon source, do not exclude the possibility of studying other strains with the ability of degrading organic compounds in the presence of other carbon sources by co-metabolism. As it is described in various reviews about biodegradation (Juhasz and Naidu, 2000; Haritash and Kaushik, 2009; Mackova et al., 2006; Kanaly and Harayama, 2000), high molecular weight compounds (as PAH with more than 4 aromatic rings) and highly chlorinated PCBs are usually degraded this way. However, although this is a valid strategy, degrading pollutants as a sole carbon source is desirable in order to produce CO<sub>2</sub>, water and cell biomass as a result. Secondary metabolites are sometimes more toxic than those that we try to remediate (Pašková et al., 2006) and in case of co-metabolism we cannot assure their total degradation.

#### **4.2 Considerations for phytoremediation of heavy metal and organic co-polluted soils**

The poor growth of yellow lupin, its leaf symptoms (chlorosis and necrosis) and the lack of vigour were evident even in the least polluted soil. In addition, this damage in tissues could have made the colonization of endophytic bacteria impossible. That is why the use of this species in phytoremediation studies cannot be recommended in alkaline soils and Mediterranean environment. However, the whole set of results



provides considerations that should be taken into account when proposing realistic studies about remediation of sites as the one described here.

Pollution conditions found in the landfill are extremely complex, due to the heterogeneous distribution and concentration of all kind of pollutants present in this site (set of heavy metals and several families of organic compounds). In addition, the diversity of environments that makes up this site is important: flat and elevated areas, slopes with different aspects and discharge areas with higher moisture. This problem has also been described in other sealed landfill sites, where plant communities demonstrate to reflect this complexity (Hernández et al., 2008). Microorganism communities also show effects depending on the different conditions of soil pollution, as exposed by Pérez-Leblic et al. (2012) in soils of this same landfill. Gómez et al. (2011) also demonstrated how soil communities in a landfill vary depending on pollution as well as depth.

Results of endophytes and soil bacteria have been promising, and suggest future studies to test the real capacity of organic compound degradation. We should also check the performance of these bacteria in field trials, in the same ways that other authors have tried in other environments with similar co-pollution problems (Weyens et al., 2009c, 2010a, 2010b, 2011). However, isolated strains from different treatments do not seem to share common traits (colony morphology, type of cells observed by optical microscopy and phenotypic characteristics demonstrated in tests), which may mean that bacteria populations change from one point to another in the same landfill. This points out that results from one area cannot be easily extrapolated to other areas, even within the same site.

We emphasize again the importance of testing in the field the effectiveness of greenhouse results. Some obviated factors in the greenhouse may be fundamental for phytoremediation in the field: topographic factors (with more or less pronounced slopes), climatologic factors (as in Mediterranean environments with strong summer drought) and, above all, competition of native communities. As Gerhardt et al. (2009) indicates, wild communities are usually considered as competitors of chosen species for phytoremediation, which frequently leads to failure. Even if native communities contribution to phytoremediation can be fundamental (pollutant uptake and bioremediation), they are not commonly

considered, due to the difficulty of cultivation and management for experimentation. Also notable is the close relationship between the plant and the microbial community, as it is put forward by Olson et al. (2003), and proved by the experiment of Barrutia et al. (2011). The heterogeneous distribution of pollution, soil properties and native communities makes the complex problem of landfill co-polluted soils difficult to solve. All of these considerations make clear that phytoremediation studies are dependent on specific contexts, and results can hardly be extrapolated to other sites. However, methodologies and strategies, as these about phytoremediation with endophytic bacteria could be used in other sites with heavy metal and organic compound co-polluted soils.

## 5. Conclusions

The great heterogeneity in distribution and composition of soil pollution in the landfill described in this work indicates the complex problem that has to be faced when characterizing and studying remediation strategies in this site. There are numerous areas along this landfill with high concentration of heavy metals as well as organic compounds of all analysed families.

Yellow lupin (*Lupinus luteus* L.) was not affected by increasing concentrations of BaP (dangerous organic compound and frequently detected in soils of this landfill). However, its growth decreased when exposed to landfill soils, even in that with the lowest metal and organic pollution. For this reason, this plant species cannot be suggested for phytoremediation studies in soils with this kind of pollution in Mediterranean environment.

This is the first time that a phytoremediation study in landfills of Mediterranean environments takes into account the endophytic bacteria. The preliminary study of this technique produced good results, as endophytes from roots and shoots of lupins grown in BaP polluted substrate were isolated. On the contrary, it was not possible to find them in shoots of lupin grown in landfill soils, as a consequence of the poor conditions of leaf tissues due to the toxicity. But they were isolated from roots and soils, even from the most polluted by heavy metals and organics. The initial results with these isolated strains indicated that 1 of them has a high capacity

of improving plant growth. In addition, 9 strains grew in media with organic pollutants as sole carbon source.

These discoveries encourage us to continue the research with these strains to know their real organic pollutant degradation capacity, and the possibility to use them in field experiments. Future research cannot ignore landfill real conditions: huge heterogeneity of pollution, even in sites very close to each other; great variety of edaphic factors and different environments within the site (slopes, flat areas and discharge areas), native plant and microorganism communities that greatly vary according to the latter factors, and which the establishment of other interesting species for phytoremediation (herbs and bacteria) will depend on. Taking into account this great variety of abiotic and biotic factors in a site is fundamental for the success of phytoremediation studies.

### **Acknowledgements**

Authors acknowledge the projects CTM 2008-04827/TECNO of Spanish Science and Innovation Ministry, P2009/AMB-1478 Community of Madrid Program (EIADES). They also thank Dr. Jaco Vangronsveld and Dr. Nele Weyens for their help and the support of laboratory staff of Centre for Environmental Sciences of Hasselt University (Belgium). Moreover, we appreciate the collaboration of Dr. M<sup>a</sup> Isabel Pérez-Leblic and laboratory staff of Microbiology and Parasitology Unit, Biomedical Sciences Department of Alcalá University (Spain). MJGG was funded by the FPU fellowship (AP2008-02934) of Spanish Education Ministry.

### **References**

- Adarve MJ, Hernández AJ, Gil A, Pastor J. 1998. B, Zn, Fe and Mn content in four grassland species exposed to landfill leachates. *Journal of Environmental Quality*, 27: 1286-1293.
- Atlas RM, Bartha R. 2002. *Ecología microbiana y Microbiología ambiental*. Ed. Pearson Educación SA, Madrid.
- Bannister P. 1976. *Introduction to physiological plant ecology*. Ed. Blackwell, Oxford
- Barac T, Taghavi S, Borremans B, Provoost A, Oeyen L, Colpaert JV, Vangronsveld J, van der Lelie D. 2004. Engineered endophytic bacteria improve phytoremediation of water-soluble, volatile, organic pollutants. *Nature Biotechnology*, 22: 583-588.
- Barrutia O, Garbisu C, Epelde L, Sampedro MC, Goicolea MA, Becerril JM. 2011. Plant tolerance to diesel minimizes its impact on soil microbial characteristics during rhizoremediation of diesel-contaminated soils. *Science of the Total Environment*, 409: 4087-4093.

- Bergmeyer HU, Gawenn K, Grassl M. 1974. Enzymes as biochemical reagents. In: HU Bergmeyer (Ed.) *Methods in Enzymatic Analysis*. Ed. Academic Press, New York, pp. 425–522.
- BOE. 1990. RD 1310/1990. Real Decreto 1310/1990 de 29 de octubre, por el que se regula la utilización de los lodos de depuración en el sector agrario. Boletín Oficial del Estado del 1 de noviembre de 1990.
- BOE. 2005. Real Decreto 9/2005, de 14 de enero, por el que se establece la relación de actividades potencialmente contaminantes del suelo y los criterios y estándares para la declaración de suelos contaminados.
- Burken J. 2003. Uptake and metabolism of organic compounds: green-liver model. In: SC McCutcheon, JL Schnoor. (Eds.) *Phytoremediation: Transformation and Control of Contaminants*. Ed John Wiley and Sons, Hoboken, New Jersey, pp 59-84.
- Chekol T, Vough LR, Chaney RL. 2004. Phytoremediation of polychlorinated biphenyl-contaminated soils: the rhizosphere effect. *Environment International*, 30: 799– 804.
- Cunningham JE, Kuiack C. 1992. Production of Citric and Oxalic Acids and Solubilization of Calcium Phosphate by *Penicillium bilaii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 58 (5): 1451-1458.
- Effroymsen RA, Sample BE, Peterson MJ. 2004. Ecotoxicity Test Data for Total Petroleum Hydrocarbons in Soil: Plants and Soil-Dwelling Invertebrates. *Human and Ecological Risk Assessment*, 10: 207-231.
- Gomez AM, Yannarell AC, Sims GK, Cadavid-Restrepo G., Moreno Herrera CX. 2011. Characterization of bacterial diversity at different depths in the Moravia Hill landfill site at Medellín, Colombia. *Soil Biology & Biochemistry*, 43: 1275-1284.
- Gerhardt K, Huang XD, Glick BR, Greenberg BM. 2009. Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: Potential and challenges. *Plant Science*, 176: 20-30.
- Gutiérrez-Ginés M J, Pastor J, Hernández A J. 2012. Integrated approach to assessing the effects of soils polluted with heavy metals on a plant population. *Ecotoxicology*, 21: 1965-1978.
- Haritash AK, Kaushik CP. 2009. Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. *Journal of Hazardous Materials*, 169: 1–15.
- Hayashi S, Kobayashi T, Honda H. 2003. Simple and rapid cell growth assay using tetrazolium violet coloring method for screening of organic solvent tolerant bacteria. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 96(4): 360-363.
- Hernández AJ, Pastor J. 1989. Técnicas analíticas para el estudio de las interacciones suelo-planta. Henares. *Revista de Geología*, 3: 67-102.
- Hernández AJ, Bartolomé C (Eds). 2010. *Estudio multidisciplinar de vertederos sellados. Diagnóstico y pautas de recuperación*. Ed. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares.

- Hernández AJ, Adarve MJ, Pastor J. 1998. Some impacts of urban waste landfills on Mediterranean soils. *Land Degradation & Development*, 9: 21-33.
- Hernández AJ, Adarve MJ, Gil A, Pastor J. 1999. Soil salination from landfill leachates: effects on the macronutrient content and plant growth of four grassland species. *Chemosphere*, 38: 1693-1711.
- Hernández AJ, Bartolomé C, Álvarez J, Pastor J. 2008. Comunidades vegetales de antiguos vertederos sellados pastados por ovinos: caracterización botánica y suelos. In: P Fdez. Rebollo et al. (Eds.) *Pastos, clave en la gestión de los territorios*, Ed. Consejería de Agricultura y Pesca, Junta de Andalucía, pp. 143-149.
- Hernández AJ, Pérez-Leblic MI, Bartolomé C, Rodríguez J, Álvarez J, Pastor J. 2012. Ecotoxicological diagnosis of a sealed municipal landfill. *Journal of Environmental Management*, 95: S50-S54.
- Juhasz AL, Naidu R. 2000. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 45: 57-88.
- Kanally RA, Harayama S. 2000. Biodegradation of High-Molecular-Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Bacteria. *Journal of Bacteriology*, 182: 2059-2067.
- Labud V, García C, Hernández T. 2007. Effect of hydrocarbon pollution on the microbial properties of a sandy and a clay soil. *Chemosphere*, 66: 1863-1871
- Lakanen E, Ervio R. 1971. A comparison of eight extractants for the determination of plant available micronutrients in soils. *Acta Agricultura Fennica*, 123: 223-232.
- Leclerc JC .2003. *Plant ecophysiology*. Ed. Science Publishers Inc, New Hampshire.
- Li H, Luo YM, Song J, Wu LH, Christie P. 2006. Degradation of benzo[a]pyrene in an experimentally contaminated paddy soil by vetiver grass (*Vetiveria zizanioides*). *Environmental Geochemistry and Health*, 28: 183-188.
- Mackova M, Barriault D, Francova K, Sylvestre M, Möder M, Vrchotova B, Lovecka P, Najmanova J, Demnerova K, Novakova M, Rezek J, Macek T. 2006. Phytoremediation of polychlorinated biphenyls. In: M Mackova, DL Dowling, T Macek (Eds.) *Phytoremediation and Rhizoremediation*, Ed. Springer, Dordrecht, The Netherlands. pp 143-167.
- Mayer AM. 1958. Determination of indole acetic acid by the Salkowsky reaction. *Nature*, 182: 1670-1671.
- McCord J, Fridovich I. 1969. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocyte peroxidase (hemocuprein). *Journal of Biological Chemistry*, 244: 6049-6055.
- Meng L, Qiao M, Arp HPH. 2011. Phytoremediation efficiency of a PAH-contaminated industrial soil using ryegrass, white clover, and celery as mono- and mixed cultures. *Journal of Soils and Sediments*, 11 (3): 482-490.

- Mergeay M, Nies D, Schlegel HG, Gerits J, Charles P, Van Gijsegem F (1985) *Alcaligenes eutrophus* CH34 is a facultative chemolithotroph with plasmid-bound resistance to heavy metals. *Journal of Bacteriology*, 162: 328–334.
- Millán R, Gamarra R, Schmid T, Sierra MJ, Quejido AJ, Sánchez DM, Cardona AI, Fernández M, Vera R. 2006. Mercury content in vegetation and soils of the Almadén mining area (Spain). *Science of The Total Environment*, 368(1): 79-87.
- Olson PE, Reardon KF, Pilon-Smits EAH. 2003. Ecology of rhizosphere bioremediation. In: SC McCutcheon, JL Schnoor (Eds.) *Phytoremediation: Transformation and Control of Contaminants*. Ed John Wiley and Sons, Hoboken, New Jersey, pp 317 - 353.
- Pašková V, Hilscherová K, Feldmannová M, Bláha L. 2006. Toxic effects and oxidative stress in higher plants exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons and their *N*-heterocyclic derivatives. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25 (12): 3238–3245.
- Pastor J, Hernández AJ. 2002. Evaluation of the suitability of two grass species for phytoremediation of contaminated soils from landfills under field and experimental conditions. In: JL Rubio et al. (Eds.) *Man and Soil at the Third Millennium*. Ed. Geoforma, Logroño, pp. 1687-1701.
- Pastor J, Hernández AJ. 2012. Heavy metals, salts and organic residues in old solid urban waste landfills and surface waters in their discharge areas: determinants for restoring their impact. *Journal of Environmental Management*, 95: S42-S49.
- Pastor, J.; Urcelay, A.; Oliver, S. and Hernández, A. J. 1993. Impact of Municipal Waste on Mediterranean Dry Environments. *Geomicrobiology Journal*, 11: 247-260.
- Pérez-Leblic MI, Turmero A, Hernández M, Hernández AJ, Pastor J, Ball AS, Rodríguez J, Arias ME. 2012. Influence of xenobiotic contaminants on landfill soil microbial activity and diversity. *Journal of Environmental Management*, 95: S285–S290.
- Sandrin TR, Maier RM. 2003. Impact of metals on the biodegradation of organic pollutants. *Environmental Health Perspectives*, 111: 1093-1101.
- Schwyn B, Neilands B. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical biochemistry*, 160: 47–56
- Schlegel HG, Daltwasser H, Gottschal G. 1961. Ein sumbersverfahren zur kultur assert offoxidierender bacterien: Wachstum physiologische untersuchungen. *Archives in Microbiology*, 38: 87–98.
- Tao S, Cui YH, Xu FL, Li BG, Cao J, Liu WX, Schmitt G, Wang XJ, Shen WR, Qing BP, Sun R. 2004. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in agricultural soil and vegetables from Tianjin. *The Science of the Total Environment*, 320: 11–24.
- Urcelai A, Hernández AJ, Pastor J. 2000. Biotic indices based on soil nematode communities for assessing soil quality in terrestrial ecosystems. *The Science of the Total Environment*, 247: 253-261.
- Vangronsveld J, Clijsters H. 1994. Toxic effects of metals. In: Farago M (Ed.) *Plants and the Chemical Elements*. Ed. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, pp. 149–177.

Walsh LM, Soil Science Society of America. 1971. *Instrumental Methods for analysis of soils and plant tissue*. Ed. Soil Science Society of America, Wisconsin, US, VII, 334.

Weyens N, van der Lelie D, Taghavi S, Vangronsveld J. 2009a. Phytoremediation: plant-endophyte partnerships take the challenge. *Current Opinion in Biotechnology*, 20: 248-254.

Weyens N, van der Lelie D, Taghavi S, Newman L, Vangronsveld J. 2009b. Exploiting plant-microbe partnerships to improve biomass production and remediation. *Trends in Biotechnology*, 27 (10): 591-598.

Weyens N, van der Lelie D, Artois T, Smeets K, Taghavi S, Newman L, Carleer R, Vangronsveld J. 2009c. Bioaugmentation with Engineered Endophytic Bacteria Improves Contaminant Fate in Phytoremediation. *Environmental Science & Technology*, 43 (24): 9413-9418.

Weyens N, Croes S, Dupae J, Newman L, van der Lelie D, Carleer R, Vangronsveld J. 2010a. Endophytic bacteria improve phytoremediation of Ni and TCE co-contamination. *Environmental Pollution*, 158: 2422-2427.

Weyens N, Truyens S, Dupae J, Newman L, Taghavi S, van der Lelie D, Carleer R, Vangronsveld J. 2010b. Potential of the TCE-degrading endophyte *Pseudomonas putida* W619-TCE to improve plant growth and reduce TCE phytotoxicity and evapotranspiration in poplar cuttings. *Environmental Pollution*, 158: 2915-2919.

Weyens N, Truyens S, Saenen E, Boulet J, Dupae J, Taghavi S, van der Lelie D, Carleer R, Vangronsveld J. 2011. Endophytes and their potential to deal with co-contamination of organic contaminants (toluene) and toxic metals (nickel) during phytoremediation. *International Journal of Phytoremediation*, 13: 244-255.

Weyens N, Boulet J, Adriaensen D, Timmermans JP, Prinsen E, Van Oevelen S, D'Haen J, Smeets K, van der Lelie D, Taghavi S, Vangronsveld J. 2012. Contrasting colonization and plant growth promoting capacity between wild type and a gfp-derivative of the endophyte *Pseudomonas putida* W619 in hybrid poplar. *Plant and Soil*, 356: 217-230.

Wittig R, Ballach HJ, Kuhn A. 2003. Exposure of the Roots of *Populus nigra* L. cv. Loenen to PAHs and its Effect on Growth and Water Balance. *Environmental Science and Pollution Research*, 10 (4): 235 - 244.

Whitfield Åslund ML, Zeeb BA, Rutter A, Reimer KJ. 2007. In situ phytoextraction of polychlorinated biphenyl - (PCB) contaminated soil. *Science of the Total Environment*, 374: 1-12.

# Chapter 7

---

**Contents of heavy metals and trace elements in native plant species growing in abandoned mine sites: tolerant species and accumulator species in polluted soils**





This chapter reproduces the manuscript:  
Gutierrez-Ginés MJ, Pastor J, Henández AJ. *Journal of  
Environmental Sciences* (**submitted**)

## Contents of heavy metals and trace elements in native plant species growing in abandoned mine sites: tolerant species and accumulator species in polluted soils

### Abstract

There are many abandoned mine sites in Central Spain with soils highly polluted by metals and other trace elements in their top layers (0-10 cm). Nevertheless, plant communities of Mediterranean grasslands develop over them, and are grazed by cattle and sheep. These sites are the object of study in this work. 191 soil samples collected from 8 referred sites have been chemically tested. Although composition depends generally on the exploited mineral, most soils show more than one heavy metal at higher concentration than allowed. Moreover, Cu, Zn, Pb, Cd, As, Al and Mn were analyzed in above-ground parts of 171 grass species and 16 woody species of these grasslands. Presented results provide minimum and maximum values of these elements in each plant species. Metal accumulation capacity of grass species was assessed by the RDB index (Relative deviation to background values).

It can be stated that all analyzed species are tolerant to the stress caused by soil pollution in the areas where they grew. Poaceae and Asteraceae are the greatest accumulator families, especially the former for Cu, Zn, Pb and As. Only *Agrostis castellana* can be considered hyperaccumulator of Cu, Zn and Pb, also taking up As, Al and Mn. These results are interestingly useful for phytoremediation studies of polluted soils, as well as for toxicity studies concerning animals consuming these plants.

## **Contenidos de metales pesados y elementos traza en especies autóctonas que crecen en emplazamientos de minas abandonadas: especies tolerantes y acumuladoras en suelos contaminados**

### **Resumen**

Los emplazamientos de minas abandonadas en la zona centro de España presentan suelos con niveles altos de metales pesados y elementos traza en su capa superficial. No obstante, en ellos se ubican comunidades vegetales de pastos mediterráneos que son consumidos por ganado vacuno y ovino. Estos escenarios han constituido el objeto de estudio en este trabajo. Se presentan los análisis químicos realizados en un total de 191 muestras de suelo correspondientes a 8 de los emplazamientos referidos. En muchos de ellos hay más de un metal por encima de los niveles permitidos por la legislación, si bien esta composición depende del tipo de mineral que fue explotado. Así mismo se han analizado Cu, Zn, Pb, Cd, As, Al y Mn en las partes aéreas de 171 especies herbáceas y 16 leñosas que pertenecen a estos pastos. Los resultados aportan datos de mínimos y máximos de estos elementos en cada una de las especies. También se valora la capacidad de acumulación de metales en las especies herbáceas mediante el índice RDB.

Podemos decir que todas las especies analizadas son tolerantes para el ambiente estresante que presentan los suelos donde crecen, siendo las correspondientes a la familia de las Poáceas (gramíneas) y de las Asteráceas las más acumuladoras, especialmente las primeras para Cu, Zn, Pb y As. Solamente *Agrostis castellana* se ha revelado como hiperacumuladora esos metales además de Al y Mn). Todos estos resultados son de interés tanto para poder ser utilizados para técnicas de fitorremediación de suelos contaminados, como con fines de estudios de toxicidad que pueden provocar en los animales que consumen estas plantas.

## 1. Introduction

The abandonment of several mines in Central Iberian Peninsula has left an unexpected number of tailings and soils highly polluted by heavy metal levels and other trace elements. Plant communities that grow in these sites are composed mainly by grassland species, which are consumed by livestock or wild animals with conservation or hunting interest. This is the case of old mines in the Sierra de Guadarrama mountain range (Madrid).

The decrease in species diversity is the most evident impact of pollutants on plant communities, so it is the most common effect assessed in Environmental Impact Studies. Thus, the presence of a pollutant in a habitat affects either the area occupied by each species or the resources they use. These effects depend on the species level of tolerance or sensitivity to given pollutant (Pastor and Hernández, 2007). As a consequence, the modification on competition that pollutants can cause, may produce a disturbance in the balance between components of a community, which may lead to the elimination of the most sensitive populations. Therefore, distribution of species frequency will vary along a gradient of chronic pollution in an ecosystem.

In terrestrial ecosystems, knowledge of processes and interrelations in soil-plant system is essential to understand how it works and its perturbations. Some of these processes, like those that control heavy metal dynamics, are slow and complex. Some toxic elements are incorporated to food webs, causing possible direct effects on ecosystem health or human population welfare (Hernández et al., 2009). It is necessary to know in detail these aspects in order to suggest remediation and avoid consequences.

This work is part of a research line aimed to ecological restoration of sites with heavy metal polluted soils (Hernández and Pastor, 2008). For that purpose we intend i) to know the heavy metal, trace element and Al contents of topsoil layers in sites with abandoned mines, ii) to study the concentrations of these elements in plant species growing on those sites: tailings, slope breaks and other areas affected by both operations and runoffs from the former. This will lead to go deeply into the

native species that can be heavy metal phytoextractors and characterize them as tolerant and/or accumulator.

## 2. Material and methods

### 2.1. Mine sites and sampling

8 sites with old abandoned mines have been studied. They will be named after the municipalities where they are located. The main element exploited and UTM coordinates are indicated in parentheses after each municipality name. 5 sites are located in Community of Madrid, in municipalities of Garganta de los Montes (Cu, X=443297 Y= 4529867, 30 T, hereafter called Garganta), Bustarviejo (Ag, X=438423 Y=4524252, 30 T), Navas del Rey (Ba, X=393455 Y=4474405, 30T, henceforth named Navas), Colmenar del Arroyo (Pb, X=395182 Y=4474723, 30 T, referred as Colmenar) and Colmenarejo (Cu, X=415799 Y=4486912, 30 T). Their main characteristics are described in Fernández-Rubio (2007), Jiménez et al. (2004), Jiménez-Ballesta et al. (2009). The other 3 sites are located in Community of Castilla La Mancha, 2 in Toledo province, municipalities of Mazarambroz (Ag, X=406730 Y= 4397755, 30 S) and Buenasbodas (Au, X=332410 Y=4392147, 30 S); and the other one in Guadalajara province in Hiendelaencina (Ag, X=500459 Y=4548926, 30 T) (Libro Blanco de la Minería de Castilla-La Mancha, 2004). In the Result and Discussion section, the sites with abandoned mines will be referred just as mines.

Plant species inventories were made in the 8 mentioned sites according to geomorphology (tailings, slopes and valleys affected by mining operation), as it is known that heavy metals spread beyond tailings (Encabo et al., 1987; Gutiérrez-Maroto et al. 1989; Lacal et al., 1995). A stratified random sampling in each alluded geomorphologic unit was conducted. Species have been determined under Flora de Andalucía and Flora Ibérica, although the exposed nomenclature is that accepted on January 2013 in Anthos (Sistema de Información sobre Plantas de España, [www.anthos.es](http://www.anthos.es)). The name of the author describing each species is not included in tables of results. In addition, species are grouped in the three most abundant families in Mediterranean grasslands (Poaceae or grasses, Fabaceae or legumes and Asteraceae or composite).

---

Samples of above ground parts of 171 grass species (several individuals) were collected. Species were either the dominant in each site or the ones that were relevant to food webs even if they did not grow abundantly. Additionally, samples of 15 woody species were gathered, because of their structural role in these sites. Topsoil (0-10 cm) samples were also collected by a hoe in each geomorphologic unit and were transported to laboratory for determining heavy metal contents.

## 2.2. Chemical and data analysis

Soil samples were dried at room temperature for one week and sieved through a 2 mm mesh. Tests conducted in each one were: pH in slurry, organic matter by potassium dichromate oxidation (according to protocols described in Hernández and Pastor, 1989), pseudo-total metal contents determined by inductively coupled plasma-optical emission spectroscopy (ICP-OES, Perkin-Elmer 4300DV), previous HNO<sub>3</sub> and HClO<sub>4</sub> digestion (Walsh and SSSA, 1971), and As and Ba contents by X-ray fluorescence (SIEMENS SRS 300). All plant samples (separating root from shoots) were washed with tap water and rinsed two times with deionised water, oven-dried at 70 °C for 48 h and ground in a IKA-WERKE Yellow Line A10 grinder. Procedure for determining metals was the same as the one used with soils. Metals that can be introduced in food webs were analyzed (Cu, Zn, Pb, Cd, Ni, Cr, Al and Mn).

Results from chemical analyses are exposed as minimum and maximum.

To assess the accumulation capacity of native plants, the Relative deviation to background values (RDB) exposed in Kabata-Pendias and Mukherjee (2007) was used:

$$RDB = [(AM - RF) / RF] \times 100$$
, where AM is the arithmetic mean of measured contents and RF is the reference value. RF is the maximum value of each element considered normal for plants, exposed by those authors (mg kg<sup>-1</sup>): 1 Cd; 30 Cu; 10 Pb; 150 Zn; 1,5 As; 300 Mn; 3000 Al.

### 3. Results and Discussion

#### 3.1. Concentration of heavy metals and other trace elements in mine soils

A total of 191 soil samples from the 8 abandoned mine sites were analyzed (tables 1 and 2). Results of the first sampling had to be completed by subsequent samplings in those sites with a great range of metal concentrations, or those whose affected area around the main pollution source was very large (cases of Garganta and Mazarambroz).

The prevailing pH in the 8 sites is acidic, representing a risk of high metal bioavailability. Soils from valleys and slope breaks have the greatest O.M contents. In contrast, those samples collected from tailings are the ones with the least O.M. Since regulations of reference values do not usually include Al and Mn, results of these elements were compared with the mean in Earth's crust and the light sandy soils (as most of the studied) exposed in Kabata-Pendias and Mukherjee (2007). Cr and Ni did not surpass the reference values in any case. On the other hand, Ba was only analyzed in the mine where this element was exploited (Navas). Anyway, we summarize below the metals that mostly contribute to soil pollution in each of the studied sites

Practically all mine soils had several metals in higher concentration than the reference levels. Garganta mine is mainly polluted by Cu. Although one of the analyzed samples had important Pb and Cd concentrations (3750 mg kg<sup>-1</sup> and 340

**Table 1.** Ranges of pH, organic matter (OM, %), contents of Al (%), Mn and Ba (mg kg<sup>-1</sup>) and number of soil samples (N) collected in each mine.

Mine	N	pH	OM	Ba	Al	Mn
Garganta	N=50	4.6 - 7.6	0.3 - 17.9	-	1.6 - 5.4	70 - 1450
Bustarviejo	N=15	4.0 - 6.2	0.3 - 9.0	-	1.2 - 4.1	200 - 690
Colmenarejo	N=12	5.7 - 7.0	0.9 - 8.0	-	1.2 - 3.0	266 - 449
Navas	N=11	4.7 - 6.7	2.0 - 7.1	42 - 1630	1.7 - 2.9	135 - 605
Colmenar	N=4	6.2 - 7.6	3.7 - 7.5	-	2.0 - 3.8	58 - 609
Mazarambroz	N=79	1.6 - 8.0	0.3 - 9.7	-	0.4 - 5.2	45 - 1625
Buenasbodas	N=12	5.0 - 6.9	1.4 - 10.0	-	1.6 - 5.2	41 - 1315
Hiendelaencina*	N=8	-	-	-		
<b>Reference level</b>				<b>160<sup>(1)</sup></b>	<b>8 - 4<sup>(2)</sup></b>	<b>1200 - 2000<sup>(2)</sup></b>

<sup>(1)</sup> Dutch reference

<sup>(2)</sup> (Concentration in Earth's crust – Concentration in light sandy soils), Kabata-Pendias and Mukherjee (2007)

\* analyzed by XRF

**Table 2.** Ranges of pseudo-total content of metals and total content (XRF) of As ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) in each of the studied mines

Mina	Cu	Zn	Pb	Cd	As	Cr	Ni
Garganta	30 - 3500	40 - 540	5 - 3750	0.1 - 340	21 - 45	2.0 - 35	8.0 - 26
Bustarviejo	45 - 2070	140 - 11010	40 - 3953	4.5 - 263	205 - 15436	2.0 - 12	1.0 - 6.0
Colmenarejo	22 - 10909	87 - 248	11 - 178	0.0 - 6.0	9.0 - 224	0.0 - 10	1.0 - 5.1
Navas	4.5 - 888	69 - 1130	10 - 249	4.0 - 5.5	-	5.6 - 21	3.5 - 32
Colmenar	1.5 - 435	131 - 2641	209 - 8584	0.0 - 16	nd	1.0 - 10	1.5 - 15
Mazarambroz	8.5 - 201	62 - 10430	20 - 6542	0.0 - 35	36 - 531	0.0 - 54	3.0 - 41
Buenasbodas	5 - 25	16 - 69	1 - 25	0.0 - 0.5	-	2.5 - 10	2.0 - 24
Hiendelaencina*	26 - 63	91 - 420	18 - 516	-	-		
<b>Ref pH&lt;7<sup>(1)</sup></b>	<b>50</b>	<b>150</b>	<b>50</b>	<b>1</b>	<b>29<sup>(2)</sup></b>	<b>100</b>	<b>150</b>
<b>Ref pH&gt;7<sup>(1)</sup></b>	<b>210</b>	<b>450</b>	<b>300</b>	<b>3</b>		<b>150</b>	<b>450</b>

<sup>(1)</sup> Reference according to Spanish law RD1310/1990 (BOE, 1990)

<sup>(2)</sup> Dutch reference

\* Analyzed by XRF

$\text{mg kg}^{-1}$  respectively), the frequent contents of those metals are about  $100 \text{ mg kg}^{-1}$  and  $<10 \text{ mg kg}^{-1}$  respectively. Arsenic is the main pollutant in Bustarviejo mine, but in some areas Cu, Zn, Pb and Cd are also worrying. Only 2 samples among those analyzed in Navas presented element levels higher than the references. In the same way, only one sample from the mine located in Colmenar had important levels of Cu, Zn and Pb. Mazarambroz mine was the one with the largest area affected by heavy metals, mainly Zn and Pb, but also As, Cu and Cd in several points. None of the samples collected in Hiendelaencina mine showed metals at polluting levels (analyzed only by XRF), so ICP-OES tests were not made.

### 3.2. Plant communities developed in these sites

It is not the objective of this work to expose the results of each inventory in all the described mine sites. Nonetheless, tables 3 and 4 show the main results of samplings carried out in two sites of Community of Madrid, in order to indicate the dominance of grassland species. Legume species are hardly present in these sites, probably due to impact of heavy metal pollution on soils (Hernández and Pastor, 2005). Navas is the site with the greatest diversity in this family (up to 11 recorded clover species). The probable reason is the low heavy metal levels in soils (table 2). The areas with the maximum plant cover are also the ones with the lowest diversity (only 7 recorded species), as they have both the highest soil moisture and soil pollution (table 3).



**Table 3.** Species numbers recorded in the plant communities of rubble landfills and ecosystems of the copper mine Garganta de los Montes, Madrid. (Source: Hernández and Pastor, 2005)

Species	Tailing	Tailing base	Floodplain	Ash woodland	Temperate grassland	Wet grassland
Speices richness	30	30	25	28	11	7
Plant cover (%)	60	39	80	95	57	99
Dominant species	<i>Melilotus officinalis</i> (15%)	<i>Agrostis castellana</i> (6%) <i>M. officinalis</i> (4%)	<i>T. campestre</i> (23%) <i>A. castellana</i> (5%) <i>Plantago coronopus</i> (15%)	<i>A. castellana</i> (40%) <i>Adenocarpus complicatus</i> (8%)	<i>Agrostis pourretii</i> (30%) <i>A. castellana</i> (9%)	<i>A. castellana</i> <i>Holcus lanatus</i> <i>A. complicatus</i>

**Tabla 4.** Speices recorded in Navas mine.

POACEAE	FABACEAE AND ASTERACEAE	OTHERS
<i>Agrostis castellana.</i>	<i>Astragalus pelecinus</i>	<i>Anagallis arvensis</i>
<i>Avena barbata</i>	<i>Hymenocarpus cornicina</i>	<i>Asterolinon linum-stellatum</i>
<i>Bromus hordeaceus</i>	<i>Hymenocarpus lotoides</i>	<i>Bartsia trixago</i>
<i>Bromus rubens</i>	<i>Lathyrus aphaca</i>	<i>Centranthus calcitrapae</i>
<i>Corynephorus fasciculatus</i>	<i>Medicago minima</i>	<i>Cerastium glomeratum</i>
<i>Cynosorus echinatus</i>	<i>Trifolium arvense</i>	<i>Brassica barrelieri</i>
<i>Gaudinia fragilis</i>	<i>Trifolium campestre</i>	<i>Echium plantagineum</i>
<i>Holcus lanatus</i>	<i>Trifolium cherleri</i>	<i>Erodium cicutarium</i>
<i>Mibora minima</i>	<i>Trifolium dubium</i>	<i>Galium parisiense</i>
<i>Molineriella laevis</i>	<i>Trifolium gemellum</i>	<i>Geranium molle</i>
<i>Phalaris sp.</i>	<i>Trifolium glomeratum</i>	<i>Herniaria glabra</i>
<i>Poa bulbosa</i>	<i>Trifolium retusum</i>	<i>Juncus bufonius</i>
<i>Polypogon maritimus</i>	<i>Trifolium scabrum</i>	<i>Petrorrhagia nanteuilii</i>
<i>Stipa parviflora</i>	<i>Trifolium striatum</i>	<i>Plantago afra</i>
<i>Taeniatherum caput-medusae</i>	<i>Trifolium suffocatum</i>	<i>Plantago coronopus</i>
<i>Trisetum ovatum</i>	<i>Trifolium tomentosum</i>	<i>Plantago lanceolata</i>
<i>Vulpia bromoides</i>	<i>Vicia sativa</i>	<i>Plantago lagopus</i>
<i>Vulpia ciliata</i>	<i>Andryala integrifolia</i>	<i>Rumex acetosella</i>
<i>Vulpia myuros</i>	<i>Anthemis arvensis</i>	<i>Sanguisorba minor</i>
<i>Vulpia unilateralis</i>	<i>Artemisia campestris</i>	<i>Scirpoides holoschoenus</i>
	<i>Calendula arvensis</i>	<i>Silene gallica</i>
	<i>Carduus tenuiflorus</i>	<i>Silene nocturna</i>
	<i>Centaurea melitensis</i>	<i>Spergularia rubra</i>
	<i>Crepis capillaris</i>	<i>Veronica triphyllos</i>
	<i>Leontodon saxatilis</i>	
	<i>Senecio vulgaris</i>	
	<i>Sonchus asper</i>	
	<i>Tolpis barbata</i>	

Species richness is obviously influenced by site altitudinal location. Thus, 147 species were recorded in Garganta mine, at 1200 m.a.s.l., whereas 23 were observed in Mazarambroz mine, at 700 m.a.s.l., as is usually the case in xeric grasslands in Central Iberian Peninsula (Hernández et al., 1994; Hernández and Pastor, 2006). In

all studied cases, plant communities of slopes and valleys affected by mining operation correspond to Mediterranean grasslands (Pastor and Hernández, 2008; 2010), which, depending mainly on humidity and, therefore, also on altitude, are grazed by cattle or sheep. That is why this kind of communities is a priority for investigating heavy metals and trace elements in shoots of edible species.

### **3.3. Heavy metals, trace elements and Al contents in shoots of grass species growing in mine sites**

174 native grass species of the 8 mine sites, plus 16 woody species were analysed. Most of tested species had metals and trace elements in concentrations higher than those considered normal (tables 5 to 9); many even had higher than toxic levels (table 13).

Poaceae family (table 5) is especially interesting for having a great number of species with very important metal concentrations. *Agrostis castellana* is the species, among all tested, with the highest levels of Cu, Zn and Pb. It is also broadly distributed in all sites. Many species of this family have outstanding concentrations of Zn, but species with high levels of Cu, Pb, Cd or As are not that frequent. *A. elatius* subsp. *bulbosum*, *Holcus annuus* subsp. *setiglumis* and *Vulpia myuros* are interesting with high concentrations of Zn, Pb, Cd and As. Apart from *Agrostis castellana*, *A. stolonifera*, *Corynephorus canescens* and *Lolium multiflorum* are the ones with the greatest Cu content.

Metal content in legumes is not remarkable (table 6), being always lower than that of grasses. This is also noticed in Kabata-Pendias and Mukherjee (2007). However, some species can reach high metal levels, as *Trifolium scabrum* with maximum values of 496 mg Zn kg<sup>-1</sup> and 100 mg Pb kg<sup>-1</sup>, or *T. campestre* with 8 mg Cd kg<sup>-1</sup>. None of them have As in shoots, so this element is not shown in the table. However, Jana et al. (2012) did report 208 mg As kg<sup>-1</sup> in *Trifolium pratense* leaves.

Asteraceae family (table 7) is known for having species with high accumulation capacity. Despite the fact that some species show important metal concentration, they never reach the levels of grasses. *Leontodon saxatilis* has the maximum Zn concentration (1087 mg Zn kg<sup>-1</sup>). *Carduus pycnocephalus* and *Crepis vesicaria* have important Pb concentration. Cd concentration is noticeable in most of this family's

**Table 5.** Range of heavy metal and As concentration ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) in shoots of native Poaceae species collected from the studied mine sites.

Poaceae speices	Cu	Zn	Pb	Cd	As	Al	Mn
<i>Aegilops geniculata</i>	1.2 - 4.8	1.0 - 23	0.0	0.0	-	10 - 31	9.2 - 35
<i>Aegilops triuncialis</i>	0.9 - 6.7	12 - 91	0.0	0.0	-	42 - 282	10 - 56
<i>Agrostis castellana</i>	0.0 - 2785	17 - 9065	0.0 - 1572	0.0 - 12	0.0 - 135	11 - 3059	40 - 2465
<i>Agrostis stolonifera</i>	2.1 - 941	3.6 - 123	0.0 - 12	0.0 - 2.8	0.0	1247	9.5 - 118
<i>Aira caryophylla</i>	0.8 - 93	39 - 140	0.0	0.0 - 2.0	0.0	189 - 626	49 - 231
<i>Anthoxanthum aristatum</i>	0.7 - 19	50 - 401	0.0	0.0	0.0	109 - 227	44 - 251
<i>Arrhenatherum album</i>	0.0 - 39	43 - 268	0.0 - 8.3	0.0	-	40 - 171	0.0 - 218
<i>Arrhenatherum elatius</i>	0.0 - 98	20 - 790	0.0 - 43	0.0 - 16	-	139 - 1078	20 - 373
<i>A. elatius</i> subsp. <i>bulbosum</i>	0.5 - 16	0.6 - 1740	0 - 198	0 - 10	0.0 - 51	1.8 - 325	1.1 - 848
<i>Avena barbata</i>	0.7 - 14	30 - 423	0.0 - 249	0.0 - 5.5	-	54 - 2511	32 - 442
<i>Avena sativa</i>	3.6 - 27	12 - 176	0.0 - 3	0.0	0.0	9.2 - 19	10 - 192
<i>Avena sterilis</i>	4.8 - 11	14 - 320	0.0 - 44	0.0 - 2.6	0.0	2.1 - 77	28 - 484
<i>Bromus diandrus</i>	2.3 - 45	0.0 - 194	0.0	0.0	-	28 - 362	10 - 130
<i>Bromus hordeaceus</i>	2.0 - 64	14 - 210	0.0 - 18	0.0 - 1.2	-	31 - 150	25 - 253
<i>Bromus madritensis</i>	1.3 - 26	131 - 720	3 - 74	0.0 - 3.1	-	61 - 335	8.2 - 78
<i>Bromus rubens</i>	1.2 - 19	17 - 677	0.0 - 309	0.0 - 1.9	0.0	44 - 2205	5.1 - 97
<i>Bromus sterilis</i>	1.8 - 14	40 - 127	0.0	0.0	-	-	20 - 269
<i>Bromus tectorum</i>	0.0 - 47	33 - 487	0.0 - 78	0.0 - 4.7	0.0	25 - 389	1.9 - 278
<i>Corynephorus canescens</i>	2.2 - 659	54 - 108	0.0	0.0 - 0.4	0.0	249 - 2419	30 - 198
<i>Cynodon dactylon</i>	7.1 - 86	24 - 462	0.0 - 98	0.0 - 6.0	0.0	53 - 571	13 - 834
<i>Cynosurus cristatus</i>	1.0 - 3.5	1.0 - 37	0.0	0.0	-	-	14 - 125
<i>Cynosurus echinatus</i>	0.9 - 8.5	18 - 60	0.0	0.0	-	17 - 76	28 - 195
<i>Dactylis glomerata</i>	0.0 - 24	21 - 424	0.0 - 50	0.0 - 0.8	-	12 - 362	7.2 - 327
<i>Festuca rothmaleri</i>	0.2 - 1.6	1.5 - 22	0.0	0.0	-	31 - 529	6.8 - 15
<i>Holcus annuus</i> subsp. <i>setiglumis</i>	0.4 - 34.3	24 - 1220	0.0 - 262	0.0 - 4.6	0.0 - 51	18 - 456	4.1 - 695
<i>Holcus lanatus</i>	0.0 - 84	20 - 840	0.0 - 3.5	0.0 - 8.6	0.0	24 - 2531	72 - 1140
<i>Hordeum murinum</i>	5.5 - 32	12 - 204	0.0	0.0	-	52 - 2380	10 - 70
<i>Koeleria vallesiana</i>	0.0 - 17	28 - 71	0.0	0.0	-	-	128 - 228
<i>Lolium multiflorum</i>	0.3 - 662	2.6 - 209	0.0	0.0 - 4.9	0.0	0.0 - 133	1.5 - 117
<i>Lolium rigidum</i>	4.3 - 38	48 - 147	0.0 - 6.0	0.0	0.0 - 195	41 - 1510	135 - 295
<i>Melica ciliata</i>	1.9 - 10	24 - 206	0.0 - 4.6	0.0 - 4.1	-	79 - 94	6.2 - 35
<i>Micropyrum tenellum</i>	2.0 - 21	78 - 781	0.0 - 104	0.0 - 2.6	-	13 - 1171	32 - 206
<i>Molineriella laevis</i>	5.2 - 89	33 - 748	0.0	0.0 - 7.8	0.0	31 - 431	74 - 524
<i>Periballia involuocrata</i>	3.2 - 33	111 - 304	0.0 - 21	0.0 - 1.4	0.0 - 200	37 - 716	82 - 147
<i>Phalaris canariensis</i>	0.9 - 1.5	3.6 - 36	0.0	0.0	-	-	24 - 140
<i>Phalaris minor</i>	0.7 - 6.0	77 - 127	0.0	0.0	-	-	229 - 266
<i>Phleum pratense</i>	4.6 - 11	68 - 82	0.0	0.0	-	10 - 52	34 - 43
<i>Poa annua</i>	7.7 - 8.5	43 - 52	0.0	0.0	0.0	47 - 61	42 - 133
<i>Poa bulbosa</i>	6.0 - 23	79 - 260	4.0 - 6.0	0.0	-	24 - 88	27 - 83
<i>Poa trivialis</i>	1.5 - 46	12 - 339	0.0	0.0 - 2.0	-	-	29 - 82
<i>Stipa lagascae</i>	0.7 - 16	15 - 301	0.0 - 75	0.0 - 1.1	0.0	14 - 286	10 - 129
<i>Stipa parviflora</i>	8.5 - 12	35 - 217	0.0 - 7.8	0.0	0.0	25 - 188	12 - 55
<i>Taeniatherum caput-medusae</i>	1.2 - 152	0.0 - 21	0.0	0.0	0.0 - 57	41 - 100	18 - 26
<i>Trisetum ovatum</i>	1.9 - 7.2	25 - 109	0.0	0.0 - 0.3	-	-	47 - 400
<i>Vulpia bromoides</i>	3.6 - 49	88 - 892	0.0 - 58	0.0 - 2.4	0.0	56 - 1998	63 - 394
<i>Vulpia ciliata</i>	4.3 - 8.1	133 - 254	0.0 - 107	0.0 - 0.7	0.0	480 - 3608	0.0 - 398
<i>Vulpia membranacea</i>	2.6 - 12	3.6 - 94	0.0	0.0	-	52 - 189	24 - 92
<i>Vulpia myuros</i>	0.0 - 47	6.3 - 3165	0.0 - 771	0.0 - 20	0.0 - 139	22 - 2118	2.5 - 602
<i>Vulpia unilateralis</i>	2.1 - 4.9	12 - 101	0.0 - 25	0.0	0.0	52 - 236	31 - 90

**Table 6.** Range of heavy metal and As concentration ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) in shoots of native Fabaceae species collected from the studied mine sites.

Fabaceae species	Cu	Zn	Pb	Cd	Al	Mn
<i>Anthyllis vulneraria</i>	18 - 62	34 - 60	0.0	0.0	91 - 1963	112 - 115
<i>Lathyrus angulatus</i>	10 - 18	50 - 70	0.0	0.0	-	20 - 192
<i>Lotus corniculatus</i>	2.0 - 6.9	34 - 324	0.0	0.0 - 1.3	-	63 - 91
<i>Lotus pedunculatus</i>	2.1 - 7.6	1.0 - 80	0.0	0.0 - 2.7	-	21 - 236
<i>Medicago minima</i>	1.9 - 12	28 - 50	0.0	0.0	-	10 - 26
<i>Medicago sativa</i>	2.2 - 8.2	1.5 - 30	0.0	0.0	-	7.6 - 21
<i>Medicago turbinata</i>	0.9 - 12	12 - 60	0.0	0.0	-	11 - 20
<i>Melilotus officinalis</i>	1.5 - 22	2.1 - 58	0.0	0.0	21 - 508	11 - 35
<i>Ononis pusilla</i>	13 - 21	31 - 27	0.0	0.0	116 - 198	7.1 - 21
<i>Ononis spinosa</i>	7.7 - 32	29 - 50	0.0	0.0	51 - 243	6.8 - 100
<i>Ornithopus compressus</i>	4.4 - 13	27 - 209	0.0	0.0	32 - 275	138 - 353
<i>Ornithopus perpusillus</i>	1.5 - 6.8	2.1 - 234	0.0	0.0 - 3.6	-	20 - 113
<i>Trifolium angustifolium</i>	2.0 - 6.0	1.0 - 50	0.0	0.0	71 - 150	10 - 36
<i>Trifolium arvense</i>	13 - 27	60 - 99	0.0	0.0 - 1.0	56 - 141	34 - 67
<i>Trifolium campestre</i>	7.0 - 38	84 - 214	0.0	0.0 - 8.1	111 - 3294	43 - 171
<i>Trifolium cherleri</i>	1.8 - 10	22 - 80	0.0	0.0	-	11 - 70
<i>Trifolium dubium</i>	8.0 - 14	66 - 117	0.0	0.0	53 - 81	59 - 110
<i>Trifolium gemellum</i>	3.0 - 5.0	62 - 348	0.0 - 32	0.0	78 - 311	65 - 151
<i>Trifolium glomeratum</i>	6.7 - 27	32 - 61	0.0	0.0	39 - 692	24 - 1253
<i>Trifolium ochroleucon</i>	8.6 - 23	50 - 220	0.0	0.0 - 0.5	18 - 205	7.0 - 69
<i>Trifolium repens</i>	4.7 - 5.8	20 - 26	0.0	0.0	-	37 - 38
<i>Trifolium sylvaticum</i>	13 - 17	114 - 496	0.0 - 100	0.0 - 0.1	154 - 308	45 - 223
<i>Trifolium striatum</i>	5.6 - 20	50 - 120	0.0	0.0 - 0.8	50 - 92	10 - 58
<i>Trifolium strictum</i>	4.0 - 79	34 - 120	0.0	0.0 - 1.5	50 - 114	22 - 69
<i>Trifolium subterraneum</i>	7.0 - 21	93 - 214	0.0	0.0 - 1.2	66 - 168	131 - 198
<i>Trifolium suffocatum</i>	1.5 - 5	2.1 - 43	0.0	0.0	41 - 116	20 - 93
<i>Trifolium tomentosum</i>	2.6 - 15	21 - 295	0.0 - 76	0.0 - 2.4	65 - 552	14 - 29
<i>Vicia angustifolia</i>	1.3 - 10	2.9 - 156	0.0	0.0	-	51 - 102
<i>Vicia benghalensis</i>	2.1 - 19	1.0 - 44	0.0	0.0	-	10 - 36
<i>Vicia hirsuta</i>	1.7 - 16	11 - 139	0.0	0.0	-	21 - 265

species (up to  $44 \text{ mg kg}^{-1}$  in *Andryala ragusina*), and higher than those of grasses. Arsenic was neither detected in any species.

Among the rest of families (table 8), there are several species with important accumulation capacity. *Scirpoides holoschoenus* is the only species of this group with As concentration ( $57 \text{ mg kg}^{-1}$ ), although other similar species did take up this metal according to Jana et al. (2012): *Juncus effusus* with  $29 \pm 0.3 \text{ mg As kg}^{-1}$  and *Plantago major* with  $7 \text{ mg kg}^{-1}$ . Species of *Rumex* genus had notable contents of Cu, Zn, Pb and Cd together. *Spergularia rubra*, species of *Plantago* genus and those of Brassicaceae family are also interesting, even though their Cu accumulation capacity is limited. Maximum Cd concentration of all tested plants is found in *Jasione montana* ( $64 \text{ mg Cd kg}^{-1}$ ), but other species like *Andryala ragusina* or *Corrigiola telephifolia* can also accumulate an important quantity of this metal. These species, however, do not

**Table 7.** Range of heavy metal and As concentration ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) in shoots of native Asteraceae species collected from the studied mine sites. \**Chamaemelum mixtum* is not the species nomenclature of Anthos, instead the name of Andalucía Flora is shown.

Asteraceae species	Cu	Zn	Pb	Cd	Al	Mn
<i>Anacyclus clavatus</i>	5.9 - 66	43 - 79	0.0	0.3 - 4.6	25 - 432	155 - 334
<i>Andryala integrifolia</i>	2.2 - 51	12 - 172	0.0	0.0 - 20	26 - 637	7.5 - 63
<i>Andryala laxiflora</i>	7.4 - 15	191 - 285	2.1 - 8.2	0.0 - 10	48 - 96	71 - 206
<i>Andryala ragusina</i>	6.3 - 27	167 - 824	0.0 - 57	4.8 - 44	158 - 811	32 - 60
<i>Artemisia sp.</i>	0.8 - 1.0	12 - 206	0.0	0.0 - 2.0	-	9.4 - 14
<i>Carduus pycnocephalus</i>	3.7 - 20	27 - 472	0.0 - 115	0.0 - 5.1	21 - 75	0.0 - 44
<i>Carthamus lanatus</i>	1.9 - 7.9	1.5 - 10	0.0	0.0	32 - 115	14 - 21
<i>Centaurea alba</i>	1.5 - 8.1	2.1 - 22	0.0	0.0	-	24 - 51
<i>Centaurea calcitrapa</i>	4.1 - 18	20 - 75	0.0	0.0 - 1.8	64 - 3156	0.9 - 108
<i>Centaurea melitensis</i>	1.3 - 8.0	71 - 224	0.0 - 52	0.0 - 6.1	41 - 128	0.0 - 96
<i>Centaurea paniculata</i>	8.9 - 13	14 - 94	0.0	0.0 - 2.5	20 - 57	4.8 - 14
<i>Chamaemelum mixtum*</i>	1.9 - 13	10 - 58	0.0	0.0	206 - 390	43 - 46
<i>Chondrilla juncea</i>	1.0 - 19	0.4 - 294	0.0 - 6.4	0.0 - 14	48 - 1019	0.0 - 1312
<i>Cichorium intybus</i>	2.0 - 10	21 - 80	0.0	0.0	54 - 163	9.2 - 16
<i>Cirisium sp.</i>	4.5 - 19	14 - 82	0.0	0.0 - 6.5	28 - 239	2.3 - 9.1
<i>Crepis capillaris</i>	6.2 - 39	48 - 264	0.0 - 8.6	0.0 - 8.7	74 - 1060	25 - 248
<i>Crepis vesicaria</i>	2.4 - 25	34 - 603	0.0 - 176	0.0 - 20	23 - 534	3.9 - 346
<i>Filago arvensis</i>	1.5 - 74	12 - 459	0.0	0.0 - 4.0	-	21 - 281
<i>Filago gallica</i>	11 - 25	85 - 461	9.0 - 97	1.7 - 13	62 - 425	37 - 51
<i>Hypochaeris radicata</i>	2.4 - 73	36 - 724	0.0 - 0.2	0.0 - 17	90 - 1734	20 - 327
<i>Leontodon saxatilis</i>	4.8 - 54	91 - 1087	0.0 - 45	0.0 - 24	70 - 199	9.3 - 433
<i>Mantisalca salmantica</i>	2.8 - 10	5.0 - 10	0.0	0.0	41 - 101	5.1 - 10
<i>Pallenis spinosa</i>	6.1 - 8.7	11 - 13	0.0	0.0	51 - 93	17 - 16
<i>Picnomon acarna</i>	2.3 - 10	2.1 - 50	0.0	0.0 - 1.2	-	6.3 - 20
<i>Pilosella officinarum</i>	5.0 - 25	15 - 84	0.0 - 1.9	0.0 - 16	99 - 1144	10 - 75
<i>Podospermum laciniatum</i>	2.1 - 4.7	1.5 - 123	0.0	0.0 - 0.2	-	20 - 49
<i>Santolina rosmarinifolia</i>	5.0 - 52	15 - 193	0.0	0.0 - 9.3	85 - 1537	0.5 - 107
<i>Scolymus hispanicus</i>	0.0 - 23	40 - 579	0.0 - 23	0.0 - 8.5	41 - 173	0.0 - 86
<i>Sonchus asper</i>	0.9 - 3.5	12 - 380	0.0 - 43	0.0 - 13	-	1.6 - 7.9
<i>Tragopogon crocifolius</i>	7.4 - 12	50 - 70	0.0	0.0 - 1.9	-	10 - 15

show this metal in their shoots as frequently as *J. montana*, which took up this metal in all tested samples. In spite of being very bioavailable (as exposed by Kabata-Pendias and Mukherjee, 2007), Cd concentration in shoots is not usually high. Zhang et al. (2012), in their study about Cd accumulation in native species from mine sites, did not find important concentration in vascular plants either. In general, metal concentrations in native species from mine sites studied in this work are greater than those shown by other authors (Conesa et al., 2006, 2007; García-Salgado et al., 2012; Jana et al., 2012; Massa et al., 2010; Moreno-Jiménez et al., 2009; Pratas et al., 2013; Zhang et al., 2012), but those species really belong to other kind of communities.

**Table 8.** Range of heavy metal and As concentration (mg kg<sup>-1</sup>) in shoots of native species of other families collected from the studied mine sites

Other families	Cu	Zn	Pb	Cd	Al	Mn
<i>Anarrhinum bellidifolium</i>	60 - 100	40 - 59	0.0	0.0	149 - 186	19 - 35
<i>Armeria arenaria</i>	10 - 156	34 - 219	0.0	0.0 - 2.2	125 - 3831	15 - 74
<i>Bartsia trixago</i>	2.8 - 21	39 - 385	0.0 - 102	0.0 - 2.0	59 - 1986	15 - 99
<i>Campanula rapunculus</i>	0.9 - 6.4	5.8 - 19	0.0	0.0	50 - 107	9.2 - 18
<i>Carum verticillatum</i>	1.2 - 5.2	12 - 124	0.0	0.0 - 0.4	-	62 - 974
<i>Centranthus calcitrapae</i>	3.5 - 4.8	100 - 102	0.0 - 29	0.0	160 - 195	26 - 27
<i>Cerastium glomeratum</i>	2.0 - 4.4	22 - 185	0.0 - 3.2	0.0 - 0.3	41 - 207	34 - 122
<i>Clinopodium vulgare</i>	2.1 - 12	19 - 43	0.0	0.0	62 - 802	5.9 - 46
<i>Convolvulus arvensis</i>	10 - 122	56 - 106	0.0	0.0 - 2.3	138 - 814	18 - 85
<i>Coronopus sp.</i>	10 - 125	21 - 100	0.0	0.0	-	21 - 73
<i>Corrigiola telephiifolia</i>	4.6 - 465	31 - 554	0.0	0.0 - 57	53 - 630	10 - 575
<i>Crucianella angustifolia</i>	1.5 - 25	1.5 - 66	0.0	0.0	27 - 117	62 - 106
<i>Daucus carota</i>	1.0 - 20	22 - 179	0.0 - 7.3	0.0 - 6.2	54 - 1253	9.0 - 200
<i>Digitalis purpurea</i>	6.9 - 17	211 - 276	0.0 - 8.5	5.4 - 12	-	19 - 303
<i>Diplotaxis catholica</i>	3.0 - 14	63 - 1375	0.0 - 96	0.0 - 10	39 - 115	50 - 88
<i>Echium vulgare</i>	2.8 - 25	59 - 581	0.0 - 57	0.0 - 5.1	35 - 653	20 - 520
<i>Eryngium campestre</i>	1.7 - 15	16 - 86	0.0	0.0	-	9.0 - 203
<i>Foeniculum vulgare</i>	3.1 - 11	18 - 83	0.0	0.0	19 - 170	0.0 - 81
<i>Galium aparine</i>	7.0 - 8.0	134 - 481	10 - 66	0.0 - 1.9	94 - 186	33 - 459
<i>Geranium molle</i>	5.5 - 29	84 - 216	0.0	0.0 - 18	349 - 558	3.9 - 130
<i>Heliotropium europaeum</i>	9.0 - 13	171 - 248	20 - 52	0.0	26 - 107	33 - 133
<i>Hirschfeldia incana</i>	0.0 - 6.6	29 - 827	0.0 - 142	0.0 - 11	31 - 1094	0.0 - 34
<i>Hypericum humifusum</i>	3.6 - 15	14 - 242	0.0 - 0.1	0.0 - 15	92 - 118	31 - 651
<i>Hypericum perforatum</i>	2.1 - 12	12 - 94	0.0	0.0 - 25	39 - 312	28 - 71
<i>Jasione montana</i>	1.7 - 26	35 - 1549	0.0 - 43	0.0 - 64	51 - 508	43 - 654
<i>Juncus effusus</i>	2.9 - 7.0	15 - 55	0.0	0.0	69 - 451	8.2 - 10
<i>Lomelosia simplex</i>	3.0 - 7.5	44 - 77	0.0	0.0	-	1.2 - 68
<i>Malva neglecta</i>	0.2 - 2.1	33 - 88	0.0	1.1 - 8.0	-	44 - 98
<i>Marrubium supinum</i>	1.9 - 11	352 - 74	0.0 - 80	0.0 - 0.7	49 - 320	0.0 - 32
<i>Marrubium vulgare</i>	4.0 - 5.8	1.5 - 8.0	0.0	0.0	14 - 69	16 - 31
<i>Mentha pulegium</i>	4.1 - 18	70 - 354	0.0 - 24	0.0 - 15	32 - 393	5.0 - 91
<i>Papaver rhoeas</i>	10 - 15	44 - 110	0.0	0.0	19 - 35	15 - 40
<i>Parentucellia latifolia</i>	2.1 - 7.5	20 - 86	0.0	0.0	-	26 - 213
<i>Paronychia argentea</i>	8.6 - 30	20 - 51	0.0	0.0	196 - 929	29 - 90
<i>Petrorhagia nanteuilii</i>	6.2 - 31	12 - 305	0.0	0.0 - 7.1	98 - 687	25 - 111
<i>Petrorhagia prolifera</i>	1.0 - 37	38 - 184	0.0	0.0 - 3.2	106 - 261	12 - 172
<i>Plantago afra</i>	3.7 - 15	294 - 1105	2.1 - 256	0.0 - 12	23 - 164	15 - 410
<i>Plantago coronopus</i>	5.4 - 31	72 - 799	0.0 - 239	0.0 - 8.0	43 - 420	8.9 - 423
<i>Plantago holosteum</i>	9.0 - 53	39 - 94	0.0	0.0	128 - 388	25 - 252
<i>Plantago lagopus</i>	1.8 - 97	21 - 1622	0.0 - 292	0.0 - 14	46 - 3037	3.6 - 985
<i>Plantago lanceolata</i>	3.1 - 39	10 - 417	0.0 - 41	0.0 - 4.5	49 - 824	7.5 - 322
<i>Plantago ovata</i>	4.0 - 11	27 - 400	0.0 - 31	0.0 - 3.5	-	13 - 45
<i>Reseda lutea</i>	3.3 - 20	60 - 173	0.0 - 7.9	0.0 - 1.3	-	14 - 62
<i>Rumex acetosella</i>	0.5 - 447	5.3 - 1114	0.0 - 108	0.0 - 11	65 - 1036	0.0 - 998
<i>Rumex bucephalophorus</i>	2.6 - 177	17 - 3077	0.0 - 525	0.0 - 25	54 - 664	0.0 - 564
<i>Rumex induratus</i>	1.0 - 12	6.8 - 35	0.0	0.0 - 1.4	62 - 312	2.0 - 29
<i>Rumex papillaris</i>	6.3 - 597	12 - 242	0.0	0.0 - 6.4	61 - 322	1.2 - 89
<i>Rumex pulcher</i>	3.5 - 10	2.1 - 13	0.0	0.0	68 - 372	8.6 - 20
<i>Salvia verbenaca</i>	9.0 - 20	3.5 - 23	0.0	0.0	75 - 181	2.9 - 37
<i>Sanguisorba minor</i>	0.0 - 32	23 - 103	0.0	0.0 - 0.6	226 - 927	0.0 - 189
<i>Scandix pecten-veneris</i>	3.0 - 6.3	180 - 461	37 - 78	0.0	86 - 194	58 - 389
<i>Scirpoides holoschoenus</i>	0.0 - 36	11 - 1747	0.0 - 231	0 - 20	6.4 - 401	4.5 - 2901
<i>Sesamoides purpurascens</i>	0.8 - 2.5	32 - 176	0.0	0.0	-	24 - 72
<i>Silene colorata</i>	7.2 - 10	57 - 62	0.0	0.0	68 - 103	14 - 135

**Table 8.** (continued)

Other families	Cu	Zn	Pb	Cd	Al	Mn
<i>Silene vulgaris</i>	5.4 - 18	24 - 127	0.0	0.0 - 4.3	84 - 681	1.6 - 302
<i>Sinapis arvensis</i>	2.4 - 7.3	17 - 1656	0.0 - 83	0.0 - 8.8	10 - 166	20 - 59
<i>Spergularia rubra</i>	3.0 - 82	69 - 2775	0.0 - 805	0.0 - 11	51 - 1914	22 - 590
<i>Torilis nodosa</i>	2.8 - 6.9	3.5 - 50	0.0	0.0	-	19 - 40
<i>Verbascum pulverulentum</i>	5.8 - 12	669 - 726	26 - 38	0.4 - 2.0	109 - 145	11 - 42
<i>Veronica arvensis</i>	2.1 - 32	3.5 - 49	0.0	0.0	19 - 92	30 - 66
<i>Xolantha guttata</i>	14 - 20	68 - 69	0.0	3.2 - 5.5	105 - 2518	140 - 426

**Table 9.** Maximum metal and As concentration (mg kg<sup>-1</sup>) in above-ground parts in woody species growing in mine sites.

Species	Cu	Zn	Pb	Cd	Al	Mn
<i>Quercus ilex</i> ssp. <i>ballota</i>	17	29	0.0	0.0	293	193
<i>Olea europea</i>	4.5	7.4	0.0	0.0	66	9.2
<i>Cytisus scoparius</i>	15	225	0.0	2.7	-	234
<i>Adenocarpus complicatus</i>	15	103	0.0	2.4	161	100
<i>Helianthemum caput-felis</i>	5.0	106	0.0	0.0	-	0.0
<i>Helichrysum stoechas</i>	31	64	0.0	13	2189	143
<i>Genista cinerascens</i>	2.1	79	0.0	0.0	-	4.9
<i>Daphne gnidium</i>	10	38	0.0	0.0	217	212
<i>Lavandula stoechas</i>	6.9	192	0.0	1.7	-	245
<i>Lavandula pedunculata</i>	5.0	75	0.0	0.0	-	11
<i>Cistus ladanifer</i>	6.9	33	0.0	0.0	237	441
<i>Crataegus</i> sp.	5.6	20	0.0	0.0	106	70
<i>Salvia verbenaca</i>	20	23	0.0	0.0	181	37
<i>Sambucus nigra</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	33
<i>Thymus zygis</i>	40	431	275	1.5	625	166
<i>Thymus mastichina</i>	37	73	0.0	2.6	999	66

The main woody species of these sites were also analyzed (table 9) as they can be consumed by goats. *Thymus zygis* is the only one with notable metal concentration in leaves.

### 3.4. Evaluation of studied species as tolerant or accumulator

We considered that the RDB index (Relative deviation to background values) exposed in Kabata-Pendias and Mukherjee (2007) can be an appropriate tool to assess the mean metal accumulation capacity of species that grow in polluted soils. The relationship between the mean metal content in a species growing in polluted soils and the normal concentration is expressed in % (tables 10, 11, 12). Only those species with RDB index higher than 20 % are shown, as lower values are considered insignificant.

Maximum metal concentration found in a species (those presented in tables 5 to 9) indicates the maximum accumulation capacity. On the contrary, RDB index refers to mean concentration, so it shows better the general or mean accumulation capacity of

**Table 10.** Accumulation capacity of Poaceae and Fabaceae species assessed by RDB index.

Species	Cu	Zn	Pb	Cd	As	Al	Mn
<b>Poaceae</b>							
<i>Agrostis castellana</i>	115	308	278		105		103
<i>Agrostis stolonifera</i>	3036		21	180			
<i>Aira caryophyllea</i>	52						
<i>Arrhenatherum elatius</i>		91		306			
<i>A. elatius</i> subsp. <i>bulbosum</i>		116	226	40	145		
<i>Avena barbata</i>		29	467	22			
<i>Bromus madritensis</i>		103	209				
<i>Bromus rubens</i>		85	849				
<i>Bromus tectorum</i>			98				
<i>Corynephorus canescens</i>	400						
<i>Cynodon dactylon</i>		65	290	202			
<i>Holcus annuus</i> subsp. <i>setiglumis</i>		95	66				
<i>Holcus lanatus</i>		56					37
<i>Lolium multiflorum</i>	1003			145			
<i>Lolium rigidum</i>					4236		
<i>Melica ciliata</i>				37			
<i>Micropyrum tenellum</i>		122					
<i>Molineriella laevis</i>	37						
<i>Periballia involucrata</i>		42			4333		
<i>Poa trivialis</i>	54	126		95			
<i>Stipa parviflora</i>		45					
<i>Trisetum ovatum</i>							33
<i>Vulpia bromoides</i>		33	61				
<i>Vulpia ciliata</i>		20	322				
<i>Vulpia myuros</i>		71	373		27		
<i>Vulpia unilateralis</i>			148				
<b>Fabaceae</b>							
<i>Anthyllis vulneraria</i>	33						
<i>Lotus pedunculatus</i>				170			
<i>Ornithopus perpusillus</i>		56		260			
<i>Trifolium gemellum</i>		37	59				
<i>Trifolium glomeratum</i>							113
<i>Trifolium scabrum</i>		103	400				
<i>Trifolium tomentosum</i>		97	659	140			

RDB =  $[(AM - RF) / RF] \times 100$ ; AM, arithmetic mean of measured contents; RF, reference values ( $\text{mg kg}^{-1}$ ): 1 Cd; 30 Cu; 10 Pb; 150 Zn; 1,5 As; 300 Mn; 3000 Al.

a species. As an example we can cite the commented case of Cd accumulation of *Corrigiola telephiifolia* and *Jasione montana*, with similar maximum Cd concentrations. RDB indicates, in contrast, that *J. montana* is a better accumulator than *C. telephiifolia*.

Despite the great metal accumulation capacity of many species collected from mine sites, only *Agrostis castellana* has Cu, Zn and Pb concentration higher or similar to limits generally used to consider a species as hyperaccumulator ( $10000 \text{ mg kg}^{-1}$  for Mn and Zn,  $1000 \text{ mg kg}^{-1}$  for the rest of the metals, except Cd which is  $100 \text{ mg kg}^{-1}$ ). McGrath and Zhao (2003), on the other hand, consider these limits rather arbitrary



**Table 11.** Accumulation capacity of Poaceae and Fabaceae species assessed by RDB index.

Species	Cu	Zn	Pb	Cd	As	Al	Mn
<b>Asteraceae</b>							
<i>Anacyclus clavatus</i>				153			
<i>Andryala integrifolia</i>				403			
<i>Andryala laxiflora</i>		48		166			
<i>Andryala ragusina</i>		284	103	1784			
<i>Artemisia</i> sp.		37		100			
<i>Carduus pycnocephalus</i>		29	162	84			
<i>Centaurea melitensis</i>			139	53			
<i>Centaurea paniculata</i>				25			
<i>Chondrilla juncea</i>				501			
<i>Cirsium</i> sp.				550			
<i>Crepis capillaris</i>				115			
<i>Crepis vesicaria</i>		36	107	436			
<i>Filago arvensis</i>	147	206		300			
<i>Filago gallica</i>		82	429	617			
<i>Helichrysum stoechas</i>				881			
<i>Hypochaeris radicata</i>				175			
<i>Leontodon saxatilis</i>		194	96	509			
<i>Pilosella officinarum</i>				1468			
<i>Santolina rosmarinifolia</i>				320			
<i>Scolymus hispanicus</i>				22			
<i>Sonchus asper</i>		153	332	1230			

RDB = [(AM - RF) / RF] x 100; AM, arithmetic mean of measured contents; RF, reference values (mg kg<sup>-1</sup>): 1 Cd; 30 Cu; 10 Pb; 150 Zn; 1,5 As; 300 Mn; 3000 Al.

and establish that hyperaccumulators share the following common characteristics: bioaccumulation index (BI) > 1, but in some cases they can reach 50-100; transfer factor (shoot/root ratio) > 1, meaning good metal transport to shoots; hypertolerance to metals in soil and inside the plant, indicating a good internal detoxification.

Although we consider reasonable these criteria, they are not easy to apply. Accumulation capacity of species (BI) depends on the concentration in soil (as demonstrated in Gutiérrez-Ginés et al., 2012). In fact, when this index was calculated in species of this work, values > 1 were found in samples collected from soils with unimportant metal concentration. On the contrary, it was not frequent to obtain values > 1 in those plants collected from the most polluted points. On the other hand, total or pseudo-total metal concentration of soil is generally used to calculate this index. However, bioavailable content reflects more realistically the amount of metal that in fact can be taken up by plants. For this reason, species have not been classified by this criterion.

Although *Agrostis castellana* is the species indicated as hyperaccumulator, we can summarize the ones that significantly accumulate Zn and Pb together (important in sites of Mazarambroz, Colmenar del Arroyo and Bustarviejo): grasses *Avena barbata*,

**Table 12.** Accumulation capacity of species of other families assessed by RDB index.

Species	Cu	Zn	Pb	Cd	As	Al	Mn
Anarrhinum bellidifolium	166						
Armeria arenaria	418	46		120			
Carum verticillatum							225
Centranthus calcitrapae			47				
Cerastium glomeratum		23					
Convolvulus arvensis	40						
Coronopus sp.	316						
Corrigiola telephiifolia	226			487			
Daucus carota				33			
Digitalis purpurea		58		767			
Echium vulgare		140	110				
Galium aparine		141	303				
Geranium molle				553			
Heliotropium europaeum		60	278				
Hirschfeldia incana		162	509	246			
Hypericum humifusum		62		1400			117
Hypericum perforatum				2380			
Jasione montana		105		2320			
Malva neglecta				306			
Marrubium supinum		57	217				
Mentha pulegium				144			
Petrorhagia nanteuilii		103		614			
Plantago afra		264	937	232			
Plantago coronopus		120	419				
Plantago lagopus		209	503	112			
Plantago ovata		167	209	253			
Rumex acetosella	26	22		82			
Rumex bucephalophorus		428	712	106			
Rumex papillaris	369			47			
Scandix pecten-veneris		114	501				
Scirpoides holoschoenus		56	104	81	191		
Sinapis arvensis		412	129	358			
Spergularia rubra		230	780	243			
Thymus zygis			264				
Verbascum pulverulentum		368	230	47			
Xolantha guttata				333			

RDB = [(AM - RF) / RF] x 100; AM, arithmetic mean of measured contents; RF, reference values (mg kg<sup>-1</sup>): 1 Cd; 30 Cu; 10 Pb; 150 Zn; 1,5 As; 300 Mn; 3000 Al.

*Arrhenatherum elatius* subsp. *bulbosum*, *Bromus rubens*, *Holcus annuus* subsp. *setiglumis*, *Micropyrum tenellum*, *Vulpia bromoides* and *V. myuros*; the composite *Crepis vesicaria*; Brassicaceae species *Diploaxis catholica*, *Hirschfeldia incana* and *Sinapis arvensis*; most species of *Plantago* and *Rumex* genus, as well as *Spergularia rubra* and *Scirpoides holoschoenus*.

Though there are many species that tolerate the Cu contents found in Colmenarejo and Garganta mines, there are few that can accumulate this element remarkably. *Agrostis stolonifera*, *Corynephorus canescens*, *Lolium multiflorum*, *Armeria arenaria*, *Convolvulus arvensis*, *Corrigiola telephiifolia*, *S. holoschoenus* and species of *Rumex*

genus are those with the maximum concentration of this metal. Among these, *C. telephiifolia* is the one that accumulates the highest concentration of Cd.

### 3.5. Tolerance, resistance and toxicity

Mine sites have been ignored for decades. Nevertheless, they have aroused some interest for studying the selection and adaptation of vegetation over time (Dickinson et al., 1991; Shaw, 1990). Thus, study of metallophytes –plants adapted to heavy metal enriched soils- contributes to knowing natural mechanisms of adaptation to heavy metal stress. Barceló and Poschenrieder (1992) systematized the complexity of stress resistance and the behaviour models of plants exposed to metal toxicity: plants can either avoid/exclude the metal or tolerate it.

Since all analyzed species in this work were collected from mine sites, we can consider them tolerant to heavy metal concentration of their soils. The fact that legumes do not seem to have evolved to be tolerant to heavy metals, as exposed by Ernst (1996), may be the reason why they are hardly found in studied sites. However, grasses (Poaceae) and composites (Asteraceae) are heavy metal accumulators, indicating tolerance of these families to metal conditions of soils where they grew.

Growing in community can cause interspecific relations to increase the tolerance of some species. In fact there are species growing in the most polluted areas, which is unthinkable if growing alone. Those relations can also decrease the tolerance if that effort of one species to tolerate high metal levels leads to a decrease in its competition capacity against others.

**Table 13.** Range of concentrations (mg kg<sup>-1</sup>) in plant shoots considered normal or toxic for themselves and allowed values in consumed plants or maximum ones tolerated by livestock

Element	Normal for plants <sup>(1)</sup>	Toxic for plants <sup>(1)</sup>	Maximum values allowed for forage <sup>(2)</sup>	Maximum levels tolerated by livestock <sup>(3)</sup>	
				Cattle	Sheep
Cu	5 - 30	20 – 100	2.9	100	25
Zn	25 - 150	100 - 400	45	500	300
Pb	5 - 10	30 - 300	1.3	30	30
Cd	0,01 – 0,2	5 - 30	0.23	0.5	0.5
As	1 – 1,5	5 - 20	1	50	50
Mn	30 - 300	400 - 1000	32.5	1000	1000

<sup>(1)</sup> Kabata-Pendias and Mukherjee (2007)

<sup>(2)</sup> W.H.O. 1992, 1995; FAO, 2000

<sup>(3)</sup> Adapted from Madejón et al. (2006)

---

Many tested species, even growing in highly polluted soils, do not reflect that concentration in their shoots. They may be excluders and hardly take up metals from soils. However, the decrease in metal transport from roots to shoots is considered the main tolerance mechanism of this kind of species (Schat et al., 2000).

Other species, on the other hand, show such metal concentration in their shoots (even much higher than that considered toxic) that they must have great internal detoxification mechanisms. The main symptom of heavy metal and Al toxicity in plant species growing in polluted soils might be the decrease in root growth (Barceló and Poschenrieder, 1992; Hernández, 1986; Hernández et al., 2007).

However, the toxicity that we refer in this section is that caused by plants on animals that graze on them. Table 13 shows some approximate values that we can compare with those exposed in tables 4 to 9. There are many species that can pose problems to livestock grazing in these sites (as cattle in Garganta or sheep in Mazarambroz or Colmenarejo). Indeed, 70 % of all analyzed species have at least one metal (but many even more than one) in such concentration that could cause health problems in this kind of livestock.

Many studies have demonstrated that animals reflect toxic element concentration when they graze on polluted soils (Madejón et al., 2006; Morcombe et al. 1994; Petersson et al 1997; Ronneau and Cara, 1984). However, information about this fact is rather scarce (Hapke, 1996; Madejón et al., 2009), especially the one related with native species. This situation can cause a health risk to both primary consumers and those that feed on them, thus affecting food webs (Kabata-Pendias and Mukherjee, 2007). Therefore, it is necessary to control heavy metals in terrestrial ecosystems. FAO (2000) established regulations to limit the maximum Pb and Cd levels, which EU has subsequently assumed.

In previous works, we exposed results related to behaviour of Poaceae species (maize, sorghum, oats and ray grass) cultivated in soils of abandoned mines of Cu, Ag or Al exploitation. Shoots of these species, especially maize, concentrated high quantities of metals (Gutiérrez-Ginés et al., 2010,2011; Hernández et al., 2007; Pastor et al, 2009, 2012). Thus, they can be interesting if implementing “induced phytorestation” techniques, as their biomass is much higher than that of native accumulator species. However, if they are used as forage, their use for

phytoremediation of heavy metal polluted soils is discouraged, unless their consumption was completely avoided.

#### **4. Conclusions**

Heavy metal pollution of soils (Cu, Zn, Pb, Cd, As, Cr, Ni, Mn, Al and Ba) has been studied in 8 abandoned mine sites in Central Spain. 6 of them showed worrying levels of at least 5 metals together. However, there are plant communities (Mediterranean grasslands) growing on tailings and surrounding soils affected by this pollution. Analyses in shoots of 174 native species from these communities provide results on plant accumulation capacity of one or more of these metals. Accumulation capacity depends on the potential uptake of each species, as well as the edaphic environment (thus metal bioavailability). As a consequence, establishing groupings according to metal tolerance or hyperaccumulation is not easy. Nevertheless, Poaceae family is the one with the largest amount of species with Cu, Zn, Pb and As accumulation capacity. *Agrostis castellana* is especially relevant, indeed it can be considered as hyperaccumulator of Cu, Zn and Pb, but also takes up As, Al and Mn.

The complete set of results is of great interest, as it shows the metal accumulation capacity of a high number of grassland species growing on abandoned mine sites. Although all of them provide important information about appropriate species for phytoremediation (the main objective of most works with similar characteristics) the possible toxicity to animals that consume them cannot be omitted.

#### **Acknowledgments**

Authors acknowledge the projects CTM 2008-04827/TECNO of Spanish Science and Innovation Ministry, P2009/AMB-1478 Community of Madrid Program (EIADES). MJGG was funded by the FPU fellowship (AP2008-02934) of Spanish Education Ministry.

#### **References**

- Barceló J, Poschenrieder C, 1992. Respuesta de las plantas a la contaminación por metales pesados. *Suelo y Planta*, 2: 345--361.
- BOE (Boletín Oficial del Estado). 1990. RD 130/1990. Real Decreto 1310/1990 de 29 de octubre, por el que se regula la utilización de los lodos de depuración en el sector agrario. Boletín Oficial del Estado del 1 de noviembre de 1990.

- Conesa H, Faz A, Arnaldos R, 2006. Heavy metal accumulation and tolerance in plants from mine tailings of the semiarid Cartagena-La Union mining district (SE Spain). *Science of the Total Environment*, 366 (1): 1--11.
- Conesa H, Faz A, Arnaldos R, 2007. Initial studies for the phytostabilization of a mine tailing from the Cartagena-La Union Mining District (SE Spain). *Chemosphere*, 66 (1): 38--44.
- Dickinson N M, Turner A P, Lepp N W, 1991. How do trees and other long-lived plants survive in polluted environments. *Functional Ecology*, 199: 5--11.
- Encabo C, Cala V, Gutierrez-Maroto A, 1987. Evaluación de la dispersión de metales pesados en suelos del entorno de una mina, mediante el método de especiación secuencial química. *Boletín Geológico y Minero*, 108: 57--68.
- Ernst W H O, 1996. Phytotoxicity of heavy metal. In: Fertilizers and Environment (Rodríguez-Barrueco C R, ed). Dordrecht: Kluwer Acad Publishers. 423--430
- FAO, 2000. Infections and intoxications of farm livestock associated with feed and forage. [www.fao.org/es/ESN/animal/animapdf7annex-4.pdf](http://www.fao.org/es/ESN/animal/animapdf7annex-4.pdf)
- Fernández-Rubio R, ed. 2007. Activos Ambientales de la Minería Española. Consejo Superior de Colegios de Ingenieros de Minas de España.
- García-Salgado S, García-Casillas D, Quijano-Nieto M A, Bonilla-Simón M M, 2012. Arsenic and Heavy Metal Uptake and Accumulation in Native Plant Species from Soils Polluted by Mining Activities. *Water, Air and Soil Pollution*, 223: 559--572.
- Gutiérrez-Ginés M J, Pastor J, Hernández A J, 2010. Effect of heavy metals from mine soils on *Avena sativa* L. and education strategies. *Fresenius Environmental Bulletin*, 19: 2083--2086.
- Gutiérrez-Ginés M J, Hernández A J, Pastor J. 2011. Estudio del comportamiento de *Lolium perenne* L. en suelos del centro de España contaminados por metales pesados. In: Control de la degradación y uso sostenible del suelo (Ortiz Silla R, Sánchez Navarro A, eds). Murcia: Universidad de Murcia. 177--180.
- Gutiérrez-Ginés M J, Pastor J, Hernández A J, 2012. Integrated approach to assessing the effects of soils polluted with heavy metals on a plant population. *Ecotoxicology*, 21: 1965--1978.
- Gutiérrez-Maroto A, Sobrados L, Jimenez-Ballesta R, Morcillo E, Álvarez J B, 1989. Dispersión de elementos pesados y su incidencia en el medio natural. *Boletín Geológico y Minero*, 100-105: 886--896.
- Hapke H J, 1986. Heavy metals transfer in the food chain to humans. In: Fertilizers and Environment (Rodríguez-Barrueco C R, ed). Dordrecht: Kluwer Acad Publishers. 431--436.
- Hernández A J, 1986. Acción del aluminio del suelo sobre los vegetales, microflora y microfauna edáficas. *Anales de Edafología y Agrobiología*, 9-10: 1369--1388.
- Hernández A J, Pastor J, 1989. Técnicas analíticas para el estudio de las interacciones suelo-planta. *Henares. Revista de Geología*, 3: 67--102.

Hernández AJ, Pastor J. 2005. Incidencia conjunta de metales pesados en pastos de vacuno ubicados en el entorno de una mina abandonada en la Sierra de Guadarrama. In: Producciones agroganaderas: Gestión eficiente y conservaciones del medio natural (De La Roza B, Martínez-Fernández A, Carballal A, eds). Gijón: SERIDA. 955--963.

Hernández A J, Pastor J, 2006. Mediterranean grasslands: ecological observations related to the climates of the past 55 years. *Grassland Science in Europe*, 11: 790--792.

Hernández A J, Pastor J, 2008. La restauración ecológica de emplazamientos con suelos contaminados: evaluación de metodologías para la acción. In: Contaminación de Suelos. Tecnologías para su recuperación (Millán R, Lobo C, eds). Madrid: CIEMAT. 61--82.

Hernández A J, Pastor J, Rey-Benayas J M, 1994. Forage production under suboptimal conditions: an overview of drought problems in Mediterranean-type ecosystems. In: Grassland and Society. Proc. off General Meeting of the European Grassland Federation (Mannetje L T, Frame J, eds). Wageningen. 539--548

Hernández A J, Alexis S, Gutiérrez-Ginés M J, Pastor J, 2007. Acción conjunta de metales pesados del suelo en cultivos (maíz y sorgo) para alimentación humana. In: Libro de Actas IX Congreso Nacional de Sanidad Ambiental, Sevilla.

Hernández A J, Gutiérrez-Ginés M J, Pastor J, 2009. Ecology and health in risk analysis of polluted soils. In: Environmental health Risk (Brebbia C A, ed) Southampton: WIT Press. 257--268.

Jana U, Chassany V, Bertrand G, Castrec-Rouelle M, Aubry E, Boudsocq S, Laffray D, Repellin A, 2012. Analysis of arsenic and antimony distribution within plants growing at an old mine site in Ouche (Cantal, France) and identification of species suitable for site revegetation. *Journal of Environmental Management*, 110: 188--193.

Jiménez R, Jordá L, Jordá R, Prado P, 2004. La minería metálica en Madrid. *Bocamina*, 14: 50--89.

Jiménez Ballesta R, Cala V, García R, Patino M, 1990. Diferenciación textural en suelos de la cuenca de Madrid. Alteración y génesis mineral. *Boletín Geológico y Minero*, 101: 593--599

Kabata-Pendias A, Mukherjee A B, 2007. Trace Elements from Soil to Human. Berlin and Heidelberg: Springer-Verlag.

Lacal M, Encabo C, Jiménez-Ballesta R, Gutiérrez-Maroto A, 1995. Contaminación ambiental provocada por una escombrera en Garganta de los Montes (CM). In: Actas VI Congreso de Geoquímica. 5061--5065.

Libro Blanco de la Minería de Castilla-La Mancha, 2004. Consejería de Industria y Tecnología.

Madejón P, Murillo JM, Marañón T, Cabrera F, 2006. Bioaccumulation of trace elements in a wild grass three years after the Aznalcóllar mine spill (South Spain). *Environmental Monitoring and Assessment*, 114: 169--189.

Madejón P, Domínguez M, Murillo J M, 2009. Evaluation of pastures for horses grazing on soils polluted by trace elements. *Ecotoxicology*, 18, 417--428.

- Massa N, Andreucci F, Poli M, Aceto M, Barbato R, Berta G, 2010. Screening for heavy metal accumulators amongst autochthonous plants in a polluted site in Italy. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73: 1988--1997.
- McGrath S P, Zhao F J, 2003. Phytoextraction of metals and metalloids from contaminated soils. *Current Opinion in Biotechnology*, 14: 277--282.
- Morcombe P W, Petersson D S, Masters H G, Ross P J, Edwards J R, 1994. Cd concentrations in kidney of sheep and cattle in Western Australia. I. Regional distribution. *Australian Journal of Agriculture Research*, 45: 851--862.
- Moreno-Jiménez E, Peñalosa J M, Manzano R, Carpena-Ruiz R O, Gamarra R, Esteban E, 2009. Heavy metals distribution in soils surrounding an abandoned mine in NW Madrid (Spain) and their transference to wild flora. *Journal of Hazardous Materials*, 162: 845--859.
- Pastor J, Hernández A J, 2007. La restauración en sistemas con suelos degradados: estudio de casos en vertederos, escombreras y emplazamientos de minas abandonadas. In: Procesos de Degradación y Recuperación de suelos (Millán R, Lobo C, eds). Madrid: CIEMAT. 529--550.
- Pastor J, Hernández A J, 2008. Multi-functional role of grassland systems in the ecological restoration of mines, landfills, roadside slopes and agroecosystems. *Options Méditerranéennes*, 79: 103--107
- Pastor J, Hernández A J, 2009. Acción Conjunta de Al y Metales Pesados del Suelo en la Nutrición Mineral del Maíz: Bioensayos en Microcosmos y Reflexiones con Fines de Fitorremediación. In: Presente y Futuro de la Nutrición Mineral de las Plantas (Romero L, ed). Granada: INDEMA. 661--673.
- Pastor J, Hernández A J, 2010. Pastizales del occidente de la comunidad de Madrid: su importancia como referentes para acciones de recuperación de sistemas degradados. In: Pastos: fuente natural de energía (A Calleja et al. eds). León: Universidad de León. 221--227.
- Pastor J, Gutiérrez-Ginés M J, Hernández A J, 2012. Respuesta del maíz (*Zea mays*) en suelos contaminados por metales pesados después de crecer una comunidad de pasto. In: Nuevos retos de la ganadería extensiva: un agente de conservación en peligro de extinción (Canals R M, San Emeterio L, eds). Sociedad Española para el Estudio de los Pastos. 177--184.
- Petersson K P, Thierfelder T, Jorhem L, Oskarsson A, 1997. Cd levels in kidneys from Swedish pigs in relation to environmental factors-temporal and spatial trends. *Science of the Total Environment*, 208: 111--122.
- Pratas J, Favas P J C, D'Souza R, Varun M, Paul M S, 2013. Phytoremediation assessment of flora tolerant to heavy metals in the contaminated soils of an abandoned Pb mine in Central Portugal. *Chemosphere*, 90: 2216--2225.
- Ronneau C, Cara J, 1984. Correlations of element deposition on pastures with analysis of cows' hair. *Science of the Total Environment*, 39: 135--142.
- Schat H, Llugany M, Bernhard R, 2000. Metal-Specific Patterns of Tolerance, Uptake, and Transport of Heavy Metals in Hyperaccumulating and Nonhyperaccumulating



Metallophytes. In: Phytoremediation of Contaminated Soil and Water (Terry N, Bañuelos G, eds). Boca Raton: CRC Press. 171--188.

Shaw A J, ed. 1990. Heavy Metal Tolerance in Plant: Evolutionary Aspects. Boca Raton: CRC Press.

Walsh L M, SSSA (Soil Science Society of America), 1971. Instrumental Methods for analysis of soils and plant tissue. VII, 334, Ed. Soil Science Society of America, Wisconsin, US.

WHO (World Health Organization), 1992. Cadmium Environmental Aspect. Environmental Health Criteria 135. Geneva.

WHO (World Health Organization), 1995. Inorganic lead. Environmental Health Criteria 165. Geneva.

Zhang S, Li T, Huang H, Zou T, Zhang X, Yu H, Zheng Z, Wang Y, 2012. Cd accumulation and phytostabilization potential of dominant plants surrounding mining tailings. *Environmental Science and Pollution Research*, 19: 3879--3888.

## Chapter 8

---

### **Phytostabilization of heavy metals by the root systems of grassland communities growing at abandoned mine sites**



This chapter reproduces the manuscript:  
Hernández AJ, Gutiérrez-Ginés MJ, Pastor J. *Science of  
the Total Environment* (**submitted**)

---

## **Phytostabilization of heavy metals by the root systems of grassland communities growing at abandoned mine sites**

### **Abstract**

Several abandoned mine sites in central Spain show elevated Zn, Pb, Cu, Cd and As levels in their topsoil layer. Even so, grassland communities grow in them. These feature good structural stability indicating the adaptation of their plant communities to this type of pollution. This study addresses the contribution of these communities to phytostabilization of soil heavy metals in these sites.

Fifty five microcosms were set up in a greenhouse using real soil samples containing at least one heavy metal. The outcome measures considered after a 4-year period were below-ground phytomass and its metal concentrations (Cu, Zn, Pb, Cd, Cr, Ni, As, Al and Mn). Phytomass was unrelated to total soil metal concentrations but did show correlation with the levels of metals taken up by root systems. Accordingly, accumulated root levels were correlated with soil concentrations of the metals, which were greatest for Zn, Cu, Cd and Mn (in this order) with bioaccumulation indices > 1. We also assessed the joint contributions of perennial herbaceous species, some with rhizomes, and of Poaceae to phytostabilization. Given the scarcity of data from metal phytostabilization studies addressing the use of native herbaceous communities to remediate polluted soils, the present findings provide useful information on this topic.

## **Estudio de la fitoestabilización de metales pesados en comunidades de pasto de emplazamientos de minas abandonadas**

### **Resumen**

Los emplazamientos de minas abandonadas en el centro de España presentan elevados niveles de Zn, Pb, Cu, Cd y As en la capa superficial edáfica. Sin embargo en ellos se ubican pastos que presentan bastante estabilidad estructural (sin cambios en la composición florística), y por tanto están adaptados a esta contaminación. Por ese motivo, tres de estos emplazamientos han sido elegidos para diseñar y realizar un bioensayo en invernadero durante cuatro años consecutivos. Se ha estudiado así la componente radicular de estas comunidades autóctonas en 55 microcosmos con suelos reales y con presencia de más de un metal pesado en los mismos.

Al final del ensayo se ha evaluado la fitomasa subterránea producida, así como la concentración de metales en la misma (Cu, Zn, Pb, Cd, Cr, Ni, As, Al y Mn). Este atributo de la comunidad no está relacionado con los niveles totales de estos elementos en suelo, pero sí con aquellos absorbidos por los sistemas radiculares. La acumulación de metales absorbidos en los mismos sí está relacionada con la concentración de metales en los suelos, siendo mayor para el Zn, Cu, Cd y Mn, (por ese orden), con índices de bioacumulación  $> 1$ . Se valora la contribución conjunta de especies herbáceas perennes y con rizomas, así como la de gramíneas en estos pastos a la fitoestabilización. Dado que son muy escasos los trabajos sobre la fitoestabilización de metales que utilizan comunidades herbáceas autóctonas como referentes a la hora de aplicar esta técnica de remediación a suelos contaminados, consideramos que los resultados alcanzados son una contribución para una mayor profundización de la misma.

## 1. Introduction

Revegetation of abandoned mine tailings has been frequently studied as a restoration method and a suitable solution against pollutant dispersion (Mendez and Mainer, 2008; Wong, 2003). Indeed, many authors demonstrated the metal phytostabilization capacity of some plant species (Andreazza et al, 2011; Dominguez et al, 2009; Johansson et al, 2005). Other studies searched potentially phytostabilizers among native plant communities developed on abandoned mine sites (Conesa et al., 2006; 2007; Conesa and Faz, 2011; Jana et al., 2012; Lei and Duan, 2008; Zhang et al., 2012; Zou et al., 2011). Our research group has been working for 20 years in pollution characterization and its effect on plant communities in 10 abandoned mine sites in central Iberian Peninsula (Hernández and Pastor, 2008; Pastor and Hernández, 2008). All those mines ceased their operation in the beginning of XX<sup>th</sup> century. Since then, they have not been subjected to any tailing restoration and no work for avoiding pollutant dispersion has been conducted. This is the reason why heavy metals found in tailings are also detected in important concentrations in adjacent ecosystems. Plant communities have been studied in detail, and they are considered stable and adapted to physical and chemical properties of substrate or soil where they grow. Many of them are grasslands grazed by livestock or exploited for hunting (Hernández and Pastor, 2005, 2007a; Pastor and Hernández, 2009a; Pastor et al., 2003, 2010). These communities are studied again in this work for understanding their stability and their adaptation to such heavy metal concentrations in soils. In this case, we focus on the root component of these grasslands. In order to make a more detailed monitoring of this issue, a greenhouse bioassay has been designed and conducted with the following objectives: i) knowing the concentrations of heavy metal and As in topsoil layers and their relationship with root component of grasslands that thrive at them, ii) studying the contribution of native plant communities to phytostabilization of polluted soils and to what extent they can prevent the dispersion of heavy metals and other trace element from these sites.

## 2. Material and Methods

### 2.1. Soils and plant communities in abandoned mine sites

Three abandoned mine sites were chosen for this study. Old Ba mine is located in Southwest of Community of Madrid (Navas del Rey). It was operated during XIXth and XXth centuries for barite exploitation until 1945, when ceased the operation leaving many tailings scattered in the surroundings (henceforth “scenario 1”). Other site, in Northwest of the same Community (Garganta de los Montes, “scenario 2”), exploited for Cu, was abandoned some 50 years ago. Nowadays, the tailing has an approximate volume of 3500 m<sup>3</sup>. The third mine site (located in Mazarambroz, Toledo, “scenario 3”) was operated for Ag extraction until 1990, when it was abandoned, leaving about 25000 m<sup>3</sup> of tailings. Most of soils in these sites are cambisols and leptosols. Other geochemical characteristics are described Hernández and Pastor (2007b).

Soil samples were collected from 55 selected areas from the three mine sites (7 in scenario 1, 22 in scenario 2 and 26 in scenario 3). They were chosen according to results exposed in Hernández and Pastor (2005, 2007a, 2007b). An average sample from the topsoil layer (0 – 10 cm) was collected in each area by a hoe. The quantity was enough for performing the chemical analyses and filling the microcosms described in next section.

Plant communities developed in these three sites are herbaceous grass formations, formations of bush-pasture and some wooded pastures, used by cattle, sheep and wildlife. Communities were characterized by stratified samplings according to different morphologies (tailings, slopes, slope breaks and valleys affected by mining operation). In most of these scenarios, there are grasslands with *Agrostis castellana* L., which are important as a reference for degraded soil remediation, as assessed by Pastor and Hernández (2009b). Indeed, root systems of this kind of grassland had been described previously (Hernández et al., 1992), what was also a good background for the study of metal phytostabilization in the present work.

Most frequent species recorded in these sites are shown in table 1. The design of the bioassay took into account the perennial nature of some species, as well as the

**Table 1.** The most frequent species recorded in grasslands developed on abandoned mine sites with topsoil layers polluted by more than one heavy metal

<i>Agrostis castellana</i>	<i>Convolvulus arvensis</i>	<i>Lolium rigidum</i>	<i>Spergularia purpurea</i>
<i>Anagallis arvensis</i>	<i>Crepis capillaris</i>	<i>Plantago afra</i>	<i>Stipa lagascae</i>
<i>Andryala integrifolia</i>	<i>Crepis vesicaria</i>	<i>Plantago coronopus</i>	<i>Thymus zygis</i>
<i>Avena barbata</i>	<i>Dactylis glomerata</i>	<i>Plantago lagopus</i>	<i>Trifolium striatum</i>
<i>Bromus hordaceus</i>	<i>Diptotaxis catholica</i>	<i>Plantago lanceolata</i>	<i>Trisetum paniceum</i>
<i>Bromus madritensis</i>	<i>Echium vulgare</i>	<i>Pulicaria paludosa</i>	<i>Vulpia ciliata</i>
<i>Bromus rubens</i>	<i>Hirschfeldia incana</i>	<i>Sanguisorba minor</i>	<i>Vulpia myuros</i>
<i>Bromus tectorum</i>	<i>Jasione montana</i>	<i>Scirpoides holoschoenus</i>	
<i>Carduus pycnocephalus</i>	<i>Leontodon taraxacoides</i>	<i>Sonchus asper</i>	

minimum time needed by a plant community for reaching a certain degree of stability after a disturbance.

## 2.2. Experimental layout

The criteria followed for designing the bioassay in greenhouse (17.4 °C - 24.5 °C y 70 - 80% humidity) were: a) being based on ecological succession theory, knowing that communities like those referred previously can recover stability in 4 years (Hernández et al., 2002); b) simulating the grassland management of annual mowing or grazing; c) simulating the effect of rain (by watering) on runoff of soil materials; d) reproducing a gradient of metals and trace elements of soils in order to observe the response of plant communities to the different situations they deal with on real scenarios of polluted soils.

Collected soils were not sieved to avoid losing the seed bank. They were placed in plastic trays (30 cm long x 21 cm wide x 5 cm deep) used as microcosms. This is the mean size where plant biodiversity of these communities is approximately represented (Hernández and Pastor, 2008; Pastor and Hernández, 2010). Depth matches up with first cm of soil, where the below-ground biomass is the highest (Hernández et al., 1991; Pastor et al., 1995). A grid was placed at a distance of 1cm from the bottom of the tray in order to collect leaching. Microcosms were watered each other day with 100 ml deionised water. Annual monitoring recorded the species in each microcosm. In addition, annual species were also cut at ground level every year after blooming and fruiting. During the final harvest, above-ground parts were separated from the whole root component. The latter was washed with pressured tap water as many times as necessary to remove all soil particles. Finally,



it was rinsed twice with deionised water. When it was possible, root systems of those species easily identifiable were considered separately from the whole root component. Each root sample was oven-dried (48 h, 70 °C) and weighted.

### **2.3. Chemical analyses and microanalyses with scanning electron microscopy**

Soil samples were dried at room temperature, sieved through a 2 mm mesh and ground in agate mortar. Plant samples were also ground in an IKA-WERKE Yellow Line A10 grinder. Soil pH was determined in slurry. Pseudo-total metal contents of soils and plants were determined by Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectroscopy (ICP-OES, Perkin-Elmer 4300DV) following HNO<sub>3</sub> and HClO<sub>4</sub> digestion at a 4:1 ratio (Walsh and SSSA, 1971). Soil As concentration was determined by X-ray fluorescence (Siemens SRS 300).

During the harvest, some fragments of roots and rhizomes of identified species collected at random from most polluted treatments were subjected to Low-Temperature Scanning Electron Microscopy (LTSEM, DSM 960 Zeiss). Sample preparation and observation procedure was that described by De Los Ríos et al. (1999). Microanalyses were made by the energy dispersive X-ray detector (EDS/SEM, Link ISIS, Oxford).

### **2.4. Data analyses**

Below-ground phytomass in each microcosm was calculated from root dry weight and expressed as g m<sup>-2</sup>. Metal concentration of root component in each microcosm corresponds to weighted average of chemical results of each subsample. Bioaccumulation index ( $[\text{metal}]_{\text{plant}} \cdot [\text{metal}]_{\text{soil}}^{-1}$ ) was calculated from ICP-OES data of soils, roots and rhizomes. Metal concentrations of root components were correlated with those of soils by Pearson coefficient. In the cases of not normality or no lineal relationship, even after log-transformation, the Spearman non parametric coefficient was used. T-test was used to compare the means of phytomass in microcosms with or without *Scirpoides holoschoenus* or *Agrostis castellana*.

Regressions and Principal Component Analysis (PCA) were used to study the relationship between metal concentration in soils and below-ground phytomass.

Calculations were made with Microsoft Excel 2007 and Statgraphics 15.2.14 programs.

### 3. Results

#### 3.1. Heavy metal and As concentration in soils

Results of leachates produced as a consequence of watering and those of above-ground parts are not exposed in this work. Only results of root component are related with the objective of this work: phytostabilization of metals in grassland ecosystems.

Table 2 shows synthetically the characteristics of soils used in the bioassay. In all sites there are areas with four or more elements in concentration higher than the reference levels. Since Cr and Ni never surpass these limits, they are not shown in the following tables. There is a wide range of pH, from the most acidic (pH = 4.2) to the most alkaline (pH = 8.1). The latter is consequence of liming in some areas of Mazarambroz mine site (scenario 3). Results of chemical tests of each microcosm are exposed in tables 3 to 5. Microcosms are ordered according to a general gradient of metal pollution.

#### 3.2. Below-ground phytomass collected from microcosms and concentration of metals and As in root systems

Tables 6, 7 and 8 show the below-ground phytomass and heavy metal and As concentration of the root component of microcosms. When it was possible, roots and rhizomes were analyzed separately. Higher metal concentration was always found in the former. Although Cr and Ni concentrations in soils were not worrying, some root components took them up in remarkable concentration, thus, they are shown in following tables.

**Table 2.** Range of metal and As concentration ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) and pH of soils used in 55 microcosms, number of them corresponding to each mine site (N), metal reference levels in soils according to Spanish law RD1310/1990 (BOE, 1990),

Scenarios	N		pH	Cu	Zn	Pb	Cd	Cr	Ni	As	Al	Mn
1	7	Max	6.7	170	795	249	5.5	19	22	0.0	29235	543
		Min	5.5	4.5	69	94	n.d	5.6	n.d	0.0	17245	135
2	22	Max	7.6	3500	478	199	18	n.d	26	155	47970	1087
		Min	4.6	30	65	45	n.d	n.d	8	-	16090	287
3	26	Max	8.1	89	5095	5775	31	41	26	505	47385	20375
		Min	4.2	8.5	62	20	n.d	7.5	n.d	-	15610	160
Ref. (pH<7)				150	50	50	1	100	30	50*		
Ref. (pH>7)				450	210	300	3	150	112			

\*Dutch reference level.

**Table 3.** pH and pseudo-total metal concentration ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) of soils of each microcosm (site) corresponding to scenario 1.

Site	pH	Cu	Zn	Pb	Cd	Al	Mn
1	6.6	170	795	104	5,5	17245	135
2	5.5	26	238	-	n.d.	-	543
3	6.1	33	158	115	n.d.	25975	310
4	6.7	14	96	249	n.d.	29235	300
5	6.0	18	133	94	n.d.	25435	305
6	6.1	4,5	79	122	n.d.	27760	195
7	6.1	5,0	69	110	n.d.	25535	160

n.d., not detected; -, not analysed.

**Table 4.** pH and pseudo-total metal concentration ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) of soils of each microcosm (site) corresponding to scenario 2.

Site	pH	Cu	Zn	Pb	Cd	As	Al	Mn
8	5.8	3500	246	181	8.5	60	30960	662
9	5.5	1950	478	123	18	33	25570	987
10	5.2	1800	202	160	3.5	-	44225	1087
11	5.6	1000	361	120	11.5	-	27515	612
12	5.4	1000	139	165	n.d.	76	28935	675
13	5.1	950	134	162	3.5	55	34885	650
14	5.2	910	166	133	n.d.	38	28535	512
15	5.0	770	118	135	n.d.	31	34540	725
16	5.1	750	159	145	4.1	-	34445	287
17	4.6	680	133	199	n.d.	24	47970	362
18	5.1	680	104	97	n.d.	22	37640	475
19	4.7	385	100	115	n.d.	-	32510	462
20	7.0	325	166	120	n.d.	124	25415	987
21	5.1	295	149	118	n.d.	19	38985	537
22	5.5	225	133	136	7.5	-	33445	562
23	-	205	65	45	n.d.	77	-	1000
24	6.9	185	150	104	n.d.	82	26425	887
25	7.6	150	147	107	n.d.	115	23485	887
26	7.5	135	110	70	n.d.	155	16090	605
27	5.3	55	95	118	n.d.	-	32880	337
28	5.1	46	103	99	n.d.	3.6	23555	395
29	5.1	30	70	134	n.d.	3.2	40180	310

n.d., not detected; -, not analysed.

The order of microcosms in tables 6 to 8 corresponds to the gradient of soil pollution. However, that gradient is not as evident in metal and As concentration in root components. There is a correlation between metal and As concentration in root components and soils (table 9). This means that despite the leaching of metals and As from soils due to watering, these elements are still retained in soils and are bioavailable for roots.

**Table 5.** pH and pseudo-total metal concentration ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) of soils of each microcosm (site) corresponding to scenario 3.

Site	pH	Cu	Zn	Pb	Cd	As	Al	Mn
30	7.2	85	5095	3855	26	374	25515	20375
31	7.0	89	4530	5775	n.d.	421	23735	1620
32	8.0	31	3760	1425	13	244	15610	1625
33	7.2	53	3295	3550	n.d.	-	24420	385
34	7.4	47	3005	1650	n.d.	180	16005	355
35	6.4	46	2940	2250	11	-	27115	315
36	5.6	51	2865	2430	7.5	376	18690	280
37	7.3	64	2385	3015	7.0	503	45470	480
38	6.3	32	2410	1215	9.0	342	34595	300
39	7.2	23	2290	1635	9.5	191	35050	465
40	7.8	30	1940	2545	n.d.	-	15960	355
41	5.5	41	1690	1345	6.0	273	20430	395
42	6.0	24	1585	1770	6.0	-	44720	350
43	5.8	26	1340	2690	5.0	-	30210	265
44	6.5	20	1005	1845	n.d.	220	45075	405
45	4.2	10	1490	180	n.d.	173	39450	370
46	6.0	12	975	1045	n.d.	-	22855	185
47	6.5	17	855	1220	3.1	-	33395	285
48	7.0	20	835	1420	n.d.	170	25870	300
49	6.6	13	820	1205	n.d.	-	38945	340
50	6.3	16	715	795	n.d.	286	33400	575
51	6.4	10	565	960	n.d.	182	38065	295
52	6.6	9.5	515	720	n.d.	285	47385	245
53	6.5	8.5	260	230	n.d.	-	32540	250
54	6.9	16	250	410	n.d.	18	21455	220
55	5.8	12	62	20	n.d.	0.9	23460	160

n.d., not detected; -, not analysed.

Table 10 shows bioaccumulation indices ( $\text{BI} = [\text{metal}]_{\text{plant}} / [\text{metal}]_{\text{soil}}$ ) calculated for roots and rhizomes. Evidently they are higher in roots than in rhizomes, since metal and As concentration is greater in the former. Al, Pb and As present the lowest values, because, as it is known, they are not very mobile. Zn and Cu are the metals with the highest BI. Values for Mn and Cd are also  $> 1$ , but lower than those of Zn and Cu. A negative relationship between BI and metal concentration in soil was expected (as demonstrated previously by Gutiérrez-Ginés et al., 2012), meaning a maximum amount of metal uptake regardless the concentration in soil. This relationship was only significant in the cases of As, Mn and Zn in scenario 3.

Below-ground phytomass ( $\text{g m}^{-2}$ ) extracted from each microcosm is shown in tables 6 to 8. There seems not to be a relation between phytomass and pollution level in soils. In fact, there is no correlation between phytomass and the PCA axis that indicates heavy metal and As pollution gradient. Correlations between phytomass and soil heavy metals and As separately does not show any relation neither.

**Table 6.** Below-ground phytomass ( $\text{g m}^{-2}$ ) and metal and As concentration ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) in the root component of microcosms corresponding to scenario 1.

Microcosm	Phytomass	Cu	Zn	Pb	Cd	Cr	Ni	As	Al	Mn
1	439	117	1075	576	14	74	16	0.0	2372	618
2	-	27	596	26	1.5	105	25	1.0	3581	168
3	36	114	586	41	1.5	40	16	12	9373	1247
4	474	57	648	332	0.4	67	14	9.0	3555	520
5	485	78	261	23	0.4	44	16	0.0	1541	322
6	552	13	319	6.2	0.0	5.3	2.3	2.3	448	85
7	726	49	817	23	1.3	67	19	3.9	2637	206

**Table 7.** Below-ground phytomass ( $\text{g m}^{-2}$ ) and metal and As concentration ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) in the root component of microcosms corresponding to scenario 2.

Microcosm	Phytomass	Cu	Zn	Pb	Cd	Cr	Ni	As	Al	Mn
8	957	2793	675	68	12	78	45	90	2414	600
9	394	2097	810	47	19	7.1	7.1	26	667	729
10	310	957	274	9.1	3.5	5.5	7.7	52	984	541
11	590	1894	505	27	17	6.3	5.2	0.0	956	480
12	222	1930	275	66	0.0	118	68	271	5193	904
13	686	893	409	57	0.5	36	18	213	3170	506
14	297	1133	527	46	6.4	40	27	112	1704	683
15	229	1340	455	36	7.5	39	24	57	3257	776
16	454	946	293	21	9.4	7.7	11	6.7	1761	488
17	230	1313	501	45	3.0	106	60	78	3433	403
18	441	557	359	37	1.3	19	12	89	2484	300
19	259	441	485	5.3	0.9	15	9.3	0.0	1069	231
20	72	734	305	57	9.2	12	11	508	1296	261
21	934	169	532	1.2	3.5	31	19	1.6	1813	429
22	421	287	353	4.4	1.6	3.6	6.7	9.7	1310	374
23	66	461	682	16	16	206	85	418	8196	402
24	66	561	430	30	6.9	0.0	5.7	514	429	519
25	10	788	521	9.4	19	0.0	3.3	336	445	257
26	56	403	578	4.2	11	1.0	3.9	611	442	326
27	167	106	389	2.3	0.0	10	6.0	73	1622	261
28	698	30	433	22	0.4	68	24	2	1943	495
29	1019	35	162	7.9	0.0	183	81	1.5	4179	296

Metal and As pseudo-total concentration in soil provides poor information about bioavailability of these elements, thus their hazard. Therefore, we considered that metal and As concentration in root component (which may show more realistically the bioavailability of these elements) might be related with phytomass. Thus, chemical results of root components were correlated with phytomass as it has been previously explained for soils. Regression results with the data set from three scenarios (fig 1) indicate a negative relationship between phytomass and metal concentration in root component.

PCA (fig 1A) shows a first component positively correlated with all metals and As. Second component seem to differentiate cases of scenario 3 (with Zn and Pb as main

**Table 8.** Below-ground phytomass ( $\text{g m}^{-2}$ ) and metal and As concentration ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) in the root component of microcosms corresponding to scenario 3.

Microcosm	Phytomass	Cu	Zn	Pb	Cd	Cr	Ni	As	Al	Mn
30	2572	26	2394	1130	6.3	112	63	67	2318	231
31	1278	29	2118	1146	13	30	25	0.0	1208	852
32	142	59	1318	670	13	73	46	0.0	1769	324
33	144	114	1078	1451	19	7.6	5.4	46	576	163
34	417	65	749	533	7.9	10	5.2	5.9	489	65
35	379	100	1938	2431	19	2.6	6.1	105	620	139
36	1386	36	1862	3663	10	25	9.1	54	998	209
37	343	58	1113	793	12	234	37	65	2691	183
38	149	125	2672	2598	45	28	20	247	2483	642
39	1829	37	337	407	0.8	107	14	12	1451	95
40	278	335	329	376	5.1	1.1	0.4	9.1	378	95
41	220	103	1745	3769	46	128	76	76	4188	361
42	1171	38	758	160	1.8	2.3	3.6	1.1	280	70
43	203	159	1148	2956	5.6	1.5	5.0	182	1587	117
44	10	72	1757	1646	3.1	17	17	1171	5612	2148
45	252	26	2947	182	4.0	13	9.3	0.0	1958	225
46	426	52	1269	458	4.0	0.5	1.5	76	489	106
47	565	53	896	515	2.8	2.7	2.6	35	868	71
48	594	47	436	431	0.9	27	7.1	51	1500	113
49	619	43	924	269	1.9	12	13	19	1827	216
50	1010	23	501	169	0.3	37	20	89	1748	383
51	274	79	1034	859	3.6	5.2	6.2	529	807	450
52	19	59	2107	848	2.4	78	55	522	14510	569
53	703	49	188	50	0.2	3.6	3.9	0.0	660	53
54	1163	11	356	132	0.4	30	15	0.0	716	80
55	565	7.0	168	6.3	0.0	81	38	0.0	2317	89

**Table 9.** Correlations between heavy metal and As concentrations in soils and root components

Element	Navas		Garganta		Mazarambroz	
	Coef.	Sig.	Coef.	Sig.	Coef.	Sig.
Cu	0.68 <sup>L</sup>	R	0.89 <sup>L</sup>	***	NR	
Zn	NR		NR		0.50 <sup>L</sup>	**
Pb	NR		0.44 <sup>L</sup>	*	0.58 <sup>S</sup>	**
Cd	d.i.		0.86 <sup>L</sup>	*	NR	
As	d.i.		0.91 <sup>L</sup>	***	NR	
Al	NR		0.58 <sup>L</sup>	**	0.38 <sup>L</sup>	R
Mn	NR		NR		0.42 <sup>S</sup>	*

Coef., Pearson coefficient unless otherwise indicated; Sig., significance at 90% (R), 95% (\*), 99% (\*\*), 99,9% (\*\*\*); NR, no significant relation; i.d., insufficient number of data (N<4); <sup>L</sup> log-transformation, <sup>S</sup> Spearman non parametric coefficient.

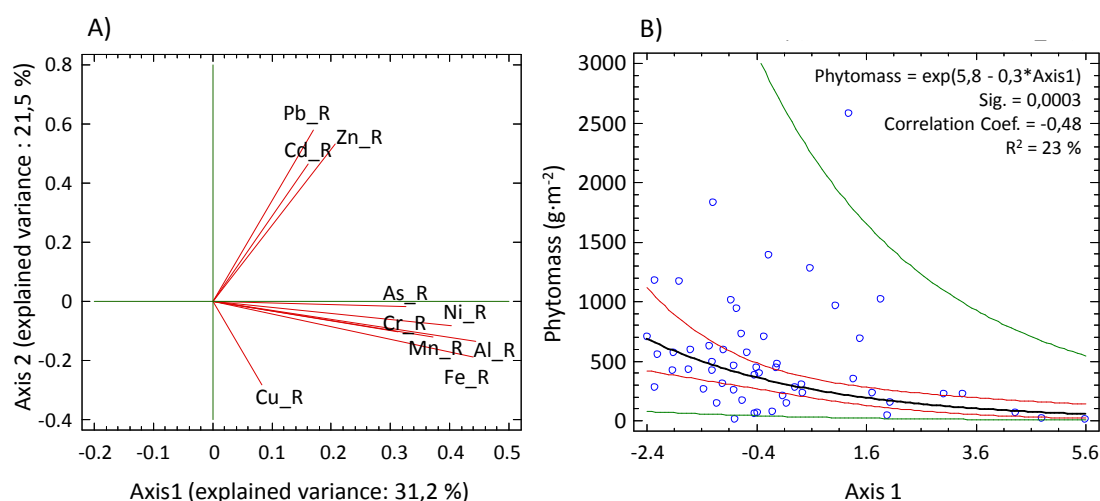
pollutants) from those of scenario 2 (where Cu is the main pollutant). The first axis, which indicates the gradient of metal and As concentration in root components, was plotted against phytomass (fig 1B). Even if signification of exponential model was very high (99,9 %), the explained variance was not important ( $R^2 = 23 \%$ ). This indicates that there is a tendency to be related, but there must be other factors that explain better the below-ground

phytomass. Even so, we decided to study the data for each scenario separately.

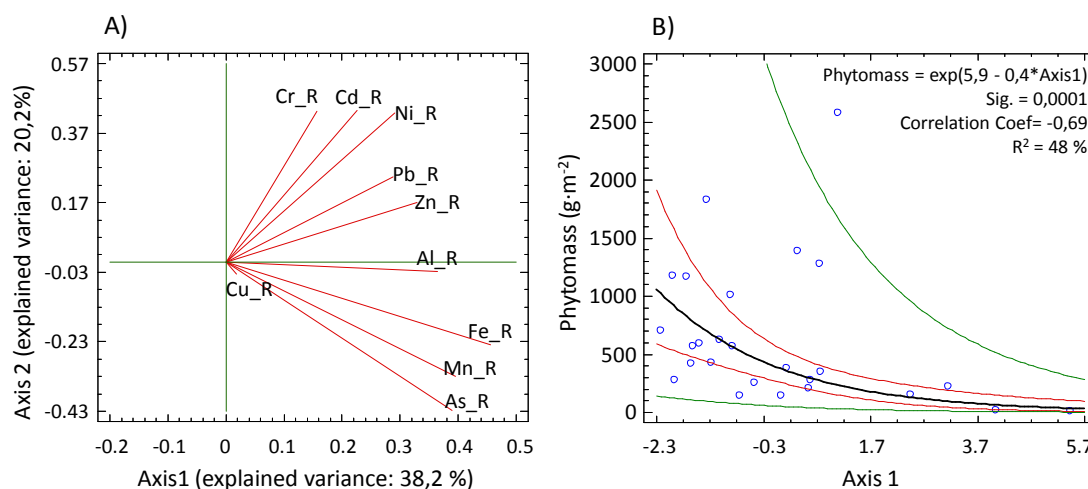
Data of scenario 1 did show no relation between these two parameters, maybe due to low number of data (6 complete cases). Relationship was not found with data

**Table 10.** Mean, maximum and minimum of bioaccumulation indices ( $[\text{metal}]_{\text{plant}} \cdot [\text{metal}]_{\text{soil}}^{-1}$ ) in roots (R) and rhizomes (Z).

Site	Cu		Zn		Pb		Cd		As		Al		Mn	
	R	Z	R	Z	R	Z	R	Z	R	Z	R	Z	R	Z
<i>Scenario1</i>														
Mean	9.6	2.6	16	3.6	0.20	0.10					0.11	0.04	2.3	0.75
Max	13	2.6	29	5.0	0.40	0.10					0.13	0.04	3.5	1.3
Min	5.8	2.5	2.0	2.2	0.00	0.09					0.10	0.03	1.1	0.24
<i>Scenario2</i>														
Mean	1.6	0.78	4.0	1.8	0.09	0.10	2.0	1.3	0.41	0.00	0.05	0.03	1.0	1.0
Max	2.6	1.5	5.8	3.1	0.24	0.36	2.4	1.7			0.09	0.07	1.8	2.2
Min	0.90	0.35	1.5	0.70	0.01	0.00	1.5	1.0			0.03	0.01	0.38	0.2
<i>Scenario3</i>														
Mean	5.4	2.8	1.2	0.66	0.81	0.34	1.2	0.93	0.19	0.03	0.08	0.02	0.70	0.3
Max	17	21	4.9	2.2	2.1	1.4	2.7	2.1	0.76	0.15	0.38	0.05	2.3	0.7
Min	0.38	0.28	0.19	0.05	0.14	0.07	0.23	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.04	0.02

**Fig 1.** Relationship between phytomass and metal and As concentration in root component of all microcosms used in the bioassay. Graphic A) represents the weight of each variable in the new PCA axis, cases of all microcosms (55) were used. Graphic B) represents the relation between values of the first axis and phytomass. Black line represents the exponential model, red one the confidence intervals (95%) and green line the prediction limits.

of scenario 2 neither. On the contrary, data of scenario 3 did demonstrate a relationship between phytomass and metal and As concentration in root components (fig 2). In this case, the exponential model explains the 45 % of variance. Studying this relationship with every element separately (table 11), we discovered that phytomass is related with the non-principal metals of each mine, that is As in the case of scenario 2 and basically Cu in the case of scenario 3. No metal was related with phytomass in the case of scenario 1. These relationships are not linear and are mainly characterized by a high variability of phytomass when element



**Fig 2.** Relationship between phytomass and metal and As concentration in root component of microcosms of scenario 3. Graphic A) represents the weight of each variable in the new PCA axis, cases of microcosms from scenario 3 (26) were used. Graphic B) represents the relation between values of the first axis and phytomass. Black line represents the exponential model, red one the confidence intervals (95%) and green line the prediction limits.

**Table 11.** Spearman correlation coefficients between phytomass and element concentration in root component.

Element	Scenario 2		Scenario 3	
	Coef.	Sig.	Coef.	Sig.
Pb			-0.39	R
Cu			-0.73	***
Cd			-0.40	*
As	-0.68	**	-0.40	*

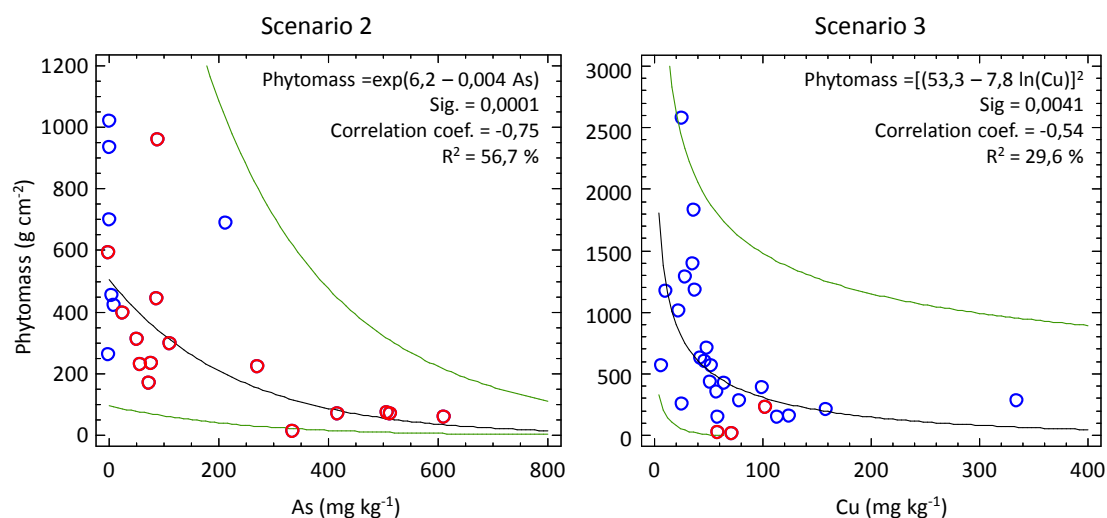
Significance of 90% (R), 95 % (\*), 99 % (\*\*) and 99,9 % (\*\*\*).

concentration is low, whereas it is always low when concentration is high (fig 3).

This relationship must not be the only explanation of below-ground phytomass. In fact, during the harvest, we observed that phytomass seemed to

be related with the presence of perennial rhizomatous species (fig 4). More specifically, *Scirpoides holoschoenus* was the species that could contribute mostly to increase below-ground phytomass. Mean phytomass in microcosms in which this species was present was 684 g m<sup>-2</sup>, compared with those in which it was not present (274 g m<sup>-2</sup>). This difference is statistically significant (T-test, 99.9%). Differences are also significant when they are calculated separately in each scenario. Arsenic content in root component from microcosms of scenario 2 seems to affect the presence of *S. holoschoenus* (fig 3). This fact is also proved in the case of Cu in scenario 2. *Agrostis castellana* also seems to increase below-ground phytomass. Indeed, mean phytomass in microcosms with *A. castellana* is 602 g m<sup>-2</sup>, and it is 374 g m<sup>-2</sup> when it was not present. However, this difference is not significant.





**Fig 3.** Relationship between below-ground phytomass ( $\text{g m}^{-2}$ ) and metal concentration in root components ( $\text{mg kg}^{-1}$ ). Best fitting model. Blue spots represents microcosms with *S. holoschoenus*, red ones those without this species.



**Fig 4.** Detail of the bottom of two microcosms in the end of the bioassay, a) dominated by *S. holoschoenus* rhizomes, b) dominated by grasses (Poaceae).

### 3.3. Metal and As contents in roots of native species collected from mine sites

Taking into account the role that perennial species seem to play in root metal accumulation, we decided to study some of them collected from field. We collected and analysed dominant perennial species from the two sites with the highest pollution (Garganta and Mazarambroz). In general, it can be stated that metal and As concentrations in roots are related to those of soils. Nevertheless, absorption dynamics are complex and depends on soil properties in each abandoned mine site. Results from native species collected in field (table 12) differ from those of bioassay, above all in the non-principal metals in each site. Cu concentration in root systems of *A. castellana* collected from Garganta mine was much higher than that found in

**Table 12.** Maximum metal and As concentration (mg kg<sup>-1</sup>) in root systems of perennial species collected in abandoned mine sites.

Species	Cu	Zn	Pb	Cd	Ni	Cr	As	Al	Mn
<u>Garganta mine</u>									
<i>Agrostis castellana</i>	7471	496	83	36	19	78	0.0	5263	813
<i>Arrhenatherum elatius</i> subsp. <i>bulbosum</i>	33	158	0.0	0.0	3.9	16	0.0	-	115
<i>Corrigiola telephiifolia</i>	356	211	14	8.0	4.2	6	0.0	1622	75
<i>Dactylis glomerata</i>	254	217	0.0	10	7.8	71	0.0	1566	225
<i>Holcus lanatus</i>	105	674	0.0	0.0	56	60	0.0	3736	516
<i>Plantago lanceolata</i>	50	279	4.0	17	4.5	21	-	-	306
<i>Sanguisorba minor</i>	233	218	4.9	0.0	9.4	13	-	-	62
<u>Mazarambroz mine</u>									
<i>Agrostis castellana</i>	43	2875	1116	15	66	251	43	3775	386
<i>A. elatius</i> subsp. <i>bulbosum</i>	12	970	0.0	2.8	8.6	11	0.0	138	60
<i>Scirpoides holoschoenus</i>	35	895	1952	3.2	5.3	3.7	-	-	34

samples from microcosms. However, As concentration in samples from field never was as high as concentration found in samples from bioassay (maximum of 611 mg kg<sup>-1</sup>). In the case of scenario 3, there was not a great difference between Zn and Pb values in field and in bioassay, but Cu, Cd and As results were much lower in plants collected from field than those from bioassay. Anyway, results of field samples seem to confirm the importance of *A. castellana* and *S. holoschoenus* in phytostabilization, since they are the species with the greatest metal concentration in root systems. Regarding the dominance of these species, *S. holoschoenus* was more abundant in microcosms than in field records, whereas *A. castellana* was, without any doubt, the dominant species in most of sampling points. The former was only recorded in the most humid areas.

### 3.4. Metal contents in cells of rhizome and root tissues analysed by scanning electron microscopy

Microanalyses of *S. holoschoenus* and *A. castellana* root systems were conducted in order to study in detail the metal uptake by below-ground organs. Even if these microanalyses are rather an approach, we find them interesting for further research in phytostabilization issues.

Metal retention by rhizomes tissues of species growing in microcosms of scenario 3 are shown in tables 13 and 14. In general, cells of external tissues, which are in contact with soil, seem to have greater metal content. It is also interesting the presence of metals in conductive tissues (xylem), indicating a possible translocation

**Table 13.** Mean percentage of metals in rhizome cells of *S. holoschoenus* from microcosms of scenario 3.

Element	External tissues	Intermediate tissues	Xylem
Pb	29	22	41
Cr	2.0	1.4	1.4
Ni	7.3	10	7.2
Cu	15	20	8.3
Cd	n.d.	n.d.	n.d.

4 microanalyses were performed in the section.  
n.d., not detected

**Table 15.** Mean percentage of Cu and Zn in cells of rhizome, main root and secondary root of *A. castellana* from microcosms of scenario 2

Cells	Rhizome		Main root		Secondary root	
	Cu	Zn	Cu	Zn	Cu	Zn
External tissues	4.9	-	20	-	16	7.3
Intermediate tissues	22	-	13	8.9	-	-
Xylem	11	-	20	6.2	15	7.3

Number of microanalyses performed: rhizome: 3; main root: 3 in external cells, 2 in intermediate tissue cells, 10 in xylem; secondary root: 2 in external cells, 4 in xylem

**Table 14.** Mean percentage of metals in rhizome cells of *A. castellana* from microcosms of scenario 3.

Element	External tissues	Intermediate tissues	Xylem
Pb	62	60	49
Zn	4.04	2.1	n.d.
Cd	n.d.	n.d.	2.6
Cu	28.2	27	25

4 microanalyses were performed in the section.  
n.d., not detected

**Table 16.** Mean percentage of metals in rhizome cells of *S. holoschoenus* from microcosms of scenario 2.

Element	External tissues	Xylem
Cu	40	19
Cr	9.4	-
Ni	34	16
Cd	2.9	-
Zn	-	-

4 microanalyses were performed in the section.  
n.d., not detected.

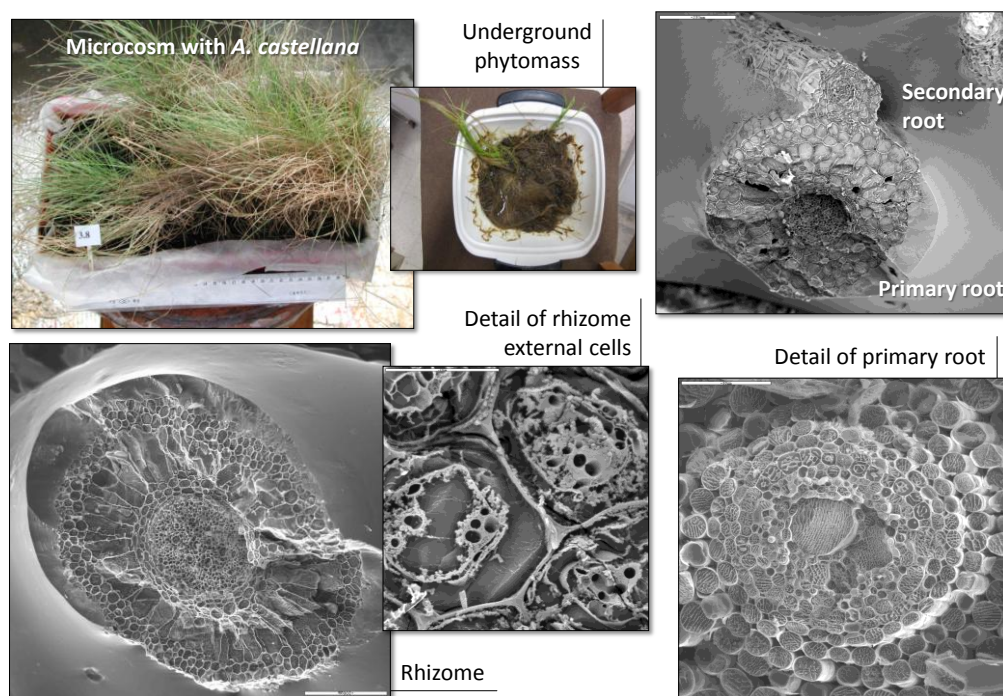
to above-ground parts. Although *S. holoschoenus* shoots are not consumed by livestock, *A. castellana* leaves are edible, being a risk of toxicity to animals.

In the case of microcosms of scenario 2, results of *A. castellana* (table 15) are more detailed than those of *S. holoschoenus* (table 16), since the former is more abundant in these microcosms. A synthesis of the protocol followed for obtaining the results of table 15 is shown in fig 5.

Microanalyses in root and rhizomes of *A. castellana* (table 15) confirm that metal accumulation is higher in roots than in rhizomes, so this observation could be assumed for results from field samples (table 12).

## 4. Discussion

This study examines the bioaccumulation of metals and As by the root systems of plants growing in polluted soils under greenhouse conditions. These conditions vary somewhat from "real" environmental conditions, especially in terms of the soil



**Fig 5.** Synthesis of the protocol for LTSEM observation

and environmental water regime. This difference could lead to an increase in heavy metal bioavailability, which would explain the high uptake detected relative to soil levels in the bioassays compared to plant specimens collected in the field. These different conditions could also explain the growth of perennial species such as *S. holoschoenus*, which in the field can only be found in the wetter zones. It should be noted that increased rainfall will speed up the secondary succession process in the plant communities. However, the results obtained provide a good overall picture of several important aspects of the phytostabilization of soils polluted with several heavy metals, As and, in many cases (for a soil pH of 4.5 to 5.5), with Al.

The maximal absorption of metals and As by the root systems of grassland communities growing at the abandoned mine sites examined here was higher than that observed in the species employed in studies by Conesa et al. (2007), Jana et al. (2012); Lei and Duan (2008), despite the higher soil Zn and Pb concentrations compared to the soils we used to set up our microcosms.

The metals taken up by root systems may translocate to stems and leaves, in agreement with electron microscopy studies that have examined the rhizomes of *S. holoschoenus* and *A. castellana*, and of other studies performed in field specimens

(Hernández and Pastor, 2005; Pastor and Hernández, 2009a; Pastor et al., 2010). The ability of roots to take up metals when these occur in high proportions in soils needs to be considered due to a possible food chain effect. Thus, animals will consume such affected plants and in turn, many wild animal species are the targets of hunters.

It is striking that below-ground phytomass was correlated with the metals that do not appeared in greatest concentrations in the soils of each site. This was observed for As in the microcosms prepared using soil from scenario 2, and for As, Cu and Cd in soil obtained from scenario 3. It was precisely these metals that showed a higher bioavailability in the bioassays compared to that observed in field studies. In effect, the microcosm showing least below-ground phytomass also returned the highest root As level (1171 mg kg<sup>-1</sup>). Such level was not detected in any of the plants growing in the field.

A possible explanation for this may be found in the review by Clements and Rorh (2009), who argued that the adaptation or acclimation of a community to a series of stress factors (described as Pollution-Induced Community Tolerance, PICT) occurs at a cost; that is, it increases susceptibility to other stressors. This rationale suggests that the increased bioavailability of metals in our bioassay acts as a new stress factor for the plant communities that had already adapted to elevated levels of Cu in the case of the scenario 2, and to Zn and Pb in the case of scenario 3.

Perennial herbaceous species with rhizomes play an essential role in creating a large biomass root layer. However, this is also true of the dense fascicular root systems of annual Poaceae species, which aggregate in the top soil centimeters, as we observed for rhizomes and stolons at the end of the bioassay. Hernández and Pastor (1988) and Hernández et al. (1989, 1995) highlighted the importance of the fascicular morphology of annual Poaceae in grasslands whose soils become seasonally flooded in Mediterranean environments. However, it is the wide range of root system morphologies found in these grassland communities described by Hernández et al. (1992) that is responsible for the creation of this matted underground network. The growth of this network in the rubble tips and slopes of old mines slows down the surface run off of pollutants towards deeper soil layers, thus reducing impacts on the water table.

These considerations are consistent with the ideas expressed by Bolan et al. (2011), who argued that a large number of species is needed to improve the phytostabilization of soil metals, supporting the use of plant covers to restore polluted soils. In agreement with the opinions of others (Becerra-Castro et al. 2012; Conesa and Faz, 2011; Conesa et al., 2006, 2007; Lei and Duan, 2008), we also feel that certain native species that grow at abandoned mine sites exert an effect on the rhizosphere's chemical properties including the bioavailability of heavy metals and trace elements. Finally, we would recommend that not only annual species should be used for the phytostabilization of soils with very high metal contents. In agreement with the findings of Martínez-Alcalá et al. (2012), the contribution of these species to this remediation technique is not relevant.

The root systems of Mediterranean grassland communities thus play an important role in phytostabilizing the metals present in polluted soils. These root systems confer mechanical stability, which reduces metal transport, induce the formation of aggregates, enhancing porosity, and absorb soil water, reducing the amount of water containing heavy metals, Al and As that reaches the water table.

The good response shown by the plant communities in most of our microcosms, even those with elevated soil metal concentrations, stresses the importance of working with native plant species that thrive at polluted soil sites. This point was highlighted by Pastor and Hernández (2010), who identified pasturelands in central Spain as reference systems for any remediation measure designed to recover degraded soils. Experiments by Zhang et al. (2012) and Zou et al. (2011) have revealed the different tolerance to Zn and Pb shown by two ecotypes of the same plant species; one collected from a polluted site and the other from an unpolluted zone. The different sensitivity of ecotypes of a single species towards pollutants has been well established in ecotoxicology studies. This means that despite phytostabilization being an accepted technique for restoring metal-polluted soils, we cannot generalize about the use of a given species for all cases.

Finally, we admit that the use of amendments needs to be tailored to a given setting since not all of them are equally effective as reported by several authors (Carcamo et al., 2012; Clemente et al., 2012; Kshirsagar and Aery, 2007; Méndez et al., 2007). For example, for the soils of the *Garganta* mine, whose organic matter level is highly

acceptable, we conducted a prior bioassay such as the present to test the use of chelating agents (Pastor et al., 2007). According to the results, these substances had no severe negative effects on biodiversity yet they significantly increased the amounts of Cu detected in the roots of the species. Specifically, *Corrigiola telephiifolia* and *Agrostis castellana* extracted large amounts of Cu in combination with EDTA, though some nutritional imbalance was observed. In addition, metal amounts accumulating in roots were lower in response to DTPA than EDTA.

## 5. Conclusions

The present study provides useful information on the root systems of the plant communities that grow in the soils of abandoned mine sites under a Mediterranean climate. The metals and trace elements detected in these root systems reveal that these organs are capable of extracting substantial amounts of Cu, Zn, Pb, Cd, Cr, Ni, As, Mn and Al from polluted soils. Our results also provide insights into the relationship between below-ground phytomass and the combined effects of the metals present in the stressful environment where this phytomass grows. Although this attribute of the plant community was uncorrelated with the levels of metals and As in the soil, correlation was observed between below-ground phytomass and the concentrations of metals absorbed by roots. Thus, greater accumulation values were recorded for Zn, Cu, Cd and Mn (in this order), with bioaccumulation indices > 1.

The species observed to mostly contribute to phytostabilization were *A. castellana* and *S. holoschoenus*, although we should also stress contributions by other perennials such as *Arrhenatherum elatius* subsp. *bulbosum*, *Corrigiola telephiifolia*, *Sanguisorba minor* and *Plantago lanceolata*. In addition, we propose that the organization of the root systems of Poaceae growing in the topsoil centimeters of these grasslands is such that an underground mat is formed and this network is equally responsible for phytostabilization. This may be deduced from the entire root component of the microcosms set up along with the results provided by microanalysis of the rhizomes and roots of *A. castellana*.

## Acknowledgements

Authors acknowledge the projects CTM 2008-04827/TECNO of Spanish Science and Innovation Ministry, P2009/AMB-1478 Community of Madrid Program (EIADES). They

would like to thank Sofía Hernández for her help in sample preparation. MJGG was funded by the FPU fellowship (AP2008-02934) of Spanish Education Ministry.

## References

- Andreazza R, Bortolon L, Pieniz S, Giacometti M, Roehrs DD, Lambais MR, Camargo FAO. Potential Phytoextraction and Phytostabilization of Perennial Peanut on Copper-Contaminated Vineyard Soils and Copper Mining Waste. *Biol Trace Elem Res* 2011; 143 (3): 1729-39.
- Becerra-Castro C, Monterroso C, Prieto-Fernández A, Rodríguez-Lamas L, Loureiro-Viñas M, Acea MJ, Kidd PS. Pseudometallophytes colonising Pb/Zn mine tailings: A description of the plant-microorganism-rhizosphere soil system and isolation of metal-tolerant bacteria. *J Hazard Mater* 2012;217- 218: 350-9.
- BOE. 1990. RD 130/1990. Real Decreto 1310/1990 de 29 de octubre, por el que se regula la utilización de los lodos de depuración en el sector agrario. *Boletín Oficial del Estado* del 1 de noviembre de 1990.
- Bolan NS, Park JH, Robinson B, Naidu R, Huh KY. Phytostabilization: A Green Approach to Contaminant Containment. *Adv Agron* 2011;112: 145-204.
- Cárcamo V, Bustamante E, Trangolao E, Fuente LM, Mench M, Neaman A, Ginocchio R. Simultaneous immobilization of metals and arsenic in acidic polluted soils near a copper smelter in central Chile. *Environ Sci Pollut R* 2012; 19: 1131-43.
- Clemente R, Walker DJ, Pardo T, Martínez-Fernández D, Bernal MP. The use of a halophytic plant species and organic amendments for the remediation of a trace elements-contaminated soil under semi-arid conditions. *J Hazard Mater* 2012;223- 224: 63- 71.
- Clements WH, Rohr JR. Community responses to contaminants: using basic ecological principles to predict ecotoxicological effects. *Environ Toxicol Chem* 2009;28 (9): 1789-1800.
- Conesa H, Faz A. Metal Uptake by Spontaneous Vegetation in Acidic Mine Tailings from a Semiarid Area in South Spain: Implications for Revegetation and Land Management. *Water Air Soil Poll* 2011; 215: 221-7.
- Conesa H, Faz A, Arnaldos R. Heavy metal accumulation and tolerance in plants from mine tailings of the semiarid Cartagena-La Union mining district (SE Spain). *Sci Total Environ* 2006: 366 (1): 1-11.
- Conesa H, Faz A, Arnaldos R. Initial studies for the phytostabilization of a mine tailing from the Cartagena-La Union Mining District (SE Spain). *Chemosphere* 2007;66 (1): 38-44.
- De Los Ríos A, Ascaso C, Wierzchos J. Study of lichens with different state of hydration by the combination of low temperature scanning electron and confocal laser scanning microscopies. *Internatl Microbiol* 1999; 2: 251-7
- Domínguez MT, Madrid F, Marañón T, Murillo JM. Cadmium availability in soil and retention in oak roots: Potential for phytostabilization, *Chemosphere* 2009;76 (4): 480-6.



Gutiérrez-Ginés MJ, Pastor J, Hernández AJ. Integrated approach to assessing the effects of soils polluted with heavy metals on a plant population. *Ecotoxicology* 2012;21: 1965–78.

Hernández AJ, Pastor J. Ecological information from root characteristics of winter-flooded grasslands. In: *Grassland and Animal Production Now and the Future*. Abstract European Grassland Federation. Dublin; 1988.

Hernández AJ, Pastor J. Incidencia conjunta de metales pesados en pastos de vacuno ubicados en el entorno de una mina abandonada en la Sierra de Guadarrama. In: De La Roza B, Martínez-Fernández A, Carballal A, editors. *Producciones agroganaderas: Gestión eficiente y conservaciones del medio natural*. Gijón: SERIDA; 2005. p. 955–63.

Hernández AJ, Pastor J. Incidencia de metales pesados en la biodiversidad de pastizales en el emplazamiento de una explotación abandonada de baritina. In: *Los Sistemas Forrajeros: Entre la Producción y el Paisaje*. SEEP; 2007a. p. 122-8.

Hernández AJ, Pastor J. 2007b. Ecosystems health and geochemistry: concepts and methods applied to abandoned mine sites. In: Loredó J, editor. *The 23rd International Applied Geochemistry Symposium (IAGS 2007)*. Oviedo: Universidad de Oviedo; 2007b. p. 219-31.

Hernández AJ, Pastor J. Validated approaches to restoring the health of ecosystems affected by soil pollution. In: Domínguez JB, editor. *Soil Contamination Research Trends*. New York: Nova Science Publishers; 2008. p. 51-72.

Hernández AJ, Pastor J, Oliver S. Relationships between root morphology and nutrient uptake in winter-flooded Mediterranean grasslands. In: *International Grassland Congress*, Nice, France. Association Française pour la Production Fourragère; 1989. p. 15-6.

Hernández AJ, Pastor J, González T, Oliver S. Study of plant biomass in oligotrophic pasture communities of western central Spain. In: *IV<sup>o</sup> Congrès International des Terres de Parcours*, Montpellier, France; 1991. p. 211-2.

Hernández AJ, Pastor J, Urcelay A, Estalrich E. Características radiculares de pastos oligotrofos con *Agrostis*. In: *XXXII Reunión Científica de la SEEP*, Pamplona; 1992. p. 140-5.

Hernández AJ, Pastor J, Estalrich E, Oliver S. Relations between the yield and root soil characteristics of species from Mediterranean pasture ecosystems. In: Cook HF, Lee HC, editors. *Soil Management in Sustainable Agriculture*. London: Wye College Press; 1995. p. 354-62.

Hernández AJ, Urcelay A, Pastor J. Evaluación de la resiliencia en ecosistemas terrestres degradados encaminada a la restauración ecológica. In: *II Reunión Española de Ciencia de Sistemas (RECS-II)*. Valencia: SESGE; 2002. p. 45-53.

Jana U, Chassany V, Bertrand G, Castrec-Rouelle M, Aubry E, Boudsocq S, Laffray D, Repellin A. Analysis of arsenic and antimony distribution within plants growing at an old mine site in Ouche (Cantal, France) and identification of species suitable for site revegetation. *J Environ Manage* 2012;110: 188-93.

Johansson L, Xydas C, Messios N, Stoltz E, Greger M. Growth and Cu accumulation by plants grown on Cu containing mine tailings in Cyprus. *Appl Geochem* 2005; 20: 101–7.

- Kshirsagar S, Aery NC. Phytostabilization of mine waste: Growth and physiological responses of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. *J Environ Biol* 2007;28(3): 651-4.
- Lei D, Duan C. Restoration potential of pioneer plants growing on lead-zinc mine tailings in Lanping, southwest China. *J Environ Sci* 2008; 20: 1202-9.
- Martínez-Alcalá I, Clemente R, Bernal MP. Efficiency of a phytoimmobilisation strategy for heavy metal contaminated soils using white lupin. *J Geochem Explor* 2012;123: 95-100.
- Mendez MO, Maier R. Phytostabilization of mine tailings in arid and semiarid environments – an emerging remediation technology. *Environ Health Persp* 2008;116: 278-83.
- Mendez MO, Glenn EP, Maier RM. Phytostabilization potential of quailbush for mine tailings: growth, metal accumulation, and microbial community changes. *J Environ Qual* 2007; 36 (1): 245-53.
- Pastor J, Hernández AJ. La restauración en sistemas con suelos degradados: estudio de casos en vertederos, escombreras y emplazamientos de minas abandonadas. In: Millán R, Lobo C, editors. *Contaminación de Suelos. Tecnologías para su Recuperación*. Madrid:CIEMAT; 2008. p. 523-44.
- Pastor J, Hernández AJ. Contenidos de metales pesados en gramíneas de ecosistemas desarrollados sobre antiguas minas abandonadas de Madrid y Castilla-La Mancha. In: *Cumbre del Desarrollo Sostenible*. CD. Fundación CONAMA. 2009a.
- Pastor J, Hernández AJ. Multifuncionalidad de pastos con *Agrostis castellana* L. In: Reiné R, Barrantes O, Broca A, Ferer C, editors. *La multifuncionalidad de los pastos: producción ganadera sostenible y gestión de los ecosistemas*. Ecología y Botánica de Pastos. Huesca:SEEP; 2009b. p. 43-51.
- Pastor J, Hernández AJ. Pastizales del occidente de la comunidad de Madrid: su importancia como referentes para acciones de recuperación de sistemas degradados. In: Calleja A et al. editors. *Pastos: fuente natural de energía*. León: Universidad de León; 2010. p. 221-7.
- Pastor J, Gutiérrez-Maroto A, Hernández AJ. Biomarcadores a nivel de una comunidad de pasto y de una población herbácea forrajera para suelos contaminados por cobre. *Anales de Biología* 2003; 25: 103-8.
- Pastor J, Martín-Aparicio A, Gutierrez-Maroto A, Hernández AJ. Effects of two chelating agents (EDTA & DTPA) on the autochthonous vegetation of a soil polluted by Cu, Zn and Cd. *Sci Total Environ* 2007; 378: 114-8.
- Pastor J, Gutiérrez-Ginés MJ, Hernández AJ. Contenidos de metales en plantas y estudio de la generación de lixiviados en una antigua mina de plata con contenidos elevados de Zn y Pb. In: Estavillo JM, editor. *Aspectos fisiológicos, agronómicos y ambientales de la nutrición mineral de las plantas*. Bilbao: Universidad del País Vasco; 2010. p. 217-23.
- Walsh LM, Soil Science Society of America. *Instrumental Methods for analysis of soils and plant tissue*, vol VII. Soil Science Society of America, Wisconsin; 1971.
- Wong MH. Ecological restoration of mine degraded soils, with emphasis on metal contaminated soils. *Chemosphere* 2003;50: 775-80.

Zou T, Li T, Zhanga X, Yua H, Luo H. Lead accumulation and tolerance characteristics of *Athyrium wardii* (Hook.) as a potential phytostabilizer. *J Hazard Mater* 2011;186: 683–9.

Zhang S, Li T, Huang H, Zou T, Zhang X, Yu H, Zheng Z, Wang Y. Cd accumulation and phytostabilization potential of dominant plants surrounding mining tailings. *Environ Sci Pollut R* 2012;19: 3879–88.

# Chapter 9

---

**General conclusions**

–

**Conclusiones generales**



## CONCLUSIONES GENERALES

Si bien en cada uno de los capítulos precedentes se alude a las conclusiones de la investigación expuesta en los mismos, consideramos procedente presentar una visión global de todos los resultados en este capítulo. No olvidamos, sin embargo, que la temática abordada es de naturaleza sistémica, como lo son las realidades medioambientales que son objeto de investigación. Ello significa no sólo que la metodología utilizada debe integrar visiones analíticas concretas con aquellas más holísticas, sino que a medida que avanzamos en su conocimiento, se presentan lagunas que deben seguirse trabajando. Así pues, el estudio abordado deja posibilidades abiertas a la investigación futura, aunque hemos llegado a las siguientes conclusiones.

## GENERAL CONCLUSIONS

Although each of the previous chapters contains its own conclusions, it is considered appropriate to provide in this chapter an overview of all results. The systemic nature of the addressed issue must not be forgotten, in the same way environmental realities subject of research are also systemic. This means not only that the methodology has to integrate certain analytic insights with those more holistic, but as it is increasingly known, there are gaps that need further work. Thus, this study opens up possibilities for future research, while reaching the following conclusions.

1. Aunque las técnicas y métodos más novedosos utilizados en esta tesis sean conocidos, aquí se han usado de forma sistemática para una mejor y más eficiente caracterización de emplazamientos con suelos contaminados y su efecto en las poblaciones vegetales que crecen en ellos. Estos métodos y técnicas son: el análisis del tamaño de partículas mediante el equipo Mastersizer-S de láser rojo, la detección de metales pesados *in situ* mediante la fluorescencia de rayos X portátil, la representación espacial de contaminantes en un emplazamiento mediante Sistemas de Información Geográfica (ArcMap), la determinación de clorofilas de plantas vasculares afectadas por metales pesados mediante el método “Gauss Peak Spectra”, la determinación de la distribución de metales en diferentes tejidos vegetales mediante microanálisis SEM-EDS y la aplicación de técnicas microbiológicas para el aislamiento y cultivo de bacterias endófitas de raíces y partes aéreas de especies herbáceas con capacidad para mejorar la fitorremediación.

2. La fluorescencia de rayos-X portátil se ha revelado muy eficaz por dos motivos principales: i) es capaz de detectar *in situ* y forma fiable metales pesados de suelos y plantas, por lo que es interesante para la investigación preliminar de emplazamientos con suelos potencialmente contaminados; ii) su uso puede contribuir a la sostenibilidad económica y ambiental de proyectos de investigación en emplazamientos con suelos contaminados.

3. Para cualquier investigación fronteriza entre diversas ciencias medioambientales es preciso disponer de datos cuantitativos sin dejar de tener una visión holística de la problemática abordada. En la tesis se aportan:

a) Datos cuantitativos referidos a la contaminación de la capa superficial edáfica que afectan a las poblaciones vegetales que se desarrollan en ella: metales pesados, elementos traza, aluminio, aniones (cloruros, sulfatos, nitratos y nitritos), compuestos orgánicos (hidrocarburos totales, hidrocarburos aromáticos policíclicos, bifenilos policlorados, insecticidas y otros compuestos organoclorados, fenoles y compuestos orgánicos volátiles).

b) Datos cuantitativos respecto a los metales que son absorbidos por las especies de pasto que se ubican en emplazamientos con suelos contaminados y, por tanto, ser susceptibles de pasar a la cadena trófica.

1. Even if the novel techniques and methods employed in this thesis were already known, they have been used systematically for a better and more efficient characterization of sites with polluted soils and their effect on plant population grown on them. These methods and techniques are: analysis of particle size by Mastersizer-S laser system, *in situ* detection of heavy metals by field portable X-ray fluorescence, representation of spatial distribution of pollution by a Geographic Information System (ArcMap), determination of plant chlorophylls affected by heavy metals by “Gauss Peak Spectra” method, study of heavy metal distribution in different plant tissues by microanalyses SEM-EDS, and implementation of microbiologic techniques for isolating and growing root and shoot endophytic bacteria with capacity for phytoremediation improvement.

2. Field portable X-ray fluorescence has proved to be very effective for two main reasons: i) it can detect *in situ* and reliably heavy metals in soils and plants, thus it is interesting in screening research of sites with potentially polluted soils; ii) its use can contribute to economic and environmental sustainability of research projects in sites with polluted soils.

3. Quantitative data is necessary for every research bordering different environmental sciences, not obviating the holistic view of the addressed issues. This thesis provides:

a) quantitative data of topsoil layer pollution that affects plant populations growing on it: heavy metals, trace elements, Al, anions (chlorides, sulfates, nitrates and nitrites), organic compounds (hydrocarbons, polycyclic aromatic hydrocarbons, polychlorinated biphenyls, pesticides and other organochlorinated compounds, phenols and volatile compounds).

b) Quantitative data of metals and trace elements taken up by species of the grasslands developed on sites with polluted soils and, thus, likely to incorporate into food webs.



c) Datos cuantitativos respecto a la fitomasa subterránea que puede desarrollarse en suelos contaminados

4. El planteamiento metodológico llevado a cabo para el estudio de la acción conjunta de metales en la capa superficial edáfica en una población vegetal ha resultado positivo. Y ello, porque es posible detectar los efectos de la contaminación a diferentes escalas de organización biológica: desde parámetros que conciernen a nivel de población, al efecto en órganos, tejidos y células, utilizando tanto métodos de observación visual, como técnicas de análisis químico o de microscopía electrónica. El protocolo seguido es considerado muy importante para la evaluación ecotoxicológica de un emplazamientos con suelos contaminados, así como también para aplicar al análisis de riesgos.

5. En relación a las técnicas de remediación de suelos contaminados utilizando poblaciones vegetales, podemos concluir:

a) Resulta idóneo estudiar la colonización vegetal de VRSU sellados con suelos procedentes de los respectivos entornos donde se ubican, en base a las relaciones entre los factores geo-edáficos y cubiertas de vegetación, así como las relaciones eco-químicas de las especies (nutrición mineral, toxicidad y salinidad). Los resultados obtenidos podrán dirigir una **revegetación** realista de estos sistemas emergentes que son las montañas de residuos en nuestro paisaje. Además, la teoría ecológica de la sucesión de comunidades y de la ecología del estrés, son aplicables a este tipo de escenarios objeto de restauración.

b) Del mismo modo resulta importante el análisis de los metales que son absorbidos por las especies de pasto que crecen en emplazamientos de minas abandonadas de la zona centro de España. Una gran mayoría de las mismas son tolerantes a más de un metal presente en el suelo por encima de sus niveles aceptados, especialmente de la familia Poaceae (gramíneas), para Cu, Zn, Pb y As. Solamente una especie,

c) Quantitative data of underground phytomass that can grow in polluted soils.

4. The methodological approach conducted for the study of the joint action of the different topsoil layer metals in a plant population has been positive. The reason is that it was possible to detect pollution effects at different levels of biological organization (from parameters at population level to effects in organs, tissues and cells), using visual observation methods, chemical analyses and electron microscopy. The applied protocol is considered important for ecotoxicological assessment of sites with polluted soils, as well as for risk analyses.

5. With respect to remediation techniques of polluted soils using plant populations, we can conclude: a) It is suitable to study plant colonization of urban waste landfills sealed with soils from their surroundings, based on the relationship between geodaphic factors and plant covers, as well as eco-chemical relations of plant species (mineral nutrition, toxicity and salinity). Obtained results may lead to a realistic revegetation of these emerging systems, the waste mountains in our landscapes. Furthermore, the ecological theory of community succession and that of ecology of stress are applicable to this type of scenarios under restoration.

b) the analysis of metals that are taken up by grassland species growing on abandoned mine sites in Central Spain is similarly important. Most of them are tolerant to more than one metal at a concentration higher than accepted levels, especially those of Poaceae family for Cu, Zn, Pb and As. Only

*Agrostis castellana*, se ha revelado como hiperacumuladora de Cu, Zn y Pb. Estos resultados son de interés tanto para poder ser utilizados en el empleo de técnicas de fitorremediación de suelos contaminados, como con fines de estudios de toxicidad que pueden provocar en los animales que consumen estas plantas.

c) Nos enfrentamos, no obstante, al conocimiento de **plantas fitorremediadoras** que puedan hacer frente no solo a tolerar la acción conjunta de metales en el suelo, sino que puedan favorecerse de bacterias asociadas - bacterias endofitas - para obtener una degradación eficiente de los compuestos orgánicos. Hemos obtenidos algunas cepas bacterianas que demuestran capacidad de incentivar el crecimiento de las plantas y tolerar BaP y otros contaminantes orgánicos (gasoil y mezclas comerciales de PCBs). Un menor número de cepas parecen tener además capacidad de metabolizar estos compuestos orgánicos. En un futuro inmediato nos proponemos seguir con la identificación de dichas bacterias.

d) Valoramos la contribución conjunta de especies herbáceas perennes y con rizomas, así como la de Poáceas a la **fitoestabilización** de metales en suelos contaminados. La acumulación de metales absorbidos por los sistemas radicales está relacionada con la concentración de ellos en los primeros cm del suelo, siendo mayor para el Zn, Cu, Cd y Mn. Consideramos que los resultados alcanzados son una contribución para una mayor profundización en esta técnica de remediación.

6. Nos ha resultado muy gratificante vincular muchos de los resultados obtenidos a la **docencia** universitaria y secundaria, aunque para ello haya sido preciso la innovación didáctica relacionada con estrategias posibles de ser utilizadas por las y los estudiantes.

*Agrostis castellana* resulted to be hyperaccumulator of Cu, Zn and Pb. These results are interesting for both phytoremediation techniques of polluted soils and studies of toxicity on animals that consume these plants.

c) Nevertheless, we focus on phytoremediation plants that can deal with soil heavy metals and take advantage of associated bacteria (endophytes) to achieve an efficient degradation of organic compounds. Some strains with plant growth promoting capacity and tolerance to BaP and other organics (diesel and commercial mixtures of PCBs) were isolated. Fewer of them seemed to have also the capacity to metabolize these compounds. In the near future we intend to continue with the identification of these bacteria.

d) The joint contribution of perennial herbaceous species with rhizomes and those of Poaceae family to phytostabilization of soil heavy metals was assessed. The accumulation of metals by root systems is related to metal concentration in the first cm of soil, being higher for Zn, Cu, Cd and Mn. Obtained results are considered an important contribution to detailed research of this remediation technique.

6. It has been very rewarding to link many results achieved in this study to University education and Secondary education, although innovation in teaching techniques has been necessary, with strategies that could be used by students.



# Anexo

---

## Transferencia de resultados a la docencia





---

## Transferencias de resultados a la docencia

Aunque las principales transferencias de los resultados de la investigación están dirigidas a la comunidad científica mediante los capítulos que hemos considerado anteriormente, deseamos dejar constancia en este Anexo de la vinculación que dichos resultados han tenido con la docencia y la divulgación de los mismos. Pero además, porque uno de los 6 objetivos que nos propusimos en el proyecto de solicitud de la beca FPU del Programa Nacional y que hemos disfrutado, hacía referencia a: *Investigar acerca de la percepción de la gente (estudiantes, maestros y agricultores fundamentalmente) acerca de la contaminación de los suelos, mediante la elaboración de instrumentos sencillos y el análisis de sus respuestas.*

La transferencia a la Educación Superior se ha basado en la preparación y realización de clases prácticas en las asignaturas de *Ecotoxicología* de la Licenciatura de Ciencias Biológicas y las asignaturas de *Toxicología Ambiental y Salud Pública y Educación Ambiental* del Grado de Ciencias Ambientales, en la Universidad de Alcalá.

También se han diseñado y realizado actividades para acercar la investigación de suelos contaminados a alumnos de Educación Secundaria, de los que daremos cuenta a continuación, aunque a pie de página<sup>(1)</sup> pueden verse otras publicaciones. Así mismo se ha colaborado en la realización de talleres en la 12ª Semana de la Ciencia en el IMIDRA, para alumnos de Bachiller y universitarios.

---

<sup>(1)</sup> Gutiérrez MJ, Cachofeiro P, Mínguez A, Hernández AJ. 2009-a. Investigación del tratamiento de la contaminación del suelo en libros de texto para escolares españoles y dominicanos. *Libro de Actas XVIII Congreso Latinoamericano de la Ciencia del Suelo*. San José, Costa Rica, 16 – 20 nov. 2009.

Hernández, AJ, Gutiérrez MJ, Mínguez A, Alexis S. 2009c. Instrumentos para la percepción de la contaminación de los suelos. *Libro de Actas XVIII Congreso Latinoamericano de la Ciencia del Suelo*. San José, Costa Rica, 16 -20 nov. 2009.

Gutiérrez-Ginés MJ, Pastor J, Hernández AJ. 2010. Effect of heavy metals from mine soils on *Avena sativa* L. and education strategies. *Fresenius Environmental Bulletin*, 19: 2083-2086.

Gutiérrez Ginés MJ. 2012. La contaminación de suelos y los alimentos. Ecología y consumo responsable. *Revista CRÍTICA*, 980: 21.23





---

## Investigación del tratamiento de la contaminación del suelo en libros de texto para escolares y alternativas docentes experimentadas

Hernández AJ, Gutiérrez-Ginés MJ, Pastor J.

Publicado en: *El suelo; funciones y manejo* Ed. Copicentro, Granada, pp. 929-938. 2010. ISBN: 978 84-15026-39-6

### Resumen

Los conocimientos relativos a la contaminación de los suelos que tienen los escolares al finalizar la enseñanza obligatoria tanto en España como en otros países latinoamericanos son, en general, escasos y, a veces, erróneos. La hipótesis de que esta temática sigue siendo un tema poco o mal tratado en los contenidos básicos que forman los *currricula* de la enseñanza obligatoria, nos ha determinado a llevar a cabo el trabajo que se presenta. Partimos de que es importante reconocer la dificultad que entraña la percepción de la contaminación de un suelo, en comparación con la contaminación del aire o del agua, por lo que su comprensión resulta compleja.

Se expone en primer lugar el análisis de esta problemática en 22 libros de texto mediante una misma pauta metodológica, y después se muestran dos instrumentos didácticos sencillos, que ayudan a conseguir buenos resultados acerca de la percepción de la contaminación de los suelos, un experimento para observación directa y otro realizado mediante indicadores con plantas cultivadas. Para el diseño de ambos instrumentos se han combinado dos criterios: a) que se pudieran percibir algunos efectos de la contaminación del suelo en un periodo corto de tiempo, y b) que dicha contaminación respondiera a casos habituales. Los suelos utilizados (capa superficial de *luvisoles cálcicos*, *vertisol*, y *entisoles* principalmente), corresponden tanto a agroecosistemas frecuentes en el territorio mediterráneo hispano (olivar, viñedo y cereal), como a otros frecuentes en el territorio tropical dominicano con cultivos de habichuela y maíz. Además se trabajó con suelos que contienen metales pesados de emplazamientos de ambos territorios (vertedero de RSU y minas abandonadas). Toda la experimentación se ha llevado a cabo con dos colectivos de estudiantes de último año de enseñanza obligatoria para España (4º ESO) y de la República Dominicana (8º grado de enseñanza básica), si bien fueron previamente experimentados por 24 maestras/os de escuelas públicas dominicanas, además de 94 estudiantes de último curso de la Licenciatura en Biología de la Universidad de Alcalá. Se concluye acerca de la importancia de introducir esta temática en los textos escolares.

Palabras clave: Contaminación del suelo, educación obligatoria, libros de texto.

## 1. Introducción

La problemática de la contaminación del suelo nos preocupa por dos razones. Por un lado, los contaminantes del suelo son capaces de afectar de forma negativa a las comunidades vegetales que se desarrollan sobre ellos pudiendo pasar a la red trófica, y, por tanto presentar riesgos para la salud de la personas. Sin embargo, la gente apenas percibe la contaminación de los suelos, aunque asume que algunos compuestos utilizados en la agricultura (fertilizantes químicos, pesticidas y herbicidas) les causen problemas de salud. Nuestro equipo es consciente de ello. Pero, aunque viene investigando en los últimos veinte años, en varias líneas relativas a la contaminación de los suelos (caracterización del estado de los suelos contaminados por metales pesados, contaminantes orgánicos y salinización, mejora de métodos analíticos de contaminantes orgánicos, estudio de la biodisponibilidad de metales pesados, procesos de atenuación natural, evaluación del riesgo para la salud de ecosistemas, desarrollo de tecnologías de descontaminación como la fitorremediación y la recuperación de suelos mediante revegetación), tanto en el territorio mediterráneo centro peninsular como en el tropical del sur dominicano, (Hernández & Pastor, 2008; Pastor y Hernández, 2008), no habíamos acometido los aspectos docentes para colectivos no universitarios.

Si bien los conocimientos científicos referente a los suelos contaminados han ido creciendo en todos estos años, ellos no parecen haber entrado en los *currícula* escolares. Sin embargo, esta temática la consideramos básica para la educación de la ciudadanía, ya que está íntimamente ligada a la salud pública, y esta última, no solamente tiene que ver con la contaminación del aire y del agua, como suele seguir figurando en los textos escolares.

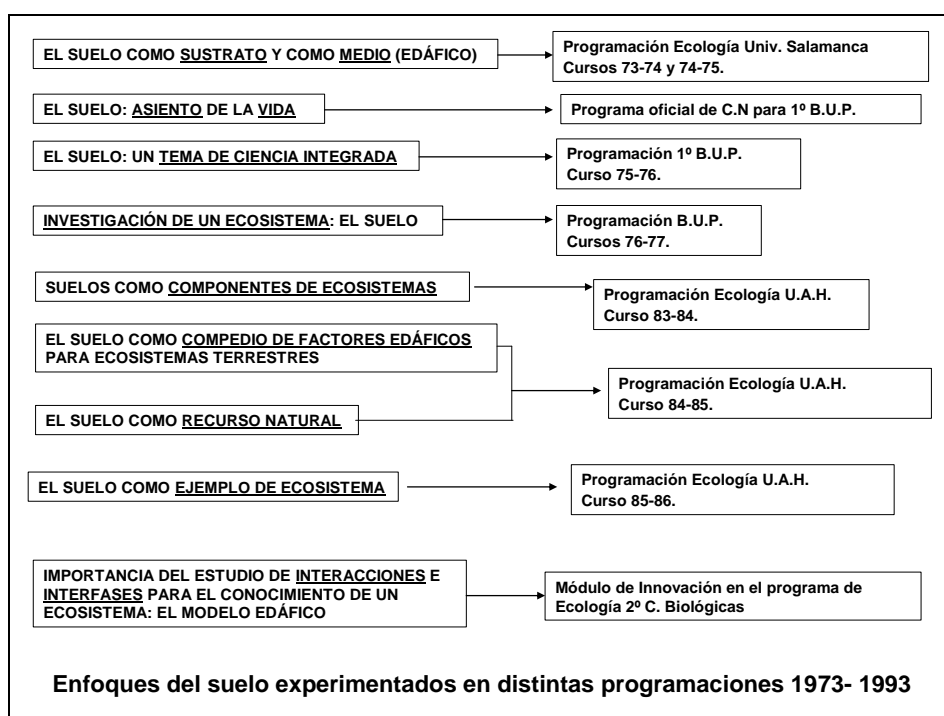


Figura 1

---

No obstante, desde hace algo más de treinta años hemos estado interesados en el tratamiento del suelo en la enseñanza (Hernández, 1978). Las diferentes programaciones experimentadas que fueron llevadas a cabo por algunos de nosotros desde 1973, tanto en la enseñanza universitaria como de bachillerato, (figura 1), fueron recogidas en Hernández (1988). Sin duda, el suelo se nos fue revelando como un tema idóneo para la implementación de una enseñanza interdisciplinar y para la integración de muchas cuestiones entre las ciencias naturales y sociales.

## **2. Objetivos**

El creciente interés por los estudiantes latinoamericanos no universitarios en el conocimiento de la ciencia del suelo, como pudimos comprobar en Guanajuato (México) y en San José (Costa Rica), (SLCS, 2006 y 2009), unido a la voluntad de difundir el conocimiento del suelo dirigido al profesorado de primaria, secundaria, bachillerato y agricultores, como se muestra en las “orientaciones estratégicas” de la SECS (2009), nos llevaron a planificar este trabajo. Pretendemos, por un lado, saber cómo son los enfoques que del suelo se están teniendo en los libros de texto que llegan a la escuela. Y por otro lado, y a la vista de los resultados obtenidos del propósito anterior, diseñar algunos instrumentos didácticos con fines de formación e información acerca de cómo abordar los suelos contaminados.

## **3. Metodología**

En primer lugar se han analizado un total de 22 libros de texto correspondientes a la enseñanza obligatoria en España y República Dominicana, de las áreas de ciencias naturales y sociales, en distintos niveles de enseñanza y de editoriales que suelen ser comunes en ambos países, así como en otros de Latinoamérica (Santillana, SM, Mc Graw Hill y Vicens Vives). Las ediciones van desde 1996 a 2008, si bien la mayoría son reimpresiones de los mismos textos, incluso de fechas anteriores, aunque lleven otra más actual, pero aprobados como textos oficiales para ser utilizados en la escuela. Para que el análisis de los libros sea homogéneo en todos ellos, se ha diseñado una ficha (tabla 1) que se ha aplicado a cada uno.

A partir de los resultados de este análisis de textos y de los conocimientos aportados por 45 estudiantes al finalizar la enseñanza básica acerca de la contaminación del suelo, se diseñaron dos instrumentos que permitieran a distintos colectivos (maestras/os, estudiantes y agricultores fundamentalmente), percibir los efectos de la contaminación de los suelos. Para este diseño se han combinado dos criterios: a) que se pudieran percibir algunos efectos de la contaminación del suelo en un periodo corto de tiempo, y b) que dicha contaminación respondiera a casos habituales.

Así, el diseño experimental que se muestra en la figura 2, consiste en un experimento sencillo con distintos productos habituales (aceite usado para cocinar, detergente líquido, gasolina y un medicamento líquido), para ver sus efectos en distintos tipos de suelo. Los suelos se secan al aire y se pasan por un tamiz de 2 mm. Se añaden 20 ml de cada producto a 200g de cada suelo, previamente humedecido, para lo que se usan unos dispositivos diseñados para que sean capaces de

**Tabla 1.** Ficha-guía para el análisis del tema del suelo en los libros de textos de ciencias de la naturaleza y de sociales de la enseñanza obligatoria

1. Nivel de estudios en el que se encuadra el suelo y editorial del texto.
2. La temática del suelo se presenta en libros de ciencias de la naturaleza o de sociales.
3. Se encuentra siempre una definición del suelo correcta.
4. Se considera la observación como punto de partida en el tratamiento del tema.
5. Se presenta el tema con una metodología investigativa.
6. Se presenta la teoría (definiciones, composición, tipos de suelo...) como final de una investigación justificada por la observación y la experimentación escolar.
7. Se señala si el tema del suelo expuesto alude a distintas facetas del mismo: recurso natural, componente de ecosistemas terrestres, ecosistema, otros.
8. Se hace referencia a la contaminación del suelo exponiendo contenidos concretos.
9. Los suelos contaminados son presentados mediante las interacciones mutuas, teoría-práctica, proceso natural-proceso antrópico
10. En todo el libro de texto analizado, señalar el número total de páginas dedicadas al suelo.

recoger los efluentes de dichos vertidos (Hernández, 2009). Sin mover ni revolver estos vertidos, se realizan observaciones a las 24 horas, anotando los resultados y discutiéndolos.

Un segundo ensayo es utilizado para percibir la contaminación del suelo por metales pesados mediante algunos indicadores sencillos en plantas cultivadas (figura 3). El experimento dura cuatro semanas: consiste en plantar maíz y habas en macetas, en cinco suelos diferentes (dos de ellos de la cubierta de sellado de un vertedero de residuos urbanos, contaminados con 6 elementos traza o más; uno de una mina abandonada y otro de un cultivo, ambos con 5 elementos traza, y un control

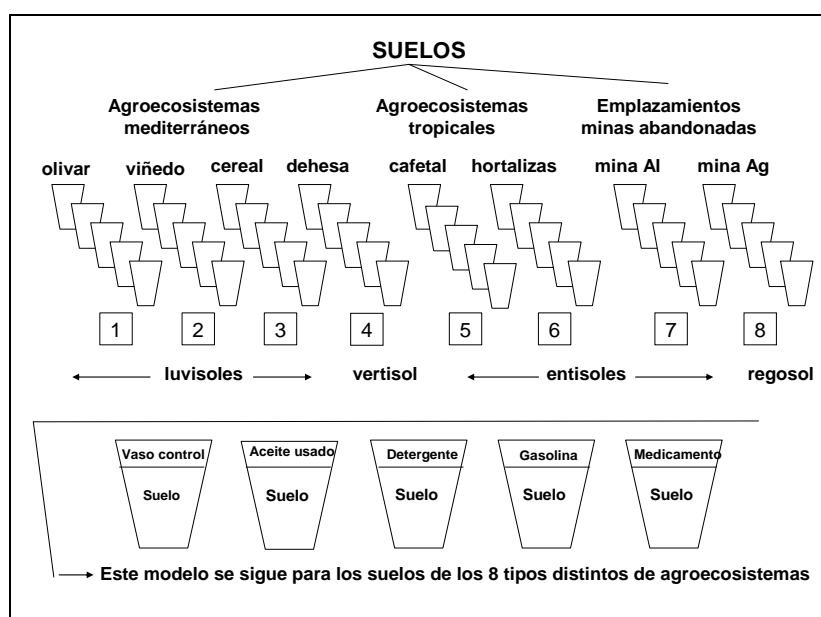


Figura 2

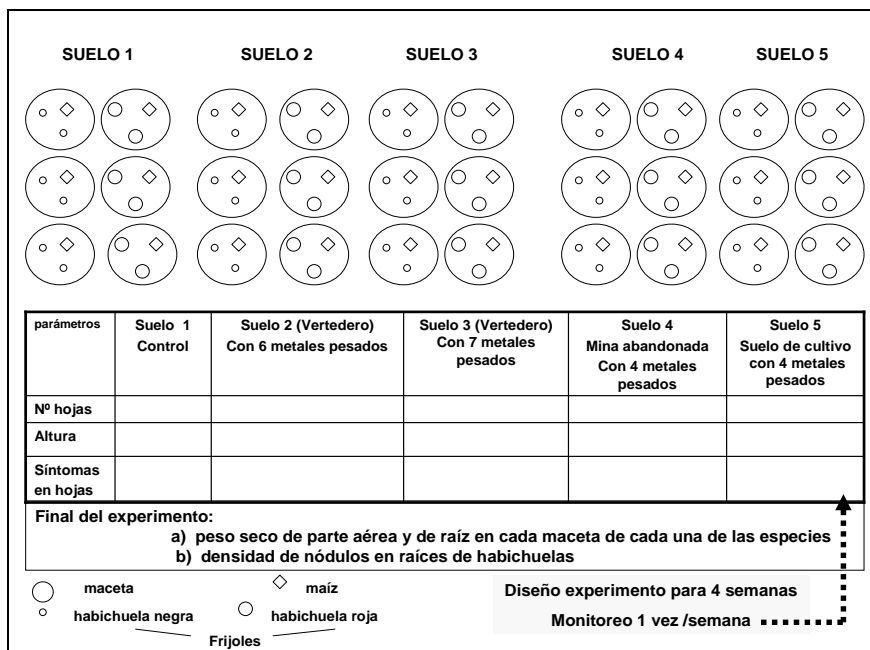


Figura 3

de suelo de cultivo no contaminado). Se riegan cada día las macetas y una vez por semana se lleva a cabo un monitoreo en el que se miden la altura de las plantas, el número de hojas y los síntomas que presentan.

Los dos diseños experimentales contemplan dos escenarios frecuentes: efecto de vertidos en distintos tipos de suelo y la acción conjunta de metales en la capa superficial de suelos de vertederos y de minas abandonadas, en plantas cultivadas. Los suelos han sido recogidos en los escenarios reales de los agroecosistemas de campo, y han sido aplicados a dos colectivos de estudiantes de último año de la enseñanza obligatoria para España (4º ESO, Colegio Diocesano Santa Cruz, de Guadalajara, España) y de la República Dominicana (8º grado de enseñanza básica, escuela Pedernales). Los dos instrumentos fueron previamente experimentados por 24 maestros/as de escuelas públicas de la provincia dominicana de Pedernales, además de 94 estudiantes de último curso de la Licenciatura de Biología en la Universidad de Alcalá.

Los dos diseños experimentales contemplan dos escenarios frecuentes: efecto de vertidos en distintos tipos de suelo y la acción conjunta de metales en la capa superficial de suelos de vertederos y de minas abandonadas, en plantas cultivadas. Los suelos han sido recogidos en los escenarios reales de los agroecosistemas de campo, y han sido aplicados a dos colectivos de estudiantes de último año de la enseñanza obligatoria para España (4º ESO, Colegio Diocesano Santa Cruz, de Guadalajara, España) y de la República Dominicana (8º grado de enseñanza básica, escuela Pedernales). Los dos instrumentos fueron previamente experimentados por 24 maestros/as de escuelas públicas de la provincia dominicana de Pedernales, además de 94 estudiantes de último curso de la Licenciatura de Biología en la Universidad de Alcalá.

#### **4. Resultados y discusión**

Respecto al análisis de los libros de texto, debemos señalar que la selección de libros para esta investigación ha estado únicamente determinada por aquellos que se han estado utilizando en las escuelas y/o colegios donde venimos teniendo actividades relacionadas con la implementación de actividades que conduzcan a la calidad de enseñanza. Por tanto, los resultados no están sujetos a un análisis estadístico, sino que son mostrados a modo de una aproximación que, por otra parte, puede tener mucho de realismo para otros casos, tanto de editoriales como de países.

##### ***a) Tratamiento de los contenidos sobre el suelo en los libros de texto***

Llama la atención que en un 30 % de los libros de texto analizados no se mencione el suelo y cuando se trata de abordar alguna cuestión relativa al mismo, ni siquiera muestra una definición en el 40% de los casos. Solamente un 12 % considera la observación como punto de partida en su tratamiento y, aunque a primera vista puede parecer que el tema tiene una metodología investigativa, realmente no presentan los contenidos después de una investigación justificada por la observación y la experimentación. Ni siquiera se muestran unas prácticas que corroboren, complementen o apliquen la teoría. En el conjunto de aquellos libros que aluden al suelo, el máximo de páginas dedicadas al mismo es 2,3 de un total de 223 (equivalente a un máximo de 1,1% en los libros analizados), y un mínimo de 0,8 páginas. Es un hecho que hay alusiones al suelo en distintas unidades temáticas en las que no figura como tal el estudio de los mismos. Así, lo más frecuente es tratarlo como recurso natural (50%), y siempre vinculado a los servicios que presta para la agricultura, ganadería y materias primas, tanto se trate de textos de ciencias naturales como de sociales; en otras ocasiones, como parte de los ecosistemas terrestres o un solo ecosistema (13%), soporte de la vegetación (12,5%), componente del ciclo de la naturaleza (12,5%), y como un elemento vital (12%). Todos estos epígrafes son los perfiles más frecuentes del tratamiento del suelo en los textos de Ciencias de la Naturaleza, si bien son análogos a los enfoques que suelen dar los textos de Ciencias Sociales al insertar el suelo en unidades didácticas de agricultura y de economía de sus correspondientes disciplinas. También hay alusiones al suelo cuando se mencionan en “los problemas del medio ambiente”, en concreto cuando se habla de problemas del suelo se refieren mayoritariamente a la erosión y la desertificación, sobre todo en los textos españoles (62%). Mucho más puntuales son las referencias al suelo en temas referidos a “paisaje y relieve”, o para decir cómo se forma un suelo en “geología externa”

La magnitud y gravedad de los procesos de la contaminación de los suelos, han llevado a los expertos de la FAO a revisar la clasificación de los mismos y a proponer una nueva que sea útil con vistas a dar cuenta de este tipo de degradación edáfica, incluyendo ahora también los vertederos (sellados con una cubierta edáfica) y *tecnosuelos* para aquellos que han sido degradados por actividades industriales, mineras en gran mayoría (FAO, 2007). Así pues, no solo los suelos que soportan actividad agrícola, sino estos dos últimos mencionados, deberán ser incluidos en los textos escolares.

##### ***b) Tratamiento de la contaminación de los suelos en los libros de texto***

**Tabla 2.** Respuestas a las preguntas “¿Cómo se contamina el suelo?” y “¿qué consecuencias tiene esta contaminación?”

<b>Cómo se contamina un suelo</b>	<b>Frec. %</b>	<b>Consecuencias de la contaminación del suelo</b>	<b>Frec. %</b>
Insecticidas/pesticidas/herbicidas	100	Se mueren las plantas y los animales	45
Exceso de abonos (químicos o fertilizantes)	66	Se acaba la agricultura	21
Basura doméstica	44	Las plantas no realizan la fotosíntesis, por lo que no hay oxígeno	10
Desechos animales y productos químicos	33	Los árboles no pueden estar allí porque se desprenden	10
Productos tóxicos	21	Las plantas no pueden nutrirse	10
Detergentes, residuos hospitalarios		Todo se queda estéril	10
residuos industriales, vertederos, metales pesados, gasolina, papeles y botellas	10	Se pueden producir incendios	10

No nos sorprende que las referencias a la contaminación del suelo sean muy escasas en los textos analizados. Un 70 % de los mismos no hace ninguna alusión a la contaminación del suelo, mientras que la contaminación del agua y del aire se menciona con bastante extensión en los libros escolares (en el 63,6% de los analizados). Y cuando se trata de contenidos alusivos a suelos contaminados, solamente aparecen los abonos químicos y los pesticidas como causantes de este proceso mencionando su repercusión en alimentos vegetales.

Tampoco es de extrañar que no se proponga el estudio del proceso de la contaminación del suelo, por lo que no se muestran las implicaciones del mismo con la relación a los demás procesos de contaminación en otros medios de vida. Somos conscientes de las dificultades que entraña para la escuela el abordaje de procesos tan complicados como el de la contaminación. Sin embargo, no estamos de acuerdo con que se muestren hechos o resultados parciales y no de forma integrada, sea en el nivel educativo que se incluya. O llenar las páginas con fotos u otras ilustraciones que no se corresponden a la didáctica de dicha temática. En este aspecto, nos parece inadmisibles que se haya encuadrado la contaminación del suelo en la mayoría de los textos escolares de 3º grado de la enseñanza básica que han sido revidados para la República Dominicana. En dicho país, algunos textos lo mencionan para 4º grado en las ciencias de la naturaleza.

A la vista de los resultados obtenidos, pensamos que la complejidad de esta temática aconseja que debe ser abordada en niveles superiores de la enseñanza obligatoria (7º y 8º grados en el país dominicano o en 2º y 3º ESO - enseñanza secundaria obligatoria - en España), cuando se tengan estudiantes más próximos a los 12-14 años. Pero abogamos porque la contaminación de los suelos sea contemplada en el currículo escolar, aun sabiendo que “todo no puede entrar en la escuela”. Para ello, hay que pensar en “saberes con fecha de caducidad”, como serían cuestiones relativas a clasificaciones de suelos en la enseñanza primaria, a fin de procurar el aprendizaje de otros saberes que están más en sintonía con las necesidades para una educación básica contemporánea. Esto significa que hay que dar paso a algunos conocimientos para la escuela de forma interdisciplinar o



integrada, y no ser contemplados en diferentes áreas (naturales o sociales) abordando los mismos contenidos.

A partir de estos resultados expuestos y de los correspondientes a un sencillo cuestionario realizado por los estudiantes que finalizaban la enseñanza básica (tabla 2), decidimos diseñar los instrumentos para la percepción de suelos contaminados (figura 1 y 2), con el fin de implementar una metodología científica y sencilla en relación a percibir la contaminación de los suelos. En dicho cuadro pueden observarse errores y falta de algunos conocimientos.

### ***c) Resultados de las actividades relativas a los dos instrumentos diseñados***

Las observaciones realizadas sobre el experimento de la figura 2 hicieron referencia sobre todo a la cantidad de efluentes que cada vertido era capaz de producir y cuanto quedaba retenido en el suelo, y a otros aspectos como la compactación. A partir de las observaciones realizadas por los alumnos, fueron capaces de pensar o deducir si los vertidos añadidos resultan perjudiciales para el suelo o también para las aguas subterráneas, en caso de percolar. La realización del experimento permite pues percibir procesos y sacar conclusiones sobre cómo distintos vertidos afectan a distintos tipos de suelos.

Así, a modo de resumen de los resultados observados se pudo observar que un luvisol deja percolar los vertidos líquidos, haciendo que sean un peligro para las aguas subterráneas que serán alcanzadas fácilmente por los contaminantes. En este suelo son el detergente y el aceite los que más afectan al suelo. Con el primer producto, puede haber un problema de eutrofización debido a los compuestos fosfatados de los detergentes; en el segundo caso puede haber un problema de anoxia, debido a la capa de aceite que puede quedarse en la superficie del suelo. Mientras, en el suelo de tipo vertisol, el aceite supone un gran peligro, puesto que no percola pudiendo crear situaciones de anoxia; también la gasolina se queda de forma preferencial en el suelo. Los que percolan de forma más fácil son el detergente y sobre todo el medicamento, que apenas quedan en el suelo. Los suelos tropicales del sur de la República Dominicana se comportan de forma similar tanto para el agua (control) como para los vertidos, por lo que los compuestos domésticos utilizados suponen un problema para el suelo. Los suelos de las dos minas abandonadas (una de plata y otra de bauxita) dejan percolar los vertidos

Respecto al instrumento mostrado en la figura 3, a partir de los datos del monitoreo semanal se pueden construir gráficos sencillos que permiten visualizar fácilmente el efecto que la contaminación del suelo produce sobre plantas cultivadas (figura 4); además se pueden percibir síntomas que presentan las plantas expuestas a ésta contaminación (tabla 3). Los trabajos de Hernández et al., (2006) y Pastor et al (2009) pueden ayudar a interpretar los resultados más concretos en orden al efecto de la contaminación sobre la nutrición mineral. Aunque estamos de acuerdo con Stocking y Murnaghan (2003) en que las deficiencias (o toxicidades) de diferentes nutrientes pueden mostrar el mismo síntoma visual, los parámetros considerados refuerzan nuestra percepción de la contaminación del suelo por metales mediante los indicadores referidos.

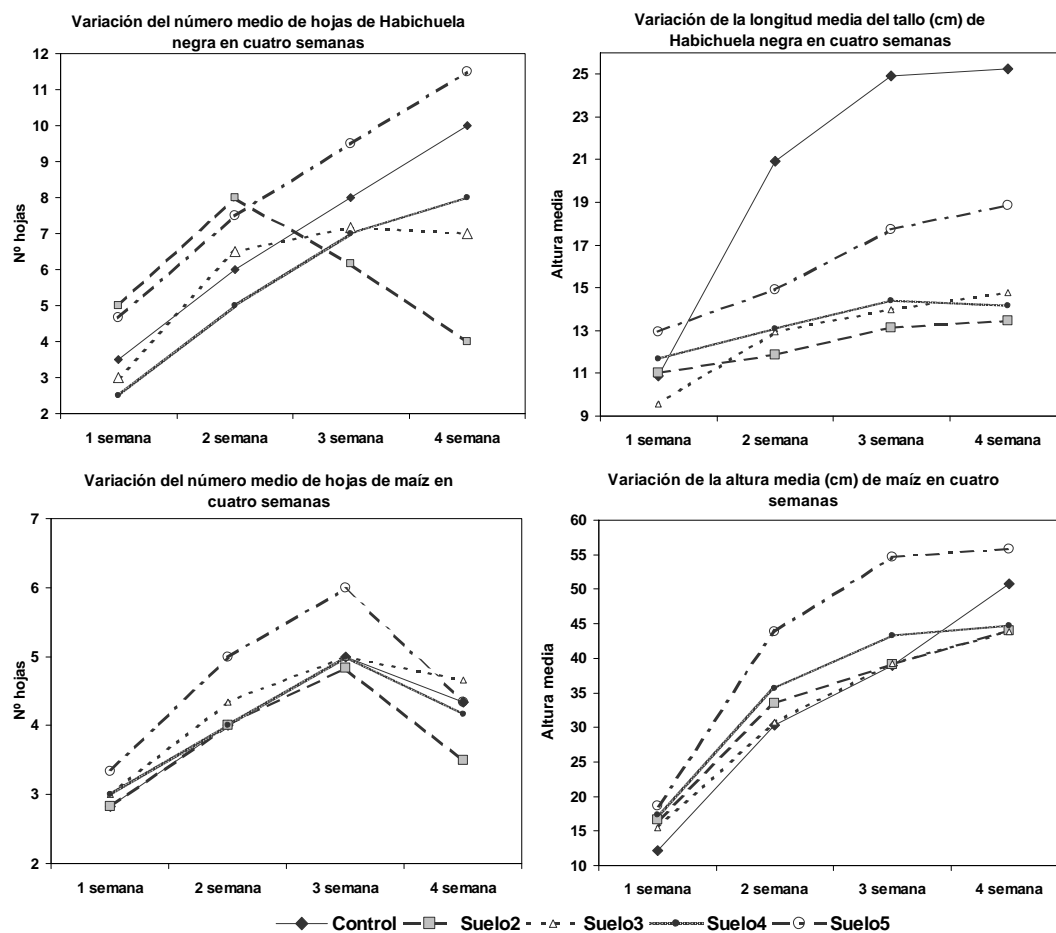


Figura 3. Gráficos que muestran los resultados del monitoreo semanal llevado a cabo para el experimento 3.

**Tabla 2.** Síntomas de las hojas de maíz y habichuelas negras descritos por los alumnos de 4º de ESO a lo largo de las 4 semanas del experimento.

Suelos	Hojas de maíz	Hojas de habichuela negra
Control	- Un poco pálidas	- Descoloridas
	- Un poco arrugadas	- Arrugadas
Suelo 2	- Con poco color, descolorido	- Pequeñas
	- Un maíz se ha muerto	- Los bordes se están muriendo
		- Manchas grises
		- Arrugadas
Suelo 3	- Pequeñas	- Pálidas, amarillas
	- Bordes arrugados	- Con manchas
		- Caídas
		- Nervios muy marcados de color gris
		- Arrugadas
Suelo 4	- Amarillas	- Pálidas
	- Muy claras	- Con puntos blancos
	- Con rayas rojas	- Con puntos granates
		- Verde muy oscuro
Suelo 5	- Verde oscuro	- Verde muy oscuro
		- Algunas manchas más claras

Ambos experimentos pueden llevarse a cabo de forma sencilla y no es necesario un largo periodo de tiempo para ver unos resultados significativos. En el primer caso, en una semana de observaciones se pueden ver procesos y efectos de los vertidos en los suelos. En el segundo caso, las habas, debido a su rápido crecimiento, son capaces en 4 semanas de llegar a producir flores y de mostrar algunos efectos importantes de la contaminación. Este tiempo no es suficiente para el maíz para fructificar, pero sí para poder observar también los signos de estrés que le produce un suelo contaminado. Por otra parte, los materiales necesarios tampoco son difíciles de conseguir y la búsqueda y recolección de los suelos la pueden realizar los y las estudiantes con ayuda del profesor.

## **5. Conclusiones**

El suelo es un tema escasamente tratado en los libros de texto de la educación obligatoria de España y de la República Dominicana. En comparación con la contaminación del aire o del agua, la del suelo tiene poca cabida en los temarios, que suele estar incompleta y cuando existe, el tema no se trata desde una perspectiva investigativa. No nos extraña, por tanto, que los conocimientos de los alumnos de últimos cursos de enseñanza obligatoria sean incompletos y/o erróneos.

Por este motivo los diseños experimentales que hemos realizado permiten llevar a cabo bien la percepción directa de posibles causas de contaminación de los suelos, así como la observación de efectos de la contaminación de los mismos mediante indicadores sencillos en plantas cultivadas. Ambos experimentos pueden llevarse a cabo de forma sencilla y no es necesario un largo periodo de tiempo para ver unos resultados significativos. En el primer caso, en una semana de observaciones se pueden ver procesos y efectos de los vertidos en los suelos. En el segundo caso, las habas, debido a su rápido crecimiento, son capaces en 4 semanas de llegar a producir flores y de mostrar algunos efectos importantes de la contaminación. Este tiempo no es suficiente para el maíz para fructificar, pero sí para poder observar también los signos de estrés que le produce un suelo contaminado. Por otra parte, los materiales necesarios tampoco son difíciles de conseguir y la búsqueda y recolección de los suelos la pueden realizar los y las estudiantes con ayuda del profesor.

Debido a la sencillez de su puesta en marcha y obtención de resultados, y al poco tiempo necesario para llevarlos a cabo, estos dos instrumentos resultan aptos para las escuelas de ambos países, pero también proponerlos para otros colectivos escolares e incluso de agricultores.

## **6. Agradecimientos**

Al proyecto de Investigación CTM 2008-04827/TECNO, a los Programas financiados por la Comunidad de Madrid: "Tecnologías de Evaluación y Recuperación de Emplazamientos Contaminados" S2009AMB-1478 y al de "Promoción de la Calidad Educativa y el Desarrollo Local en la Provincia de Pedernales, República Dominicana".

## **6. Bibliografía**

FAO, 2007. *Base referencial internacional del recurso suelo. Un marco conceptual para clasificación, correlación y comunicación internacional.*

- 
- HERNÁNDEZ, A. J. 1978. *Experiencias de Interdisciplinariedad*. Ed. Nancea, Madrid.
- HERNÁNDEZ, A. J. 1988. Repercusión de los cambios conceptuales y metodológicos en la enseñanza del suelo. *Henares, Rev. Geol.*, 2: 445-453.
- HERNÁNDEZ, A. J. 2009. Orientaciones para el aprendizaje de las Ciencias de la Naturaleza en el siglo XXI. *Cuadernos de Sociedad y Educación*, nº 22. Ed. Centro Cultural Poveda, República Dominicana.
- HERNÁNDEZ, A. J.; ALEXIS, S.; FERNÁNDEZ-PASCUAL, M.; PASTOR, J. 2006. Estudio de la nutrición mineral de *Phaseolus vulgaris* L. en suelos de cultivo que contienen metales pesados. En: *Nutrición Mineral. Aspectos fisiológicos, agronómicos y ambientales*. C. Lamsfus, (Editora-Coord.). Ed. Universidad Pública de Navarra, España: 573-580.
- HERNÁNDEZ, A. J. & PASTOR, J. 2008. Validated Approaches to Restoring the Health of Ecosystems Affected by Soil Pollution In: J. B. Dominguez & Frank Columbus (Eds.). *Chapter 2: Soil Contamination Research Trends*, pp. 51-72. Nova Science Publishers, Inc., Hauppauge, NY USA.
- PASTOR, J. y HERNÁNDEZ, A. J. 2008. La restauración en sistemas con suelos degradados: estudio de casos en vertederos, escombreras y emplazamientos de minas abandonadas. En *Contaminación de Suelos. Tecnologías para su Recuperación*. R. Millán y C. Lobo (ed): 523-544. Ed. CIEMAT, España.
- PASTOR, J Y HERNÁNDEZ, A. J. 2009. Acción conjunta de Al y metales pesados del suelo en la nutrición mineral del maíz: Bioensayos en microcosmos y reflexiones con fines de fitorremediación. En *Nutrición mineral*. Ed. Universidad de Granada, España: 85-95.
- SECS, 2009. Orientaciones Estratégicas de la SECS 2010-2020.
- SLCS, 2006 y 2009. II y III Simposios Latinoamericanos de Innovaciones Educativas en la Enseñanza de la Ciencia del Suelo, Guanajuato (México) y San José (Costa Rica), respectivamente
- STOCKING, M. & MURNAGHAN, N. 2003. *Manual para la evaluación de campo de la degradación de la tierra*. Ed. Mundi-Prensa, Madrid-Barcelona-México.



---

## **Efectos de la contaminación del suelo en plantas de cultivo: experiencias docentes de transversalidad e incorporación de las TIC para escolares españoles y dominicanos**

M<sup>a</sup> Jesús Gutiérrez-Ginés, Ángel Mínguez y Ana J. Hernández

Publicado en: *II Congreso de Docentes de Ciencias de la Naturaleza. Investigación y Didáctica en ESO y Bachillerato*. M González, A Baratas, A Brandi (Eds.) Ed. Santillana, pp. 71-80. 2013.

### **Resumen**

La contaminación de los suelos es un tema poco y mal tratado en los contenidos básicos que forman los *currícula* de la enseñanza obligatoria tanto en España como en muchos países latinoamericanos. La dificultad que entraña la percepción de este tipo de contaminación, en comparación a la del aire y del agua, hace complejo el aprendizaje de este tema. Para resolver esta problemática, se diseñaron y probaron dos instrumentos didácticos sencillos y complementarios (uno de laboratorio escolar y otro de utilización de las TIC), encaminados a la comprensión de los efectos de la contaminación del suelo en la salud por parte de estudiantes de 14-16 años.

Palabras clave: interdisciplinariedad, integración de competencias básicas y digital

### **Abstract**

Soil pollution is a rarely and poorly treated subject in the basic contents that constitute the curriculum of compulsory education in Spain and many Latin American countries. The difficulty with the perception of this type of pollution, compared to air and water, makes learning this subject complex. To resolve this problem, we designed and tested two simple and complementary educational tools (one of school laboratory and other of using the ICT) aimed at understanding the effects of soil pollution on health by 14-16 year-old students.

Key words: interdisciplinarity, integration of digital and basic competences

## Introducción y planteamiento del trabajo

El conocimiento del suelo ha venido siendo objeto de nuestra investigación didáctica durante muchos años (figura 1). Recientemente surge la hipótesis de que la contaminación de los suelos es un tema poco o mal tratado en los contenidos básicos que forman los *currricula* de la enseñanza obligatoria en muchos países latinoamericanos, al igual que en España. Esto nos llevó a investigar el tratamiento que se viene dando a dicho tema en los libros de texto aprobados por las autoridades educativas en los últimos años, tanto en nuestro país como en la República Dominicana, donde venimos trabajando acerca de los efectos de la contaminación de suelos (figura 2). La carencia de dichos contenidos nos hace proponer los trabajos de KABATA-PENDIAS y MUKHERJEE (2007)<sup>1</sup>, HERNÁNDEZ y BARTOLOMÉ (2010)<sup>2</sup>, HERNÁNDEZ y PASTOR (2011<sup>3</sup> y 2012<sup>4</sup>), GUTIÉRREZ-GINÉS y col. (2011)<sup>5</sup> como apoyo para el profesorado.



Figura 1. Enfoques del suelo experimentados en distintas programaciones didácticas según el orden cronológico de su realización

<sup>1</sup> KABATA-PENDIAS A. Y MUKHERJEE A.B. (2007), *Trace Elements from Soil to Human*, Berlin and Heidelberg, Springer-Verlag, p. 550.

<sup>2</sup> HERNÁNDEZ, A.J y BARTOLOMÉ, C (eds.) (2010), *Estudio multidisciplinar de vertederos sellados. Caracterización y pautas de recuperación*, Alcalá de Henares, Servicio de Publicaciones de la Universidad de Alcalá, p. 225.

<sup>3</sup> HERNÁNDEZ, A.J. y PASTOR, J. (2011), *El impacto ambiental de la minería y de los residuos urbanos e industriales. Sensibilización Científica y desafíos para la ciudadanía dominicana*, Santo Domingo, CCPoveda, p. 143.

<sup>4</sup> HERNÁNDEZ, A.J. y PASTOR, J. (2012), Respuestas de las comunidades y las poblaciones a los contaminantes del suelo para predecir efectos ecotoxicológicos: estudio de casos en emplazamientos mediterráneos y tropicales. En MILLÁN, R. y LOBO, C. (eds.), *Evaluación y recuperación de emplazamientos degradados y/o contaminados*, Madrid, CIEMAT, pp. 557-601.

<sup>5</sup> GUTIÉRREZ-GINÉS, M<sup>a</sup> J.; PASTOR, J. y HERNÁNDEZ, A. J. (2011), Impacto de la contaminación por Cu, Zn, y Pb de suelos de minas abandonadas en una especie cultivada en ellos. En: AGUADO J., et al. (eds.) *Terceras Jornadas de Jóvenes Investigadores de la Universidad de Alcalá*, Alcalá de Henares, Servicio de Publicaciones de la Universidad de Alcalá, pp. 105-116.

Los contenidos curriculares de la enseñanza secundaria suelen dar referentes acerca de del uso de pesticidas y de los fertilizantes inorgánicos (fosfatos y nitratos esencialmente) en la agricultura. Sin embargo, no suele ser tan conocida la problemática, quizá más importante, de la contaminación de suelos por metales pesados. Esta contaminación puede ser consecuencia de vertidos no adecuados, o de deposición a causa de explotaciones mineras; incluso de las prácticas de tala y quema de bosques tropicales que dejan en superficie metales que estaban en capas menos superficiales del suelo. En muchos casos, esos suelos son utilizados para la agricultura, por lo que los metales pueden pasar a los vegetales bien directamente por la absorción de los mismos del suelo, o porque son regados con aguas que llevan cantidades importantes de los mismos; posteriormente pueden ser consumidos por los animales y las personas. Los riesgos derivados de su consumo son debidos a que esos metales se van acumulando en la cadena alimenticia (bioacumulación). Puesto que los suelos con este tipo de contaminación pueden ser perjudiciales para la salud, nos hemos querido centrar en este tipo de contaminación para su incorporación educativa, dado que es un problema generalizado en muchos países.



Figura 2

### Metodología empleada, material y métodos

Se diseñaron y probaron dos instrumentos didácticos sencillos y complementarios (uno de laboratorio escolar y otro de utilización de las TIC), que combinan los siguientes criterios: (1) que se puedan percibir algunos efectos de la contaminación del suelo en un periodo corto de tiempo; (2) que dicha contaminación responda a casos frecuentes; (3) que se usen plantas de cultivos básicos en alimentación, y cuyo manejo sea fácil para estudiantes de 14-16 años; y, (4) que permita comprender la transversalidad de un tema curricular y la interdisciplinariedad de las ciencias de la naturaleza entre sí y con las ciencias sociales.

El primer instrumento trata de un experimento en el que semillas de habas y maíz (compradas en el mercado) se siembran en suelos contaminados que son conocidos previamente por nosotros. El



segundo instrumento supone la continuación del primero mediante el registro digital tomado (fotografías y datos); a partir del cual se elaboran unas diapositivas en *PowerPoint* que se copian en un CD que se distribuye en el aula de informática del centro educativo a través de la red de ordenadores. Esto permite además consultar en Internet información para la discusión de los efectos percibidos.

La puesta a punto de los instrumentos se ha llevado a cabo con dos colectivos: 40 estudiantes de último curso de la Licenciatura en Biología de la Universidad de Alcalá y 24 maestras/os de escuelas públicas dominicanas. Después se han implementado con estudiantes de 3º y 4º de la ESO (el primer instrumento en 3º y esos mismos alumnos utilizaron el 2º al llegar a 4º).

Con ligeras variaciones relativas a los colectivos participantes en la investigación (como los suelos utilizados para el experimento y/o lenguaje apropiado), se elaboró una programación que incluye el diseño experimental (ver figura 3), así como fichas para la recogida de datos de la monitorización requerida en la utilización del instrumento 1 (ver figura 8). El instrumento 2 fue elaborado a base de fotografías realizadas por nosotros en el transcurso de la puesta a punto del instrumento 1, así como de su realización por los estudiantes de 3º ESO y las tablas de los resultados obtenidos. Todo ello se copió en un CD que, por el momento no ha sido publicado, pero fue utilizado para las actividades relacionadas con 4ª ESO.

Para los estudiantes de secundaria se seleccionaron 4 suelos contaminados, dos correspondientes a la cubierta edáfica de dos vertederos sellados ubicados en la Comunidad de Madrid, y otros dos correspondientes al territorio sur dominicano con explotación de bauxita. Ambos presentan un conjunto de varios metales pesados y aluminio en su capa más superficial, aunque en distintas proporciones, pero con valores superiores a los considerados como referentes de un suelo no

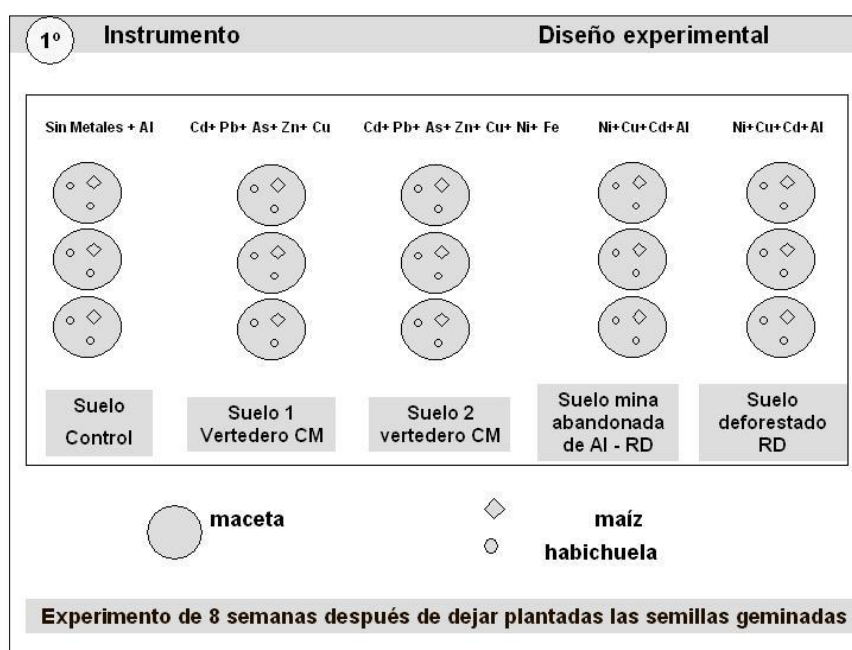


Figura 3. Diseño experimental del instrumento1 utilizado en 3ª ESO

contaminado. El suelo control, lógicamente, no posee contaminantes. Ambos suelos fueron recogidos previamente por nosotros.

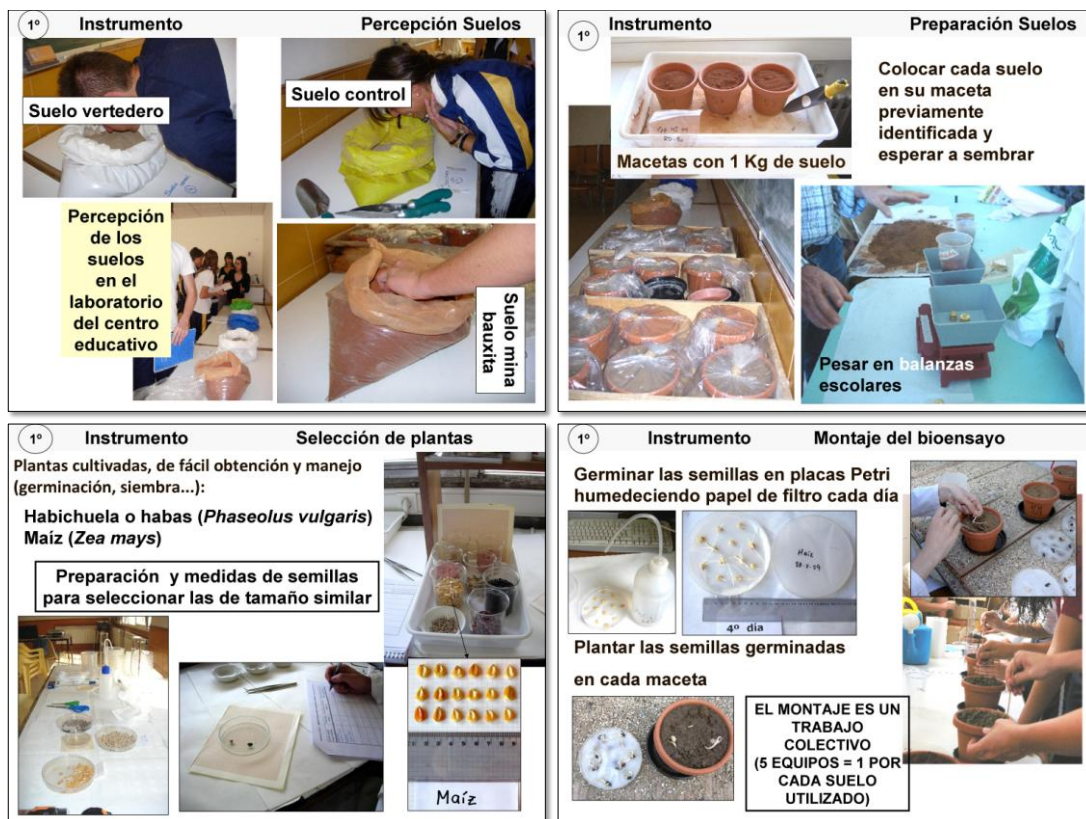
El tiempo necesario para la realización del instrumento 1 es de 8 h de trabajo colectivo + 2 h de trabajo en equipo + 2 h trabajo personal (incluye regar un día en bioensayo). Y el tiempo de trabajo con el instrumento 2 es de 3 h por pareja + 2 h trabajo colectivo + 1 h de trabajo personal.

**Resultados**

**a) Instrumento 1: “Percepción de efectos de la contaminación del suelo en plantas de cultivo”**

Las semillas elegidas para ser cultivadas corresponden a las de la judía y el maíz (*Phaseolus vulgaris* y *Zea mays*, respectivamente). El cultivo de estas plantas es muy común en los dos países en los que pusimos a punto el instrumento, por lo que las hemos utilizado con los estudiantes de la ESO. A este colectivo es al que hacemos referencia en los resultados obtenidos.

La percepción y preparación de suelos y semillas para germinar llevan un total de 4 horas de trabajo colectivo entre toda la clase. Suele ser importante la utilización de una mañana completa de viernes a fin de poder sembrar el viernes siguiente. En las figuras 4 a 7 se pueden observar algunas de las actividades realizadas para el montaje del bioensayo. Durante cada una de las 8 semanas que dura el experimento, se rotan los equipos formados en la clase para hacer la monitorización de las variables de todo el bioensayo, así como para el riego de las macetas. Con ello logramos que cada alumno



Figuras 4, 5, 6 y 7. Actividades para el montaje del bioensayo

pase, al menos una vez por cada una de las actividades diseñadas para recoger la información de las variables que se miden (figura 8). Los principales síntomas que se pueden observar en las hojas son el punteado blanco en el haz, el color amarillo (clorosis), el enroscamiento, las puntas marrones o la caída de las mismas (figuras 9 y 10).

Este experimento fue levantado por los estudiantes (figura 11) y secuenciado de forma fotográfica por los profesores hasta la realización de los análisis químicos efectuados y para montar el 2º instrumento. Las actividades relativas a la observación y medidas de las raíces, se consigue en esta fase final del bioensayo referido.

La preparación del material vegetal para los análisis químicos y realización de los mismos ha sido efectuada por los autores de este trabajo: moler las muestras vegetales secas para homogeneizarlas, extracción de metales pesados mediante digestión ácida con ácido nítrico y perclórico, análisis del extracto mediante espectrometría de emisión óptica por plasma (ICP-OES), y los cálculos para transformar los datos obtenidos (de mg/l a mg/Kg).

**b) Instrumento 2: Estudio de resultados y discusión de la acción de varios metales pesados y de aluminio de suelos contaminados sobre las plantas cultivadas y la salud humana**

Este segundo instrumento didáctico consta de una colección de diapositivas *PowerPoint* elaboradas con la secuencia fotográfica completa desde el inicio del bioensayo, incluyendo la elaboración de resultados y material de apoyo con pauta-guía para utilizar Internet. Todo ello con el fin de que los y las estudiantes de 4º ESO puedan discutir sus propios resultados. Mediante parejas, estudian los contenidos fundamentales acerca de la respuesta las dos poblaciones vegetales que habían cultivado en los suelos contaminados utilizados en las macetas. La figura 12 muestra cómo aparece en pantalla el listado de datos obtenidos. La elaboración de algunos resultados a partir de los mismos se expone en las figuras 13 a 16.

1º Instrumento Monitorización y Toma de datos

Riego diario con agua limpia y Monitorización semanal

Monitorización Exp Maiz Habichuelas 2009				Semana:		Fecha:	
Tratamiento	Repl.	Especie	Nº Hojas	Altura (cm)	Nº flores y/o frutos	Síntomas	Otras observaciones
Control	1	Habichuela					
Control	2	Habichuela					
Control	3	Habichuela					
Control	1	Maiz					
Control	2	Maiz					
Control	3	Maiz					
Suelo 1 vertedero	1	Habichuela					
Suelo 1 vertedero	2	Habichuela					
Suelo 1 vertedero	3	Habichuela					
Suelo 1 vertedero	1	Maiz					
Suelo 1 vertedero	2	Maiz					
Suelo 1 vertedero	3	Maiz					
Suelo 2 vertedero	1	Habichuela					
Suelo 2 vertedero	2	Habichuela					
Suelo 2 vertedero	3	Habichuela					
Suelo 2 vertedero	1	Maiz					
Suelo 2 vertedero	2	Maiz					
Suelo 2 vertedero	3	Maiz					

Figura 8



Figuras 9 y 10. Efectos de la contaminación del suelo en hojas

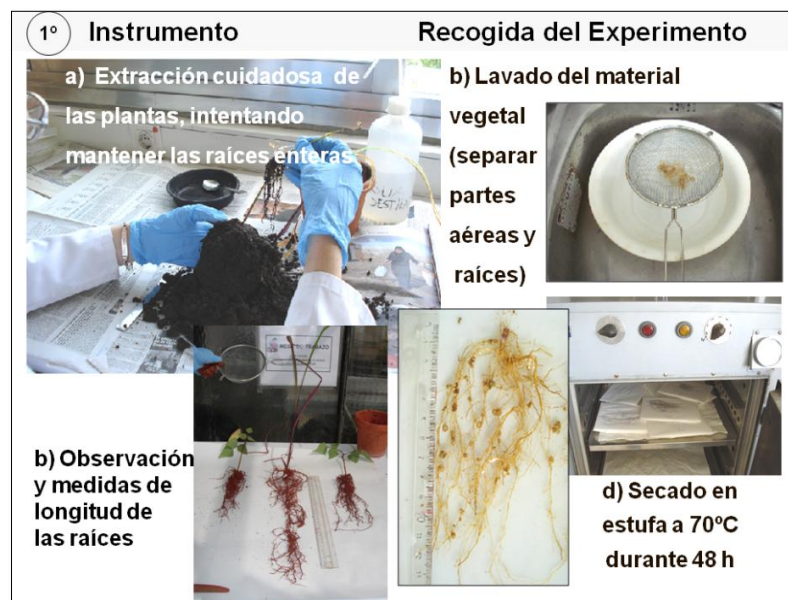


Figura 11. Actividades realizadas al levantar el experimento

Estos resultados permiten realizar la discusión atendiendo a (1) las deducciones de la biomonitorización, que pueden poner de manifiesto los efectos de los metales del suelo para las dos poblaciones cultivadas, y (2) la cantidad de metales que estas dos poblaciones pueden acumular y, por lo tanto, pueden ser ingeridas por animales que, a su vez pueden ser consumidos por nuestra especie. Se llama así la atención acerca del efecto de bioacumulación de los metales pesados en la cadena trófica y de la toxicidad potencial de los mismos.

Para facilitar la discusión de dichos aspectos, se prepararon fichas-guía como la que se muestra en la figura 17 o fichas de apoyo, como la que se expone en la figura 18.

Así mismo, se podrán estudiar algunas de las enfermedades crónicas y trastornos causados por deficiencias o excesos de determinados elementos en las poblaciones humanas que se alimentan

**Instrumento 2º TIC Ejemplo de Resultados**


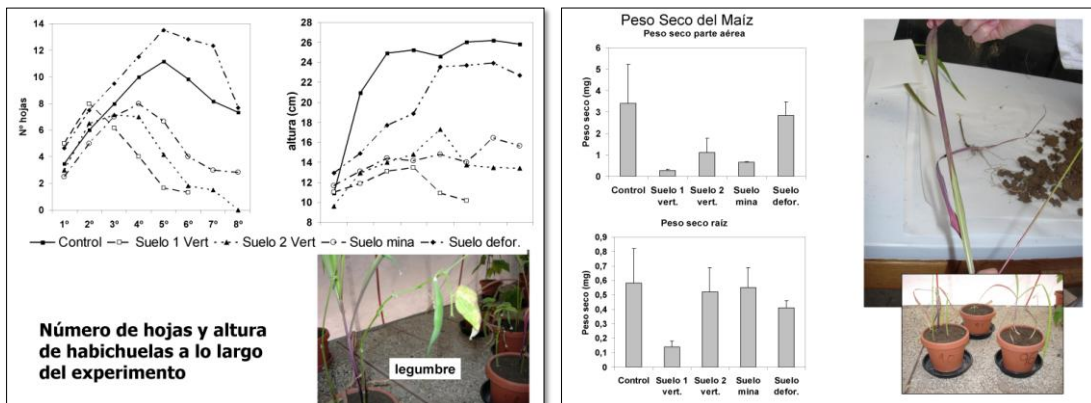
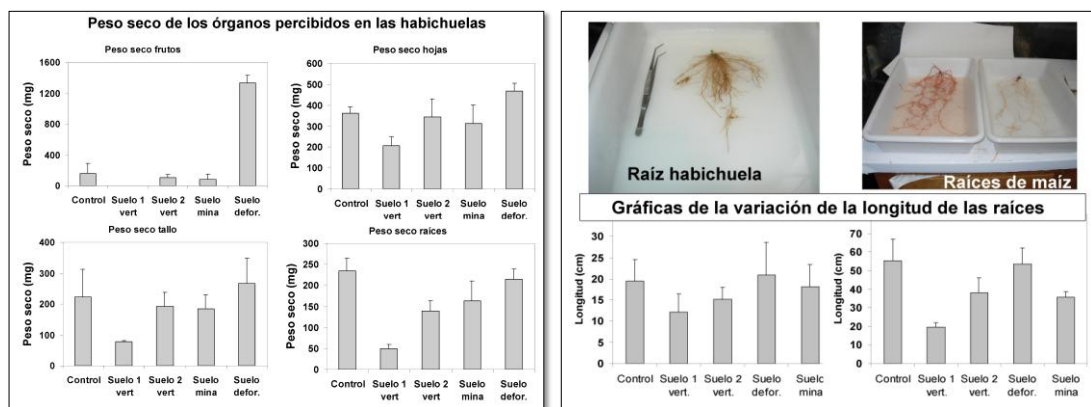
<p>Nº hojas (semanal)</p> <p>Altura (semanal)</p>	<p>Para facilitar el estudio de los datos se muestran sólo las monitorizaciones cada dos semanas</p>	<p><a href="#">Pincha aquí para ver tabla</a></p>
<p>Síntomas hojas (semanal)</p> <p>Registro fotográfico (semanal)</p>	<p>Para facilitar el trabajo no se muestran los síntomas en cada monitorización, para conocerlos ver el registro fotográfico</p>	<p><a href="#">Pincha aquí para ver fotos</a></p>
<p>Longitud de raíces</p> <p>Presencia nódulos raíces</p>	<p><a href="#">Pincha aquí para ver tabla</a></p>	
<p>Peso seco Parte aérea</p> <p>Peso seco Raíz</p>	<p><a href="#">Pincha aquí para ver tabla</a></p>	
<p>Contenido de metales parte aérea</p> <p>Contenido de metales raíz</p>	<p><a href="#">Pincha aquí para ver tabla</a></p>	

Figura 12



Figuras 13 y 14. Ejemplo de resultados obtenidos en la biomonitorización



Figuras 15 y 16. Exposición de resultados en forma gráfica relativos a parámetros obtenidos después de levantar el experimento de las macetas

- ¿Cuáles de los resultados se pueden utilizar para estudiar los efectos de los suelos contaminados por metales en las plantas cultivadas?
- Utilizando el programa *Excel* pueden analizar los resultados y explicar qué efectos de los observados son significativos estadísticamente.
- ¿Qué nos dicen los resultados sobre el comportamiento de las plantas en cada uno de los escenarios?
- ¿Cuáles de los resultados se pueden ser más útiles para estudiar la biodisponibilidad y la bioacumulación de los metales del suelo en las plantas cultivadas?

Figura 17. Ejemplo de una Ficha-guía

con los cultivos estudiados o con animales que los han comido como forraje (caso del maíz, por ejemplo); incluso cuando materiales verdes como hojas y raíces se utilizan como “abono verde” incorporando los metales pesados que contienen otra vez al suelo. Podemos así hablar de las denominadas “ecopatologías”. Por ejemplo, se puede observar en pantalla cómo el Cu es sin duda el metal pesado que más toxicidad parece provocar en *Phaseolus vulgaris*. Los resultados muestran que este elemento alcanza niveles muy altos en los frutos de la leguminosa estudiada, sobre todo si se cultiva en suelos con mucho aluminio. Los altos contenidos en este elemento y la disminución del peso seco de las judías también han sido puestos de manifiesto. De 2 a 250 mg de Cu /100 g suelo este metal puede ser tóxico para las plantas cultivadas y, dado que este nutriente mineral, unido al Zn, suele ser aportado por las legumbres a la dieta, los niveles alcanzados por los mismos en los frutos, pueden ocasionar efectos tóxicos.

#### **Discusión global de resultados y conclusiones**

Los primeros resultados de la investigación fueron presentados y discutidos en el Congreso Latinoamericano de la Ciencia del Suelo celebrado en Costa Rica a finales de 2009 y después publicados en HERNÁNDEZ (2009<sup>6</sup> y 2011<sup>7</sup>) y HERNÁNDEZ y col. (2010)<sup>8</sup>. La dificultad que entraña la percepción de la contaminación del suelo, así como de los procesos implicados de larga duración en la naturaleza, hace complejo el aprendizaje de este tema, en comparación a la contaminación del aire y del agua (detectamos mal olor, “smog”, turbidez, por ejemplo). Sin embargo, la percepción de cada suelo (color, textura, olor y otras características del mismo que puedan obtenerse mediante la vista, el tacto y el olfato), es juzgada de especial importancia para que el alumnado se familiarice con los suelos en general, aunque no pueda percibirse su posible contaminación.

Se combinan diferentes tipos de dinámicas de trabajo: utilización de laboratorio y de TIC con distintos tipos de aprendizajes. No es posible dejar constancia por escrito de un instrumento

<sup>6</sup> HERNÁNDEZ, A. J. (2009), *Orientaciones para el aprendizaje de las Ciencias de la naturaleza en el siglo XXI*, Santo Domingo, CCPoveda, p. 113.

<sup>7</sup> HERNÁNDEZ, A.J. (2011), *El Laboratorio escolar. Experiencias para aprendizajes integrados*. Santo Domingo, CCPoveda, p. 104.

<sup>8</sup> HERNÁNDEZ, A. J.; GUTIÉRREZ-GINÉS, M<sup>a</sup> J. y PASTOR, J. (2010), Investigación del tratamiento de la contaminación del suelo en libros de texto para escolares y alternativas docentes experimentadas. En *El Suelo: Funciones y Manejo*, Granada, Copicentro, pp. 929-938.

Instrumento <sup>2º</sup> TIC		ejemplo de documento de apoyo	
¿CÓMO SE ESTUDIAN LOS EFECTOS DE LOS CONTAMINANTES DEL SUELO EN LOS ECOSISTEMAS?			
Listado de la evaluación de efectos potenciales y de sus medidas utilizados			
EVALUACIÓN	NIVEL	MEDIDAS	
No utilizado este nivel para la evaluación ecológica pero sí para las personas y plantas de cultivo	Individuo	Crecimiento Fecundidad	Síntomas Biomarcadores Concentraciones en órganos y/o tejidos
Efectos en la abundancia Mortalidad de individuos Extinción de especies	Población	Medidas de Abundancia y Producción	Frecuencia de mortalidad Morbilidad Reproducción
Valor en el mercado Calidad del paisaje	Comunidad	Nº total de especies Dominancia de una sp. Biodiversidad	<b>Busca las palabras que no conoces en Google para clarificar su significado</b>
Productividad	Ecosistema	Biomasa Dinámica de nutrientes	Índices de contaminación en suelo y plantas
ESTA DIAPOSITIVA ES APOYO PARA APRENDIZAJES BÁSICOS DE ECOLOGÍA			

Figura 18

interactivo mediante su utilización con ordenador. Lo interesante es que los mismos estudiantes se enfrentan a un problema de la realidad, como son los efectos de la contaminación de suelos, en diferentes momentos de su etapa educativa, pero con diferente contenido. Esta última cuestión es juzgada muy importante en relación a la comprensión del tiempo necesario para percibir efectos de procesos lentos en la naturaleza, además de comportar la transversalidad de un mismo tema en dos niveles educativos (3º y 4º ESO).

Estos instrumentos ayudan a dimensionar la escala temporal en que se manifiestan algunos procesos (como sería el caso entre las 48 h de tiempo para la germinación de las semillas utilizadas, o los 2 meses para percibir un problema de contaminación de suelos). Es fácil deducir las operaciones lógico-matemáticas involucradas y relacionadas con distintas fases del método científico.

Entre las principales conclusiones, reconocemos que el suelo es un tema muy adecuado para la conexión de la geología, la física, la química, la biología y la ecología, por lo que no incidiremos en el carácter de transversalidad obvio que se desprende de esta afirmación. Los instrumentos presentados permiten a la vez realizar muchas actividades sencillas en el laboratorio, objeto de contenidos curriculares de estas disciplinas. Por último, la temática abordada ofrece, sin duda, un componente interactivo de primer orden entre las ciencias de la naturaleza y las ciencias sociales, que no nos es posible argumentar en las páginas del trabajo, pero que es fácil deducir en cuanto a la repercusión de alimentos sembrados en suelos contaminados por metales pesados. De ahí, considerar importante el introducir la temática de suelos contaminados en la enseñanza obligatoria a la ciudadanía o, al menos, incorporarla a la planificación de actividades escolares en la educación secundaria

---

Aunque las actividades presentadas pueden parecer conllevar un tiempo excesivo para el aprendizaje de un tema no prioritario, no se pierde de vista la cantidad de logros que pueden alcanzarse con las mismas. Además, puede comprenderse mejor el carácter global de un problema medioambiental, como es el caso de la contaminación de suelos de suelos, ya que éstos pueden encontrarse en todo el mundo y provocan efectos similares en los seres vivos, en especial si la contaminación se debe a metales pesados.

Este trabajo está en sintonía con las "Metas Educativas" que los países iberoamericanos han propuestos para estos años (OEI-CEPAL, 2010<sup>9</sup>), especialmente las metas de adquisición de conocimientos científicos y de competencia digital. Pero también, con las líneas más actualizadas de la pedagogía de la integración (ROEGIERS, 2010<sup>10</sup>).

Finalmente diremos, que en la actualidad estamos comenzando a experimentar los dos instrumentos con estudiantes dominicanos y pensamos realizar el segundo de ellos conjuntamente entre los que proceden de ese país y los españoles, vía Internet, para ir dando también pasos en el desarrollo de didácticas análogas para el tratamiento de problemas ambientales de carácter global.

**Agradecimientos** a los Proyectos CTM 2008-04827/TECNO del MICIN y P200I 9/AMB-1478<sup>a</sup>: EIADES de la Comunidad de Madrid. "M<sup>a</sup>JGG es financiada por la beca FPU del Ministerio de Educación (AP2008-02934)."

---

<sup>9</sup> OEI-CEPAL, 2010. *2021 Metas Educativas*.

<sup>10</sup> ROEGIERS, X. 2010. *Una pedagogía de la integración. Competencias e integración de los conocimientos en la enseñanza*, México, Fondo Cultura Económica, p. 386.



## **Contaminación de suelos y sus efectos en la salud de ecosistemas y salud humana. Talleres para la investigación con estudiantes no universitarios**

La figura siguiente reproduce la portada del libro aceptado para publicar por la editorial CCPoveda en Santo Domingo (República Dominicana). Se trata de un recurso didáctico para ser utilizado en las actividades curriculares elaborado a partir de las experiencias que hemos venido poniendo en práctica y discutidas con docentes de los niveles de educación primaria y secundaria. El contenido de este “cuaderno de trabajo” se muestra a continuación.



## Índice

### 1. Aspectos introductorios

- 1.1 El impacto de los suelos contaminados
- 1.2 Los suelos contaminados en los currícula escolares
- 1.3 Una propuesta para el aprendizaje del método científico

### 2. Presentación y sugerencias para el desarrollo de los talleres

- Taller 1: Observación de escenarios con suelos contaminados utilizando las TICs
- Taller 2: Percepción de diferentes muestras de suelos y análisis de los mismos en el laboratorio escolar
- Taller 3: Evaluación del impacto ambiental de suelos contaminados mediante un ensayo experimental
- Taller 4: Realización de un bioensayo para estudiar efectos de la contaminación del suelo en plantas de cultivo utilizando el aula como lugar para la experimentación.
- Taller 5: Discusión científica de resultados obtenidos por las y los estudiantes sobre los efectos de los suelos contaminados en plantas utilizando TIC
- Taller 6: Acción de varios metales pesados y del aluminio de suelos contaminados en la salud animal y la salud humana utilizando TIC
- Taller 7: Relacionando la acción de abonos químicos (fertilizantes inorgánicos y orgánicos) con la salud del suelo y la salud humana mediante un debate socioeducativo
- Taller 8: Trabajando los suelos contaminados entre estudiantes de diferentes países mediante Internet