

ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD MICROBIANA EN SUELOS DE VERTEDEROS DE RESIDUOS SÓLIDOS URBANOS

Pérez-Leblic, M. I.¹, Rodríguez, J.¹, Turmero, A.¹, Hernández, M.¹, Blánquez, A.¹, Pastor, J.² y Arias, M. E.¹

¹ Dpto. de Microbiología y Parasitología. Alcalá de Henares. Madrid. Spain.

² CCMA-CSIC. Madrid.

INTRODUCCIÓN

En España, una de las prácticas más habituales para la eliminación de los residuos generados como consecuencia de la actividad doméstica y comercial de ciudades y pueblos, ha sido y sigue siendo, su almacenamiento en vertederos de residuos sólidos urbanos (VRSU). Entre los desechos que se acumulan en los mismos figuran, tanto residuos domésticos (basuras, muebles, electrodomésticos...), como residuos industriales (metales, disolventes, pinturas...), que dan lugar a la acumulación, tanto en el suelo, como en las aguas subterráneas, de compuestos nitro-aromáticos, hidrocarburos policíclicos aromáticos, pesticidas y metales pesados, entre otros. Estos compuestos, aunque se encuentran en bajas concentraciones, producen graves efectos biológicos, dado que muchos de ellos son tóxicos y/o cancerígenos (Baun *et al.*, 2000). Además, debido a los procesos químicos y biológicos que tienen lugar en los vertederos, aparecen compuestos orgánicos e inorgánicos solubles, que, dependiendo de la composición y de las características del suelo, pueden originar cambios muy drásticos en la geoquímica y microbiología del vertedero (Röling *et al.*, 2001; Sastre *et al.*, 2003). Existe, pues, una gran preocupación por parte de la opinión pública y de los investigadores sobre el impacto ambiental que estos vertederos ejercen sobre el suelo, y en este sentido, muchos grupos de investigación, tanto a nivel nacional, como internacional, están tratando de encontrar nuevas estrategias para descontaminar los emplazamientos donde estos se sitúan.

También en los últimos años ha aumentado sensiblemente el interés por conocer la salud del suelo, debido a que esta aproximación, podría contribuir a predecir la capacidad de recuperación del suelo dañado por distintos agentes. El concepto de salud del suelo hace referencia a diferentes atributos, relacionados con aspectos físicos, químicos y biológicos, tales como: pH, retención hídrica, mineralogía, contenido en materia orgánica

nica, incluyendo los microorganismos, que juegan un importante papel en la capacidad del suelo para funcionar como un sistema vital (Arias *et al.*, 2005). En este sentido, el conocimiento de las poblaciones microbianas presentes en un ecosistema contaminado, como es el caso de un VRSU incontrolado, podría ser usado como una herramienta para predecir y monitorizar la posible degradación natural de los contaminantes presentes en el mismo (Jain *et al.*, 2005); de hecho, las bacterias juegan un papel central en la bioremediación de contaminantes, junto con otros organismos tales como hongos, protozoos y plantas (Demmerová *et al.*, 2005).

Las técnicas que se aplican para el estudio de la microbiota del suelo son variadas e incluyen, técnicas clásicas y técnicas moleculares. Así, la biodiversidad genética de las comunidades microbianas puede ser determinada utilizando técnicas tales como, la electroforesis en gel de gradiente desnaturante (DGGE) y el clonaje y secuenciación del gen de ADNr 16S. La técnica DGGE permite el análisis de muchas muestras al mismo tiempo, proporcionando información sobre los patrones de las comunidades microbianas presentes en una muestra. Por otra parte, la secuenciación del gen que codifica para ARNs 16S permite identificar y establecer las relaciones filogenéticas de los microorganismos de una muestra.

El trabajo que se presenta, se ha realizado en dos vertederos urbanos de la Comunidad de Madrid, situados en las localidades de Torrejón de Ardoz y Getafe, zonas que han experimentado un gran desarrollo industrial y urbano en los últimos años. Estos vertederos fueron sellados por primera vez hace unos 20 años, pero a lo largo de los diez últimos se han depositado nuevos residuos, que han ido aumentando, tanto el área de vertido, como la contaminación química de los suelos.

Este trabajo se centra en un estudio de la biodiversidad microbiana presente en los vertederos citados, con el objeto de determinar las poblaciones microbianas presentes en suelos con distintas concentraciones de contaminantes orgánicos, tales como hidrocarburos policíclicos aromáticos (PHAs) y bifenilos policlorados (PCBs), así como de metales pesados.

Para determinar la actividad microbiana de los vertederos se han medido parámetros tales como, biomasa, actividad respiratoria inducida por sustrato y perfiles enzimáticos. La caracterización de las comunidades microbianas presentes en los vertederos se ha llevado a cabo, mediante técnicas moleculares, tales como electroforesis en gel con gradiente desnaturante (DGGE) y clonaje y secuenciación del gen de ADNr 16S.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Características de los vertederos

A los vertederos situados en los municipios de Torrejón de Ardoz y Getafe corresponden los análisis efectuados en este trabajo; han sido descritos en sus aspectos generales en Pastor y Hernández (2002 y 2007), así como en el primer capítulo de este libro. Diremos, no obstante, que están localizados en la región central española, que se caracteriza por presentar un clima mediterráneo continental de carácter semiárido (con precipitaciones medias anuales entre 400 y 600 mm y una evapotranspiración potencial media anual de 750 mm). Los vertederos estudiados están ubicados en un entorno de importante actividad industrial, por lo que los residuos sólidos urbanos almacenados en

estos vertederos aparecen mezclados con otros procedentes de industrias de muy diversa índole.

2.2. Muestreo y procesado de las muestras

En cada uno de los vertederos estudiados se muestrearon 4 zonas, denominadas T2, T2B, T8 y T9, en el caso del vertedero de Torrejón de Ardoz, y G1, G2, G3 y G4, en el caso del vertedero de Getafe. Las muestras de suelo de las diferentes zonas (2 kg) se recogieron mediante azada en la capa superficial del suelo comprendida entre 0 y 15 cm, retirando la hojarasca antes de tomar la muestra. Las muestras se guardaron en bolsas de plástico y se transportaron en frío al laboratorio. Allí, una parte de cada muestra se secó a temperatura ambiente y otra en campana de flujo laminar, con el fin de mantener la esterilidad necesaria para la valoración de los parámetros biológicos. Una vez secas, las muestras se tamizaron para conseguir un tamaño de partícula menor de 2 mm. Para la realización de los análisis físico-químicos, se guardó una parte de las muestras a temperatura ambiente. Para la determinación de las actividades enzimáticas se mantuvo otra parte a 4 °C y para los estudios genéticos a -20 °C.

2.3. Análisis físico-químicos

En las muestras analizadas se determinaron los siguientes parámetros:

1. pH: para la determinación del pH se realizó una suspensión acuosa 1: 2,5 suelo:agua. Posteriormente, el pH se midió en un pH-metro digital Orion 720 A.
2. Capacidad de campo (CC): su determinación se llevó a cabo en un aparato de presión-membrana de Richard. La capacidad de campo de una muestra se estimó por gravimetría, pesando la muestra antes y después de someterla a una presión de 1/3 de atmósfera (pF = 2,5).
3. Hidrocarburos totales: se determinaron por espectrofotometría infrarroja siguiendo la Norma UNE 77307.
4. Hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs): su determinación se llevó a cabo por cromatografía de gases, y se siguió la Norma ISO 18287.
5. Bifenilos policlorados (PCBs): se determinaron por cromatografía de gases, de acuerdo a la Norma ISO 10382.
6. Metales pesados: se determinaron por espectroscopía de emisión de plasma ICP (Allen, 1989).

2.4. Análisis biológicos

2.4.1. Recuento en placa de microorganismos viables del suelo

Se tomaron 10 g de suelo y se resuspendieron en 95 mL de tampón fosfato (PBS) pH 7,4, 0,1 M, incubando dicha mezcla a 28 °C durante 30 minutos. A continuación, se realizaron diluciones decimales seriadas en el mismo tampón.

El recuento de bacterias viables se llevó a cabo tras inocular 100 ml de las diluciones correspondientes en placas que contenían el medio TSA (Agar Triptona de Soja) diluido 1:10. Las placas se incubaron durante 1 semana a 28 °C, realizando el recuento de las colonias cada 24 horas.

Para recuento de mohos y levaduras se sembraron las diluciones correspondientes en placas que contenían el medio Agar Sabouraud con Oxitetracina (100 mg/ml). Las placas se incubaron a 28 °C y los recuentos se realizaron diariamente durante una semana.

Los resultados se expresaron en unidades formadoras de colonias/gramo de suelo (ufc/g).

2.4.2. Actividad microbiana: Respiración Inducida por Sustrato (SIR)

Para la determinación de la respiración inducida por sustrato (SIR) se siguió el método de Jenkinson y Powlson (1976) modificado. Para ello, tres muestras de suelo fresco (5 g cada una) se incubaron con una solución de glucosa (0,45 mg/g de suelo) durante dos días, a 30 °C en frascos con tapón de rosca. La concentración de CO₂ se determinó en un analizador μ -Trac 4200 siguiendo el método automatizado Bac-Trac, método basado en la medición de los cambios de impedancia de una solución de KOH al 2%.

2.4.3. Valoración de las actividades enzimáticas

Las actividades enzimáticas determinadas en las muestras de suelo fueron:

1. Fosfatasas ácida y alcalina (Tabatabai y Bremner, 1969).
2. β -glucosidasa (Tabatabai, 1982).
3. β -N acetilglucosaminidasa (Tabatabai, 1982).
4. Celulasa (Pancholy y Rice, 1973, modificado por García-Alvárez e Ibáñez, 1994).
5. Invertasa (Hoffmann y Pallauf, 1965, modificado por García-Alvárez e Ibáñez, 1994).
6. Ureasa (Kandeler y Gerber, 1988).

2.4.4. Análisis moleculares

2.4.4.1. Extracción del ADN cromosómico de las muestras de suelo

Para la extracción de ADN se partió de 0,5 g de muestra de suelo y se usó el Kit comercial «Power Soil DNA Isolation Kit» (MoBio, Carlsbad, CA, USA). Las muestras de ADN obtenidas se resolvieron por electroforesis en gel de agarosa al 1%. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio, y el ADN se visualizó a la luz ultravioleta (λ , 254 nm). La extracción del ADN se realizó por triplicado para cada suelo.

2.4.4.2. Condiciones de desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

A partir de las distintas muestras de ADN se amplificaron por PCR fragmentos del gen codificante para ARNr 16S. Para ello, se utilizaron cebadores universales del dominio *Bacteria* (341F + GC clamp y 907 R; 27 F y 1492R) y del dominio *Archaea* (340F + GC clamp y 915R). Para todas las amplificaciones se utilizó la Taq polimerasa «FideliTaq PCR Master MIX», de la casa comercial General Electric.

2.4.4.3. Condiciones de desarrollo de la electroforesis en geles de gradiente desnaturalizante (DGGE)

Los fragmentos de ADNr 16S elegidos para su amplificación y posterior análisis por DGGE fueron los correspondientes a la región V3-V5 (347F + GC clamp y 907 R) para el dominio *Bacteria*, y a la región amplificada por los cebadores 340F + GC clamp y 915R para el dominio *Archaea* (Nakatsu *et al.*, 2000; Yu y Morrison, 2004).

La DGGE se realizó en un sistema de detección DCode Mutación Universal (BioRad, Hércules, CA, USA). Para separar los distintos fragmentos de ADNr 16S amplificados en la reacción de PCR, se prepararon geles de poliacrilamida al 6 % con diferentes gradientes desnaturalizantes de urea-formamida, con el fin de conocer cuál era el gradiente óptimo de separación de los fragmentos amplificados. La electroforesis se desarrolló a un voltaje constante de 60 V durante 18 h, a 60 °C. Para visualizar las bandas de ADN, los geles se tiñeron con bromuro de etidio (50 µg/mL) durante 20 minutos y se destiñeron con agua desionizada durante 40 minutos. Las bandas de ADN se visualizaron con luz UV y se digitalizaron en un Gel Doc 2000 (BioRad, Hércules, CA, USA).

2.4.4.4. Clonaje del gen codificante para ARNr 16S y análisis de las secuencias

Para el clonaje del gen de ADNr 16S del dominio *Bacteria* se llevó a cabo la amplificación del citado gen utilizando los cebadores universales 27F y 1492R. El producto de amplificación se clonó en células competentes de *E. coli* utilizando el kit de clonación «TOPO TA Cloning Kit» (Invitrogen, Carsbad, USA) utilizando el protocolo descrito por el fabricante. Los clones positivos (aproximadamente 100 por muestra), se purificaron utilizando el Kit Ultraclean (MoBio, USA) y se analizaron en el Servicio de Secuenciación de la Unidad de Biología Molecular de la Universidad de Alcalá. Las secuencias obtenidas se compararon con las disponibles en la base de datos Ribosomal Data Project.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Vertedero de Torrejón de Ardoz

En el vertedero de Torrejón de Ardoz se han estudiado cuatro zonas: T2, T2B, T8 y T9 en las que se ha detectado la presencia de diferentes compuestos tóxicos, tales como, hidrocarburos (alifáticos y aromáticos), hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) y bifenilos policlorados (PCBs). Los resultados correspondientes a la concentración de estos compuestos se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Concentración de contaminantes orgánicos presentes en las muestras de suelo del vertedero de Torrejón de Ardoz

Muestras	Hidrocarburos		
	totales (mg Kg ⁻¹)	PAHs (mg Kg ⁻¹)	PCBs (mg Kg ⁻¹)
T2	165,60	0,21	0,22
T2B	84,52	0,16	0,057
T8	54,48	0,20	< 0,04
T9	189,91	11,06	4,14

Como puede observarse en esta tabla, aunque los contaminantes están presentes en todas las zonas del vertedero analizadas, los valores más elevados de hidrocarburos totales y PCBs se encontraron en las zonas T9 (189,91 mg/kg y 4,14 mg/kg, respectivamente) y T2 (165,6 mg/kg y 0,22 mg/kg, respectivamente). Es importante destacar la elevada concentración de PAHs detectada en la zona T9 (11,06 ppm), en la que se detectaron compuestos como: pireno (1,33 ppm), fluoranteno (1,55 ppm), benzo[b]fluoranteno (1,69 ppm) y benzo[a]pireno (2,23 ppm). En la zona T8, se detectaron las concentraciones más bajas de hidrocarburos totales y de PCBs, si bien también se determinó la presencia de benzo[b]fluoranteno (0,062 ppm) y benzo[a]pireno (0,059 ppm).

Los resultados correspondientes a los parámetros físicos (pH y capacidad de campo) y biológicos (biomasa microbiana) determinados en las distintas zonas del vertedero figuran en la Tabla 2.

Tabla 2. Parámetros físicos y biológicos determinados en el vertedero de Torrejón de Ardoz

Muestras	pH	CC (%)	Bacterias viables (ufc g ⁻¹)	Hongos viables (ufc g ⁻¹)	SIR*
T2	7,58	36,4	4,6 × 10 ⁶	5,0 × 10 ⁴	46,55
T2B	7,75	23,0	1,68 × 10 ⁷	2,0 × 10 ⁵	76,19
T8	7,62	31,3	7,9 × 10 ⁷	1,2 × 10 ⁵	77,33
T9	7,8	20,9	1,5 × 10 ⁷	5,5 × 10 ⁴	45,05

* SIR (mg CO₂ h⁻¹ 100 g⁻¹ suelo seco)

Los resultados correspondientes a la biomasa microbiana, estimada mediante el recuento de bacterias y hongos viables y mediante la respiración inducida por sustrato (SIR), ponen de manifiesto una mayor actividad microbiana en las zonas T8 y T2B, zonas en las que se detectaron las concentraciones más bajas de los contaminantes orgánicos. En las distintas zonas estudiadas del vertedero, se han valorado, además, distintas actividades enzimáticas relacionadas con los ciclos del C, N y P. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3. Actividades enzimáticas determinadas en las muestras de suelo del vertedero de Torrejón de Ardoz

	Fosfatasa ácida (U g ⁻¹)	Fosfatasa alcalina (U g ⁻¹)	β-glucosidasa (U g ⁻¹)	Invertasa (U g ⁻¹)	Celulasa (U g ⁻¹)	β-N-acetil-glucosaminidasa (U g ⁻¹)	Ureasa (U g ⁻¹)
T2	0,61	1,35	0,59	7,15	0,08	0,07	0,80
T2B	0,76	4,85	1,70	44,02	0,34	0,17	1,90
T8	2,47	9,72	6,66	53,75	0,18	0,32	2,77
T9	0,70	2,90	1,94	18,49	0,18	0,11	1,03

Las actividades fosfatasas, β-glucosidasa y β-N-acetilglucosaminidasa se expresan en μmoles de p-nitrofenol/h. Las actividades invertasa y celulasa en μmoles de glucosa/h. La actividad ureasa en μmoles de NH₄/h.

Como se puede observar en la Tabla 3, los valores de actividad enzimática más altos se detectaron en la zona T8 y correspondieron a las enzimas invertasa, fosfatasa alcalina, β-glucosidasa y ureasa. Asimismo, es importante mencionar que, al igual que ocurrió

con el recuento de bacterias y hongos y la determinación de SIR, los valores de actividad de todas las enzimas estudiadas fueron más elevados en las zonas con menor concentración de compuestos tóxicos (T8 y T2B). Estos resultados, por tanto, ponen de manifiesto la existencia de una relación lineal entre la actividad enzimática, el recuento de viables y el SIR. Resultados similares fueron obtenidos para otros suelos analizados por Taylor *et al.* (2002). Además, y teniendo en cuenta que los parámetros biológicos arriba mencionados han sido propuestos como biomarcadores de recuperación de suelos afectados por diversas perturbaciones (García *et al.*, 1997; Pascual y *et al.*, 2000; Trasar-Cepeda *et al.*, 2000), las zonas T9 y T2 pueden ser consideradas como las más degradadas del vertedero de Torrejón de Ardoz en el momento actual.

La diversidad genética de las poblaciones microbianas pertenecientes a los dominios *Bacteria* y *Archaea* se estudió mediante la técnica de DGGE y los resultados obtenidos aparecen representados en la Figura 1.

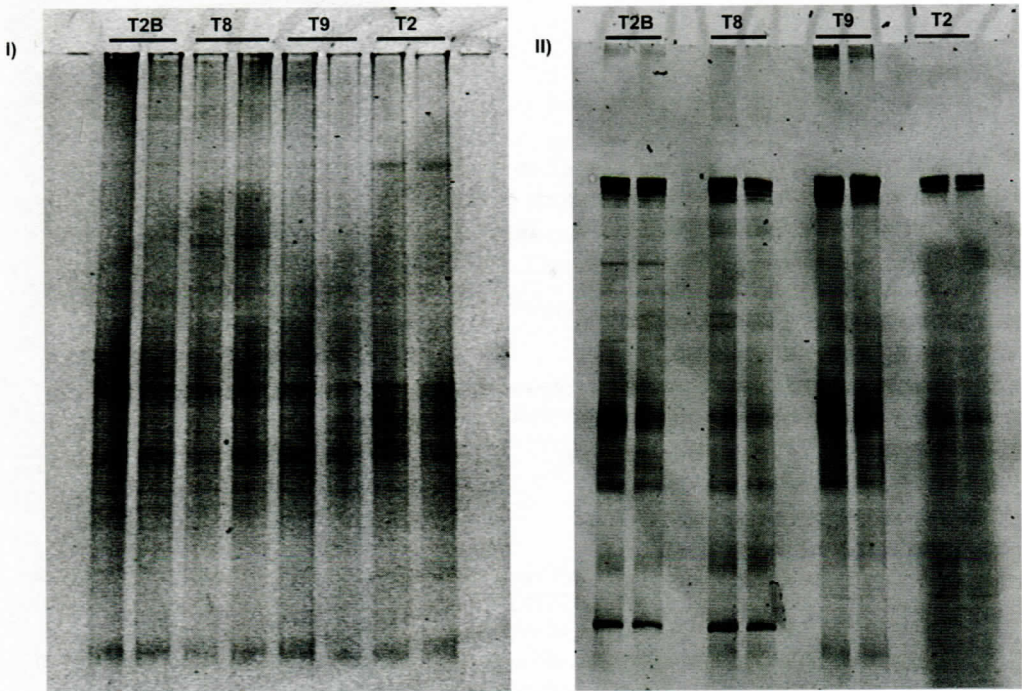


Figura 1. Patrones de bandas correspondientes a los dominios *Bacteria* (I) y *Archaea* (II) (fotografía invertida) obtenidos mediante DGGE

Respecto al dominio *Bacteria*, se obtuvieron patrones de bandas diferentes en cada muestra analizada. Podemos observar, que la muestra T9 presentó el menor número de bandas, mientras que el más alto se obtuvo en la muestra T2B. En la fotografía correspondiente al DGGE del dominio *Archaea*, se observa el mayor número de bandas en la muestra T8 y el menor en las muestras T2 y T9. Una vez más se pone de manifiesto el efecto negativo de los contaminantes estudiados sobre las poblaciones microbianas presentes en los suelos.

La caracterización de las poblaciones microbianas presentes en las muestras de suelo de las diferentes zonas del vertedero, se llevó a cabo mediante el clonaje del gen codificante para ARNr 16S. Esta técnica permite, no sólo la identificación de los grupos microbianos presentes en las muestras, sino también el establecimiento de sus relaciones filogenéticas. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 2. Las secuencias de los genes que muestran un valor de similitud mayor o igual al 95% se considera que pertenecen al mismo filotipo.

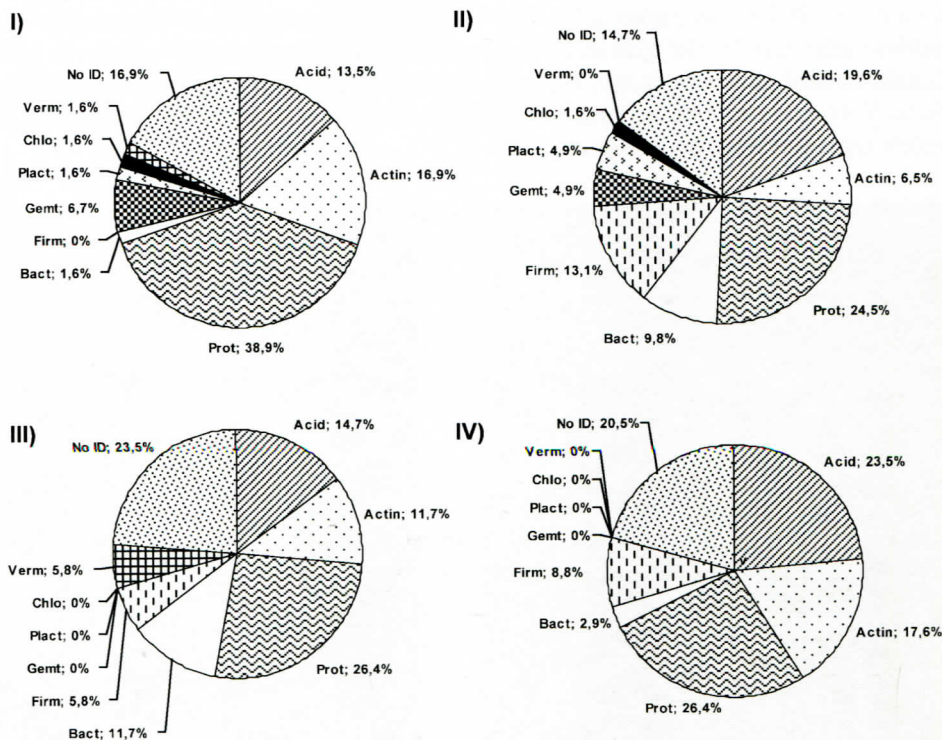


Figura 2. Grupos filogenéticos (%) presentes en las distintas zonas del vertedero de Torrejón de Ardoz. Zonas: T2 (I); T2B (II); T8 (III); T9 (IV). Grupos filogenéticos: Acidobacteria (Acid); Actinobacteria (Actin); Proteobacteria (Prot); Bacteroidetes (Bact); Firmicutes (Firm); Gemmatimonadetes (Gemt); Planctomycetes (Plact); Chloroflexi (Chlo); Verrucomicrobia (Verm); No identificadas (No ID).

En todas las muestras analizadas el phylum mayoritario fue el de *Proteobacteria* (24,5 – 38,9), seguido de los phyla *Acidobacteria* (13,5 – 23,5) y *Actinobacteria* (6,5 – 17,6). Es importante resaltar que la muestra T9 presentó la menor diversidad microbiana, puesto que sólo se detectaron 5 phyla, siendo las proteobacterias (26,4) y las acidobacterias (23,5) los grupos más representativos. En todas las muestras estudiadas se calculó el índice de biodiversidad de Shannon utilizando el programa PAST (<http://folk.uio.no/ohammer/past>). Este índice osciló entre valores comprendidos entre 1,89 y 1,44, correspondiendo los valores más bajos a las muestras T9 y T2 (1,44 y 1,52, respectivamente) y los más altos a T2B y T8 (1,89 y 1,69, respectivamente).

Como ya se ha mencionado, el phylum predominante en todas las muestras fue el de *Proteobacteria*. Se han identificado α -, β -, γ - y δ -*Proteobacteria*, siendo el sub-grupo α -*Proteobacteria* el más abundante en todas las áreas. En el área T8, las β -proteobacterias fueron tan abundantes como las α -proteobacterias (44, 4 %), mientras en el área T9, destaca, a diferencia de otras áreas estudiadas, el sub-grupo δ -proteobacterias (33,3 %). Aunque entre las δ -proteobacterias y γ -proteobacterias se han descrito cepas microbianas degradadoras de hidrocarburos (Powell *et al.*, 2003), serán necesarios estudios más exhaustivos para determinar si los grupos microbianos identificados pudieran estar implicados en la degradación natural de los hidrocarburos presentes en los suelos.

En conclusión, los resultados obtenidos sugieren una clara relación inversa entre la presencia de contaminantes en el suelo y la actividad y diversidad microbiana presente en el mismo. De hecho, en las zonas T9 y T2, zonas en las que se ha detectado la concentración más elevada de contaminantes, se han encontrado también los valores más bajos de biomasa microbiana, de actividades enzimáticas y una menor diversidad en las poblaciones microbianas.

3.2. Vertedero de Getafe

En el vertedero situado en la localidad de Getafe se muestrearon 4 zonas: G1, G2, G3 y G4. En todas ellas se detectó la presencia de metales pesados, cuyas concentraciones se presentan en la Tabla 4. Las concentraciones más elevadas se detectaron en la zona G4 y correspondieron a los metales Cu, Zn y Pb. Destaca, además, la presencia de elevados niveles de hidrocarburos alifáticos (854,41 mg/kg) en la zona G4 (dato no mostrado).

Tabla 4. Concentración de metales pesados presentes en las muestras de suelo del vertedero de Getafe

Muestras	Al mg/kg	Cu mg/kg	Fe mg/kg	Mn mg/kg	Ni mg/kg	Pb mg/kg	Zn mg/kg
G1	4,62	0,60	3,09	4,66	0,04	2,47	5,50
G2	3,98	0,97	2,52	4,09	0,04	4,21	8,87
G3	3,05	0,19	1,07	7,26	0,05	1,09	0,32
G4	3,06	32,19	4,26	5,64	0,32	4,30	11,06

Tabla 5. Parámetros físicos y biológicos determinados en el vertedero de Getafe

Muestras	pH	Bacterias viables (ufc g ⁻¹)	Hongos viables (ufc g ⁻¹)	SIR*
G1	8,10	4,6 × 10 ⁶	2,6 × 10 ⁴	13,8
G2	7,81	1,6 × 10 ⁷	2,9 × 10 ⁵	30,6
G3	7,83	5,3 × 10 ⁶	1,7 × 10 ⁵	34,0
G4	7,57	4,7 × 10 ⁶	6,2 × 10 ⁴	14,0

* SIR (mg CO₂ h⁻¹ 100 g⁻¹ suelo seco)

En la Tabla 5 se presentan los resultados correspondientes al pH, recuento de bacterias y hongos viables y SIR. Podemos observar que en todas las muestras analizadas mediante la técnica de recuento en placa, el número de bacterias fue siempre mayor que

el de hongos viables (mohos y levaduras). Cabe destacar asimismo, que en las muestras correspondientes a las zonas G2 y G3 se estimó un número mayor de microorganismos viables (bacterias y hongos). Del mismo modo, fue en estas zonas donde se detectaron los niveles más elevados de respiración inducida por sustrato (SIR).

En la Tabla 6 se presentan los resultados correspondientes a las actividades enzimáticas valoradas en las diferentes zonas del vertedero. Como se puede observar, las zonas G1 y G4 presentaron los niveles más bajos de actividad enzimática, especialmente en lo que se refiere a las enzimas fosfatasa alcalina, β -glucosidasa e invertasa. Es importante mencionar, que fue también en estas zonas, principalmente en la zona G4, donde se detectaron los niveles más elevados de metales pesados (Tabla 4). Estos resultados están de acuerdo con lo descrito para las actividades invertasa y β -glucosidasa, que se muestran especialmente sensibles a la presencia de agroquímicos y metales pesados (Sastre *et al.*, 1996).

Tabla 6. Actividades enzimáticas determinadas en las distintas zonas del vertedero de Getafe

	Fosfatasa ácida (U g ⁻¹)	Fosfatasa alcalina (U g ⁻¹)	β -glucosidasa (U g ⁻¹)	Invertasa (U g ⁻¹)	Celulasa (U g ⁻¹)	β -N-acetil- glucosaminidasa (U g ⁻¹)	Ureasa (U g ⁻¹)
G1	0,37	1,37	0,46	20,25	0,05	0,20	0,82
G2	1,71	3,88	3,90	42,97	0,03	0,17	1,23
G3	0,54	3,34	2,61	55,69	0,05	0,31	1,03
G4	0,54	2,26	1,13	17,45	0,08	0,11	1,00

Las actividades fosfatasas, β -glucosidasa y β -N-acetilglucosaminidasa se expresan en μ moles de *p*-nitrofenol/h. Las actividades invertasa y celulasa en μ moles de glucosa/h. La actividad ureasa en μ moles de NH₄/h.

Por otra parte, al igual que en el vertedero de Torrejón, los resultados obtenidos en estas muestras de suelo, indican una relación directa entre los parámetros, biomasa microbiana, SIR y actividad enzimática.

En el vertedero de Getafe se estudió asimismo, la diversidad genética de las poblaciones microbianas de *Bacteria* y *Archaea* mediante la técnica de DGGE. En este caso, los resultados obtenidos no muestran diferencias significativas entre los patrones de bandas de las distintas zonas del vertedero estudiadas. Este hecho podría ser debido a las bajas concentraciones de metales pesados detectadas en las zonas analizadas. Sin embargo, a altas concentraciones de metales pesados, se ha demostrado una clara influencia sobre la actividad y diversidad microbianas (Wang *et al.*, 2007).

En la Figura 3 se muestran los resultados del análisis de la librería de clones de la zona G4., que es la que se detectó una mayor concentración de metales pesados.

En esta zona se identificaron 6 filotipos, siendo el mayoritario el correspondiente al phylum *Proteobacteria* (54%), seguido de los phyla *Acidobacteria* y *Bacteroidete* (12%) y *Actinobacteria* (6%). Dentro del phylum *Proteobacteria*, se han encontrado los sub-grupos α -, β -, γ - y δ -*Proteobacteria*, siendo el sub-grupo α -*Proteobacteria* el más abundante. Dentro de este grupo, los órdenes *Rhizobiales* y *Sphingomonadales* fueron los más abundantes.

En estudios posteriores se intentará comprobar el potencial de estos grupos bacterianos encontrados para poder ser utilizados, en la biorremediación de estos ecosistemas contaminados.

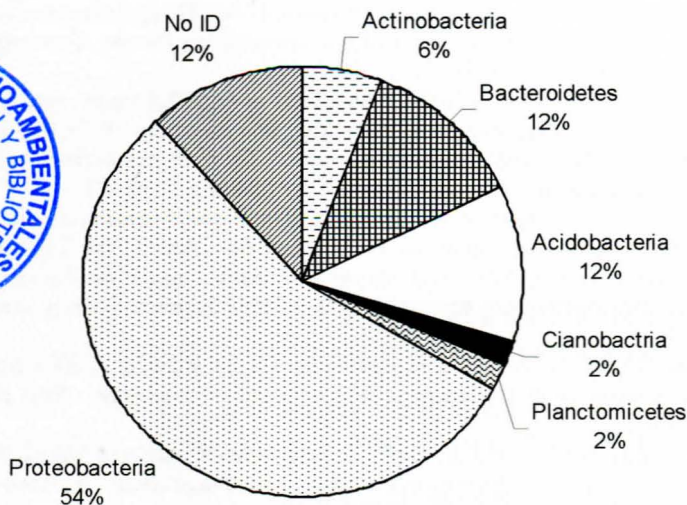


Figura 3. Grupos filogenéticos (%) identificados en la zona G4 del vertedero de Getafe

Agradecimientos: Este trabajo se ha realizado gracias a la financiación del proyecto EIADES S-0505/AMB/0296 subvencionado por la Comunidad Autónoma de Madrid (CAM) y del proyecto CICYT CGL2006-12730-C03-02. Además, al Proyecto CTM 2008-04827/TECNO del Ministerio de Ciencia e Innovación.

5. Referencias bibliográficas

- ALLEN, S. E. (1989). «Chemical Analysis of Ecological Materials». Second Edition. *Blackwell Scientific Publications*, Oxford.
- ARIAS, M. E.; GONZÁLEZ-PÉREZ, J. A.; GONZÁLEZ-VILA, F. J., y BALL, A. S. (2005). *Soil Health- a new challenge for microbiologists and chemists*. *International Microbiology*, 8: 13-21.
- BAUN, A.; JENSEN, S. D.; BJERG, P. L.; CHRISTENSEN, T. H., y NYHOLM, N. (2000). *Toxicity of organic chemical pollution in ground-water downgradient of a landfill (Grindsted, Denmark)*. *Environ. Sci. Technol.*, 34:1647-1652.
- DEMNEROVÁ, K.; MACKOVA, M.; SPEVÁKOVÁ, V.; BERANOVÁ, K.; KOCHÁNKOVÁ, L.; LOVECKÁ, P.; RYSLAVÁ, E., y MACEK, T. (2005). *Two approaches to biological decontamination of ground-water and soil polluted by aromatics-characterization of microbial populations*. *International Microbiology*, 8(3): 1-12.
- GARCÍA ÁLVAREZ, A. e IBÁÑEZ, J. J. (1994). *Seasonal fluctuations and crop influence on microbiota and enzyme activity in fully developed soils of central Spain*. *Arid Soil Research and Rehabilitation*, 8: 161-178.
- GARCÍA, C.; HERNÁNDEZ, T., y COSTA, F. (1997). *Potential use of dehydrogenase activity as an index of microbial activity in degraded soils*. *Com. Soil Sc. and Plant Analysis*, 1-2: 123-134.
- HOFFMANN, G. y PALLAUF, J. (1965). *A colorimetric method for determining saccharase activity in soils*. *Zeitschrift für Pflanzenernährung, Düngung, und Bodenkunde*, 110: 193-201.
- ISO 10382. *Soil Quality. Determination of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls. Gas chromatographic method with electron capture detection*.
- ISO 18287. *Soil Quality. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH)- Gas chromatographic method with mass spectrometric detection (GC-MS)*.

- JAIN, R. K.; KAPUR, M.; LABANA, S.; LAL, B.; SARMA, P. M.; BHATTACHARYA, D., y THAKUR, S. (2005). *Microbial diversity: Application of microorganisms for the biodegradation of xenobiotics*. *Current Science*, 89(1): 101-112.
- JENKINSON, D. S. y POWLSON, D. S. (1976). *The effects of biocidal treatments on metabolism in soil—I. Fumigation with chloroform*. *Soil Biology and Biochem.*, 8(3):167-177.
- KANDELER, E. y GERBER, H. (1988). *Short term assays of soil urease activity using colorimetric determination of ammonium*. *Biology and Fertility of Soils*, 5: 68-72.
- NAKATSU, C.; TORSVIK, V., y OVREAS, L. (2000). *Soil community analysis using DGGE of 16S rDNA polymerase Chain reaction products*. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 64: 1382-1388.
- PANCHOLY, S. K. y RICE, E. L. (1973). *Soil enzymes in relation to old field succession: Amylase, cellulose, invertase, deshydrogenase and urease*. *Soil Science Society American Proceedings*, 37: 47-50.
- PASCUAL, J. A.; GARCÍA, C.; HERNÁNDEZ, T.; MORENO, J. L., y Ros, M. (2000). *Soil microbial activity as a biomarker of degradation and reclamation processes*. *Soil Biol. Biochem.*, 32(13):1877-1883.
- PASTOR, J. y HERNÁNDEZ, A. J. (2002). *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: 145-153.
- PASTOR, J. y HERNÁNDEZ, A. J. (2007). *Evaluación de la complejidad de vertederos-cubierta edáfica y suelos de las áreas de descarga en relación a la revegetación y la fitorremediación. Tendencias Actuales de la Ciencia del Suelo*; BELLINFANTE, N. y JORDÁN, A. (eds.): 947-953, Junta de Andalucía, Sevilla. ISBN 978-84-690-4129-1.
- POWELL, S. M.; BOWMAN, J. P.; SNAPE, I., y Stark, J. S. (2003). *Microbial community variation in pristine and polluted nearshore*. *Antarctic sediments*, 45: 135-145.
- RÖLING, W. F. M.; VAN BREUKELEN, B. M.; BRASTER, M.; LIN, B., y VAN VERSEVELD, H. W. (2001). *Relationships between microbial community structure and hydrochemistry in a landfill leachate-polluted aquifer*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67(10): 4619-4629.
- SASTRE, I.; VICENTE, M. A., y LOBO, M. C. (1996). *Influence of the application of sewage sludge on soil microbial activity*. *Bioresource Technology*, 57: 19-23.
- SASTRE, I.; VICENTE, M. A., y LOBO, M. C. (2003). *Contamination and environmental impact on soil biological activity*. En: M. C. LOBO y J. J. IBÁÑEZ (eds.), *Preserving soil quality and soil biodiversity*. Instituto Madrileño de Investigación Agraria y Alimentaria (IMIA), pp. 99-117.
- TABATABAI, M. A. (1982). En: *Methods of Soil Analysis Part 2. Chemical and Microbiological Properties*. Soil Science Society of America, Inc. Madison. A. L. MILLER y E. M., KEENEY, D. R. (eds.), pp. 903-947.
- TABATABAI, M. A. y BREMNER, J. M. (1969). *Use of p-nitrophenyl for assay of soil phosphatase activity*. *Soil Biol. Biochem.*, 1: 301-307
- TAYLOR, J. P.; WILSON, B.; MILLS, M. S., y BURNS, R. G. (2002). *Comparison of microbial numbers and enzymatic activities in surface soils and subsoils using various techniques*. *Soil. Biol. Biochem.*, 34: 387-401.
- TRASAR CEPEDA, C.; LEIRÓS DE LA PEÑA, M. C.; GARCÍA FERNÁNDEZ, F., y GIL SOTRES, F. (2000). *Propiedades Bioquímicas de los suelos gallegos: su utilización como indicadores de la calidad del suelo*. En: GARCÍA, C. y HERNÁNDEZ, M. T., *Investigación y Perspectivas de Enzimología de Suelos en España*. CSIC, pp. 146-206.
- UNE 77307. *Calidad del suelo. Determinación del contenido de aceite mineral. Método de espectrometría infrarroja y método de cromatografía de gases*.
- WANG, Y.; SHI, J.; WANG, H.; LIN, Q.; CHEN, X., y CHEN Y. (2007). *The influence of soil heavy metals pollutin on soil microbial biomass, enzyme activity, and community composition near a copper smelter*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 67: 75-81.
- YU, Z. y MORRISON, M. (2004). *Comparisons of different hypervariable regions of rrs genes for use in fingerprinting of microbial communities by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70(8): 4800-4806.

Estudio multidisciplinar de vertederos sellados

Caracterización y pautas de recuperación

Editoras:

Ana Jesús Hernández

Carmen Bartolomé



Universidad
de Alcalá

SERVICIO DE PUBLICACIONES



R. 20.452

El contenido de este libro no podrá ser reproducido,
ni total ni parcialmente, sin el previo permiso escrito del editor.
Todos los derechos reservados.

© Universidad de Alcalá, 2010
Servicio de Publicaciones
Plaza de San Diego, s/n
28801 Alcalá de Henares
www.uah.es

I.S.B.N.: 978-84-8138-865-7
Depósito Legal: M-11864-2010

Diseño de cubierta: Gráficas 85, S. A.
Composición: Gráficas 85, S. A.
Impresión y encuadernación: Gráficas 85, S. A.
Impreso en España

