

ESTABLECIMIENTO DE *Eucalyptus globulus* EN SUELOS CONTAMINADOS CON METALES PESADOS Y RECUPERACIÓN DE SU FLORA MICROBIANA.

C. ARRIAGADA¹, G. PEREIRA² & M. HERRERA¹

⁽¹⁾ Depto. Ingeniería Rural, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos y de Montes, Universidad de Córdoba. Apartado 3048 – 14080. Córdoba-España. E-mail: ir2aresc@uco.es

⁽²⁾ Depto. Forestal, Campus Los Angeles, Universidad de Concepción. J. A. Coloma 0201, Los Angeles-Chile.

RESUMEN

El presente trabajo estudia el posible efecto beneficioso de los microorganismos rizosféricos, hongos micorrizicos arbusculares y hongos saprofitos, en el establecimiento de plantas de *Eucalyptus globulus*, en suelos contaminados por metales pesados, procedentes de la zona minera del Valle del Alto Guadiato, Córdoba. Se sembró conjuntamente con *E. globulus* la especie *Glycine max* como planta beneficiosa para el establecimiento de la flora microbiana del suelo. La interacción MA y *G. max*, es la que más favorece el desarrollo de las plantas de *E. globulus* y la recuperación de los microorganismos del suelo, debido a la gran capacidad simbiótica de *G. max* con los hongos MA. La combinación de MA *G. deserticola* y HS *Trichoderma sp.*, fue la más efectiva en el crecimiento de las plantas en el suelo contaminado. Finalmente los resultados indican que la interacción entre el hongo MA, los saprofitos y las plantas de *E. globulus* y *G. max*, contribuyen positivamente a la recuperación de los microorganismos del suelo contaminado con metales pesados, a la inmovilización, extracción y o concentración de estos metales pesados presentes en él.

Palabras claves: *Eucalyptus*, Microorganismos, Suelo Contaminado, Metales pesados, Minería, Restauración.

SUMMARY

The effect of inoculation with the benefit microorganisms, arbuscular and saprophytic fungi, on the establishment of *E. globulus* in contaminated soils by heavy metals was studied. *Glycine max* was cultivated together *E. globulus* in order to improve soil microorganisms. Because the high susceptibility of *G. max* to arbuscular mycorrhizal fungus, the interaction between both organisms had the higher effect in the growth of *E. globulus* and in the population of soil microorganisms. The interaction between the AM fungus *G. deserticola* and the saprophytic fungus *Trichoderma sp.* was the best combination for plant growth in soil contaminated with heavy metals. Our results indicates that AM fungus, saprophytic fungus, *G. max.* and *E. globulus* increased soil microorganisms population and may directly promote the establishment of plant species on waste sites by immobilization, extraction and concentration of heavy metal of these soils.

Key words: *Eucalyptus*, Microorganisms, Contaminated Soil, Heavy metal, Mining, Restoration.

INTRODUCCION.

En las últimas décadas la contaminación del suelo por agentes tóxicos, principalmente los metales pesados, es sin duda, uno de los graves problemas medioambientales que aquejan a la sociedad. Esta contaminación puede ser de origen geoquímico, sin embargo, la actividad antropogénica, traducida en el uso de fertilizantes, pesticidas, pinturas, gasolinas, explosivos, pigmentos, pilas, entre otros, es la principal responsable de este problema (Darbon *et al.* 1992).

Para poder recuperar estos suelos contaminados, se debe tener en cuenta que los metales no se pueden ser degradar químicamente, lo que condiciona su recuperación, limitándose las opciones a técnicas de inmovilización o extracción/concentración; apareciendo la opción de fitorestauración como una herramienta válida.

La mayoría de las plantas acumuladoras de metales pertenecen a la familia *Brassicaceae* como *Thlaspic caerulescens*, no micotrófica y produce muy poca biomasa, siendo interesante considerar plantas de mayor productividad como especies del género *Eucalyptus*, que si son micotróficas. En

este sentido Pereira y Herrera (1997) indican que la micorrización de plantas de *E. globulus* y *E. camaldulensis* incrementan la supervivencia de las plántulas desarrollándose en suelos altamente contaminados por metales pesados. Además, el efecto beneficioso de las micorrizas se debe tanto al incremento de la tolerancia que produce la simbiosis, como a la mejora de la nutrición de la planta, ya que éstas zonas contaminadas, tienen una marcada ausencia de nutrientes (Bradshaw, 1983). El objetivo de este trabajo ha sido estudiar el efecto de la inoculación conjunta de hongos MA y hongos saprofitos, en las plantas de *E. globulus*, bajo un suelo contaminado por metales pesados producto de actividades mineras, y a su vez observar los posibles beneficios producto de la siembra conjunta de *G. max*.

MATERIAL Y METODOS.

Las semillas de *E. globulus*, se germinaron en arena - vermiculita (1:1 v:v) y después de su emergencia, se trasplantaron a macetas de 1000 ml con una mezcla de suelo - arena (1:1 v:v), esterilizado a vapor fluente una hora durante tres días consecutivos. Las plantas se mantuvieron en cámara de cultivo con un fotoperíodo de 16 horas y temperaturas de 24° C (día)/ 18° C (noche) y 60% de humedad relativa. Semanalmente se aplicó 50 ml de una solución de nutrientes (Hewitt, 1952) con 50 mg/l de fósforo.

Se utilizó el hongo formador de micorriza arbuscular (MA) *Glomus deserticola*. Como hongos saprofitos (HS) se utilizaron *Fusarium concolor* y *Trichoderma sp*. La inoculación de las plantas se efectuó en el caso del endofito MA, al tiempo de repicar las plantas a las macetas de 1000 ml, cuando éstas tenían el segundo par de hojas verdaderas. La inoculación de los HS a las plantas se llevó a cabo aportando a cada maceta 5 granos de cebada colonizados completamente por el hongo.

Al cabo de 8 semanas se sembró junto a las plantas de *Eucalyptus* una semilla de *Glycine max* (Soja), con el fin de observar el potencial beneficio sobre la población microbiana del suelo. Después de 16 semanas de crecimiento y antes de su cosecha se midió la altura de todas las plantas de *E. globulus*. Tras la cosecha se determinó el peso seco de la parte radical y aérea. Para la determinación de la colonización micorrícica se procedió a la tinción de raíces según lo descrito por Phillips y Hayman (1970). El porcentaje de longitud de raíz micorrizada se estimó utilizando la técnica descrita por Giovannetti y Mosse (1980). Para la detección de la actividad Succinato Deshidrogenasa (SDH) en hongos MA se utilizó la técnica descrita por Mac Donald y Lewis (1978).

Se establecieron 6 tratamientos y un nivel de interacción de plantas, *E. globulus* + *Glycine max*. Los resultados obtenidos se sometieron a un análisis de normalidad y homogeneidad de varianzas, el cual de no arrojar diferencias, se procedió a efectuar un ANOVA comparándose las medias mediante el test de Tukey (Sokal y Rohlf, 1981). Los datos de porcentaje son transformados en el arco seno de su raíz cuadrada.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Los resultados del estudio muestran que existen síntomas de deficiencia nutritiva y posiblemente de toxicidad, en aquellas plantas que no inoculadas con el endofito MA, no así en todas las plantas colonizadas por el hongo MA, siendo probable que las hifas extraradicales del hongo MA facilite el transporte de los metales desde el suelo a la planta, pero su transferencia desde el hongo a la planta se restringe e inmoviliza en sus estructuras fúngicas, sin afectar fuertemente a la parte aérea de la planta (Joner y Leyval, 1997).

Como se observa en la figura 1 El desarrollo radicular de las plantas no inoculadas con el endofito MA, poseen un mayor peso seco que las plantas micorrizadas. Esto puede deberse fundamentalmente a que las plantas micorrizadas optimizan su sistema radical, mejorando tanto la absorción de agua como su nutrición (Harley y Smith, 1983), permitiendo destinar una cantidad óptima de carbohidratos producto de la fotosíntesis, a la elaboración y mantenimiento del sistema radical, con el consiguiente beneficio para el crecimiento aéreo de la planta. No se observan diferencias significativas entre la inoculación conjunta MA y HS, respecto de sus controles. Para la interacción con las plantas de Soja este beneficio solo es levemente superior pero no es significativo.

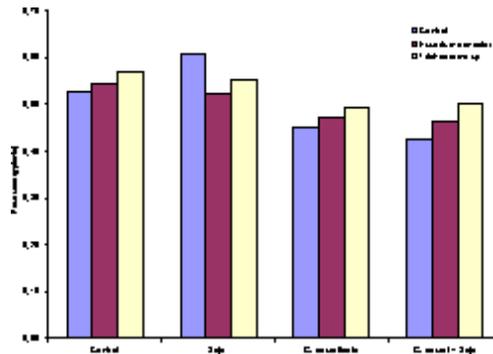


Figura 1. Biomasa radical en plantas de *E. globulus* inoculadas con *G. deserticola* y HS.

La colonización micorrícica de las plantas de *E. globulus* se vió potenciada por la interacción con Soja, aumentando en un 25% (Figura 2) y la interacción con el saprofito *Trichoderma sp.*, induce mayoritariamente esta colonización.

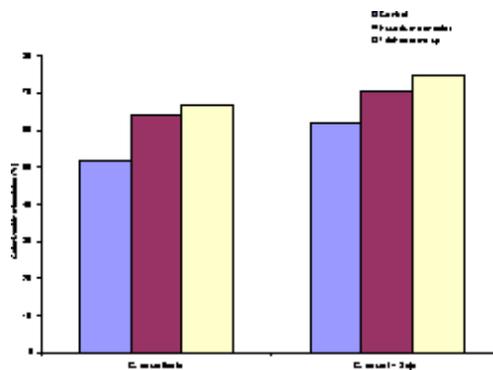


Figura 2. Colonización micorrícica en plantas de *E. globulus* inoculadas con *G. deserticola* y HS.

Si bien existe un beneficio de la interacción con Soja sobre la colonización MA en las plantas de *E. globulus* desarrolladas en el suelo contaminado, éstas se ven afectadas en al menos un 20% según lo observado bajo condiciones óptimas por Arriagada y Herrera (1999). Este estrés es menos acusado en las plantas inoculadas con MA y HS lo que concuerda con McAllister *et al* (1995), quienes encuentran que la segregación de sustancias por parte del HS, puede actuar de manera benéfica para el endofito MA.

La figura 3 muestra que la actividad metabólica del hongo, mantiene una proporcionalidad con respecto a la colonización del endofito MA. Esta medida de la enzima SDH de los hongos MA permite conocer el tejido fúngico viable (Vierheilig y Ocampo, 1990) pero no necesariamente como parámetro de medida de la efectividad del hongo sobre el desarrollo de las plantas de *E. globulus*, dado que no se observó un aumento de las variables altura y biomasa aérea a niveles estadísticamente significativos. Esta mayor colonización MA y actividad SDH del endofito en la planta de Soja, aumenta las posibilidades de establecimiento de una flora microbiana ausente, ya que se incrementan las poblaciones de endofitos capaces de resistir las altas concentraciones de metales y se potencia la recuperación de microorganismos autóctonos a largo plazo.

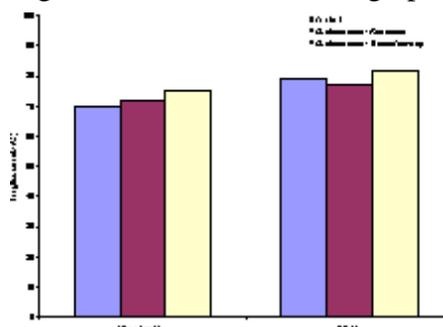


Figura 3. Colonización MA y Actividad SDH en raíces de plantas de *Glycine max* en interacción con *E. globulus* inoculadas con *G. deserticola* y HS.

El mayor crecimiento en altura lo alcanzan todas las plantas de *E. globulus* inoculadas con el endofito MA (figura 4), siendo estas diferencias estadísticamente significativas. Este incremento de la altura (31%), de las plantas colonizadas con MA, bajo condiciones de estrés por metales pesados es también observado por Hetrick *et al.* (1994). En el caso de la inoculación conjunta con los hongos saprofitos, no muestra diferencias significativas en la altura de las plantas.

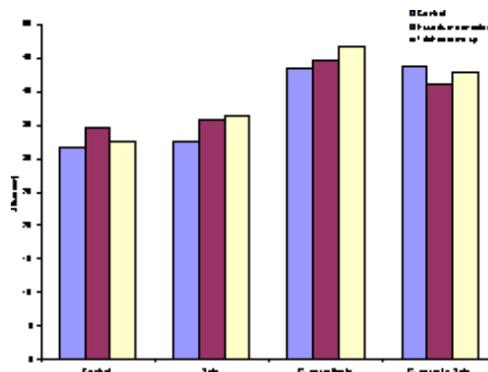


Figura 4. Altura media de las plantas de *E. globulus* inoculadas con *G. deserticola* y HS.

La biomasa aérea de las plantas de *E. globulus* micorrizadas, no se reduce por la acción tóxica de los metales pesados del suelo, como lo demuestra la Figura 5, siendo este efecto muy positivo cuando las plantas eran colonizadas por el endofito MA. Este aumento en la biomasa aérea, se debe fundamentalmente, a un incremento en la eficiencia de asimilación del N y P (Pearson y Jakobsen, 1993). La inoculación conjunta entre MA y HS, no muestra un beneficio claro de los saprofitos, aunque pueden estar actuando directamente sobre los elementos tóxicos del suelo ya que tienen la facultad de ser grandes degradadores de sustancias tóxicas (Madrid *et al.*, 1996). La mayor tolerancia de *E. globulus* a los metales pesados del suelo, puede ser consecuencia de la acción conjunta de los hongos MA y HS, los que pueden estar desarrollando un mecanismo de resistencia, a través de la formación de complejos metálicos fuera de la célula (Joho *et al.*, 1985), o bien restringiendo la acción de los metales, a través de la quelación intracelular de los metales, la síntesis de metalotioneínas, o la compartimentación dentro de las vacuolas (Turnau., *et al.*, 1996). Además, una de las estrategias de *E. globulus*, es la mayor acumulación en tejidos perennes de los metales, siendo retenidos e inmovilizados por largos períodos de tiempo (Leep y Dickinson, 1998).

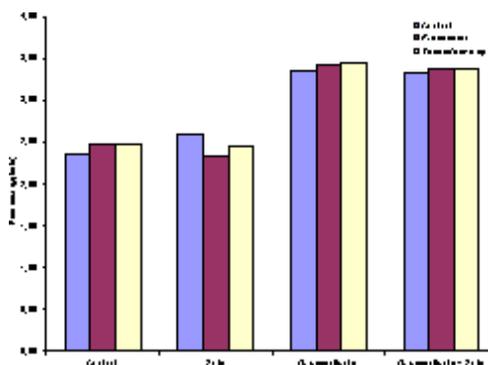


Figura 5. Biomasa aérea en plantas de *E. globulus* inoculadas con *G. deserticola* y HS.

Por último, podemos concluir que existe un marcado beneficio por parte de los hongos micorrícicos en cuanto al establecimiento y desarrollo de las plantas de *E. globulus* el cual se ve potenciado por la siembra de la especie *G. max*, la cual además de favorecer a las plantas de *E. globulus* beneficia el establecimiento de los microorganismos del suelo, piezas claves en la mantención de la biodiversidad de las plantas, su productividad, variabilidad y funcionamiento del ecosistema. (Van der Heijden *et al.*, 1998).

BIBLIOGRAFIA

- ARRIAGADA, C. & HERRERA, M. 1999. Restoration of mine soils contaminated by heavy metals through improved forest species. En: Proceedings of the International Congress Mine Water & Environment, Spain. Vol 1: 119-123.
- BRADSHAW, A. D. 1983. The reconstruction of ecosystems. *Journal of Applied Ecology* 20, 1-17.
- DARBON, N., LAVAGNE, F & QUILLON, J. P. 1992. Les phosphates et le cadmium: le sol, la plante, l'homme. APAO, Paris.
- GIOVANNETTI, M. & MOSSE, B. 1980. Evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytol* 84: 489-500.
- HARLEY, J. L., & SMITH, S. E. 1983. Mycorrhizal symbiosis. Academic Press. London. 483 pp.
- HEWITT, E.J. 1952. Sand and water culture methods in the study of plant nutrition. Tech. Comm. Farham. Roy. Bucks Comm. Agric. Bur. 22.
- HETRICK, B.A.D., WILSON, G.W.T. & FIGGE, D.A.H. 1994. The influence of mycorrhizal symbiosis and fertilizer amendments on establishment of vegetation in heavy metal mine spoil. *Environmental Pollution* 86: 171-179.
- JOHO, M., IMAI, M. AND MURAYAMA, T. 1985. Different distribution of Cd²⁺ between Cd-sensitive and Cd-resistant strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of General Microbiology* 131: 53-56.
- JONER, E. J. & LEYVAL, C. 1997. Uptake ¹⁰⁹Cd by roots and hyphae of a *Glomus mosseae* / *Trifolium subterraneum* mycorrhiza from soil amended with high an low concentrations of cadmium. *New Phytol.* 135: 353-360.
- LEEP, N. W. & DICKINSON, N. M. 1998. Biological Interactions: The role of woody plants in phytoremediation. En: *Metal Contaminated Soils. In situ Inactivation and Phytoremediation*, pp 67-73. Eds: Vangronsveld and Cunningham. Springer – Verlag Berlin Heidelberg. 1998.
- MADRID, F., DE LA RUBIA, T., & MARTINEZ, J. 1996. Effect of *Phanerochaete flavido-alba* on aromatic acids in olive oil mill waste waters. *Technological and Environmental Chemistry* 51: 161-168.
- McALLISTER, C. B., GARCIA-ROMERA, I., MARTIN, J., GODEAS, A., & OCAMPO, J. A. 1995. Interaction between *Aspergillus niger* van Tiegh. And *Glomus mosseae*. (Nicol. & Gerd.) Gerd. & Trappe. *New Phytologist.* 129: 309-316.
- MacDONALD, R. M. & LEWIS, M. 1978. The occurrence of some acid-phosphatases and dehydrogenases in the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *G. mosseae*. *New Phytol.* 80: 135-141.
- PEARSON, J.N. & JAKOBSEN, I. 1993. The relative contribution of hyphae and roots to phosphorus uptake by arbuscular mycorrhizal plants, measured by dual labeling with ³²P and ³³P. *New Phytologist* 124: 489-494.
- PEREIRA, G. & HERRERA, M. A. 1997. Micorrizas vesículo arbusculares en *Eucalyptus camaldulensis*: Efecto en el crecimiento de plántulas. I Congreso Forestal Hispano Luso. Tomo III: 509-514.
- PHILLIPS, J. M & HAYMAN, D. S. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 55:158-61.
- SOKAL, R & ROHLF, F.J. 1981. *Biometry: The principles and practice of statistics in biological research.* 2nd ed., W.H. Freeman and Co., New York. 859 p.
- TURNAU, K., KOTTKE, I. AND DEXHEIMER, J. 1996. Toxic element filtering in *Rhizopogon roseolus*/Pinus sylvestris mycorrhizas collected from calamine dumps. *Mycological Research* 100: 16-22.
- VAN DER HEIJDEN, M., KLIRONOMOS, J., URSIC., WIEMKEN, A. & SANDERS, I. 1998. Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature* 396: 69-72.
- VIERHEILIG, H. & OCAMPO, J. A. 1990. Relationship between SDH activity and VA mycorrhizal infection. *Agr. Eco. Env.* 29(1-4): 439-442.