

# El uso de la tolerancia bacteriana a Ni inducida por contaminación (PICT) para evaluar los efectos del proceso de remediación

## The use of Pollution-Induced Community Tolerance (PICT) to Ni to assess the effects of remediation techniques

Claudia Campillo-Cora\*, Manuel Arias-Estévez & David Fernández-Calviño

*Universidade de Vigo, Departamento de Biología Vegetal e Ciencia do Solo, As Lagoas s/n, 32004 Ourense, Spain  
(\*E-mail: ccampillo@uvigo.es)*

<https://doi.org/10.19084/rca.28648>

### RESUMEN

Los tratamientos de remediación en suelos contaminados por metales pesados están muy extendidos. No obstante, generalmente, cuando se evalúa su eficacia después de la aplicación, únicamente se tienen en cuenta fracciones del metal (soluble, biodisponible, etc.). Sin embargo, también es relevante conocer el estado de los microorganismos del suelo por las funciones esenciales que desempeñan. En este trabajo se evaluó el efecto de tres tratamientos de remediación en un suelo contaminado por Ni sobre las comunidades bacterianas, en términos de desarrollo de tolerancia al Ni. Los tratamientos de remediación fueron: concha de mejillón (CMT), corteza de pino (CP) y EDTA. También se estableció un control sin tratamientos. La CMT fue el tratamiento más efectivo y menos nocivo, ya que las comunidades bacterianas no desarrollaron tolerancia en respuesta a las adiciones de Ni al suelo. La remediación con CP sólo fue efectiva para niveles de Ni de 500 y 1000 mg·kg<sup>-1</sup>, pero las comunidades bacterianas desarrollaron tolerancia al Ni para 2000 mg·kg<sup>-1</sup>. El lavado del suelo con EDTA fue efectivo en términos de desarrollo de tolerancia al Ni por las comunidades bacterianas; no obstante, este procedimiento con EDTA fue demasiado nocivo para las bacterias, perjudicando la salud de la comunidad.

**Palabras clave:** níquel, remediación, crecimiento bacteriano, subproductos, contaminación.

### ABSTRACT

The use of remediation techniques in polluted soils with heavy metals is widespread. However, in general, after remediation application, only metal fractions (soluble, bioavailable, etc.) are taken into account in the assessment of their efficacy. In this sense, it is also relevant to know the status of soil microorganisms because of the essential functions they perform. In the present study, the effect of three remediation techniques on the development of bacterial community tolerance to Ni was assessed. The selected remediation techniques were: crushed mussel shell (CMS), pine bark (PB), and EDTA. A no-treatment control was also established. CMS was the most effective and least harmful treatment, as the bacterial communities did not develop tolerance in response to Ni additions to the soil. Ni-remediation with CP was only effective for Ni levels of 500 and 1000 mg·kg<sup>-1</sup>, but bacterial communities developed tolerance to Ni at 2000 mg·kg<sup>-1</sup>. Washing Ni out of the soil with EDTA was effective in terms of the development of bacterial community tolerance to Ni; however, EDTA-procedure was too harmful to the bacteria, damaging the health of the community.

**Keywords:** nickel, remediation, bacterial growth, by-products, pollution.

## INTRODUCCIÓN

La acumulación de metales pesados en los suelos es un problema global que afecta negativamente a las funciones que el suelo desempeña. Por ejemplo, en suelos con influencias antrópicas se han reportado valores de hasta 6025 mg·kg<sup>-1</sup> de níquel (Ni) (Kashulina, 2017). En general, cuando el nivel de metales supera un cierto umbral, es necesario aplicar algún tipo de tratamiento de remediación para mitigar los efectos nocivos sobre el ecosistema. Para ello se recomienda el uso de enmiendas orgánicas para inmovilizar metales pesados en suelos (Bolan *et al.*, 2014). Las enmiendas que más interesan son aquellas de bajo coste y que sean subproductos de otros tipos de industria, como la concha de mejillón triturada (CMT) o la corteza de pino (CP). Tanto la CMT como la CP son efectivas en la inmovilización de metales pesados *in situ* (Núñez-Delgado *et al.*, 2021). No obstante, en ocasiones es necesario un tratamiento más exhaustivo mediante técnicas *ex situ*, como el lavado del suelo. En este tipo de tratamientos *ex situ*, para la eliminación de los metales del suelo se suelen utilizar agentes quelantes como el EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) (Hu *et al.*, 2014). Una vez realizado el tratamiento de remediación, la evaluación del suelo no se debe limitar a las fracciones del metal en el suelo, si no que también debe de tenerse en consideración el resto de funciones del suelo. La utilización de microorganismos como indicadores puede ser muy útil dadas las funciones esenciales que desempeñan en los suelos (Nannipieri *et al.*, 2003). Una de las técnicas más sensibles con microorganismos como indicadores es la determinación de tolerancia de las comunidades microbianas a los metales (PICT: Pollution-induced Community Tolerance). El desarrollo de tolerancia informa directamente sobre la toxicidad de un metal.

En este estudio se evalúa la respuesta de comunidades bacterianas, en términos de tolerancia al Pb, después de aplicar tres técnicas de remediación (CMT, CP y EDTA) a un suelo contaminado. La hipótesis se basa en que si las técnicas de remediación han sido efectivas, la toxicidad del Pb disminuirá, y por tanto la tolerancia al Pb de las comunidades bacterianas también disminuirá.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### *Diseño experimental*

Se seleccionó un suelo forestal natural desarrollado sobre anfibolita: pH 4,7, 19,6 % MO, 79 mg Ni·kg<sup>-1</sup>. Se contaminó el suelo seco, tamizado (2 mm) y homogeneizado mediante la aplicación de diferentes disoluciones de Ni(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O al suelo. Finalmente, se obtuvieron las siguientes concentraciones finales: 2000, 1000, 500, 250 and 0 mg Ni·kg<sup>-1</sup>. Estos microcosmos se incubaron durante 30 días en oscuridad a 22°C. Una vez pasado el tiempo de incubación, se aplicaron los tratamientos de remediación a los microcosmos. Por un lado, se añadieron 48 g·kg<sup>-1</sup> de CMT y CP, individualmente, a los microcosmos. Por otro lado, se realizó el tratamiento de lavado del suelo con EDTA 0.1M mediante lixiviación en columnas (5 h EDTA 0,1M, 5 h agua destilada; 2,5 mL·h<sup>-1</sup>). Una vez realizados los tratamientos de remediación, se incubaron los microcosmos durante 60 días.

### *Determinación de tolerancia al Pb de la comunidad bacteriana*

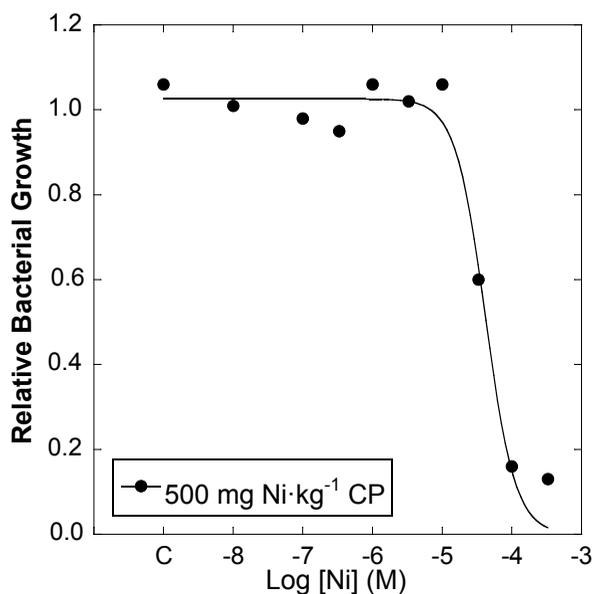
Terminada la incubación, se extrajo la suspensión bacteriana de cada microcosmos por el método de centrifugación-extracción (Bååth, 1992) utilizando MES 20 mM pH 6 (Lekfeldt *et al.*, 2014). Cada suspensión bacteriana se subdividió en microtubos a los que se añadieron 9 concentraciones de Ni(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O y un control de agua destilada. Las concentraciones de Ni en las suspensiones bacterianas oscilaron entre 10<sup>-8</sup> y 3.3 × 10<sup>-3</sup> M. Posteriormente, en cada muestra se determinó el crecimiento bacteriano por el método de incorporación de leucina (Bååth *et al.*, 2001).

Se obtuvo una curva dosis-respuesta para cada microcosmos (Figura 1). A partir de las curvas de inhibición se determinó log IC<sub>50</sub> como índice de tolerancia: la concentración de Ni necesaria para inhibir al 50% el crecimiento bacteriano. Mayor log IC<sub>50</sub> significa mayor tolerancia y mayor toxicidad del Ni; menor log IC<sub>50</sub> significa menor tolerancia y menor toxicidad del Ni. Para cada tratamiento, se determinaron individualmente el incremento de tolerancia (Δlog IC<sub>50</sub>) como la diferencia entre log IC<sub>50</sub> entre 2000, 1000 y 500 mg·kg<sup>-1</sup> y el suelo no

contaminado. Se considera incremento de tolerancia, y por tanto toxicidad, si  $\Delta \log IC_{50} > 0.3$ .

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

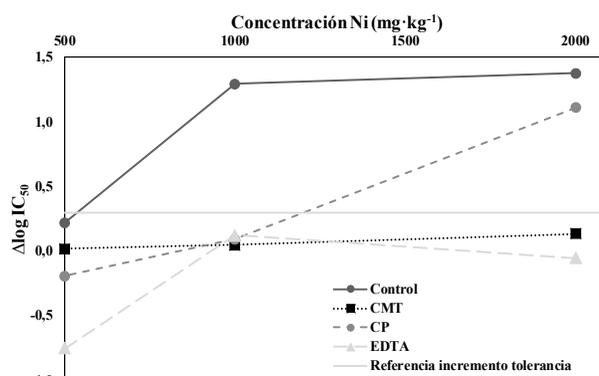
Para cada microcosmos se obtuvo una curva dosis-respuesta (o curva de inhibición) con forma sigmoïdal: en general, el crecimiento bacteriano fue máximo ( $\approx 1$ ) en las concentraciones más bajas de Ni en las suspensión bacteriana y, a medida que la concentración de Ni aumentó, el crecimiento bacteriano tendió a 0 (Figura 1). A partir de cada curva se determinaron los valores de tolerancia, es decir,  $\log IC_{50}$ .



**Figura 1** - Ejemplo de curva de inhibición de la comunidad bacteriana al Ni en la suspensión.

En cuanto a la respuesta de las comunidades bacterianas a la adición de Ni, el desarrollo de tolerancia al Ni aumentó a medida que aumentó el nivel de Ni en el suelo (Figura 2). La tolerancia al Ni fue superior al nivel de referencia ( $\Delta \log IC_{50} > 0.3$  unidades logarítmicas) para 1000 y 2000 mg Ni·kg<sup>-1</sup>, pero no para 500 mg·kg<sup>-1</sup>.

En cuanto a los tratamientos de remediación, cuando se aplicó al suelo contaminado corteza de pino triturada (CP), el desarrollo de tolerancia al Ni de las comunidades bacterianas aumentó en respuesta



**Figura 2** - Incremento de tolerancia al Ni de la comunidad bacteriana ( $\Delta \log IC_{50}$ ) en respuesta a tres niveles de contaminación por Ni (500, 1000 y 2000 mg·kg<sup>-1</sup>) y 3 tratamientos de remediación (CMT, CP y EDTA). La línea de referencia marca un valor de  $\Delta \log IC_{50} = 0.3$ .

a la adición de Ni, superando el valor de referencia (0.3) en el suelo contaminado con 2000 mg Ni·kg<sup>-1</sup> ( $\Delta \log IC_{50} = 1.1$ ) (Fig. 2). Es decir, la adición de CP redujo la toxicidad del Ni, pero sólo hasta cierto nivel de concentración. El efecto de la CP sobre la toxicidad del Ni puede deberse al aporte de materia orgánica y a la afinidad entre ésta y el Ni (Cuttillas-Barreiro *et al.*, 2014). Al añadir CP al suelo, aumenta el aporte de materia orgánica y el Ni se adsorbe a ésta formando complejos organometálicos que reducen la toxicidad del Ni para las comunidades bacterianas.

Por otro lado, cuando el suelo contaminado se trató con concha de mejillón triturada (CMT), las comunidades bacterianas no mostraron tolerancia al Ni, para ninguna de las concentraciones estudiadas (Figura 2). Es decir, la adición de CMT al suelo redujo la toxicidad del Ni casi por completo, en términos de desarrollo de tolerancia de las comunidades bacterianas. La razón de este comportamiento puede deberse a que el pH del suelo aumenta como consecuencia de la adición de la CMT. Al aumentar el pH, la biodisponibilidad del Ni disminuye (Ramírez-Pérez *et al.*, 2013) y resulta menos tóxico para las comunidades bacterianas.

De manera similar, cuando el Ni del suelo contaminado se retiró con un tratamiento de lixiviación (EDTA), las comunidades bacterianas de ese suelo no mostraron desarrollo de tolerancia al Ni, para ninguna de las concentraciones de estudio (Figura 2).

No obstante, analizando los resultados para la concentración más baja de Ni añadido ( $500 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), se puede observar que el incremento de tolerancia de las comunidades bacterianas es mucho menor cuando el suelo se lava con EDTA ( $\Delta \log \text{IC}_{50} = -0.75$ ) que en el suelo control ( $\Delta \log \text{IC}_{50} = 0.22$ ). Esto sugiere que el EDTA hace que el Ni sea más tóxico para las bacterias. No obstante, esto no es posible ya que en el lavado del suelo con EDTA se retira el Ni biodisponible para reducir la toxicidad. Otra hipótesis es que el tratamiento del suelo con EDTA también afecta de manera negativa a la comunidad bacteriana. Por tanto, cuando las comunidades bacterianas se exponen al Ni son más sensibles y muestran menor tolerancia.

## CONCLUSIONES

Se evaluaron tres técnicas de remediación suelos contaminados por Ni mediante la respuesta de las comunidades bacterianas del suelo en términos de desarrollo de tolerancia al Ni. La técnica de

remediación más efectiva y menos nociva fue la concha de mejillón triturada, que redujo la disponibilidad de Ni incluso a  $2000 \text{ mg Ni}\cdot\text{kg}^{-1}$ . La corteza de pino fue efectiva únicamente hasta  $1000 \text{ mg Ni}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Por último, el lavado de suelo con EDTA fue efectivo en términos de desarrollo de tolerancia de las comunidades bacterianas, no obstante, provocó efectos nocivos en la comunidad bacteriana en sí.

## AGRADECIMENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio español de Economía, Industria y Competitividad a través del proyecto CTM2015-73422-JIN. David Fernández Calviño posee un contrato Ramón y Cajal (RYC-2016-20411) financiado por el Ministerio español de Economía, Industria y Competitividad. Claudia Campillo-Cora posee contrato predoctoral "Xunta de Galicia" (ED401A-2020/084) financiado por la Consellería de Educación, Universidade e Formación profesional.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bååth, E. (1992) - Thymidine incorporation into macromolecules of bacteria extracted from soil by homogenization-centrifugation. *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 24, n. 11, p. 1157-1165. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(92\)90066-7](https://doi.org/10.1016/0038-0717(92)90066-7)
- Bååth, E.; Pettersson, M. & Söderberg, K.H. (2001) - Adaptation of a rapid and economical microcentrifugation method to measure thymidine and leucine incorporation by soil bacteria. *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 33, n. 11, p. 1571-1574. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(01\)00073-6](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(01)00073-6)
- Bolan, N.; Kunhikrishnan, A.; Thangarajan, R.; Kumpiene, J.; Park, J.; Makino, T.; Kirkham, M.B. & Scheckel, K. (2014) - Remediation of heavy metal(loid)s contaminated soils - To mobilize or to immobilize? *Journal of Hazardous Materials*, vol. 266, p. 141-166. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.12.018>
- Cutillas-Barreiro, L.; Ansias-Manso, L.; Fernández-Calviño, D.; Arias-Estévez, M.; Nóvoa-Muñoz, J.C.; Fernández-Sanjurjo, M.J.; Álvarez-Rodríguez, E. & Núñez-Delgado, A. (2014) - Pine bark as bio-adsorbent for Cd, Cu, Ni, Pb and Zn: Batch-type and stirred flow chamber experiments. *Journal of Environmental Management*, vol. 144, p. 258-264. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2014.06.008>
- Hu, P.; Yang, B.; Dong, C.; Chen, L.; Cao, X.; Zhao, J.; Wu, L.; Luo, Y. & Christie, P. (2014) - Assessment of EDTA heap leaching of an agricultural soil highly contaminated with heavy metals. *Chemosphere*, vol 117, p. 532-537. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.08.081>
- Kashulina, G.M. (2017) - Extreme pollution of soils by emissions of the copper-nickel industrial complex in the Kola Peninsula. *Eurasian Soil Science*, vol. 50, p. 837-849. <https://doi.org/10.1134/S1064229317070031>
- Lekfeldt, J.D.S.; Magid, J.; Holm, P.E.; Nybroe, O. & Brandt, K.K. (2014) - Evaluation of the leucine incorporation technique for detection of pollution-induced community tolerance to copper in a long-term agricultural field trial with urban waste fertilizers. *Environmental Pollution*, vol. 194, p. 78-85. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.07.013>
- Nannipieri, P.; Ascher, J.; Ceccherini, M.T.; Landi, L.; Pietramellara, G. & Renella, G. (2003) - Microbial diversity and soil functions. *European Journal of Soil Science*, vol. 54, n. 4, p. 655-670. <https://doi.org/10.1046/j.1351-0754.2003.0556.x>
- Núñez-Delgado, A.; Fernández-Sanjurjo, M.J.; Álvarez-Rodríguez, E.; Arias-Estévez, M.; Conde-Cid, M. & Fernández-Calviño, D. (2021) - Sorbents to control soil pollution. In: *Sorbents Materials for Controlling Environmental Pollution*, p. 691-700. Elsevier.
- Ramírez-Pérez, A.M.; Paradelo, M.; Nóvoa-Muñoz, J.C.; Arias-Estévez, M.; Fernández-Sanjurjo, M.J.; Álvarez-Rodríguez, E. & Núñez-Delgado, A. (2013) - Heavy metal retention in copper mine soil treated with mussel shells: Batch and column experiments. *Journal of Hazardous Materials*, vol. 248-249, p. 122-130. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.12.045>