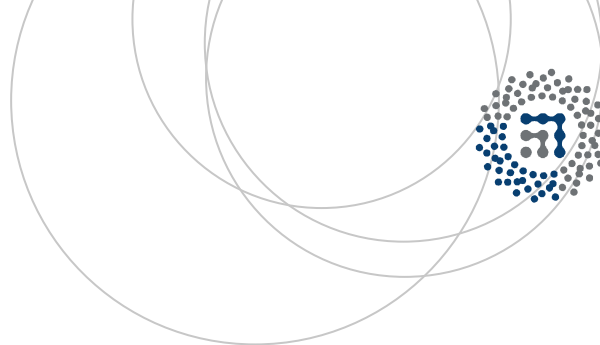


eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea



ZTF-FCT

Zientzia eta Teknologia Fakultatea
Facultad de Ciencia y Tecnología



Trabajo Fin de Grado
Grado en Biología

**DENDRORREMEDIACIÓN: EL USO DE *Betula alba* PARA MONITORIZAR Y REDUCIR
EL CONTENIDO DE METALES EN SUELOS MINEROS**

Autor:

Alessandra Maria Raimonda Nieddu

Director:

Jose María Becerril

Co-director:

Unai Artetxe



INDICE

RESUMEN

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. HIPOTESÍS Y OBJETIVOS.....	2
3. MATERIALES Y METODOS	
3.1.- Descripción del área de estudio.....	5
3.2.- Descripción de metales en suelo	5
3.3.-Determinación de metales en material vegetal	5
3.4.- Determinación de tococromanos	6
3.5.- Análisis estadístico.....	6
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
4.1- Metales en suelo.....	7
4.2- Metales en planta.....	7
4.3- Acumulación de α -tocoferol	12
5. CONCLUSION.....	14
6. BIBLIOGRAFÍA.....	15
7. AGRADECIMIENTOS.....	18



ABSTRACT

The intense industrial activity that took place over the past century resulted in large contaminated areas. This is an important risk to human health and environmental safety. Recent biotechnological techniques for bioremediation include phytoremediation, which uses plants to remove or stabilize contaminants in soils. In our study we choose birch (*Betula alba*) as the preferred species to remedy mining soils, due to it produces a large biomass and can accumulate high levels of toxic elements in its tissues. The aim of this study was (i) to determine the possibility of using this species in reforestation and/or remediation of mining soils (ii) to elucidate the potential of tocopherol levels as indicators of heavy metal pollution.

Trees growing in mining soils with high concentrations of Zn, Cd and Pb were sampled and the metal content in various organs and in tree rings was analyzed. α -tocopherol levels were also analyzed as an indicator of stress. The results showed a different distribution of metals in plant tissues. Zn and Cd had a higher accumulation in leaves, whereas Pb was stored in the timber. In addition, the metal content in tree rings was higher in older rings, leading to a conclusion that older tissues present a detoxification strategy. Furthermore, we saw how the presence of α -tocopherol on branches can be an indicator of metal stress in plants and it can be also used as a monitoring factor.

RESUMEN

La intensa actividad industrial que se ha llevado a cabo durante el siglo pasado ha dado lugar a amplias zonas contaminadas, llegando a constituir un riesgo importante para la salud humana y La seguridad ambiental. Recientes técnicas biotecnológicas para la biorremediación incluye la fitorremediación, que utiliza las plantas para eliminar o estabilizar contaminantes en los suelos contaminados. En nuestro estudio hemos elegido un especie arbórea como el abedul (*Betula alba*) como la especie idónea para remediar suelos mineros, ya que es una especie que produce una gran biomasa y puede llegar a acumular altos niveles de elementos tóxicos en sus tejidos. El objetivo de este estudio fue de determinar la posibilidad de utilizar esta especie en la reforestación y/o remediación de suelos mineros y la potencialidad de la monitorización de los niveles de tocoferoles como indicadores de la contaminación por metales pesados.

Árboles crecidos en suelo minero con altas concentraciones de Zn, Cd y Pb fueron muestreados y analizado el contenido de metales en diferentes órganos del árbol y en los anillos del tronco, además se analizó los niveles de α -tocopherol como indicador de estrés. Los resultados obtenidos muestran una diferente distribución de metales en los tejidos de las plantas. El Zn y el Cd presentan una mayor acumulación en las hojas, mientras que el Pb se almacena en la madera.

Además, el contenido de metales en los anillos del tronco muestran un mayor nivel en los más antiguos, resultando en una mayor acumulación en los tejidos muertos como estrategia de detoxificación. Además, se he visto como la presencia de α -tocopherol en las ramas pueda ser un indicador de estrés para la presencia de metales en las plantas y ser empleado como factor de monitorización.



1.- INTRODUCCIÓN

El suelo es un recurso vital y soporte sobre el que se desarrolla la vida de una gran parte de los seres vivos (Seoáñez Calvo, 1999). El crecimiento demográfico y la industrialización global que se ha llevado a cabo durante el siglo pasado a dado lugar a una contaminación generalizada del medio ambiente (incluido el suelo) con desechos orgánicos e inorgánicos persistentes y recalcitrantes (Chaudhry et al., 1998). La concentración de metales pesados en el medio ambiente aumenta anualmente (Govindasamy et al., 2011). Aunque la acumulación de los metales pesados puede ser natural por procesos de lavado de minerales, erosión del terreno o incluso actividades volcánicas, hoy en día las fuentes antropogénicas son la principal fuente de estos elementos. Una de las principales fuentes antropogénicas de contaminación por metales del medio ambiente es la extracción de estos elementos en la minería, cuya actividad y el posterior procesado de la industria de manufacturación ha hecho que haya aumentado la entrada y la acumulación de metales pesados en el medio ambiente, además existen otro tipo de actividades como son el uso de pesticidas o la utilización de biosólidos como fertilizantes en la agricultura (Ali et al., 2013). La acumulación de metales pesados y las actividades industriales generan suelos muy contaminados y degradados, en gran parte carentes de vegetación, lo que permite una fácil erosión del terreno y aumento de la dispersión de los contaminantes por el movimiento de los propios suelos o por la lixiviación de estos contaminantes hacia aguas subterráneas, haciendo que el problema generado sea aún mayor.

La práctica más extendida para la remediación de suelos contaminados por metales pesados es la excavación y almacenamiento de los suelos contaminados. La inmovilización o la extracción mediante técnicas fisicoquímicas pueden ser costosas y a menudo es apropiado sólo para pequeñas áreas donde se requiere una rápida y completa descontaminación (Martin y Bardos, 1996). Algunos métodos, como el lavado de suelos, pueden tener un efecto adverso sobre la actividad biológica, la estructura y la fertilidad del suelo, y algunos requieren costes económicos importantes. En consecuencia, el enfoque de la fitorremediación *in situ* es atractiva ya que ofrece la restauración del lugar, la descontaminación parcial, el mantenimiento de la actividad biológica y la estructura física de los suelos, y es una tecnología potencialmente barata, visualmente atractiva, y existe la posibilidad de extraer los metales (Baker et al., 1991, 1994). La Fitorremediación se define como el uso de plantas para eliminar los contaminantes del medio ambiente o para convertirlos en inocuos (Salt et al., 1998). Entre las tecnologías de fitoremediación se encuentran: i) la fitovolatilización, ii) la rizorremediación, iii) la fitoestabilización, iv) la fitoextracción y v) la dendrorremediación. La fitovolatilización es la toma y transpiración por la planta de un contaminante y la liberación de este contaminante o de una forma modificada de este contaminante a la atmósfera. La rizorremediación se basa en aprovechar la interacción de los microorganismos del suelo, los hongos micorrízicos arbusculares y las raíces de las plantas para eliminar los contaminantes del suelo. La fitoestabilización es la técnica que utiliza una cobertura vegetal (mediante especies herbáceas o especies leñosas) sobre un suelo contaminado para inmovilizar los contaminantes del suelo. La fitoextracción de metales se define como “el empleo de plantas para la eliminación de metales del suelo mediante su acumulación en la parte cosechable de las plantas” (Pilon-Smits, 2005). La dendrorremediación es una técnica más reciente que extrae, secuestra o descompone químicamente los contaminantes (Mani y Kumar, 2014) mediante especies leñosas de rápido crecimiento. La dendrorremediación ha sido estudiada con diferentes contaminantes como



petróleo, explosivos, metales o pesticidas (Komives y Gullner, 2006). La elección de las especies a utilizar dentro de esta técnica es importante para evitar riesgos ecológicos (invasión de especies invasoras) o un aumento de la dispersión de los contaminantes, debiéndose seleccionar aquellas especies nativas de la zona afectada y que permitan un manejo apropiado para la recuperación de los contaminantes (Vangronsveld et al., 2009)

Atendiendo a su función en la nutrición mineral de las plantas, entre los metales pesados se encuentran: a) micronutrientes esenciales de las plantas (Zn, Ni, Fe, Mn, Cu, Mo), necesarios para el crecimiento vegetal y el desarrollo del ciclo vital, aunque pueden resultar tóxicos a concentraciones elevada. b) micronutrientes de esencialidad restringida (Co, V etc.), que presentan efectos beneficiosos en el crecimiento de algunas especies pero resultan tóxicos a concentraciones elevadas y c) elementos no esenciales (Pb, Cd, As, Hg etc.) que resultan perjudiciales incluso a bajas concentraciones (Ross y cols., 1994). Atendiendo a estas interacciones entre plantas y metales hay varias estrategias que las plantas pueden emplear para combatir el exceso de elementos tóxicos en el medio: i) plantas excluseras, que presentan una absorción restringida del elemento tóxico y su transporte a la parte aérea y se utilizan para tecnología de fitoestabilización, ii) plantas indicadoras, cuya concentración interna de metales refleja la concentración del suelo y pueden ser utilizadas como bioindicadoras, y iii) plantas hiperacumuladoras, que presentan una alta capacidad de transporte interno del elemento tóxico de la raíz a la parte aérea donde se concentran activamente (Memon y Schroeder, 2009) y se utilizan en tecnologías de fitoextracción. Estas plantas son endémicas de áreas de mineralización natural y zonas con actividades mineras que contienen los niveles de elementos necesarios para su desarrollo (Brooks, 1998). La concentración de metales para ser considerada una especie hiperacumuladora depende del metal: 100 mg kg⁻¹ para el Cd, Se y Tl; 300 mg kg⁻¹ para el Co, Cu y Cr; 1000 mg kg⁻¹ para Ni, Pb y As; 10000 mg kg⁻¹ para el Zn y el Mn.

Inicialmente, los estudios de fitoextracción se centraron en plantas hiperacumuladoras, pero la explotación de la absorción de metal en la biomasa vegetal como un método de descontaminación del suelo está limitada por la productividad de la planta y las concentraciones de metales en las partes cosechables (Baker et al., 1991). Por ejemplo, *Nocoea caerulescens* es conocida por ser una planta hiperacumuladora de Zn, pero su uso en el campo está limitada porque la biomasa que desarrollan las plantas es muy escasa y tiene una tasa de crecimiento lenta (Ebbs y Kochian, 1997). Las especies de plantas ideales para remediar un suelo contaminado con metales pesados serían aquellas que producen alta biomasa en sus cultivos y que pueden tolerar y acumular los contaminantes de interés (Ebbs y Kochian, 1997). Una alternativa al uso de hiperacumuladoras es el uso de plantas con menos capacidad de concentración de metales en los tejidos de la parte aérea (como las plantas indicadoras) junto con la manipulación de la disponibilidad de los metales (adición de agentes quelantes) en el suelo y, por lo tanto, aumentar la absorción de la planta. Otra alternativa es la estabilización tanto del terreno como de los metales mediante plantas excluseras impidiendo la dispersión de los metales hacia lugares no contaminados o hacia las aguas subterráneas.

A pesar de que los árboles no tienen altas tasas de acumulación de metales han sido estudiados para su utilización en procesos de fitorremediación. Las ventajas que tienen los árboles frente a otras especies no leñosas es que: i) son cultivos de larga duración con una gran producción de biomasa (Marmioli et al., 2011), ii) tienen alta tolerancia a la acumulación de



metales en sus tejidos (Di Lonardo et al., 2011), iii) ciertas especies se propagan fácilmente y tienen una buena capacidad para tolerar manejos intensivos (podas, cortes de tronco), iv) tienen un sistema radical profundo que abarca un mayor volumen de suelo y v) son capaces de almacenar los metales pesados en la parte aérea (González-Oreja et al., 2008). Además, el análisis de los anillos de los árboles representa una fuente de información única, ampliamente disponible, de datos a largo plazo, ofrecen un potencial considerable para la identificación de agentes contaminantes en el suelo y nos permiten monitorizar cambios espacio-temporales de los contaminantes en escalas largas de tiempo. Este aspecto es muy importante ya que los anillos de los árboles pueden registrar la historia ambiental de un entorno del que no se dispone otra fuente de información. Además de la mejora de los servicios de los ecosistemas que supone la reforestación, existe otra ventaja adicional como es la posible utilización de la biomasa para la producción de energía, abaratando así los costes del proceso de remediación. Entre las especies de árboles más utilizados se encuentran los géneros *Salix*, *Populus*, *Alnus* y *Betula*. Los abedules (género *Betula*) aunque no se han descrito como hiperacumuladores, sí que tienen una gran afinidad por el Zn (Dmuchowski et al., 2014), llegando a acumular más zinc que otras especies incluso en sitios no contaminados.

Esta capacidad que tienen las plantas para acumular metales pesados hace que estos interfieran en los procesos fisiológicos normales. Cuando los procesos fisiológicos y bioquímicos de ven alterados en las plantas causan estrés oxidativo, mediante la formación de especies reactivas de oxígeno (EROs) produciendo daños en las membranas lipídicas, inactivación de enzimas o incluso en la propia estructura del DNA, (Bernard et al., 2015). La alteración del crecimiento y de varios procesos fisiológicos y metabólicos puede reflejar la presencia de estos elementos en el organismo de las plantas. De hecho estos indicadores vegetales pueden ser usados como herramientas biológicas para la biomonitorización de la tolerancia de las plantas o del propio proceso de fitorremediación. Para defenderse del estrés oxidativo las plantas activan una serie de mecanismos enzimáticos (Superóxido dismutasa, Ascorbato peroxidasa, Monodehidroascorbato reductasa, Dehidroascorbato reductasa y Glutathion reductasa) y no enzimáticos (ascorbato, glutathion y tocoferoles) (García-Plazaola y cols. 1999). El incremento del contenido en tocoferoles en respuesta al estrés abiótico incluyendo la toxicidad por metales pesados ha sido apuntado por varios autores indicando que este antioxidante lipofílico es un excelente biomarcador de estrés oxidativo en tejidos vegetales (Artetxe et al., 2002; Epelde et al. 2010). Estudios recientes (Fleta-Soriano y cols., 2014) indican que tococromanoles (tocóferoles y tocotrienoles) pueden ser acumulados no sólo en los tejidos verdes de la planta, sino en la madera de los árboles. De esta forma la determinación de tocoferoles en madera puede ser un biomarcador útil que registre el estado fisiológico y el estrés oxidativo durante el crecimiento de los anillos de los árboles. Esta nueva herramienta de diagnóstico dendrometabólico podría, a nivel fisiológico, complementar la información de la acumulación de contaminantes y su impacto en la planta en una escala espacio-temporal. Por ello en este estudio se analiza el contenido de metales y tocoferoles en diferentes órganos de abedules que crecen en suelos mineros.



2.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

- Hipótesis

La especie *Betula alba* es una especie autóctona del País Vasco, de crecimiento rápido, colonizadora de suelos empobrecidos y con una gran adaptación a los manejos culturales intensivos. Con estas características tiene un gran potencial para sobrevivir en suelos mineros con altos niveles de elementos tóxicos así poder monitorizar la acumulación de metales en sus anillos y otros tejidos de la planta. En base a esta capacidad podría ser utilizada para como especie extractora de metales en técnicas de dendrorremediación y ser utilizada para la remediación de suelos mineros

- Objetivos

- Determinar la potencialidad de la especie *Betula alba* para monitorizar la acumulación de metales en plantas creciendo en suelos mineros, mediante su acumulación en los diversos tejidos y en los anillos del tronco
- Determinar la potencialidad de la monitorización de niveles de tocoferol en los anillos de los árboles y su relación con la acumulación de metales.
- Determinar la potencialidad de utilización de esta especie en la reforestación y/o remediación de suelos mineros.



3.- MATERIALES Y METODOS.

3.1.- Descripción del área de estudio.

El área de estudio es una antigua zona minera abandonada situada en Lanestosa, en el distrito occidental de Bizkaia, Cuenca del Cantábrico vasco, en el norte de España (latitud 43 ° 13 ' N, longitud 3 ° 26' O). Como la mayoría de las cuencas mesozoicas en el norte peninsular, esta área contiene una mineralización de Pb y Zn de tipo Mississippi Valley. En el año 2001 en esta zona mineralizada se plantaron 30 plántulas de un año de edad de la especie *Betula alba*. Además se plantaron como controles 10 plántulas un área próxima pero no afectada por las actividades mineras. Desde entonces los árboles que han sobrevivido (15) han estado creciendo en un suelo procedente de los residuos de la actividad minera de la zona si bien su desarrollo respecto a los controles ha sido mucho menor. El entorno presenta una distribución muy heterogénea de metales (principalmente Zn y Pb y bajos niveles de Cd), bajos niveles de materia orgánica y macronutrientes esenciales (Barrutia y cols, 2011).

3.2.- Determinación de metales en suelo.

A pesar de que las raíces son profundas, se recogieron 500 g. de suelo de la zona superficial del área donde crecen los árboles. Las muestras de suelo se secaron con aire a 70 °C durante 48 horas y se tamizaron a través de una malla 2mm.

El contenido de Cd, Pb y Zn extractable se determinó mediante una solución de CaCl₂. 2 g de suelo seco y tamizado se agitaron con 20 mL de CaCl₂ 0.01 M durante 2 horas. Después de la agitación el sobrenadante se filtró por un diámetro de poro de 0,45 µm y se ajustó hasta una concentración final de 1% HNO₃. Los análisis de los metales se realizaron con un ICP-AES.

3.3.- Determinación de metales en material vegetal.

A mediados de Noviembre 2014 coincidiendo con la caída de las hojas se recogieron muestras de hojas, yemas, amentos, ramas y madera de tronco de los árboles crecidos en la zona de estudio. Los testigos del tronco fueron recolectados usando un taladro de incremento Pressler (5 mm de diámetro interior) a 1,3 m por encima del suelo. Las muestras de ramas se tomaron de la zona expuesta al sur. Las ramas se separaron en función del año de crecimiento diferenciándose hasta 3 años (2014, 2013, 2012).

Una vez obtenidas las muestras se congelaron en N₂ (nitrógeno líquido), se almacenaron a -80 °C, y finalmente se liofilizaron durante 72h.

Los testigos de los troncos de los árboles se fraccionaron en anillos anuales, para el estudio de la extracción de metales a lo largo de los años. Se necesitaron 3 testigos por árbol para tener muestra suficiente de cada anillo anual para la determinación de los metales. Los anillos de los troncos, las ramas, yemas, amentos y hojas se trituraron con el empleo de un molino Retsch MM301 (Fisher Bioblock Scientific) hasta homogeneizar las muestras en un fino polvo. Se



digirieron 100 mg de muestras de plantas con una mezcla de $\text{HNO}_3:\text{HClO}_4$ (85:15) (Zhao et al., 1994) y se determinó el contenido total de Zn, Pb y Cd, usando un ICP-AES.

3.4.- Determinación de tococromanoles.

Aproximadamente 30 mg de muestra liofilizada y triturada fueron extraídos en 1 ml de heptano puro (Romil, Barcelona, Spain) y centrifugados a 16.100 g durante 20 minutos a 4 C. El sobrenadante fue filtrado con filtros de 0.2 μm PTFE (Teknokroma, Barcelona, España). Los tococromanoles (tocoferoles y tocotrienoles) se analizaron por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) siguiendo un método modificado basado en Bagci et al. (2004a, 2004b).

La separación se realiza con una columna Supercosil LC-diol (25-0 x 4,6 mm, 5 μm de poro) (Sigma-Aldrich, Bellefonte, EE.UU.). Se flujo con un gradiente isocrático de heptano/tert-butil-metil-éter (97,5: 2,5) a un flujo de 1 mL min^{-1} . La detección se realizó con un detector de fluorescencia Waters 474 a 295 nm λ de excitación y 325 nm λ de emisión.

Esté método permite la cuantificación de α -, β -, γ - y δ -tocoferoles y α -, β -, γ - y δ -tocotrienoles (T3). Estándares de estos compuestos fueron utilizados para la identificación y cuantificación de tococromanoles.

3.5.- Análisis estadístico.

Cada grupo de datos se comprobó la distribución normal mediante el test de Kolmogorov-Smirnoff y la homogeneidad de varianzas con el test de Levene, y cuando fue posible, las diferencias entre tratamientos se realizaron mediante un test T-student ($p < 0.05$) o una ANOVA de una via ($p < 0.05$). Cuando los datos no cumplieron con las premisas de los test paramétricos, se utilizaron los test no paramétricos Mann-Whitney o Kruskal-Wallis.



4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1.- Metales en suelo.

El análisis de la concentración biodisponible del suelo determinado como la fracción extraíble mostró que el Zn ($1162 \pm 596 \text{ mg kg}^{-1}$) es el metal más abundante, seguido por el Pb ($154 \pm 68 \text{ mg kg}^{-1}$). El Cd presentó la concentración más baja de los tres elementos ($6,8 \pm 3,3 \text{ mg kg}^{-1}$). La heterogeneidad vertical y horizontal de los suelos contaminado por residuos de minería hace que, a pesar de crecer los árboles cercanos entre sí, la variabilidad de las medidas sea tan alta. El contenido de metales fue muy alto ya que el contenido extractable de los tres elementos supera incluso el contenido total de un suelo normal. Según Kabatas-Pendias (2011), aunque que depende del tipo de suelo, los valores de un suelo normal pueden oscilar entre 30 y 120 mg kg^{-1} para el Zn, entre 3-90 mg kg^{-1} para el Pb y entre 0,1-2,5 mg kg^{-1} para el Cd, valores que son inferiores al contenido de metales extraíbles del suelo en el que crecen los abedules analizados.

4.2.- Metales en planta.

- **¿En qué órganos de la planta se acumulan los metales?**

La acumulación de los metales puede darse en diferentes órganos dentro del árbol, para ello se determinaron los metales en hojas, yemas y amentos (Fig. 1), en ramas de 1, 2 o 3 años (Fig. 2) y en el tronco (Tabla 1). En la figura 1 se observa como para el Cd y el Zn hay una mayor acumulación en hojas frente a las yemas y a los amentos. Estos últimos, como estructura reproductora de especial protección, tienen un bajo nivel de metales, como ocurre la acumulación de metales en semillas.

Los niveles de Zn en hojas son muy elevados (2000 mg Kg^{-1}), lo que indica que el abedul es una especie bastante tolerante a la contaminación metálica y acumula altos niveles de Zn y Cd en comparación con los árboles del sitio control. Esta concentración es 10 veces superior para el Zn y 8.5 para el Cd en los abedules procedentes de la zona minera. Además la acumulación en hojas del Zn fue 27 veces superior a la del tronco y para el Cd fue 10 veces superior. Tanto el Zn como el Cd como iones móviles se traslocaron preferentemente a las hojas. Por el contrario, el nivel de Pb en las hojas fue muy bajo, 5 veces inferior al nivel de Pb en el tronco. La poca movilidad del Pb en los tejidos de la planta puede justificar su mayor acumulación en los tejidos leñosos. La alta acumulación de Zn en hojas es comparable al de plantas herbáceas metalícolas como *Rumex acetosa* (Barrutia y cols, 2011), e indica que esta especie debe disponer de mecanismos fisiológicos de tolerancia a la contaminación metálica que merecen ser investigados.

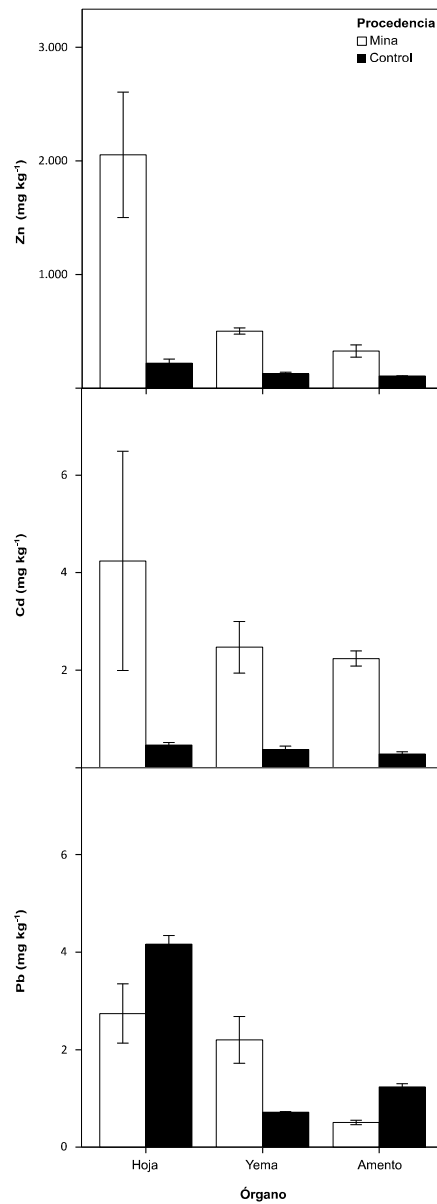


Figura 1. Contenido de Zn, Cd y Pb (mg Kg⁻¹) en hojas, yemas y amentos de abedules crecidos en suelo minero o en suelo control.

La acumulación de metales en las ramas de abedules creciendo en suelos con altos contenidos de metales fue superior a la acumulación de árboles crecidos en un sitio control (Fig. 2). El contenido de Zn y Cd en las ramas fue también más elevada que en el tronco (Tabla 1). Para el Zn entre 11 y 16 veces superior dependiendo de la edad de la rama y para el Cd entre 4 y 6 veces más. Aun así, la acumulación en las hojas es superior a la de las ramas ya que estos cocientes fueron la mitad que en las hojas. Cuando se comparan los resultados de los 3 últimos años no se observa una acumulación diferente en función de la edad.

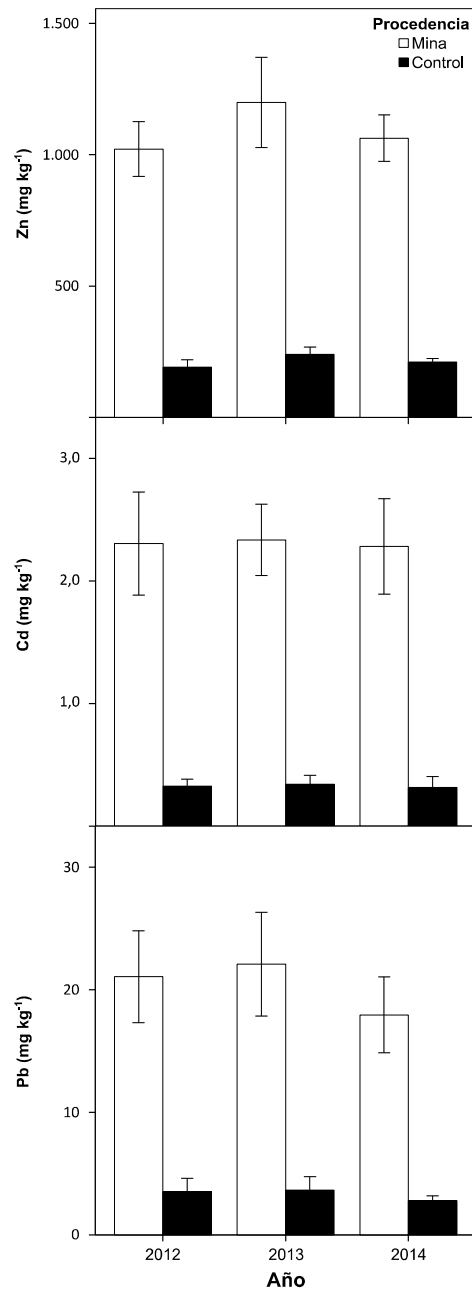


Figura 2. Contenido de Zn, Cd y Pb (mg kg⁻¹) en ramas de diferente edad (1, 2 o 3 años) de abedules crecidos en suelo minero o en suelo control.

El abedul tiene una estrategia diferente para la acumulación del Pb que para el Zn. En las ramas acumula 2 veces más Pb que en el tronco con independencia de la edad que tenga la rama, y el contenido en rama también fue superior a la acumulación en hojas, yemas y amentos (Fig. 2).

La acumulación de metales en diferentes partes de la planta es una estrategia común que utilizan las plantas para reducir los metales en las estructuras de la parte aérea (Han et al., 2006)

de la cual dependen procesos esenciales para el crecimiento como la fotosíntesis. La mayoría de los metales se acumulan en las raíces formando complejos con los grupos sulfidrilo (Singh et al., 2004) impidiendo que se trasloquen los metales a otras partes de la planta. Sin embargo, algunos metales con una alta movilidad en los tejidos de la planta como el Zn y el Cd pueden tener la máxima concentración en las hojas (Han et al., 2006; Unterbrunner et al., 2007). La propia esencialidad del Zn hace que incluso niveles altos en los tejidos no causen efectos fitotóxicos y que este elemento sea trasladado y acumulado de forma selectiva. Marguá et al., (2007) sugieren la posibilidad de utilizar *Betula pendula* como un indicador de la contaminación por metales.

Por otra parte, la baja acumulación de Pb en las hojas, incluso en especies herbáceas, es un resultado muy común (Barrutia y cols, 2011) debido a la baja disponibilidad de este metal y su acumulación en las vacuolas de la raíz (LAMB y cols, 2010).

Los datos mostrados en la Tabla 1 muestran el contenido medio de los tres metales en la madera de los árboles crecidos en un suelo minero o crecidos en un suelo control. La heterogeneidad de los suelos descrita en el punto anterior hace que la acumulación de Zn, de Cd o de Pb en los troncos diferentes árboles muestreados también sea variable.

Tabla 1. Contenido de metales (mg kg^{-1}) en madera de abedul muestreados en un suelo minero y en un suelo control.

Procedencia	ĕrbol	Zn	Cd	Pb
Mina	1	116,76 \pm 8,43	0,35 \pm ,03	10,74 \pm 2,04
	2	95,33 \pm 13,55	0,29 \pm ,03	5,37 \pm ,95
	3	62,46 \pm 13,82	0,42 \pm ,05	10,46 \pm 1,98
	4	51,58 \pm 4,32	0,25 \pm ,01	9,41 \pm 1,53
	5	65,10 \pm 9,01	0,82 \pm ,05	7,61 \pm 1,47
	6	73,60 \pm 5,61	0,41 \pm ,06	5,70 \pm 1,03
	7	65,76 \pm 9,90	0,23 \pm ,02	6,47 \pm 1,80
Control	1	19,21 \pm 2,68	0,08 \pm ,01	,62 \pm ,04
	2	26,55 \pm 2,76	0,11 \pm ,01	1,02 \pm ,14
	3	13,98 \pm 1,82	0,04 \pm ,01	,43 \pm ,08

En el tronco de los árboles crecidos en el suelo contaminado se observó que el elemento con una mayor acumulación es el Zn, después el Pb y por último el Cd, al igual que la concentración de metales encontrados en el suelo de la mina. Además, el contenido de metales en la madera de los abedules crecidos en suelo minero fue muy superior en todos los casos a los árboles crecidos en un suelo control, como se ha descrito por Reimann et al. (2007) y Unterbrunner et al. (2007). De hecho, el contenido de Zn en los árboles de la mina fue 3.8 veces superior al de los árboles de una zona no contaminada, el Cd fue 5 veces superior y el Pb fue 11,5 veces superior. Estos valores de metal en la madera son inferiores a los valores de otras plantas herbáceas que crecen en esos suelos no superando incluso los niveles de plantas con estrategia exclusora como *Festuca rubra* (Zn 766 mg kg^{-1} ; Pb 130 mg kg^{-1} ; Cd 1 mg kg^{-1}) (Barrutia y cols., 2011). Esto indica que un bajo nivel de acumulación de metales en la madera del tronco.

• ¿Influye la edad en la acumulación de metales en la madera del abedul?

Los abedules crecidos en un suelo contaminado fueron capaces de almacenar Zn, Cd y Pb en la madera del tronco, como hemos comentado en el apartado anterior. Al analizar este contenido en anillos de la madera con edades diferentes (Fig. 3) se observa que los metales no se distribuyeron uniformemente a lo largo de los años, sino que los anillos más antiguos acumularon un mayor contenido de los tres metales, mostrándose diferencias significativas para el Zn y el Pb entre los años más recientes y más antiguos. Para el Cd, aunque no se dieron diferencias significativas también se pudo observar un incremento del contenido de metales con los años.

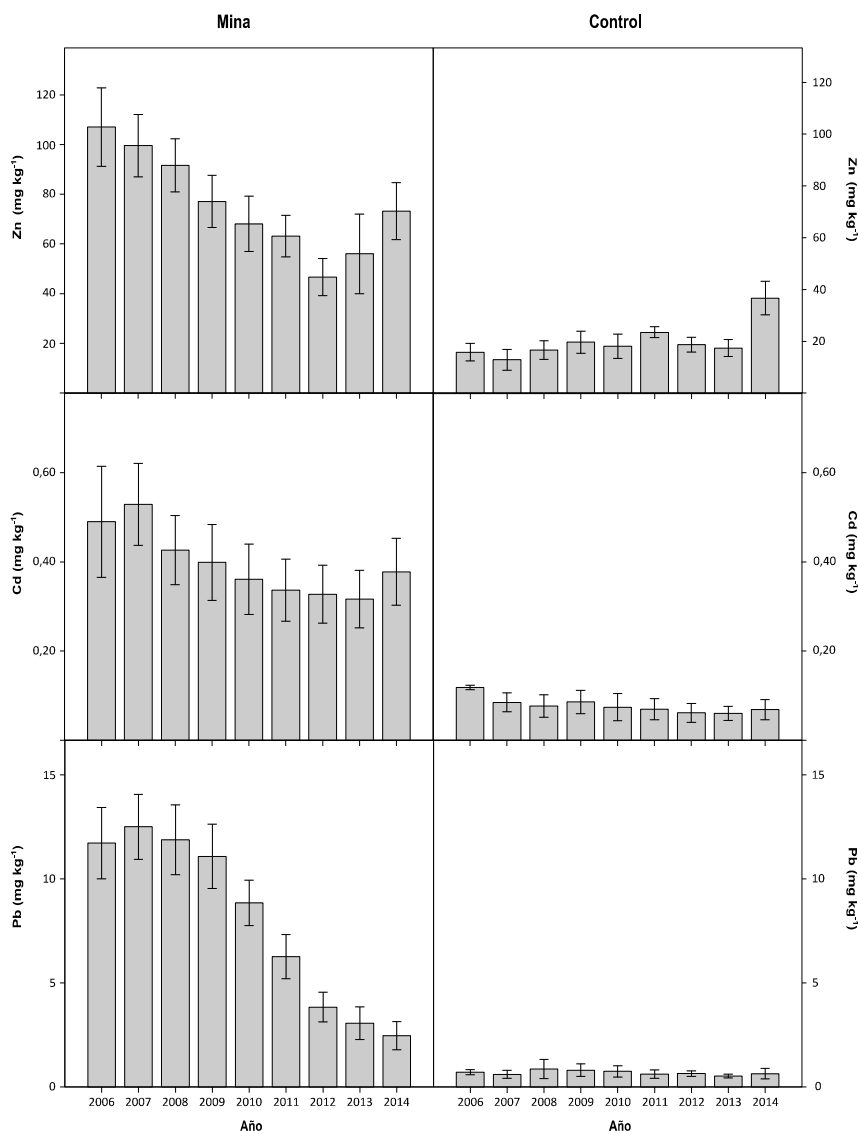


Figura 3. Contenido de Zn, Cd y Pb (mg kg⁻¹) en los anillos del tronco de abedules crecidos en un entorno minero (Mina) o en un sitio control.



Para el Zn y el Cd se observó un incremento del contenido en el año 2014 frente a los años 2012/2013, esto puede ser debido al transporte de nutrientes desde la raíz a la parte aérea sigue activo y por tanto la acumulación en el año en curso es mayor porque su sistema vascular es funcional y transporta los metales hacia la parte aérea, incluidas las hojas. Además en el caso de Zn las células vivas del cambium requieren un mayor contenido de nutrientes que el duramen (Hagemeyer y Schäfer, 1997). Por el contrario en el caso del Pb este aumento no se observa ya que la movilidad de este metal es muy reducida en comparación con el Zn y el Cd.

Los patrones de distribución de elementos en la madera de los árboles han sido usados para la monitorización de los cambios de los niveles de contaminación ambiental a lo largo de los años (Cutter y Guyette, 1993). El dendroanálisis, como se denomina a esta técnica, aunque puede aportar una información ambiental sus análisis debe realizarse con precauciones (Smith y Shortle, 1996). Como ejemplo, el ^{90}Sr es un isótopo radioactivo que no fue introducido en la biosfera hasta mediados de los años 1950, cuando se empezaron a probar las primeras bombas atómicas. Sin embargo, Bondietti et al. (1990) encontraron cantidades significativas de este isótopo en anillos de *Picea rubens* formados en la mitad de la década de 1920. También en nuestros resultados se observa una traslocación de los elementos tóxicos hacia el duramen, sugiriendo que este proceso es un mecanismo de detoxificación desde tejidos vivos hacia tejidos sin funcionalidad fisiológica (Hagemeyer y Schäfer, 1995).

4.3.- Acumulación de α -tocoferol.

La acumulación de α -tocoferol en los diferentes tejidos analizados fue muy desigual (Figs. 4 y 5). El contenido de este antioxidante fue mayor en las hojas, seguido por las yemas, las ramas, los amentos y finalmente en el tronco. Esta distribución refleja un patrón de actividad fisiológica de estos órganos, siendo los más activos aquellos que presentan más concentración y más diversa variedad de tocoferoles. Así los niveles de tocoferoles en hojas fueron los más elevados, y es aquí donde aparecían también la mayor variedad de tocoferoles y tocotrienoles (datos no mostrados). No se observó una gran diferencia entre los niveles de los árboles de la mina y los controles, debido al estado senescente de estos tejidos durante el Otoño 2014.

La acumulación de α -tocoferol en el tronco fue muy desigual ya que únicamente 2 de los 7 individuos mostraron niveles por encima del límite de detección. La acumulación de este antioxidante en la madera de los árboles, incluida una especie del género *Betula*, ha sido recientemente descrita por Fleta-Soriano et al. (2014). Sin embargo, la mayor acumulación se describe en las venas del parénquima, metabólicamente activas, mientras que la estrategia para la detoxificación es la acumulación de los metales en las partes menos activas del tronco (Hagemeyer y Schäfer, 1995).

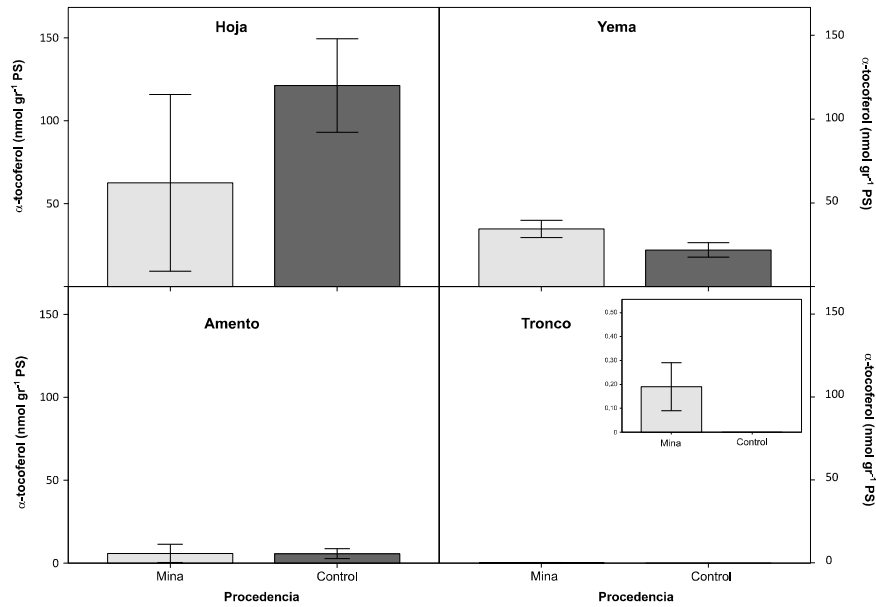


Figura 4. Contenido de α -tocoferol (nmol gr⁻¹ PS) en los diferentes tejidos analizados de *B. alba*.

Las ramas mostraron acumulación de α -tocoferol en todos los individuos, aunque no se observa un efecto de acumulación con la edad (Fig.5). Los abedules del suelo contaminado presentan valores de α -tocoferol dos veces superiores a los del suelo no contaminado, siendo este tejido el único que muestra esta diferencia. Como se ha descrito anteriormente, las ramas son el tejido que acumula un mayor nivel de metales después de las hojas para el Zn y el Cd y después del tronco para el Pb. Esto hace que un tejido metabólicamente muy activo sea utilizado por parte del abedul como reservorio de elementos tóxicos. El aumento de los niveles de α -tocoferol ya se ha descrito anteriormente (Artetxe et al., 2002), así los niveles de este antioxidante pueden ser utilizados como indicador de un estrés por acumulación en metales pesados en abedul, aunque aún son necesarios estudios complementarios.

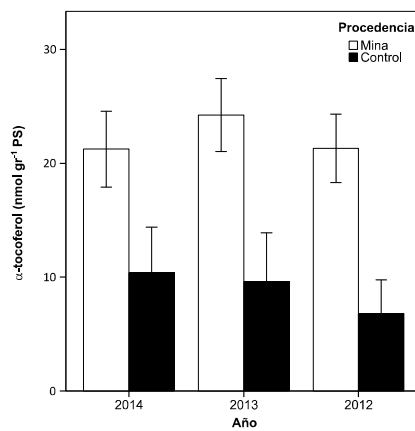


Figura 5. Contenido de α -tocoferol (nmol gr⁻¹ PS) en ramas de diferente edad (1, 2 o 3 años) de abedules crecidos en suelo minero o en suelo control.



5.- CONCLUSIONES

- El abedul es capaz de almacenar altos niveles de elementos tóxicos en sus tejidos, siendo las hojas el sitio de acumulación para el Zn y el Cd, mientras que el Pb se almacena en la madera.
- La acumulación de elementos en el tronco depende de la edad, acumulándose mayor contenido de metales en las partes con mayor edad y metabólicamente menos activas.
- El α -tocoferol acumulado en las ramas de los abedules puede ser utilizado para monitorizar los efectos fitotóxicos de los metales.
- El abedul es una especie tolerante y capaz de crecer en suelos con altas concentraciones de Zn, Cd y Pb en el suelo, es capaz además de almacenarlos en sus tejidos, no tiene unos requerimientos especiales de nutrientes y puede ser utilizado para reforestación de suelos mineros.



6.- BIBLIOGRAFÍA

1. Ali, HH; Khan, E; Sajad, M.A. (2013). Phytoremediation of heavy metals concepts and applications. *Chemosphere* 91:869-881.
2. Artetxe, U.; García-Plazaola, J.I.; Hernández, A.; Becerril, J.M.; (2002). Low light grown duckweed plants are more protected against the toxicity induced by Zn and Cd. *Plant Physiol. Biochem.* 40: 859-863.
3. Bagci, E.; Bruehl, L.; Aizetmuller, K.; Altan, Y. (2004). Fatty acid and tocochromanol patterns of some Turkish Boraginaceae—a chemotaxonomic approach. *Nord J Bot* 22:719-726.
4. Bagci, E.; Bruehl, L.; Özçelik, H.; Aizetmuller, K.; Vural, M.; Sahim, A. (2004). A study of the fatty acid and tocochromanol patterns of some Fabaceae (Leguminosae) plants from Turkey. *Grasas Aceites* 55:378-384.
5. Baker, AJM.; McGrath, SP.; Sidoli, CDM.; Reeves, RD.; (1994) The possibility of in situ heavy metal decontamination of polluted soils using crops of metal- accumulating plants. *Resour Conserv Recycl*; 11:41-9.
6. Baker, AJM.; Reeves, RD.; McGrath, SP; (1991). In situ decontamination of heavy metal polluted soils using crops of metal-accumulating plants-a feasibility study. In: Hinchey RE, Olfenbuttel RF, editors. *In situ bioreclamation*. Boston: Butterworth-Heinemann; pp. 600-5.
7. Barrutia, O.; Artetxe, U.; Hernández, A.; Olanob, J. M.; García-Plazaola, J. I.; Garbisu C., Becerril, J.M. (2011). Native Plant Communities in an Abandoned Pb-Zn Mining Area of Northern Spain: Implications for Phytoremediation and Germplasm Preservation *International Journal of Phytoremediation*, 13: 3, 256 — 270.
8. Bernard, F.; Brulle, F.; Dumez, S.; Lemiere, S.; Platel, A.; Nesslany, F.; Cuny, D.; Deram, A.; Vandenbulcke, F.; (2015). Antioxidant responses of Annelids, Brassicaceae and Fabaceae to pollutants: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 114: 273–303.
9. Brooks, R.R.; (1998). Plants that hyperaccumulate heavy metals. Brooks, R.R. (Eds.), CAB International, Oxon, pp. 356.
10. Chaudry, T.M.; Hayes, W.J.; Khan, A.G.; Khoo, C.S.; (1998). Phytoremediation-Focusing on accumulator plants that remediate metal-contaminated soils. *Australasian J. Ecotoxicol.* 4:37-51.
11. Di Lonardo, S.; Capuana, M.; Arnetoli, M.; Gabbrielli, R.; Gonnelli, C.; (2010). Exploring the metal phytoremediation potential of three *Populus alba* L. clones using an in vitro screening. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 18:82–90.
12. Dmuchowski, W.; Gozdowski, D.; Bragoszewska, P.; Baczewska, A. H.; Suwara, I. (2014). Phytoremediation of zinc contaminated soils using silver birch (*Betula pendula* Roth). *Ecological Engineering* 71: 32–35.
13. Ebbs, S.; Kochian, L. V.; (1997). Toxicity of zinc and copper to *Brassica* species: implications for phytoremediation. *J. Environ. Qual.* 26: 776-781.
14. Epelde, L.; Becerril, J. M.; Barrutia, O.; González-Oreja, J.A.; Garbisu, C.; (2010). Interactions between plant and rhizosphere microbial communities in a metalliferous soil. *Environ Pollut* 158: 1576-1583
15. Fleta-Soriano, E.; Fernández-Marín, B.; Olano, J.M.; Míguez, F.; Molinero, J.; Camarero, J.J.; García-Plazaola J.I.; (2014). Tocochromanols in Wood: a potential new tool for dendrometabolomics. *Tree Physiology* 00, 1-8.



16. García Plazaola, J.I., Artetxe, U., Duñabeitia, M. K., Becerril, J. M. (1999).
17. González-Oreja, J.A.; Rozas, M.A.; Alkorta, I.; Garbisu, C.; (2008) Dendroremediation of Heavy Metal Polluted Soils. Vol 23, n. 3.
18. Govindasamy, C.; Arulpriya, M.; Ruban, P.; Francisca, L.J.; Ilayaraja, A.; (2011). Concentration of heavy metals in seagrasses tissue of the Palk Strait, Bay of Bengal. Int. J. Environ. Sci. 2: 145-153.
19. Han, S.-H.; Lee J.C.; Oh C.-Y.; Kim P.-G.; (2006). Alleviation of Cd toxicity by composted sewage sludge in Cd-treated Schmidt birch (*Betula schmidtii*) seedlings. Chemosphere 65: 541–546.
20. Komives, T.; Gullner, G.; (2006) Dendroremediation: the use of trees in cleaning up polluted soils. Phytoremediat Rhizoremediat pp 23–31.
21. Kovalevsky, A.L.; (1987) Biogeochemical Exploration for Mineral Deposits, second ed. VNU Science Press, Utrecht, The Netherlands.
22. Lamb, D.T.; Ming, H.; Megharaj, M.; Naidu, R.; (2010). Phytotoxicity and accumulation of lead in Australian native vegetation. 58:613-621.
23. Mani, D.; Kumar, C.; (2014). Biotechnological advances in bioremediation of heavy metals contaminated ecosystems: an overview with special reference to phytoremediation Int. J. Environ. Sci. Technol 11:843–872.
24. Marmioli, M.; Pietrini, F.; Maestri, E.; Zacchini, M.; Marmioli, N.; Massacci, A.; (2011). Growth, physiological and molecular traits in Salicaceae trees investigated for phytoremediation of heavy metals and organics. Tree Physiology 00, 1–16.
25. Martin, I.; Bardos, P.; (1996). A review of full scale treatment Technologies for the remediation of contaminated land. Richmond, Surrey: EPP Publications. Vol 29: cap 4, pp 529–540.
26. Memon, A.R.; Schröder, P.; (2009). Implications of metal accumulation mechanisms to phytoremediation. Environ Sci Pollut Res 16:162-175.
27. Pilon-Smits, E.; (2005). Phytoremediation. Annu. Rev. Plant Biol. 56: 15-39.
28. Reimann, C.; Arnoldussen, A.; Finne, T.E.; Koller, F.; Nordgulen, Ø.; Englmaier, P.; (2007). Element contents in mountain birch leaves, bark and wood under different anthropogenic and geogenic conditions. Applied Geochemistry 22 1549-1566.
- Role of Photoprotective Systems of Holm-Oak (*Quercus ilex*) in the Adaptation to Winter Conditions. J. Plant. Physiol. Vol 155 pp. 625-630.
29. Ross, S.M.; (1994). Toxic Metal in Soil-Plant Systems. John Wiley and Son Ltd, New York. Ltd 1-484.
30. Salt, D.E.; Smith, R.D.; Raskin, J.; (1998). Phytoremediation. Annu Ver Plant Physiol 1998; 49: 643-68.
31. Seoáñez Calvo, M.; (1999). El Suelo como recurso para el desarrollo. En: Contaminación del suelo: Estudios, tratamiento y gestión. Ediciones Mundi-Prensa (Eds.), pp 352.
32. Singh, S.; Sinha, S.; Saxena, R.; Pandey, K.; Bhatt, K.; (2004). Translocation of metals and its effects in the tomato plants grown on various amendments of tannery waste: evidence from involvement of antioxidants. Chemosphere 57, 91-99.
33. Unterbrunner, R.; Puschenreiter, M.; Sommer, P.; Wieshammer, G.; Tlustos, P.; Zupan, M.; Wenzel, W.W.; (2007). Heavy metal accumulation in trees growing on contaminated sites in Central Europe. Environmental Pollution, 148, 107–114.



34. Vangronsveld, J.; Herzig, R.; Weyens, N.; Boulet, J.; Adriaensen, K.; Ruttens, A.; Thewys, T.; Vassilev, A.; Meers, E.; Nehnevajova, E.; (2009). Phytoremediation of contaminated soils and groundwater: lessons from the field. *Environ Sci Pollut Res Int.* 16:765–794.
35. Zhao, F.; McGrath, S.P.; Crosland, A.R.; (1994). Comparison of three wet digestion methods for the determination of plant sulphur by inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-AES). *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 25, 407-418.



7. AGRADECIMIENTOS.

Quisiera agradecer a varias personas y entidades por la ayuda que me han prestado en la realización de mi Trabajo Fin de Grado.

Al Prof. José Maria Becerril por haberme dado la posibilidad de trabajar bajo su dirección, y por sus valiosas enseñanzas. Gracias sinceramente.

Al Prof. Alberto Muñoz Rueda, que me ha abierto las puertas del Laboratorio y me ha ofrecido continuamente su disponibilidad.

A los chicos del Laboratorio de Fisiología Vegetal del Departamento de Biología Vegetal y Ecología, qué han hecho que todos los momentos de mi trabajo fuesen mucho más amenos. En particular quiero agradecer a Ander para sus palabras buenas y sus sonrisas en mis momentos más sufridos, a Fátima, Maite y Andrea por acogerme cada mañana con una sonrisa y por haberme ayudado en todo momento. Gracias también a Fernando y Asier, cuyos chistes y risas alegraban todo el Laboratorio en los interminables días de lluvia.

A la Universidad del País Vasco, por haberme dado la oportunidad de crecer, enriquecerme y ponerme a prueba cada día de mi estancia.

A María Botta, por haber demostrado que es una verdadera amiga, ayudándome con todo su cariño y su disponibilidad desde el día que nos conocimos.

A Leire, Marina, Adrián, Andrés, Lucía, Jara y Guillermo muchísimas gracias por ser unos compañeros de clase tan amables y por haberme ayudado en los momentos de dificultades y a integrarme en la Universidad.

A mi Familia que, desde la distancia, me ha apoyado cada día en mi estancia aquí en Bilbao, nunca me ha dejado sola y ha creído siempre en mis capacidades. Gracias Ama, Aita eta nire hizpa maitea.

Por último, no por importancia, un agradecimiento particular va a Unai Artetxe, por haber confiado en mí en todo momento para la realización de este proyecto y, además, por su inestimable ayuda, paciencia y enseñanzas, sin las cuales hubiera sido muy difícil la realización de este trabajo. Ante todas las dificultades que se han presentado, siempre ha estado dispuesto a dedicarme su tiempo y su conocimiento, dándome explicaciones y consejos. Se lo agradezco de corazón. ¡Eskerrik asko Unai!