

Tolerancia y acumulación de metales pesados y As en diferentes especies de *Cistus* L.

Lorena Almagro¹, Ana María Segura-Reinaldos¹, María Angeles Pedreño¹ & María Pilar Bernal²

¹ Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad de Murcia, Campus Universitario de Espinardo, 30100 Murcia, España.

² Departamento de Conservación de Suelos y Agua y Manejo de Residuos Orgánicos, Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura, CSIC, Apartado 164, 30100 Murcia, España.

Resumen

Correspondencia

L. Almagro

Tlf:+34868884904

E-mail: lorena.almagro@um.es

Recibido: 25 febrero 2014

Aceptado: 12 noviembre 2015

Publicado on-line: 16 diciembre 2015

En este estudio se analizó la tolerancia de cinco especies de *Cistus* al contenido de metales pesados de dos suelos contaminados de la Sierra Minera de La Unión. Los resultados mostraron que el suelo 1 presentó una elevada toxicidad para las especies de *Cistus*, debido al alto contenido de metales pesados y a su alta salinidad. El suelo 2 presentó niveles menores de metales pesados totales pero un pH más ácido y por tanto los elementos minerales estaban en formas más solubles y disponibles en el suelo. Los resultados indican que algunas plantas de *Cistus* podrían ser utilizadas para la recuperación de suelos mineros ya que acumularon altos niveles de metales. Sin embargo, su escaso crecimiento hacen necesario diseñar estrategias que permitan su utilización en procesos de fitoestabilización.

Palabras clave: Cistaceae, Fitoestabilización, Suelos mineros.

Tolerance and accumulation of heavy metals and As in different species of Cistus L.

Abstract

In this study the tolerance of five species of *Cistus* on the presence of heavy metals in two polluted soils of the Sierra Minera de La Union were analysed. The results indicated that the soil 1 provoked a high toxicity in *Cistus* species due to its high content of heavy metals and salinity. The soil 2 contained lower concentrations of total metal that soil 1 and an acidic pH and therefore, the mineral elements were more soluble and available in the soil. The results indicated that *Cistus* plants could be used for the recovery of contaminated soils since these plants accumulated high concentrations of metals. However, due to their slow growth, it is necessary to design new strategies which allow their use in phytostabilization processes.

Key words: Cistaceae, Phytostabilization, Mining soils.

Introducción

La contaminación de suelos por elementos metálicos en terrenos con actividad minera generalmente conlleva la degradación y modificación de su capacidad para desarrollar plenamente y de manera sostenible sus funciones ecológicas potenciales, pudiendo además afectar a los ecosistemas adyacentes. Ante este problema surge la necesidad de encontrar nuevas técnicas que reduzcan la toxicidad de los elementos traza tratándolos y estabilizándolos *in situ*, y que a su vez fomenten los procesos naturales que tienen lugar en el suelo con objeto de recuperar su funcionalidad (Pardo 2013). En este sentido una de las técnicas medioambientales más respetuosas con el medio ambiente y económicamente viable para la recuperación de zonas mineras es la fitoestabilización. Esta tecnología está basada en el uso de plantas tolerantes y la realización de prácticas agronómicas que disminuyen la disponibilidad de los contaminantes mediante la mejora de las condiciones fisicoquímicas y biológicas del suelo así como su protección física frente a la erosión y a la lixiviación (Wenzel *et al.*, 1999).

La zona minera objeto de estudio en este trabajo de investigación es la Sierra Minera La Unión- Cartagena. Esta zona fue uno de los distritos mineros más importantes de España y el más representativo de la Región de Murcia por sus yacimientos de Zn-Fe-Pb (Faz-Cano *et al.* 2003). La actividad minera de esta zona que ha tenido una duración de 250 años aproximadamente, ha provocado una grave alteración del entorno natural, tanto en las zonas de explotación agraria como en las adyacentes a éstas. Los materiales acumulados en esta zona poseen una naturaleza muy variada y granulometría heterogénea debido a una antigua mezcla y posterior sedimentación de los estériles de las minas. Además, estos suelos suelen tener un pH bajo, una escasa capacidad de retención hídrica y un nivel deficiente de nutrientes y por tanto, son una fuente potencial de contaminación de las aguas y de los suelos adyacentes lo que supone un alto riesgo para el medio ambiente y la salud humana. Todas estas características han dado lugar a una gran extensión de suelo contaminado por acumulación de elevadas concentraciones de metales pesados y elementos tóxicos como Cd, Cu, Pb, Zn, As (Bernal *et al.*, 2009), por lo que es necesario encontrar nuevas

técnicas que permitan la recuperación de estas zonas mineras.

El género *Cistus* L. pertenece al Reino Plantae, División Magnoliophyta, Clase Magnoliopsida, Orden Violales y familia Cistaceae. Comprende más de 16 especies, 12 de ellas se encuentran en la Península Ibérica formando parte del sotobosque mediterráneo (Cabezudo *et al.*, 1992). Estas plantas crecen preferentemente en suelos ácidos y raras veces suelen encontrarse en suelos calizos. De las 12 especies presentes en la Península Ibérica se han utilizado en este trabajo de investigación *C. monspeliensis* L., *C. laurifolius* L., *C. ladanifer* L., *C. psilosepalus* Sweet y *C. salvifolius* L. Además, *Cistus* ha sido utilizado anteriormente para estudios de fitorremediación en áreas mineras (Abreu *et al.*, 2009; Jiménez *et al.*, 2011).

Todas las especies de *Cistus* utilizadas en este trabajo crecen de forma natural en suelos ácidos (silíceos) de ambientes mediterráneos y no son sensibles a la aridez y sequía. Por lo tanto el objetivo general que se plantea es determinar la tolerancia de estas cinco especies de *Cistus* al contenido de metales pesados de dos suelos contaminados de la Sierra Minera de La Unión y su posible uso para fitoestabilización.

Material y métodos

Descripción de los suelos

En este estudio se han utilizado dos suelos procedentes de las cercanías de la localidad de El Llano del Beal, distrito minero de La Unión. Concretamente de las proximidades a unas escombreras de residuos mineros y a una rambla, por lo que los suelos tienen un elevado contenido en metales pesados derivados de la intensa minería de la zona. Las coordenadas geográficas donde se encuentra ubicado el suelo 1 son longitud 37° 37'12" N y latitud -0° 51' 13" O mientras que el suelo 2 son longitud 37° 36'44" N y latitud -0° 49' 56" O.

Preparación de los suelos para el cultivo de las especies de *Cistus*

Las muestras de suelo se obtuvieron de la parte superficial de los puntos de muestreo, a una profundidad de 0-25 cm y se secaron al aire. Una vez secas, se rompieron los agregados y se tamizaron con un tamiz de 4 mm (Coupe *et al.*, 2013; Wei *et al.*, 2011).

Germinación y crecimiento de las plántulas

Como material de partida se usaron semillas de las cinco especies de *Cistus* procedentes de la empresa "Zulueta Corporation" (*C. monspeliensis*, *C. laurifolius*, *C. ladanifer*, *C. psilosepalus* y *C. salviifolius*). En primer lugar, las semillas se sumergieron en hipoclorito sódico al 10% durante 5 min y se lavaron 3 veces con agua destilada. Una vez desinfectadas, se sometieron a un choque térmico introduciéndolas 1 min en agua hirviendo y se mantuvieron posteriormente durante 24 h en agua destilada (Pérez-García 1996). Tras el proceso de imbibición, las semillas se transfirieron a placas Petri que contenían papel de filtro humedecido con cloruro cálcico (Escribá-Baeza *et al.*, 2007). Cuando las semillas germinaron, las plántulas se transfirieron a bandejas de plástico rellenas con sustrato de perlita humedecido con una disolución nutritiva basada en la descrita por Hoagland (1950). Las especies de *Cistus* se mantuvieron en las bandejas dentro de una cámara de cultivo con un fotoperiodo de 14/10 h (luz/oscuridad), intensidad lumínica de $120 \mu\text{mol fotones cm}^{-2}\text{s}^{-1}$, termoperiodo 24/17 °C (día/noche) y una humedad del 70%. Cuando las plántulas contenían dos pares de hojas, se trasplantaron a las macetas con los suelos contaminados manteniendo las mismas condiciones de cultivo descritas para la perlita. Las plántulas se mantuvieron en los suelos descritos durante 5 meses en macetas de 200 g de capacidad. Se utilizaron 5 macetas por cada especie y suelo en las que se plantaron un mínimo de 3 plantas por maceta en todas las especies excepto en *C. salviifolius* que se pusieron 6 plantas por maceta.

Técnicas analíticas para los suelos

Análisis granulométrico y determinación de la textura

Para realizar estas técnicas analíticas, en primer lugar se tamizó el suelo con un tamiz de 2 mm. El análisis granulométrico y la determinación de la textura fue realizado usando el método hidrométrico que sirve para estimar la concentración total de los materiales en suspensión (Gee and Bauder, 1986).

Análisis de parámetros físico-químicos del suelo

El pH se midió sobre la pasta saturada del suelo utilizando un pH-metro (Crison pH meter Basic 20) mientras que la conductividad eléctrica (CE)

que contenía una proporción de 1:10 sólido/líquido obtenido por agitación mecánica durante 2 h se midió utilizando un conductímetro (Crison microCM 2100).

La capacidad de intercambio catiónico (CCC) se determinó usando el método de acetato de amonio (pH: 7) (Pardo *et al.*, 2011). Para ello, se añadieron 30 mL de acetato de sodio 1N a 4 g de suelo, se agitó, se centrifugó y se eliminó el sobrenadante. El exceso de Na se eliminó con etanol al 96% y se desplazó el Na adsorbido añadiendo 30 mL de acetato amónico. Finalmente, se midió el contenido de Na utilizando un espectrómetro de absorción atómica.

Por otro lado, para medir el carbono orgánico total (COT), se eliminaron los carbonatos de 10 mg de muestra mediante adiciones sucesivas de HCl (1:20, v/v ó 1:10, v/v). Posteriormente, las muestras se secaron en una estufa a 40 °C y se midió el contenido de COT utilizando un microanalizador automático (Euro EA; EuroVector, Milan, Italy) con un patrón de suelo de concentración de COT conocida. El porcentaje de materia orgánica (MO) se obtuvo multiplicando el porcentaje de COT por el factor 1,724 (Nelson y Sommers, 1982). El nitrógeno total (NT) del suelo se determinó utilizando un analizador elemental después de quemar las muestras a 1.020 °C.

Los metales pesados se determinaron utilizando un extracto de suelo obtenido después de la digestión ácida con HNO₃ y HCl. Para ello, se añadieron 3 mL de HNO₃, 9 mL de HCl a 200 mg de muestra de suelo y se dejó macerar durante 12 h. A continuación, los tubos de digestión se procesaron en un bloque digestor siguiendo el siguiente programa: 80 °C durante 1 h, 105 °C durante 2 h y 125 °C durante 2 h. Una vez enfriada la muestra, se lavó el contenido de los tubos con 10 mL de HCl al 20%, se filtró y se vertió el fluido en matraces aforados de 100 mL, enrasándose con agua destilada. Finalmente, las muestras se diluyeron con agua destilada en proporción 1/100 y se analizaron por plasma de acoplamiento inductivo / espectroscopia de emisión óptica (ICP-OES). En el caso de los metales pesados solubles se extrajeron con una disolución de CaCl₂ 0,1M (McGrath and Cegarra, 1992). Para ello, se añadieron 30 mL de CaCl₂ 0,1 M (relación 1:10 p/v) a 3 g de suelo, se agitó la disolución mecánicamente durante 16 h, se centrifugó y se filtró el sobrenadante con papel. Finalmente los metales pesados se determi-

naron por ICP-OES (McGrath and Cegarra, 1992).

Técnicas analíticas para determinar la efectividad de las especies vegetales

Rendimiento de las plantas cultivadas

La medida de peso fresco se realizó en una balanza de precisión mientras que para la medida de peso seco, las muestras se mantuvieron en una estufa a 60 °C durante 62 h, antes de pesarlas.

Determinación del NT en las plantas cultivadas

El nitrógeno total (NT) de las plantas se determinó mediante el análisis de la muestra seca en un analizador elemental CNSHO EuroVector, Milan, Italy. Para ello, las muestras se pesaron en unas cápsulas de estaño, se cerraron y se introdujeron en el analizador previamente calibrado con atropina.

Determinación de macro, micronutrientes y metales pesados totales en las plantas cultivadas

Para la determinación de la concentración de macro, micronutrientes y metales pesados se realizó un tratamiento de digestión ácida y posteriormente las muestras obtenidas se analizaron por ICP-OES. Para realizar la digestión ácida, 100 mg de peso seco de la parte aérea de la planta se introdujeron en vasos de teflón con 2 mL de H₂O₂ al 30% y 8 mL de HNO₃ al 65% y fueron digeridas en un digestor tipo microondas con un programa de temperatura de 0 a 170 °C durante 10 min, permaneciendo esta temperatura constante durante 15 min. A continuación, se procedió a la determinación de los elementos mediante ICP-OES.

Métodos estadísticos

Para obtener una identificación apropiada de los niveles de significación para los distintos tratamientos se realizó una comparación de medidas de los resultados mediante el análisis de la varianza (ANOVA) de una vía y la significación entre medias se determinó mediante el test de Tukey a $P < 0,05$.

Resultados

Resultados del análisis de los suelos

Descripción de las características físico-químicas y contenido de macronutrientes en los suelos

Los dos suelos utilizados en el estudio se caracterizaron según los métodos descritos anteriormente, para determinar las principales propieda-

des físico-químicas y el contenido de macronutrientes según se indica en la tabla 1. Así, el suelo 1 presentó un reducido contenido en MO (0,2%) y NT (0,4 g kg⁻¹) mientras que la concentración de MO y NT fue mayor en el suelo 2 (2,1% y 10,0 g kg⁻¹, respectivamente). Además, tras analizar las propiedades físico-químicas de los suelos se observó que el suelo 1 presentaba una textura areno-franca, según el diagrama triangular de texturas, de acuerdo con sus porcentajes de arena, limo y arcilla (Tabla 1). El bajo contenido en arcilla que presentaba el suelo 1 le proporcionó menor capacidad de retención hídrica que el suelo 2, que presentaba una textura franco-arenosa y por tanto, una mayor capacidad de retención hídrica. Los resultados también mostraron que la CCC del suelo 1 (6,9 cmolc kg⁻¹) fue más baja que la del suelo 2 (7,3 cmolc kg⁻¹) mientras que la CE fue mayor en el suelo 1 (2,77 dS m⁻¹) que en el suelo 2 (0,18 dS m⁻¹) (Tabla 1). En este estudio también se determinó que el suelo 1 es neutro mientras que el suelo 2 es ligeramente ácido.

PARÁMETROS	SUELO 1	SUELO 2
Capacidad de retención hídrica (%)	24,5	30,9
pH	7,5	5,1
CE (dS m ⁻¹)	2,77	0,18
CCC (cmolc kg ⁻¹)	6,9	7,3
CaCO ₃ (%)	2,0	< 1
Arena (%)	79,5	59,0
Limo (%)	15,3	27,0
Arcilla (%)	5,2	14,0
Textura	Areno-franca	Franco-arenosa
MO (%)	0,2	2,1
NT (g kg ⁻¹)	0,4	10,0
Ca (g kg ⁻¹)	41,0	1,5
K (g kg ⁻¹)	5,3	5,4
Mg (g kg ⁻¹)	10,0	8,3
Na (g kg ⁻¹)	2,7	1,9
P (g kg ⁻¹)	0,15	0,30
S (g kg ⁻¹)	41,0	9,7

Tabla 1. Características físico-químicas y concentración de macronutrientes de los suelos utilizados.

Table 1. Physico-chemical characteristics and concentration of macronutrients in the soils used.

Contenido de micronutrientes y metales pesados en los suelos

Los valores de los micronutrientes correspondientes a Fe, Mn y Zn fueron extremadamente altos en ambos suelos (Tabla 2). De hecho, la concentra-

ción total de Fe fue de 172.107 y 130.614 mg kg⁻¹, la de Mn 5.033 y 2.097 mg kg⁻¹ y la de Zn 17.936 y 8.617 mg kg⁻¹ para el suelo 1 y el suelo 2, respectivamente. En el suelo 2 también se detectaron elevadas cantidades de Zn (25,12 mg kg⁻¹), Mn (16,60 mg kg⁻¹) y Pb (10,08 mg kg⁻¹) en sus formas solubles. Además, los niveles de Pb total también fueron altos en ambos suelos alcanzando valores de 18.158 mg kg⁻¹ (suelo 1) y 7.703 mg kg⁻¹ (suelo 2).

Elemento (mg kg ⁻¹)	MUESTRA			
	SUELO 1		SUELO 2	
	Total	Extraíble	Total	Extraíble
As	673	1,76	976	0,94
Cd	45	1,39	5	2,20
Cr	76	n.d.	71	n.d.
Cu	381	0,92	337	1,19
Fe	172.107	0,16	130.614	0,41
Mn	5.033	0,71	2.097	16,60
Ni	15	n.d.	17	n.d.
Pb	18.158	3,34	7.703	10,08
Zn	17.936	10,64	8.617	25,12

Tabla 2. Contenido en micronutrientes, metales pesados, As y extraíbles en CaCl₂, de los suelos 1 y 2 (expresado en mg kg⁻¹). n.d.: no determinado.

Table 2. Content of micronutrients, heavy metals, As and CaCl₂-extractable fraction present in soils 1 and 2 (expressed as mgkg⁻¹). n.d.: no detected.

Especie \ Suelo	SUELO 1	SUELO 2
<i>C. monspeliensis</i>	0%	66,6%
<i>C. psilosepalus</i>	5%	91,0%
<i>C. laurifolius</i>	0%	75,0%
<i>C. ladanifer</i>	0%	0%
<i>C. salviifolius</i>	0%	70,0%

Tabla 3. Porcentaje de supervivencia de las especies de *Cistus* en cada suelo.

Table 3. Survival of *Cistus* species in each soil expressed in percentage.

Efectos de los metales pesados del suelo sobre el desarrollo de las plantas cultivadas

Los resultados indicaron que la supervivencia de las plantas en el suelo 1 fue de un 5% en la especie *C. psilosepalus* mientras que la supervivencia de las plantas en el suelo 2 fue más elevada (Tabla 3). En general, el crecimiento de *C. monspeliensis*, *C. psilosepalus*, *C. ladanifer* y *C. salviifolius* en suelo 2 fue lento y con la presencia de evidentes signos de toxicidad como el pardeamiento y marchitamiento de las hojas (resultados no mos-

trados).

Por otro lado, en la tabla 4 se muestra la cantidad de biomasa aérea que se produce por planta en las diferentes especies de *Cistus* tras su cultivo en suelo 2. Los resultados indicaron que *C. psilosepalus* es la especie que más biomasa por planta ha desarrollado tanto para los datos de peso fresco como de peso seco. Las otras tres especies guardan una relación en cuanto a la cantidad de biomasa generada con una media de 0,067±0,003 g de peso fresco por planta y 0,026±0,003 g de peso seco por planta. Además, del cultivo de *C. psilosepalus* en el suelo 1 sobrevivió solamente una planta y sus datos fueron de 0,292 g de peso fresco por planta y 0,141 g de peso seco por planta.

Especie	Inicio	Final	Peso fresco (g/planta)	Peso seco (g/planta)
<i>C. monspeliensis</i>	15	10	0,064±0,013	0,023±0,006
<i>C. psilosepalus</i>	11	10	0,103±0,035	0,046±0,021
<i>C. laurifolius</i>	11	9	0,068±0,007	0,023±0,002
<i>C. salviifolius</i>	30	21	0,068±0,009	0,031±0,007

Tabla 4. Efecto de los metales pesados sobre la biomasa aérea de las especies de *Cistus* en el suelo 2. Número de plantas al inicio y número de plantas vivas al final del experimento. Los pesos se expresan como $\bar{x} \pm SE$.

Table 4. Effect of heavy metals on the aerial biomass of *Cistus* species in the soil 2. Number of plants at the beginning and number of plants alive at the end of the experiment. Weights are expressed as $\bar{x} \pm SE$.

Análisis de las plantas

Macronutrientes

Los patrones de acumulación y distribución de metales en las plantas variaron significativamente en función del tipo de metal y la especie vegetal. *C. laurifolius* es la especie que presentó las mayores concentraciones de macronutrientes en la parte aérea de la planta, con excepción de N (Tabla 5). Los análisis derivados de la planta de *C. psilosepalus* crecida en el suelo 1 indicaron que la concentración de macronutrientes fue de: 7,5 g kg⁻¹ de N; 0,09 g kg⁻¹ de P; 0,61 g kg⁻¹ de Ca; 6,3 g kg⁻¹ de K; 3,62 g kg⁻¹ de Mg y de Na, 4,0 g kg⁻¹. Como puede observarse en la tabla 5, *C. laurifolius* fue la especie que presentó las mayores concentraciones de macronutrientes en la parte aérea de las plantas crecidas en el suelo 2 (9,2 g kg⁻¹ de N; 0,4 g kg⁻¹ de P; 6,3 g kg⁻¹ de K; 30,1 g kg⁻¹ de Ca y 9,8 g kg⁻¹ de Mg), con excepción de N, que fue superior en *C. monspeliensis* (9,7 g kg⁻¹).

Especies	MACRONUTRIENTES					
	N	P	K	Ca	Mg	Na
<i>C. monspeliensis</i>	9,7±1,6	0,34±0,07	3,3±0,1	20,2±0,7	9,3±2,9	4,8±2,4
<i>C. psilosepalus</i>	8,5±0,24	0,29±0,09	6,1±2,3	23,6±5,7	9,2±1,8	3,2±0,5
<i>C. laurifolius</i>	9,2±0,16	0,44±0,14	6,3±2,2	30,1±2,4	9,8±2,8	1,2±0,4
<i>C. salviifolius</i>	8,0±0,94	0,25±0,17	4,3±2,7	15,6±1,1	7,9±1,8	2,9±0,2
ANOVA (P)	0,190	0,452	0,498	0,575	0,944	0,277

Tabla 5. Contenido en macronutrientes y de Na en las plantas de *Cistus* crecidas en el suelo 2 (expresado en g kg⁻¹).

Table 5. Content of both macronutrient and Na in *Cistus* plants grown in the soil 2 (expressed as g kg⁻¹).

Especies	MICRONUTRIENTES Y METALES							
	Fe	Cu	Mn	Zn	Cd	Ni	Pb	As
<i>C. monspeliensis</i>	5.457 ±1.518	26 ±6,2	283 ±89	3.108 ± 1.153	26 ±0,1	3,3 ±2,1	525 ±143	39 ±8,9
<i>C. psilosepalus</i>	6.535 ±3.964	37 ± 20,1	312 ±117	2.508 ±763	53 ±14,8	2,7 ±1,3	767 ±617	39 ±21,4
<i>C. laurifolius</i>	4.288 ±1.200	22 ±10,2	308 ±103	2.657 ±1272	30 ±15,1	2,5 ±1,5	459 ±177	26 ±7,6
<i>C. salviifolius</i>	2.299 ±2.447	13 ±10,8	194 ±138	2.081 ±1.647	29 ±19,3	1,8 ±1,6	260 ±206	15 ±16,8
ANOVA (P)	0,302	0,240	0,706	0,836	0,253	0,777	0,458	0,276

Tabla 6. Contenido en micronutrientes, metales pesados y As (expresado en mg kg⁻¹) en las plantas de *Cistus* crecidas en el suelo 2.

Table 6. Content of micronutrient content, heavy metals and As in *Cistus* plants grown in the soil 2 (expressed as mg kg⁻¹).

Es importante destacar que la concentración de P y K encontrada en todas las especies de *Cistus* fueron muy bajas. Además, se observó que las plantas de *C. laurifolius* crecidas en el suelo 2 presentaron concentraciones más altas de K, mientras que la concentración de Na disminuyó. Los valores obtenidos de Ca (> 15,6 g kg⁻¹) y Mg (>7,9 g kg⁻¹) en las diferentes especies estudiadas son superiores a los encontrados por otros autores (Marschner 2011).

Micronutrientes y metales pesados

En la tabla 6 se muestra la concentración de micronutrientes así como de metales pesados y As en cada una de las especies vegetales supervivientes en el suelo 2. Para el caso de los micronutrientes y metales pesados, la especie *C. psilosepalus* fue la que presentó la mayor concentración de la mayoría de los micronutrientes. Además, *C. psilosepalus* crecida en el suelo 1 presentó las siguientes concentraciones de micronutrientes, metales pesados y As en su parte aérea (hojas y tallo): 0,234 g kg⁻¹ Fe; 1,2 mg kg⁻¹ Cu; 25 mg kg⁻¹ Mn; 1,2 mg kg⁻¹ Cd; 47 mg kg⁻¹ Pb; 76 mg kg⁻¹ Zn y 1 mg kg⁻¹ de As. Como puede observarse en la tabla 6, los valores de micronutrientes de esta especie crecida en el suelo 1 son inferiores a los alcanzados por la misma especie en el suelo 2. Además, las concentraciones de Fe fueron muy altas en todas las plantas aunque se detectó una gran variabilidad entre las diferentes macetas.

Por otro lado, los niveles de Mn (Tabla 6) fueron altos en las plantas crecidas en el suelo 2 y la

mayoría de las especies presentaron altas concentraciones de Cu (>20 mg kg⁻¹), con la excepción de *C. salviifolius* (13 mg kg⁻¹). Las concentraciones de Zn en la parte aérea de las plantas también fueron muy elevadas (>2.000 mg kg⁻¹ en todas las especies). En relación a las concentraciones de Cd, los resultados mostraron que las plantas acumulaban elevadas cantidades de este elemento (>26 mg kg⁻¹ en todas las especies) y la concentración de Pb estaba por encima del valor establecido como normal alcanzándose valores de 767 mg kg⁻¹ en *C. psilosepalus*. En el presente estudio se han obtenido valores de acumulación de Ni de 3,3 mg kg⁻¹ en *C. monspeliensis* y la concentración media de As más alta registrada fue para *C. psilosepalus* y *C. monspeliensis* con un valor de 39 mg kg⁻¹.

Discusión

Las formas químicas en las que se encuentran los metales en el suelo y en gran medida la movilidad y biodisponibilidad que presentan viene determinada por el conjunto de los diferentes componentes del suelo, así como los factores químicos, físicos y biológicos que influyen en la reactividad de esos componentes (Diez-Lázaro 2008). En este estudio el suelo presentó un contenido bajo de MO y NT indicando que es un suelo con escaso contenido en nutrientes y con una textura y estructura poco desarrollada debido a la ausencia de vegetación. Sin embargo, el suelo 2 es algo más evolucionado que el suelo 1 ya que la concentración de

MO y NT es mayor lo que indica una mayor fertilidad debido a la presencia de algo de vegetación en la zona.

Por otro lado, nuestros resultados muestran que la CCC del suelo 1 es más baja que la del suelo 2 debido al menor contenido de esas fracciones del suelo. Además, la CCC también está determinada por el tamaño de las partículas predominantes en cada suelo. En este sentido, en el suelo 1 destaca la fracción más gruesa (arena) sobre el resto de fracciones, por lo que el tamaño de sus partículas es mayor y por tanto la CCC es menor. Sin embargo, el suelo 2 presenta una mayor concentración de arcilla (partículas de menor tamaño) y un contenido de MO más elevado proporcionándole una CCC superior al suelo 1. Otro parámetro estudiado en los suelos es la CE que indica su grado de salinidad, es decir, la concentración de sales solubles presentes en el suelo. La CE es mayor para el suelo 1 que para el suelo 2, indicando que tiene una mayor concentración de sales solubles, lo que va a condicionar el crecimiento vegetal.

El pH es otro factor determinante en la solubilidad y biodisponibilidad de compuestos en el suelo. Comúnmente es conocido que la disponibilidad de nutrientes para las plantas es máxima y la toxicidad de los metales mínima a pH 6.5 (Wong 2005). En este estudio se observó que el suelo 1 es neutro (ligeramente alcalino) mientras que el suelo 2 es ácido aunque los valores de pH obtenidos son adecuados para el crecimiento vegetal.

En relación al contenido en micronutrientes y metales pesados de los suelos, en ambos suelos la concentración de Pb y Zn sobrepasa los niveles genéricos de referencia propuestos por Martínez-Sánchez & Pérez-Sirvent (2009) para suelos de la misma zona de la Región de Murcia (43-57 y 90-96 mg kg⁻¹ para Pb y Zn, respectivamente), por ello, según el Real Decreto 9/2005 de 14 de enero (BOE, 2005) se requieren medidas de control y/o recuperación para los suelos objeto de estudio. Los valores de los elementos totales correspondientes a los micronutrientes Fe, Zn y Mn son extremadamente altos en ambos suelos, lo que podría ser altamente tóxico para las plantas. Además el Pb, que es un metal pesado pero no un micronutriente, también se detecta en elevadas concentraciones. Según estos datos, es importante destacar que la zona minera estudiada fue importante por sus yacimientos de Zn-Fe-Pb y este

hecho dio lugar a la contaminación de una gran extensión de terreno, entre la que están los suelos objeto de estudio (Bernal *et al.*, 2009). También es importante destacar la fracción de metales extraíble en CaCl₂ que representa la concentración de metales fácilmente asimilable del suelo, ya que dicha disolución extrae la fracción soluble y retenida en el complejo de cambio. Así, el suelo 2 presenta mayor concentración de microelementos y metales pesados en formas asimilables, debido a su pH ligeramente ácido mientras que el suelo 1 presenta una mayor contaminación respecto a concentraciones de elementos totales.

La colonización vegetal de los suelos ricos en metales depende de la capacidad de las plantas para desarrollar mecanismos de tolerancia. El alto contenido en metales pesados de los suelos produce efectos tóxicos para el crecimiento y desarrollo vegetal. Además, los suelos estudiados presentan un alto contenido en sales lo que dificulta aún más la supervivencia de las plantas. Así, cuando la salinidad del suelo es alta, las raíces de las plantas encuentran dificultad para absorber el agua, debido al efecto osmótico y los extremos de las hojas se encuentran quemados. En este estudio se observó que la supervivencia de las plantas fue prácticamente nula en el suelo 1 ya que presenta una gran salinidad y sólo fueron capaces de sobrevivir un 5% de las plantas de la especie *C. psilosepalus*. También se observó que el porcentaje de supervivencia de las plantas y su crecimiento fue más elevado en el suelo 2 a pesar de que la solubilidad de los metales es superior al suelo 1 pero su salinidad es menor. Por lo tanto, es posible que la alta salinidad del suelo 1 originase un estrés osmótico demasiado elevado para todas las especies, evitando su supervivencia.

En general, el crecimiento de todas las especies de *Cistus* estudiadas fue lento y las plantas de *C. ladanifer* no sobrevivieron en ninguna de las condiciones, por lo que puede decirse que esta especie no tolera las condiciones de estrés presentes en ambos suelos. En contraste con estos resultados, varios estudios han demostrado la presencia de *C. ladanifer* en suelos mineros localizados en el Alentejo (Portugal) o en la franja pirítica Ibérica (minerales principales: pirita, calcopirita, galena y blenda), siendo suelos que presentan un carácter ácido (pH 3.9-5.5) pero con concentraciones inferiores de Zn (Alvarenga *et al.*, 2004). También se han detectado en minas abandonadas

de Castelo Branco (Portugal) con suelos ácidos (pH 3.3-5.2) y con altas concentraciones de As, Cr, Pb, Sb y W (De la Fuente *et al.*, 2010). Además, diferentes especies de *Cistus* (*C. crispus* L., *C. ladanifer*, *C. monspeliensis* y *C. salviifolius*) se han encontrado en suelos procedentes de antiguas minas de Cu, Ag y Au (Freitas *et al.*, 2005), con una gran variedad de niveles de pH y de concentraciones de metales (Cu, Pb y Zn) y metaloides (As). Sin embargo, las diferentes especies de *Cistus* de este estudio no crecieron adecuadamente en los suelos 1 y 2, por lo que es posible que la concentración de metales solubles en CaCl_2 fuera demasiado elevada para los niveles de tolerancia de estas plantas. Kidd *et al.* (2004) demostraron mediante estudios en disolución nutritiva que la tolerancia de *C. ladanifer* frente a metales pesados dependió de la línea utilizada, por lo que distintas poblaciones muestran distintos mecanismos de tolerancia para los diferentes metales. Es posible que las líneas utilizadas en este estudio no fueran de las más tolerantes para las condiciones físico-químicas de estos suelos.

Por otro lado, los resultados mostraron que *C. psilosepalus* fue la especie que más biomasa por planta desarrolló tanto en peso fresco como en peso seco indicando que esta masa no es debida al contenido en agua sino que se debe a los componentes estructurales. Es importante destacar que en el suelo 1 sobrevivió solamente una planta de *C. psilosepalus* y sus datos de biomasa fueron 0,292 g de peso fresco por planta y 0,141 g de peso seco por planta, superando enormemente los valores detectados en las otras especies de *Cistus*. Este hecho puede deberse a que esta especie vegetal presenta mejores mecanismos de supervivencia o bien que al ser la única planta que sobrevivió desarrollo más biomasa ya que no tenía que competir con otras plantas por los escasos nutrientes presentes en el suelo.

También es importante destacar que las plantas no mostraron síntomas de deficiencia en N, como clorosis (Mengel y Kirkby, 2001), pero los valores de este elemento fueron inferiores al 1 %, valor que se considera necesario para el crecimiento vegetal (Marschner 2011). Cuando analizamos los datos del P observamos que su concentración fue muy baja en todas las especies estudiadas ya que según Marschner (2011), la concentración de P debe oscilar entre 3-5 g kg^{-1} . Las concentraciones de K también fueron muy inferiores (menores de

10 g kg^{-1}) a las consideradas adecuadas para el crecimiento vegetal (20-50 g kg^{-1} ; Marschner 2011). Nuestros resultados están de acuerdo con los encontrados por Alvarenga *et al.* (2004) quienes determinaron que la concentración de K en hojas de *C. laurifolius* procedentes de suelos mineros osciló entre 4,4-8,1 g kg^{-1} . También es importante resaltar que los valores más bajos de K se encontraron en *C. monspeliensis* crecidas en el suelo 2 y paralelamente tuvo las mayores concentraciones de Na. Además, se observó que las plantas de *C. psilosepalus* presentaron concentraciones más altas de K, mientras que la concentración de Na disminuyó, indicando que el Na puede sustituir a K cuando este compuesto se encuentra a concentraciones bajas. De hecho, se ha detectado un efecto positivo en el crecimiento de algunas especies por aporte de Na bajo deficiencia de K (Mengel & Kirkby, 2001).

Las concentraciones de Ca y Mg dependen en gran medida de la especie vegetal; así para el Ca, los valores oscilan entre 1-50 g kg^{-1} y para el Mg entre 1.5-3.5 g kg^{-1} (Marschner 2011). Los valores obtenidos de Ca (> 15,6 g kg^{-1}) y Mg (>7.9 g kg^{-1}) en las diferentes especies estudiadas son superiores a los encontrados por Alvarenga *et al.* (2004) para *C. ladanifer* en suelos mineros de Portugal (Ca: 5,0-9,8 g kg^{-1} ; Mg: 0,8-1,3 g kg^{-1}), quizás debido al carácter eminentemente ácido de dichos suelos, con concentraciones inferiores de Ca y Mg que los suelos estudiados en el presente trabajo.

En relación a los micronutrientes y metales pesados, la especie *C. psilosepalus* fue la que presentó la mayor concentración de la mayoría de los micronutrientes. Las concentraciones de Fe fueron muy altas en todas las plantas aunque se detectó una gran variabilidad entre las diferentes macetas. De hecho, los valores fueron muy superiores a los considerados normales en las plantas (50-100 mg kg^{-1} ; Mengel & Kirky, 2001) y a los encontrados por otros autores en plantas de *Cistus* (Kidd *et al.*, 2004), llegando a superar los 3.800 mg kg^{-1} encontrados en las plantas de *C. ladanifer* crecidas en suelos mineros de Portugal (Alvarenga *et al.*, 2004). Los niveles de Mn fueron inferiores a los encontrados por Alvarenga *et al.* (2004) en las plantas de *C. ladanifer*, que observaron una bioacumulación selectiva de Mn y por tanto definieron a dicha especie como acumuladora de Mn. En este experimento, la mayoría de las especies presentaron altas concentraciones de Cu (>20 mg kg^{-1}),

con la excepción de *C. salviifolius* (13 mg kg⁻¹), y por tanto este elemento puede considerarse tóxico para las plantas. Además, la mayoría de las plantas de este estudio acumulan concentraciones superiores al intervalo encontrado por Alvarenga *et al.* (2004) en hoja (5,2-15,7 mg kg⁻¹).

Las concentraciones de Zn en la parte aérea de las plantas también fueron muy elevadas (>2.000 mg kg⁻¹ en todas las especies), superando los valores considerado críticos en plantas (150-200 mg kg⁻¹; Kabata-Pendias 2001). De hecho, el valor de concentración medio de Zn más alto se detectó en *C. monspeliensis* con 3108 mg kg⁻¹. Los resultados obtenidos son igualmente muy superiores a los encontrados en *C. ladanifer* por Alvarenga *et al.* (2004) y en las distintas especies de *Cistus* analizadas por Freitas *et al.* (2004) en suelos mineros de Portugal. Además, Kidd *et al.* (2004) encontraron concentraciones muy elevadas de Zn en *C. ladanifer* llegando a alcanzar 9.000 mg kg⁻¹ en la parte aérea (doble que en las raíces) cuando las plantas se expusieron a concentraciones de 1M de Zn en disolución nutritiva.

En relación a las concentraciones de Cd, nuestros resultados mostraron que las plantas acumulaban elevadas cantidades de este elemento (>26 mg kg⁻¹ en todas las especies). El Cd, al ser un elemento no esencial, se encuentra en la planta en baja concentración (<1 mg kg⁻¹), aunque puede ser fácilmente absorbido y acumulado por las raíces, limitando su transporte a la parte aérea. En ensayos realizados con una disolución nutritiva rica en Cd, Kidd *et al.* (2004) encontraron que *C. ladanifer* era tolerante a Cd, pudiendo llegar a acumular 350 mg kg⁻¹ en su parte aérea, con un transporte eficiente desde las raíces a su parte aérea. En este estudio las especies de *Cistus* acumularon eficientemente Cd, con unos factores de bioconcentración (concentración en la parte aérea respecto a concentración en el suelo) comprendidos entre 5,3 y 10,6, indicando una gran absorción y transporte de Cd. Además, es posible que la toxicidad que mostraron las especies esté asociada a la alta concentración de Cd presente en su parte aérea (debido a su rápida absorción y transporte) provocando así un escaso crecimiento y una baja tasa de supervivencia.

En el caso del Pb, que es un elemento no esencial y tóxico, sus concentraciones en la planta no deben ser superiores a 1 mg kg⁻¹ (Plant & Raiswell, 1983), sin embargo en este estudio la con-

centración de Pb estaba por encima del valor establecido como normal alcanzándose valores de 767 mg kg⁻¹ en *C. psilosepalus*. Estos resultados están en desacuerdo con los resultados obtenidos por Alvarenga *et al.* (2004) ya que ellos determinaron que *C. ladanifer* se comporta como tolerante a Pb por exclusión, presentando una menor concentración en hojas que en raíces y por tanto, no lo acumula en sus hojas en altas concentraciones. Según Robinson *et al.* (2009), en especies tolerantes por exclusión, los elementos tóxicos se mantienen a niveles bajos en las plantas en un amplio intervalo de concentración en el suelo, hasta que los mecanismos de regulación se sobrecargan. Ello provoca una entrada del elemento sin control en la planta, causando una gran reducción del crecimiento, acompañado de clorosis o necrosis. Claramente las plantas del presente experimento mostraron síntomas de necrosis y un escaso rendimiento, todo ello causado por la presencia de altos niveles de metales pesados en las plantas, que sobrepasaron sus mecanismos de control en estas especies excluyentes de metales.

El Ni ha sido incorporado a la lista de microelementos indispensables para las plantas aunque en altas dosis resulta perjudicial. En el estudio realizado por Kidd *et al.* (2004) se observó que el crecimiento de las plantas en presencia de disoluciones metálicas se detiene con valores de Ni en el medio superiores a 125 y 250 μM (7,3 y 14,7 mg l⁻¹) ya que las plantas de *C. ladanifer* acumularon concentraciones de Ni de 105 a 5330 mg kg⁻¹. En el presente estudio se han obtenido valores de Ni de 3.3 mg kg⁻¹ en *C. monspeliensis* que son inferiores a los obtenidos por Kidd *et al.* (2004) pero los suelos objeto de estudio no poseen elevados niveles de Ni.

Otro elemento detectado fue el As que forma parte de los metaloides sin función biológica conocida y por tanto cuando está presente en el suelo a concentraciones altas resulta tóxico para las plantas. Los resultados mostraron que la concentración media de As más alta registrada fue para *C. psilosepalus* y *C. monspeliensis* con un valor de 39 mg kg⁻¹. Sin embargo, en el estudio realizado por Pratas *et al.* (2005) mostró que el As se acumuló en las hojas de *C. ladanifer* con una concentración máxima de 2,77 mg kg⁻¹.

En conclusión, los resultados indicaron que *C. laurifolius*, *C. monspeliensis*, *C. psilosepalus* y *C. salviifolius* podrían ser utilizadas para la

recuperación de suelos mineros que presenten moderadas concentraciones de metales pesados. Además, la supervivencia de las plantas en el suelo 1 fue muy baja por lo que estas especies no pueden utilizarse para fitorremediación en este tipo de suelo. Sin embargo, en el suelo 2 la supervivencia fue mayor pero presentaron un escaso crecimiento y desarrollo lo que imposibilita su utilización y por tanto, se deberían diseñar estrategias que permitan incrementar estos procesos indispensables para su utilización en la recuperación de suelos mediante fitotecnologías. Las plantas de *C. ladanifer* no sobrevivieron en ninguno de los dos suelos estudiados por lo que en estas condiciones no pueden ser utilizadas para la recuperación de suelos.

Referencias

- Abreu MM, Santos ES, Anjos C, Magalhães MCF, Nabais C, Madeira MAV & Cabral FM. 2009. Lead uptake capacity of *Cistus* plants growing in mining areas. In *Revista de Ciências Agrárias*, 32: 170-181). Sociedade de Ciências Agrárias de Portugal.
- Alvarenga PM, Araújo MF & Silva JAL. 2004. Elemental uptake and root-leaves transfer in *Cistus ladanifer* L. growing in a contaminated pyrite mining area (Aljustrel-Portugal). *Water, Air, and Soil Pollution* 152: 81–96.
- Bernal MP, De la Fuente C, Albuquerque JA, Martínez-Alcalá I, Pardo T & Clemente R. 2009. Opciones de recuperación de suelos del entorno del Mar Menor afectados por la actividad minera. *El Mar Menor: Estado Actual del Conocimiento Científico*. Instituto Euromediterráneo del Agua 399-449.
- Cabezudo B, Navarro T, Pérez-Latorre AV, Nieto-Caldera JM & Orshan G. 1992. Estudios fenomorfológicos en la vegetación del sur de España. I. *Cistus* L. *Acta Botanica Malacitana* 17: 229-237.
- Coupe SJ, Sallami K & Ganjian E. 2013. Phytoremediation of heavy metal contaminated soil using different plant species. *African Journal of Biotechnology* 12: 6185-6192.
- De la Fuente V, Rufo L, Rodríguez N, Amils R & Zuluaga J. 2010. Metal Accumulation Screening of the Río Tinto Flora (Huelva, Spain). *Biological Trace Element Research* 134: 318–341.
- Díez-Lázaro FJ. 2008. Fitocorrección de suelos contaminados con metales pesados: Evaluación de plantas tolerantes y optimización del proceso mediante prácticas agrónomas. Tesis doctoral. Universidad de Santiago de Compostela.
- Escribá-Baeza MC, Arregui JM & Laguna E. 2007. Germinación de *Cistus heterophyllus* Subsp. *Carthagenensis* (Pau) M.B. Crespo y Mateo, taxón gravemente amenazado en la Comunidad Valenciana. *Lazaroa* 28: 101-107.
- España. Real Decreto 9/2005, de 14 de enero, por el que se establece la relación de actividades potencialmente contaminantes del suelo y los criterios y estándares para la declaración de suelos contaminados. *Boletín Oficial del Estado*, 18 de enero de 2005, núm. 15, p. 11.
- Faz-Cano A, Arnaldos-Lozano R, Conesa-Alcaraz HM & García-Fernández G. 2003. Soils affected by mining and industrial activities in Cartagena (SE Spain): classification problems. *European Soil Bureau* 7: 165-170.
- Freitas H, Prasad NV & Pratas J. 2005. Plant community tolerant to trace elements growing on the degraded soils of São Domingos mine in the South East of Portugal: Environmental implications. *Environment International* 30: 65-72.
- Gee GW, Bauder JW. 1986. Particle-size analysis, *Methods of Soil Analysis, Physical and Mineralogical Methods*, 2nd edn. : In: Klute, A. (Ed.). *Agronomy: Madison, Wisconsin, USA*, pp. 383–411.
- Hoagland DR & Arnon DI. 1950. The water-culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station* 347: 36-39.
- Jiménez MN, Bacchetta G, Casti M, Navarro FB, Lallena AM & Fernández-Ondoño E. 2011. Potential use in phytoremediation of three plant species growing on contaminated mine-tailing soils in Sardinia. *Ecological Engineering* 37: 392-398.
- Kabata-Pendias A. 2001. *Trace Elements in Soils and Plants*. En CRC Press, Boca Raton. USA.
- Kidd PS, Díez J, Monterroso-Martínez C (2004) Tolerance and bioaccumulation of heavy metals in five populations of *Cistus ladanifer* L. subsp. *ladanifer*. *Plant and Soil* 258: 189–205.
- Marschner P. 2011. *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants*. En: San Diego, CA: Academic Press.
- Martínez-Sánchez MJ & Pérez-Sirvent C. 2009. Análisis del estado de la contaminación del suelo en el Sistema Campo de Cartagena-Mar Menor. *El Mar Menor. Estado actual del conocimiento científico* 1º Edición. Instituto Euromediterráneo del Agua 207-243.
- McGrath SP, Cegarra J. 1992. Chemical extractability of heavy metals during and after long-term applications of sewage sludge to soil. *Journal of Soil Science* 43: 313–321.
- Mengel K & Kirkby EA. 2001. *Principles of Plant Nutrition*. En Kluwer Academic Publishers (Dordrecht, eds) Netherland: Springer, pp. 864-880.
- Pardo T, Clemente R & Bernal M P. 2011. Effects of compost, pig slurry and lime on trace element solubility and toxicity in two soils differently affected by mining activities. *Chemosphere* 84: 642-650.
- Pardo T. 2013. Recuperación de suelos contaminados por elementos traza mediante fitotecnologías de estabilización. Tesis doctoral.
- Pérez-García F. 1996. Germination of *Cistus ladanifer* seeds in relation to parent material. *Plant Ecology* 133: 57-62.
- Plant JA & Raiswell R. 1983. *Principles of environmental geochemistry*. En *Applied environmental geochemistry* (Thornton I, eds). London: Academic Press, pp. 1-39.

- Pratas J, Prasad MNV, Freitas H & Conde L. 2005. Plants growing in abandoned mines of Portugal are useful for biogeochemical exploration of arsenic, antimony, tungsten and mine reclamation. *Journal of Geochemical Exploration* 85: 99-107.
- Robinson BH, Banuelos G, Conesa HM, Evangelon WH & Schulin R. 2009. The phytomanagement of trace elements in soil. *Critical Reviews in Plant Sciences* 38: 240-266.
- Wei S, Li Y, Zhou Q, Srivastava M, Chiu S, Zhan J & Sun T. 2010. Effect of fertilizer amendments on phytoremediation of Cd-contaminated soil by a newly discovered hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. *Journal of Hazardous Materials* 176: 269-273.
- Wenzel WW, Lombi E & Adriano D. 1999. Biogeochemical Processes in the Rhizosphere: Role in Phytoremediation of Metal-Polluted Soils. En *Heavy metal stress in plants - from molecules to ecosystems*. (Prasad, N & Hagemeyer J, eds) Heidelberg: Springer Verlag, pp. 273-303.
- Wong Y, Ye Y, Fung-Yee Tam N & Lu C. 2005. Effects of salinity on germination, seedling growth and physiology of three salt-secreting mangrove species. *Aquatic Botany* Volume 83: 193-205.