

# EVALUACIÓN DE METALES PESADOS EN LAS CLOROFILAS DE GRAMINEAS PASCÍCOLAS DE UNA MINA TOLEDANA ABANDONADA MEDIANTE LA APLICACIÓN DEL MÉTODO "GAUSS PEAK SPECTRUM"

M.J. GUTIÉRREZ-GINÉS<sup>1</sup>, J. PASTOR<sup>2</sup>, C. BARTOLOMÉ<sup>3</sup> y A.J. HERNÁNDEZ<sup>1</sup>

## RESUMEN

Se ha realizado el estudio del método matemático "Gauss Peak Spectrum", que después se puso a punto en nuestro laboratorio. Este trabajo muestra el protocolo seguido para la operatividad de un método que consideramos importante para la evaluación del efecto de metales pesados del suelo en especies vasculares herbáceas.

Los resultados se muestran para cuatro gramíneas pascícolas (*Agrostis castellana*, *Arrhenatherum bulbosum*, *Dactylis glomerata*, *Micropyrum tenellum*), que crecen en el emplazamiento de una mina de plata abandonada en la provincia de Toledo. Las gramíneas son, en este enclave, las especies de mayor valor pastoral para la nutrición del ganado que las pasta, así como de la abundante fauna silvestre (el emplazamiento es un coto de caza). La capa superficial de los suelos presenta niveles de Pb y Zn muy elevados, y Cd y Cu están en varios lugares por encima de los niveles de referencia aceptables para los suelos. El método permite cuantificar las clorofilas afectadas por Cu, Zn y Cd en las especies analizadas. Cu es el metal que más afecta a la clorofila-a, a pesar de ser Zn el que más acumulan estas especies.

**Palabras clave:** *Agrostis castellana*, *Arrhenatherum bulbosum*, *Dactylis glomerata*, *Micropyrum tenellum*, Zn, Cu, Cd.

## INTRODUCCIÓN

Los residuos mineros son una de las principales fuentes de contaminación de suelos por metales pesados en ambientes mediterráneos (Navarro-Pedreño *et al.*, 2008), y esta actividad fue bastante importante en el centro peninsular hasta finales del siglo pasado. En la actualidad, con frecuencia encontramos enclaves con minas abandonadas en las que las escombreras son visibles y la contaminación del suelo se extiende en zonas más amplias que el ámbito de ubicación de la propia mina (Pastor y Hernández, 2008).

<sup>1</sup> Departamento de Ecología. Edificio de Ciencias. Universidad de Alcalá. Ctra. Madrid-Barcelona km 33,6. 28871 Alcalá de Henares, Madrid (España).

<sup>2</sup> Departamento de Biología Ambiental. CCMA. MNCN, CSIC. C/Serrano 115 bis. 28006 Madrid (España).

<sup>3</sup> Departamento de Biología Vegetal. Edificio de Ciencias. Universidad de Alcalá.



Normalmente el estudio de la contaminación del suelo por metales pesados en estos emplazamientos y su efecto en las especies vegetales que crecen sobre ellos se basan en análisis químicos de suelos y plantas (Pastor y Hernández, 2008). Para estudios más detallados sobre el efecto directo de los metales sobre la fisiología de las plantas es necesario la realización de bioensayos y el uso de metodologías complejas para analizar, por ejemplo, parámetros fisiológicos (Rossini et al., 2010), o actividad enzimática (Astolfi, et al., 2004).

En la revisión bibliográfica, se descubrió el método matemático "Gauss Peak Spectrum" ("GPS") (Küpper et al, 2007) que permitía cuantificar, entre otros pigmentos, clorofilas en las que el  $Mg^{+2}$  central de esta molécula estaba sustituido por  $Cu^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$  o  $Cd^{+2}$ . Esta sustitución impide la captura de luz en aquellas moléculas de clorofila afectadas, causando una disminución de la fotosíntesis (Küpper et al, 1996), y por lo tanto indican un efecto directo de los metales sobre el funcionamiento de las plantas que crecen en ambientes con suelos contaminados por ellos. Por otro lado nos parecía interesante disponer de un método que no requería ni equipamiento ni metodologías complejas para llevarlo a cabo. Por tanto, pretendimos probar este método en gramíneas que crecen en el emplazamiento de una mina abandonada en la provincia de Toledo con suelos contaminados por metales pesados, puesto que la zona es un coto de caza con aprovechamiento ganadero, y éstas son especies de gran valor nutricional tanto para la ganadería como para otras especies cinegéticas.

El objetivo de este trabajo se centra en estudiar el método matemático "GPS", diseñar un protocolo para llevarlo a cabo con plantas vasculares herbáceas y aplicarlo a las gramíneas pascícolas del emplazamiento mencionado.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Área de estudio

La mina "La Económica" (Mazarambroz, Toledo), situada en las cercanías del río Guajaraz, es una mina de plata que cesó su funcionamiento a finales de los años 80. La orografía es más bien plana, con cotas que oscilan entre los 660 y los 750 msnm. Los suelos, según la clasificación de FAO, ISRIC y ISSS (2006), son leptosoles dísticos, pero también aparecen cambisoles dísticos en las cercanías del río. Esta mina se explotó hasta 150 m de profundidad, produciendo escombreras de unos 25.000 m<sup>3</sup>. Su paragénesis se caracteriza por el predominio de galena y blenda, por lo que Pb y Zn son los metales con mayores concentraciones en suelos y aluviones. Cu y Cd se encuentran en algunos puntos con concentraciones mayores que los niveles de referencia (Hernández y Pastor, 2007).

La vegetación es claramente de un rétamar aclarado por la degradación de los suelos, con zonas de pastos de *Tuberarietalia guttatae* y vallicares igualmente empobrecidos en hondonadas y con presencia del junco churrero *Scirpoides holoschoenus*. Estos pastizales se enriquecen en especies "nitrófilas" debido al pastoreo por ganado ovino. Una gran parte del entorno de este emplazamiento se aprovecha para el cultivo cerealista y todo él forma parte de un coto de caza, donde abundan los conejos (Hernández y Pastor, 2007).

### Muestreo y análisis químico de plantas

La recogida de las plantas se realizó en primavera de 2010, eligiendo las gramíneas más frecuentes de distintas áreas del emplazamiento. Esta familia conforma un conjunto de especies singulares que dan mayor identidad o sirven para diferenciar los pastos de esta zona. Seleccionamos al azar, nueve parcelas de escombreras y aluviones. Las cuatro especies recogidas fueron *Agrostis castellana*, *Arrhenatherum bulbosum*, *Dactylis glomerata* y *Micropyrum tenellum*. Parte de las muestras se utilizó para los análisis de las clorofilas y otra parte fue lavada con agua desionizada, secada en una estufa (70 °C, 48 horas) y molida para el análisis químico de



Zn, Cu, Cd y Pb mediante espectroscopía de emisión por plasma (ICP-OES) previa digestión ácida con HNO<sub>3</sub> y HClO<sub>4</sub> en proporción 4:1 (Walsh y SSSA, 1971).

### Descripción del método matemático "Gauss Peak Spectrum"

El método "GPS" es un método matemático creado por Küpper *et al.* (2000 y 2007), que permite cuantificar los pigmentos presentes en un extracto vegetal, a partir de su espectro de absorción de energía electromagnética entre 350 nm y 750 nm de longitud de onda. Los principios del método se pueden consultar en las citas bibliográficas de los creadores.

### Protocolo para las determinaciones analíticas aplicado a las muestras vegetales

Puesto que el protocolo seguido para el presente trabajo difiere del presentado por los autores, pasamos a describirlo. De las muestras recogidas en el emplazamiento de la mina, se cortaron en fresco trozos al azar de las partes verdes hasta completar 1 g, y se almacenaron a -20° C hasta su posterior preparación. De la muestra se utilizaron originalmente 100 mg de material, pero debido a la frecuencia con que se tenían que hacer diluciones para no superar la absorbancia de 1,5 (requisito del método), se decidió utilizar 50 mg de muestra cuando ésta estuviera compuesta principalmente por hojas. Se extrajeron los pigmentos con acetona 100%. Los extractos se midieron en un espectrofotómetro de doble haz Perkin-Elmer λ16, en la región 350-750 nm. Los espectros obtenidos se normalizaron a la absorbancia máxima y se les aplicó la ecuación del método en el programa informático Sigmaplot 11 (2008).

A la ecuación del método se le pueden añadir tantos términos de pigmentos como se crea conveniente. Los autores, en el programa para Sigmaplot, la escribieron de cuatro formas diferentes: una para todos los pigmentos normales, y tres con los pigmentos normales más las clorofilas sustituidas por Zn, Cu o Cd. Pero, puesto que conocíamos la contaminación edáfica que tenía este emplazamiento (Hernández y Pastor, 2007), con más de tres metales en la capa superficial edáfica, y sabiendo que muchas de las plantas que crecen en este lugar acumulan varios metales en sus tejidos (Pastor *et al.* 2010), creímos adecuado realizar una ecuación en la que se incluyeran, además de los pigmentos habituales, los seis términos correspondientes a las clorofilas-a y b sustituidas por los tres metales. Por lo tanto, y para compararlas, se aplicaron las cinco ecuaciones. Se eligieron los resultados correspondientes a la ecuación que presentara un mejor ajuste.

### Tratamiento de los datos

Se ha calculado el porcentaje de clorofila-a afectada por alguno de los metales, y estos datos (que indican el grado de impacto de los metales y no son dependientes de la concentración de clorofila en la planta) se han correlacionado con la concentración de metales en los ejemplares mediante correlaciones de Pearson o Spearman (datos no normales, o con varianzas diferentes a pesar de hacer una transformación logarítmica), con la ayuda del programa Spss 19 (2010).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Efectos de Zn, Cu y Cd sobre clorofilas de gramíneas del emplazamiento de la mina abandonada "La Económica" (Toledo)

El principal resultado es que este método permite cuantificar las clorofilas afectadas por Zn, Cu y/o Cd en las especies elegidas que crecen sobre el emplazamiento descrito. La clorofila-b no sustituyó en ningún caso su Mg central por ninguno de los tres metales. La clorofila-a parece más susceptible a este estrés (tabla 1). El metal que parece afectar más a la clorofila-a es el Cu, a pesar de que sea el Zn el metal contaminante principal de estos suelos (Pastor *et al.*, 2010), y el que más absorben las plantas (tabla 2). *Arrhenaterum bulbosum* y *Agrostis castellana* en los pun-



tos de muestreo 1 y 9b respectivamente, son las especies más afectadas con un 8,5 % de la clorofila-a sustituida por Cu. La especie con la clorofila-a más sensible al Zn parece ser *Micropyrum tenellum*, puesto que es prácticamente la única en la que se ha encontrado concentración de este tipo de clorofila, hasta un máximo del 3,6 % de clorofila-a afectada por este metal. Esta especie es, además, la que acumula mayor cantidad de metales.

Tabla 1. Concentración de clorofilas-a y b normales (MgChla y MgChlb) y clorofilas-a sustituidas por  $Zn^{+2}$  (ZnChla),  $Cu^{+2}$  (CuChla) y  $Cd^{+2}$  (CdChla) en  $\mu\text{mol/g}$ .

Punto	Especie	ZnChla	CuChla	CdChla	MgChla	MgChlb
ME-1	<i>Arrhenatherum bulbosum</i>	0,00	0,082	0,00	0,88	0,35
ME-1	<i>Dactylis glomerata</i>	0,00	0,092	0,00	1,96	0,67
ME-2	<i>Agrostis castellana</i>	0,00	0,066	0,00	1,19	0,41
ME-3	<i>Agrostis castellana</i>	0,00	0,17	0,00	3,05	1,07
ME-3	<i>Micropyrum tenellum</i>	0,036	0,19	0,00	5,90	2,19
ME-4	<i>Agrostis castellana</i>	0,00	0,094	0,00	1,37	0,48
ME-4	<i>Micropyrum tenellum</i>	0,023	0,00	0,00	0,62	0,26
ME-5	<i>Agrostis castellana</i>	0,00	0,026	0,00	1,22	0,42
ME-6	<i>Agrostis castellana</i>	0,00	0,045	0,00	1,16	0,42
ME-7	<i>Agrostis castellana</i>	0,00	0,21	0,00	5,37	1,79
ME-7	<i>Arrhenatherum bulbosum</i>	0,00	0,23	0,00	5,48	2,01
ME-7	<i>Micropyrum tenellum</i>	0,010	0,011	0,00	0,57	0,21
ME-8	<i>Agrostis castellana</i>	0,039	0,038	$6,1 \cdot 10^{-3}$	1,20	0,47
ME-8	<i>Micropyrum tenellum</i>	0,014	0,00	0,00	0,68	0,26
ME-9	<i>Agrostis castellana</i>	0,00	0,19	0,00	2,23	0,78
ME-9b	<i>Agrostis castellana</i>	0,00	0,25	0,00	2,68	0,89
ME-9	<i>Micropyrum tenellum</i>	$5,0 \cdot 10^{-3}$	$8,4 \cdot 10^{-3}$	0,00	0,63	0,23

En ningún caso se ha encontrado relación ( $p < 0,1$ ) entre la concentración de los metales en las partes aéreas de los ejemplares y el porcentaje de clorofila-a afectada por alguno de ellos. Esto se puede deber a los numerosos mecanismos de tolerancia a la contaminación por metales que las plantas presentan (Hall, 2002), y que hacen que estos metales sean excluidos de la actividad metabólica de las mismas en la medida de lo posible. Cuando estos mecanismos no son suficientes o no existen, los metales son capaces de ocasionar diversos daños en las plantas a distintos niveles (Liphadzi y Kirkhan, 2006); uno de ellos, como hemos comprobado, es la sustitución del Mg de la clorofila por un ion metálico, y por lo tanto la disminución de su capacidad fotosintética. Está claro que la contaminación por metales encontrada en los suelos de este emplazamiento afecta de forma negativa a las especies vegetales que allí se encuentran, puesto que por un lado son capaces de acumularse en sus tejidos y por otro pueden afectar a su capacidad de realizar la fotosíntesis.

## CONCLUSIONES

El método "GPS" para la cuantificación de pigmentos en plantas vasculares es de fácil y no muy costosa aplicación y permite evaluar efectos directos de metales pesados del suelo sobre plantas que crecen sobre ellos, sin necesidad de realizar bioensayos y metodologías complejas. Su aplicación a especies pascícolas de la familia *Gramineae* ubicadas en el emplazamiento estudiado ha dado buenos resultados. Las clorofilas-a de las cuatro especies analizadas son más sensibles al estrés por Zn, Cu y Cd que las clorofilas-b. A pesar de



Tabla 2. Concentración (mg/kg) de metales pesados en partes aéreas de gramíneas en los distintos puntos de muestreo

Punto	Especie	Zn	Cu	Cd	Pb
ME-1	<i>Arrhenatherum bulbosum</i>	174	4,1	0,0	0,0
ME-1	<i>Dactylis glomerata</i>	54	0,6	0,0	0,0
ME-2	<i>Agrostis castellana</i>	599	3,8	0,0	0,0
ME-3	<i>Agrostis castellana</i>	516	9,0	0,0	0,0
ME-3	<i>Micropyrum tenellum</i>	665	4,6	0,0	0,0
ME-4	<i>Agrostis castellana</i>	351	2,8	0,0	0,0
ME-4	<i>Micropyrum tenellum</i>	388	2,0	0,0	0,0
ME-5	<i>Agrostis castellana</i>	535	12,8	0,0	0,0
ME-6	<i>Agrostis castellana</i>	513	9,8	0,0	38,3
ME-7	<i>Agrostis castellana</i>	1339	6,7	0,0	0,0
ME-7	<i>Arrhenatherum bulbosum</i>	223	0,5	0,0	0,0
ME-7	<i>Micropyrum tenellum</i>	781	4,5	0,0	0,0
ME-8	<i>Agrostis castellana</i>	534	4,3	0,0	0,0
ME-9	<i>Agrostis castellana</i>	1013	16,4	0,0	30,6
ME-9b	<i>Agrostis castellana</i>	838	5,1	4,1	13,5
ME-9	<i>Micropyrum tenellum</i>	333	20,6	0,0	0,0

que ellas acumulan Zn en gran cantidad, las clorofilas de estas especies parecen más sensibles al Cu que al Zn, y sólo *Micropyrum tenellum* presenta clorofilas estresadas por Zn. Estos resultados indican que las plantas que crecen en suelos contaminados por estos metales, no solo pueden acumularlos en cantidades importantes, sino que su actividad fotosintética se ve disminuida y, por tanto, se afecta la capacidad productiva del sistema.

### Agradecimientos

A la financiación los proyectos CTM 2008-04827/TECNO, del Ministerio de Ciencia e Innovación, y P2009/AMB-1478A, Programa EIADES de la Comunidad de Madrid. Al apoyo técnico de Luis Cuadra y Elena Fernández, del Servicio General de Análisis, CCMA, CSIC.

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASTOLFI, S.; ZUCHI, S.; PASSERA, C. 2004. Effects of cadmium on the metabolic activity of *Avena sativa* plants grown in soil and hydroponic culture. *Biología Plantarum*, **48** (3), 413-418.
- FAO, ISRIC y ISSS. 2006. *World reference base for soil resources*. 2nd ed. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), International Society of Soil Science (ISSS-AISS-IBG), and International Soil Reference and Information Centre (ISRIC). 128 pp. World Soil Resources Reports No. 103. FAO, Rome.
- HALL, J.L. 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, **53** (366), 1-11.
- HERNÁNDEZ, A. J.; PASTOR, J. 2007. Ecosystems health and geochemistry: concepts and methods applied to abandoned mine sites. En: *The 23<sup>rd</sup> International Applied Geochemistry Symposium (IAGS 2007)* J. LOREDO (Ed.). Ed. Universidad de Oviedo. Oviedo (España), 219-231.
- KÜPPER, H.; KÜPPER, F.; SPILLER, M. 1996. Environmental relevance of heavy metal-substituted chlorophylls using the example of water plants. *Journal of Experimental Botany*, **47** (295), 259-266.



- KÜPPER, H.; SPILLER, M.; KÜPPER, F.C. 2000. Photomeric Methods for the Quantification of Chlorophylls and Their Derivatives in Complex Mixtures: Fitting with Gauss-Peak Spectra. *Analytical Biochemistry*, **286**, 247-256.
- KÜPPER, H.; SEIBERT, S.; PARANESWARAN, A. 2007. Fast, Sensitive, and Inexpensive Alternative to Analytical Pigment HPLC: Quantification of Chlorophylls and Carotenoids in Crude Extracts by Fitting with Gauss Peak Spectra. *Analytical Chemistry*, **79**, 7611-7627.
- LIPHADZI, M.S.; KIRKHAM, M.B. 2006. Physiological Effects of Heavy Metals on Plant Growth and Function. In: *Plant-environment interactions*. B. HUANG (Ed). Ed Taylor y Francis. New York (EE.UU.), 243-269.
- NAVARRO-PEDREÑO, J.; GÓMEZ, I.; ALMENDRO, M.G; MELÉNDEZ-PASTOR, I. 2008. Heavy Metals in Mediterranean Soils. En: *Soil Contamination Research Trends*. J. B. DOMÍNGUEZ (Ed.). Ed. Nova Science Publishers New York (EE.UU.), 161-176.
- PASTOR, J.; HERNÁNDEZ, A.J. 2008. La restauración en sistemas con suelos degradados: estudios de casos en vertederos, escombreras y emplazamientos de minas abandonadas. En: *Contaminación de Suelos: Tecnologías para su recuperación*. R. MILLÁN y C. LOBO (Eds.). Ed. CIEMAT, Madrid (España), 539-560.
- PASTOR, J.; GUTIÉRREZ-GINÉS, M. J.; HERNÁNDEZ, A. J. 2010. Contenidos de metales en plantas y estudio de la generación de lixiviados en una antigua mina de plata con contenidos elevados de Zn y Pb. En: *Aspectos fisiológicos, agronómicos y ambientales de la nutrición mineral en las plantas*. J.M ESTAVILLO (Ed-coord.). Ed. Universidad del País Vasco. Bilbao (España), 217-223.
- ROSSINI, S.; MINGORANCE, M.D.; VALDÉS, B.; LEIDI, E.O. 2010. Uptake, localisation and physiological changes in response to copper excess in *Erica andevalensis*. *Plant and Soil*, **328**, 411-420.
- SIGMAPLOT for Windows. Versión 11. 2008. Systat Software, Inc.
- SPSS for Windows. Versión 19.0. 2010. Spss, Inc. and IBM Company.
- WALSH, L.M.; SOIL SCIENCE SOCIETY OF AMERICA. 1971. *Instrumental Methods for analysis of soils and plant tissue*. Ed. Soil Science Society of America, Wisconsin, US, VII, 334.

## ASSESSMENT OF HEAVY METALS IN CHLOROPHYLLS OF GRASSES OF AN ABANDONED TOLEDO MINE BY APPLYING THE METHOD "GAUSS PEAK SPECTRUM"

### SUMMARY

The "Gauss Peak Spectrum" mathematical method was studied and optimized in our laboratory. This work shows the protocol followed for the operation of a method we consider important in assessing the effect of heavy metals in vascular herbaceous species.

Results are shown for four pasture grasses, which grow on the site of abandoned silver mine in Toledo province. In this enclave grasses are the species with most pastoral value for livestock nutrition as well as for the abundant wildlife (the site is a hunting ground). The topsoil layer has very high levels of Pb and Zn, and Cd and Cu are above acceptable reference levels for soil in several places. The method allows quantification of chlorophylls affected by Cu, Zn and Cd in the analyzed species (*Agrostis castellana*, *Arrhenatherum bulbosum*, *Dactylis glomerata*, *Micropyrum genellum*). Chlorophyll-a is mostly affected by Cu, even though Zn is the metal most accumulated in these species.

**Key words:** *Agrostis castellana*, *Arrhenatherum bulbosum*, *Dactylis glomerata*, *Micropyrum tenellum*, Zn, Cu, Cd.

**Pastos, paisajes culturales  
entre tradición y nuevos paradigmas  
del siglo XXI**

Celia López-Carrasco Fernández  
María del Pilar Rodríguez Rojo  
Alfonso San Miguel Ayanz  
Federico Fernández González  
Sonia Roig Gómez



© Los autores  
© De la presente edición  
1.ª edición 2011

*Edita:* Sociedad Española para el Estudio de los Pastos.

*Edición coordinada por:* López Carrasco, C.;  
Rodríguez Rojo, M<sup>a</sup> P.;  
San Miguel Ayanz, A.;  
Fernández González, F.;  
Roig Gómez, S.

*Maquetación:* José-Luis B. Quiñones

*Imágenes portada:* Los autores

*Impresión:* Reprográficas Malpe, S.A.

Depósito Legal: M-19806-2011

ISBN: 978-84-614-8713-4