



Departamento de Bioloxía Celular e Molecular  
Área de Microbioloxía

**Avaliación da carga microbiana nun gradiente de  
solo industrial**

**Evaluación de la carga microbiana en un gradiente  
de suelo industrial**

**Assesment of the microbial load in a gradient of  
industrial soil**

Óscar Ousinde Suárez

Traballo de Fin de Grao

Data de defensa: 29/06/2015

Dirixido polo Doutor José Enrique Torres Vaamonde



## Contenido

Resumo / Abstract.....	1
Introdución.....	2
Obxectivos.....	5
Material e métodos.....	6
Localización do solo.....	6
Técnica de mostraxe.....	6
Medios de cultivo.....	7
Tratamento das mostras.....	8
Técnicas de sementeira.....	9
Medida de pH.....	10
Medida da humidade.....	11
Estatística: ANOVA e Test de Tukey.....	12
Resultados.....	13
Recontos.....	13
pH.....	15
Humidade do solo.....	16
Probas estatísticas: ANOVA e Test de Tukey.....	16
Discusión.....	18
Conclusións/ Conclusions.....	20
Bibliografía.....	21
Anexo I.....	26



## Resumo / Abstract

O solo constitúe un ambiente único e irremplazable, capaz de soportar o crecemento vexetal dos ecosistemas e mantendo os ciclos bioxeoquímicos debido aos microorganismos do solo que interveñen neles. É polo tanto un recurso moi valioso e de necesaria conservación, sen embargo, a acción do home debido a urbanización e un rápido desenvolvemento industrial, dá lugar a preocupacións ambientais polas emisións atmosféricas principalmente relacionadas coa contaminación dos solos con metais. Neste traballo, foron recollidas varias mostras de solo en gradiente nun terreo adxacente a unha industria siderúrxica da cal se teñen evidencias de emisións atmosféricas de metais contaminantes. Por isto, a partir das mostras de solo, tres grupos de microorganismos foron analizados mediante técnicas de cultivo selectivo en placa: bacterias heterotróficas aerobias, bacterias fixadoras de nitróxeno e fungos. Observouse que as u.f.c/(g solo) en bacterias heterotróficas aerobias e fixadoras de nitróxeno seguen unha dinámica similar, aumentando a medida que nos afastamos do foco industrial, sen embargo, os fungos amosan unha dinámica totalmente oposta, reducíndose as ufc/(g solo) a medida que avanzamos no gradiente, pois posúen unha maior resistencia á contaminación ambiental, en especial aos metais. Os parámetros de humidade do solo e pH non experimentan variacións ao longo do gradiente de solo, polo que todo isto reforza a hipótese da posible afección microbiana por parte da industria siderúrxica próxima.

.....

Soil is a singular and irreplaceable environment, able to support ecosystems vegetal growing and maintain biogeochemical cycles because of the microorganisms involved. It is therefore, a very valuable resource and its conservation is also necessary, nevertheless, human action due urbanization and fast industrial development, leads to environmental concerns about atmospheric emissions related with metals soil pollution. In this work, several soil samples were collected in a gradient soil adjacent to a steel industry with evidences of atmospheric pollutants metal emissions. Hereby, beginning from soil samples recollected, three microorganisms groups were analysed by means of cultured selective media plate technics: heterotrophic aerobic bacteria, nitrogen fixing bacteria and fungus. It was observed that heterotrophic aerobic bacteria and nitrogen fixing u.f.c/(g soil) have a similar dynamic, increasing as we move away from the industrial core, nonetheless, fungus show a different dynamic, decreasing as we move in the gradient, because they have high resistance to environmental pollution, specially to metals. Moisture and pH soil parameters don't oscillate in the soil gradient, so this strengthen the hypothesis of the possible microbial complaint because of the near steel industry.

## Introdución

Os procesos e os riscos de degradación do medio ambiente son percibidos cada vez por sectores sociais máis amplos, o cal fai que se lle preste máis atención para intentar evitalos. Son os solos, os constituíntes dun dos factores máis importantes para o equilibrio da biosfera, pois representan a base sobre a que se apoia o crecemento vexetal grazas ao aporte de auga e nutrientes, e polo tanto, a vida no planeta na súa forma actual. É por isto polo que un desenvolvemento duradeiro debe basearse necesariamente no uso dos solos de forma que se evite a súa degradación (contaminación, salinización, diminución da fertilidade) pois a vida e os medios de vida sobre a terra, dependen da capacidade dos solos para producir. O solo caracterízase por ser un recurso natural non renovable ou de moi difícil e custosa renovación, polo que debe de ser utilizado sen superar a súa capacidade de aceptación (Porta, 1999).

O solo cobra así grande importancia, pois é empregado pola sociedade para a produción de cultivos e alimentación animal, construción de vivendas, recreación, transporte, e actividades industriais. Ademais, as condicións hidrolóxicas do solo son influenciadas para facilitar estas actividades. En certas rexións densamente inhabitadas, coma Holanda ou Dinamarca, case cada metro cadrado de terreo forma parte dun plan espacial procesado e delimitado polo ser humano, incluso terreos de desenvolvemento natural. Sen unha política de protección do solo, este pode chegar a ter problemas de deterioro, coma contaminación da auga subterránea, erosión e desertización, capacidade insuficiente de retención de auga, susceptibilidade a pragas, reducida fertilidade do solo, e limitados valores naturais (Winding *et al.*, 2005). Por todo isto acuñouse o termo calidade do solo, que pode ser definido como a capacidade específica do solo para funcionar coma un sistema vivo para soste a vida e produtividade de plantas e animais, manter ou incrementar a calidade do aire e auga, e soste a saúde e habitabilidade humanas (Doran and Safley, 1997).

A rápida urbanización e desenvolvemento industrial das últimas décadas, deu lugar a preocupacións de tipo ambiental polas emisións atmosféricas e pola contaminación con metais (cadmio, cromo, cobre, cobalto, ferro, manganeso, níquel, chumbo, mercurio e zinc) (Reza e Singh, 2010). Cobran especial importancia, no tocante á contaminación do aire, auga e solos, actividades de antropoxénese nas que están implicados procesos industriais a altas temperaturas coma fundición de metais e produción de ferro e aceiros (Nriagu e Pacyna, 1988). Os procesos de combustión e incineración xeran gran cantidade de cinzas que poden conter certos metais tóxicos coma mercurio, chumbo, cadmio, cromo, níquel, manganeso, etc. A presenza destes metais nas cinzas depende en gran medida da eficiencia dos dispositivos para o control da contaminación atmosférica (Mugica *et al.*, 2003). Recentemente, os países máis industrializados fixaron a súa atención na emisión e presenza destes metais en aire, auga e solo debido ao dano que estes elementos poden causar aos seres vivos (Brown *et al.*, 1995).

Foi nos anos 80, cando se descubriu o gran efecto que a contaminación dos solos pode ter sobre a súa propia microbiota, abrindo unha nova liña de investigación (Giller *et al.*, 2009). Deste xeito, podemos falar da saúde do solo, entendida coma o resultado de procesos de conservación e degradación, o cal depende en gran medida do compoñente biolóxico do ecosistema do solo que inflúe na saúde vexetal, ambiental e a seguridade e calidade alimentaria (Halvorson *et al.*, 1997; Parr *et al.*, 1992). Sendo as bacterias do solo moi importantes nos ciclos bioxeoquímicos e beneficiosas para o crecemento vexetal, sintetizando compostos beneficiosos para as plantas, facilitando a toma de certos nutrientes do solo e protexéndoas de certas enfermidades (Hayat *et al.*, 2010).

Os organismos que viven no solo, poden desempeñar numerosas funcións de gran importancia para o sistema debido a súa capacidade de adaptación a condicións moi diversas. O solo é o encargado de manter os ciclos bioxeoquímicos debido a que os microorganismos do solo degradan, tarde ou cedo, todos os compostos orgánicos incluíndo xenobióticos e compostos polifenólicos (Nannipieri *et al.*, 2003). De feito, considérase que entre o 80 e o 90% dos procesos do solo son reaccións mediadas por microorganismos (Nannipiere & Badalucco, 2003).

Estas accións poden ser mecánicas ou químicas, nestas últimas cobran especial importancia os microorganismos, realizando a acción de degradación de compostos orgánicos a moléculas máis sinxelas, mineralización de compoñentes orgánicos a formas inorgánicas (liberación de nutrientes para as plantas), síntese e excreción de produtos orgánicos no solo, fixación biolóxica de nitróxeno atmosférico, participación nos ciclos de numerosos elementos (C, N, P, Ca, Fe, Mn) e produción de compostos biorreguladores (coma por exemplo substancias funxicidas). As accións dos microorganismos do solo vense en moitos casos reforzadas polas interaccións e asociación entre eles e pola dispoñibilidade de nutrientes e enerxía como a luz solar, compostos orgánicos e inorgánicos, fontes de carbono e elementos esenciais requiridos (C, O, H, N, P, K, Mg, S, Ca, entre outros). As condicións do medio tamén determinan a acción dos microorganismos do solo, aquí inclúense factores coma a temperatura, a dispoñibilidade de auga ou a aireación do solo. Dado o pequeno tamaño dos microorganismos, o seu hábitat tamén o é, e para designalo falamos de microambiente que debido a que o solo presenta unha gran variabilidade espazo-temporal, poden existir nel, moitos microambientes físicos e químicos (Porta, 1999).

Dende os anos 60, a microbioloxía do solo sufriu unha gran cantidade de cambios nos seus métodos de estudo que melloraron a súa comprensión en moitos aspectos (Insam, 2001). Aínda así, debido a que o solo é un complexo sistema biolóxico, segue a ser difícil a día de hoxe determinar a composición das súas comunidades microbianas, cobrando especial interese a relación entre biodiversidade (entendido coma o número de especies presentes no sistema) e a función no solo. De feito, a importancia da biodiversidade na funcionalidade dos ecosistemas foi resaltada por *Agenda 21*, un documento da Conferencia de Medio Ambiente e Desenvolvemento das Nacións Unidas (United Nations Conference on Environment and Development), realizada en Río de Xaneiro no ano 1992. Algúns autores coma Nannipieri *et al.* (2003) creen que ao menos un mínimo número de especies resultan esenciais para a funcionalidade dos ecosistemas baixo condición estables e que un bo número de especies son probablemente esenciais para manter estables os procesos en ambientes dinámicos.

Bacterias e fungos son polo xeral de pequeno tamaño e viven na película de auga ou en pequenos poros do solo. O movemento microbiano no solo é limitado e principalmente levado a cabo de forma pasiva polo fluxo de auga. Sen embargo, a alteración medioambiental pode resultar en grandes cambios na microflora do solo. Os microorganismos manifestan moitas formas de vida diferentes dende autotrofia, litotrofia ata heterotrofia, sendo as formas de vida heterotróficas as que dinamizan a gran cantidade de carbono presente no solo (Winding *et al.*, 2005). Así tamén, os microorganismos serven de alimentación para moitos outros organismos do solo (Brookes, 1995). Ademais, levan a cabo moitos pasos na degradación e mineralización de complexos materiais orgánicos, aportando minerais beneficiosos para outros organismos. Neste aspecto, tamén poden degradar un amplo rango de compostos orgánicos antropoxénicos, incluíndo compostos problemáticos para o medio ambiente como o TNT (2,4,6-trinitrotolueno), tras unha axeitada modificación xenética (Burlage *et al.* 1989). Consecuentemente, a acción heterotrófica dos microorganismos resulta unha base crucial para o ecosistema do solo podendo ser empregados como determinantes da calidade do solo. Adicionalmente ao efecto no ciclo dos nutrientes, os microorganismos afectan as propiedades físicas do solo. A produción de polisacáridos de orixe extracelular e outros residuos celulares, axudan á formación e mantemento da estrutura do solo, levando a cabo unha función adhesiva que estabiliza os seus agregados. Pódense ver alteradas propiedades físicas coma a capacidade de retención de auga, ratio de infiltración, erosión, e susceptibilidade á compactidade (Elliot *et al.*, 1996).

Microorganismos e comunidades microbianas poden proporcionar unha medida da calidade do solo, un aspecto que non pode ser sempre obtido mediante medidas físicas e químicas e/ou con análises de organismos superiores. As comunidades microbianas adáptanse sensiblemente ao cambio das condicións medioambientais variando a súa actividade individual, polo incremento da reprodución de especies con características favorables e expandindo as capacidades de transferencia horizontal de xenes. Os microorganismos son moi sensibles a cambios e estrés ambiental porque se atopan intimamente relacionados co ambiente que os arrodea (Winding, 2005). En moitos casos, cambios na comunidade de microorganismos poden preceder cambios nas propiedades do solo, proporcionando signos de mellora ou perigo de degradación (Pankhurst *et al.*, 1995).

Son os primeiros milímetros do solo, dominados por cianobacterias e bacterias heterotróficas aerobias, a capa máis activa con respecto ao ciclo do carbono (Abed et al., 2006). Durante o día, esta capa que habitan está supersaturada coa produción fotosintética de osíxeno, máis durante a noite, as condicións anaerobias prevalecen a pesar da continua actividade respiratoria das bacterias heterotróficas aerobias (Canfiel e Des Marais, 1994), levando a cabo a eliminación da materia orgánica tanto en condicións aerobias coma anaerobias (Truu et al., 2009). Este é un dos papeis máis importantes asignados aos microorganismos do solo, sen embargo, posúen funcións adicionais coma a síntese de factores de crecemento (vitaminas e auxinas), fixación de nitróxeno atmosférico, produción de substancias agregables de solo e moitos outros. A importancia relativa dos fungos e bacterias non é tan coñecida coma os seus papeis desasimiladores. En xeral acéptase que as bacterias asimilan só unha mínima parte de produtos de desasimilación no seu corpo onde case a metade dos produtos de descomposición son transformados polos fungos en materiais celulares (Went e Stark, 1968). Ademais da importancia das bacterias heterotróficas aerobias e dos fungos, cabe destacar a función das bacterias fixadoras de nitróxeno, pois o nitróxeno é un elemento esencial para o soporte de todas as formas de vida (Shridhar, 2012). Podémolo atopar en aminoácidos e proteínas e outros compostos orgánicos derivados do proceso de fixación do nitróxeno (Egamberdieva e Kucharova, 2008). A fixación biolóxica de nitróxeno é levada a cabo exclusivamente por organismos procariotas que poden ser de vida libre ou simbióticos (Shridhar, 2012). Estas bacterias son moi apreciadas, sobre todo no sector da agricultura en zonas tropicais, onde a fixación biolóxica de nitróxeno resulta a máis axeitada que a fertilización convencional pola rápida perda dos fertilizantes nitroxenados debido as fortes chuvias torrenciais (Döbereiner, 1996).

Do dito anteriormente podemos extraer a importancia de bacterias heterotróficas aerobias, fungos e bacterias fixadoras de nitróxeno para o solo. Son estes os microorganismos seleccionados para a elaboración do presente traballo centrado na avaliación microbiana nun gradiente de solo industrial en terreos próximos a unha empresa do sector siderúrxico de grande importancia a nivel nacional e internacional. Utilizarase isto para intentar comprobar os posibles efectos da industrialización sobre a calidade e carga microbiolóxica de solos próximos, factor determinante para a calidade e saúde do solo.



## **Obxectivos**

Mostraxe dun solo próximo a unha zona industrial establecendo varios puntos de mostraxe ao longo do mesmo e recollendo un conxunto de mostras en gradiente (afastándose do centro industrial) co fin de avaliar a carga microbiana (bacterias heterotróficas totais, fungos e bacterias fixadoras de nitróxeno) mediante técnicas de sementeira en medios de enriquecemento selectivo. Tamén se tomarán medidas dos parámetros de humidade e pH, directamente relacionados coas características do solo e de gran influencia sobre os microorganismos que o habitan.

## Material e métodos

### Localización do solo

As mostras de solo foron tomadas no Concello de A Laracha (A Coruña - Galicia, España), máis concretamente na parroquia de Lendo (8° 36' 42.55" W, 43° 15' 45.07" N) (**Imaxe 1**), núcleo industrial máis importante do concello, onde se sitúa o parque empresarial constituído por empresas do sector siderúrxico e cerámico. A zona de mostreo é un terreo adxacente a unha empresa dedicada á siderurxia da cal están dispoñibles datos anuais sobre as súas emisións atmosféricas (PRTR España, Registro Estatal de Emisiones y Fuentes Contaminantes), tomadas como posible fonte de contaminación e repercusión sobre a microbiota do solo (**Táboa 1**).



Imaxe 1. Localización xeográfica do terreo da zona de mostreo. Sinalado cun punto vermello.

**Táboa 1.** Emisións atmosféricas da empresa do sector siderúrxico situada nos terreos adxacentes aos terreos mostreados. Fonte: PRTR España, Registro Estatal de Emisiones y Fuentes Contaminantes. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, Gobierno de España.

Contaminante	Ano de referencia	Cantidade total (Kg/ano)
Óxidos de nitróxeno	2008	104.000
Arsénico e compostos	2008	22
Cadmio e compostos	2009	66,6
	2010	16,6
Cromo e compostos	2007	319
	2008	505
Cobre e compostos	2008	149
	2009	106
Níquel e compostos	2008	68,8
Chumbo e compostos	2009	538

O procedemento analítico das mostras foi realizado no Laboratorio de Microbioloxía do Departamento de Bioloxía Celular e Molecular da Facultade de Ciencias, Universidade da Coruña.

### Técnica de mostraxe

A mostraxe é un paso crítico en estudos de avaliación ambiental (Boudreault *et al.*, 2012). O obxectivo da mostraxe de solos é obter información segura dun solo en particular. Aínda que as mostras son recollidas para obter a maior información da “poboación” (neste caso microbiolóxica), moitas veces poden non ser representativas dependendo de cómo as mostras foran recollidas (Crépin e Johnson, 1993). A representatividade das mostras de solo ten unha influencia directa en estudos financeiros, ambientais e de saúde pública (Boudreault *et al.*, 2012), de aquí a importancia da realización dunha mostraxe representativo e fiable.

A mostraxe exploratoria resulta axeitada para solos onde se poida presupoñer un impacto ou dano anticipado. O investigador pode deseñar entón un programa de mostraxe, sempre acorde a natureza da disturbancia, mobilidade dos posibles contaminantes e a división natural da paisaxe. A mostraxe exploratorio permite ademais o emprego de recursos e medios axeitados para cada laboratorio de traballo (Crépin e Johnson, 1993).

Neste caso particular, quérese avaliar a carga microbiana nun gradiente de solo industrial, polo que a mostraxe debe estar deseñada con ese fin. O terreo no cal se levou a cabo (Ver apartado Localización) ten unha superficie de aproximadamente 17000ha (**Imaxe 2**) cun total de 700m de lonxitude ao longo dos cales se estableceron 7 puntos de mostraxe, un cada 100m. Deste xeito conseguimos, ademais de abarcar unha grande amplitude de mostraxe, a finalidade do estudio coa recolección dun conxunto de mostras en gradiente para o seu análise microbiolóxico.



Imaxe 2. Terreo sobre o cal se realizou a mostraxe do solo. Coloreado en rosa a superficie ao longo da cal se realizou a mostraxe, 17000ha. Os puntos laranxas corresponden cos puntos de mostraxe. Fonte: Visor de mapas Iberprix, Instituto Geográfico nacional.

Os puntos de mostraxe ao longo do gradiente foron nomeados de M0 a M6 a medida que nos afastamos do punto con máis presenza industrial, como se pode apreciar na Imaxe 1.

As mostras foron recollidas a día 26 de marzo de 2015. En cada punto de mostraxe realizouse a extracción de 3 mostras nunha cantidade entre 250 e 300g de solo por mostra (Xu *et al.*, 2012) a unha profundidade de entre 0-20cm (Merlo *et al.*, 2014) en bolsas de plástico estériles. As mostras foron levadas ao laboratorio para a súa análise e almacenadas por un máximo de 24h en escuridade (Merlo *et al.*, 2014; Oliveira e Pampulha, 2006). Para evitar a contaminación cruzada de mostras polo instrumental da mostraxe, realizouse entre mostra e mostra unha desinfección química das súas superficies (Lewis, 2004) con alcol sanitario, composto orgánico con actividade microbiana de amplo espectro: bacterias gram negativas, gram positivas, micobacterias, fungos e virus (González *et al.*, 2014).

## Medios de cultivo

As técnicas de enriquecemento selectivo, baseadas no uso de inhibidores específicos e fontes de nutrientes, constitúen unha gran parte dos métodos para detectar grupos de microorganismos específicos no solo, e o seu desenvolvemento a día de hoxe segue a ser de gran importancia. Constitúe así un dos métodos para a enumeración de microorganismos viables no seu medio natural (Nybroe *et*

*al.*, 2007). Ao igual que Oliveira e Pampulha (2006), os microorganismos que foron cultivados a partir das mostras de solo foron: bacterias heterotróficas aerobias cultivables, fungos e bacterias fixadoras de nitróxeno.

O medio empregado para o cultivo de bacterias heterotróficas aerobias foi TSA (Tryptone Soya Agar) emendado con 0.1g/L de ciclohexamida para evitar o crecemento de fungos (Oliveira e Pampulha, 2006) (**Táboa 2**).

O medio empregado para o cultivo de fungos foi o medio Sabouraud-cloranfenicol, utilizado de forma habitual para o cultivo destes microorganismos (Guinea *et al.*, 2005) (**Táboa 3**). O antibiótico cloranfenicol evita o crecemento de bacterias, neste caso o medio posúe unha concentración de 0.5g/L.

Por último realizouse o cultivo de bacterias fixadoras de nitróxeno (NFB). Para o cultivo destas bacterias empregouse o medio de cultivo Ashby agar (Ashby, 1907) (**Táboa 4**).

**Táboa 2. Composición do medio de cultivo TSA utilizado para o cultivo de bacterias heterotróficas aerobias (Martin, 1975).**

Medio de cultivo TSA	
Caldo de soia	3g
Agar agar	15g
Auga destilada	1L

**Táboa 3. Composición do medio de cultivo Sabouraud-cloranfenicol utilizado para o cultivo de fungos (Tilles, 2006).**

Medio de cultivo Sabouraud-cloranfenicol	
Peptona granulada	10g
Glicerina neutra redestilada	40g
Agar agar	13g
Cloranfenicol	0.5g
Auga destilada	1L

**Táboa 4. Composición do medio de cultivo Ashby para o cultivo de bacterias fixadoras de nitróxeno (Ashby, 1907).**

Medio de cultivo Ashby Agar	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2g
MgSO <sub>4</sub>	0.2g
NaCl	0.2g
CaCO <sub>3</sub>	5g
CaSO <sub>4</sub>	0.1g
Manitol	10g
Agar agar	15g
Auga destilada	1L

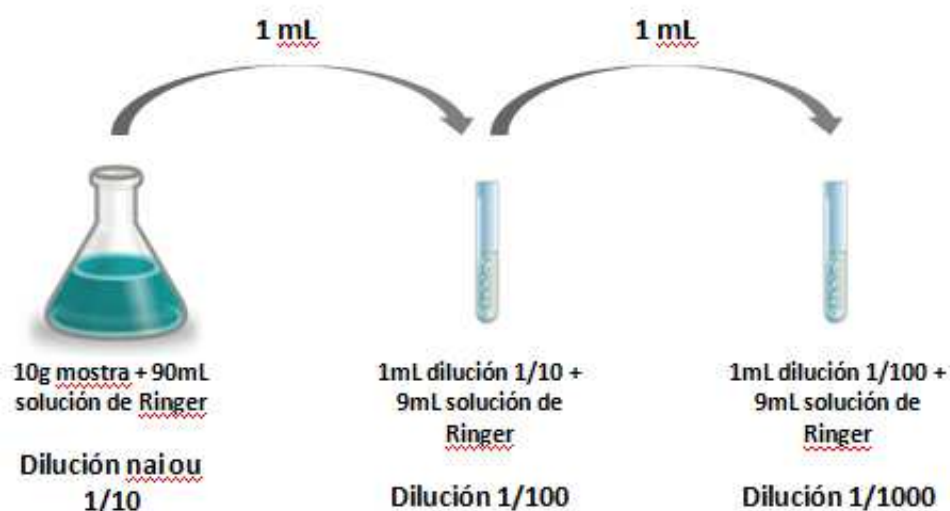
## Tratamento das mostras

Cada mostra de solo foi procesada de forma individual e baixo condicións de asepsia. Inicialmente cada mostra foi peneirada cun baruto de malla fina de 2mm de diámetro (Frey *et al.*, 2006. Forster, 1995). Tras isto realizáronse as dilucións de cada mostra. Para isto introducíronse 10g de solo nun matraz Erlenmeyer de 250mL con 90mL de solución de Ringer (solución salina) diluída un cuarto e autoclavada a 121°C durante 15min para evitar posibles contaminacións (Oliveira e Pampulha, 2006). Todo isto realizouse en condicións de asepsia grazas a utilización dun chisqueiro Bunsen e empregando material estéril.

A dispersión do solo resulta un paso crucial en moitas técnicas usadas para o estudo das bacterias do solo. A disrupción dos agregados do solo é esencial para a enumeración das bacterias (ben sexa por microscopía ou por reconto en placa). Unha extracción representativa da microbiota das mostras de solo require que as células se desunen das superficies das partículas e agregados (Lindahl,

1996). Por isto as dilución das mostras foron axitadas nun axitador automático durante 10-15min (Germida, 1993).

A dilución realizada é considerada coma a dilución 1/10 inicial ou dilución nai. Tras obter as dilucións de solo iniciais, procédese a realizar as dilucións seriadas que posteriormente serán sementadas. Para isto transfírese 1mL da dilución 1/10 inicial en condicións de asepsia, a un tubo de ensaio estéril con 9mL de solución de Ringer e coa axuda de puntas de pipeta estériles, obtendo deste xeito a dilución 1/100. Da mesma forma prepárase ata a dilución 1/1000 a partir da dilución 1/100, sempre en condicións de asepsia para evitar contaminacións (Khan *et al.*, 2008), obtendo así as dilucións seriadas (**Imaxe 3**). A realización das dilucións seriadas é necesario para un reconto en placa correcto, pois o número de u.f.c (unidades formadoras de colonias) para dar por válido un reconto debe de situarse entre as 30 e as 300 u.f.c.



Imaxe 3. Esquema que ilustra o procedemento para a preparación das dilucións seriadas.

## Técnicas de sementeira

O cálculo do número total de bacterias heterotróficas totais, bacterias fixadoras de nitróxeno e fungos foi realizado por reconto en placa sobre medios sólidos selectivos.

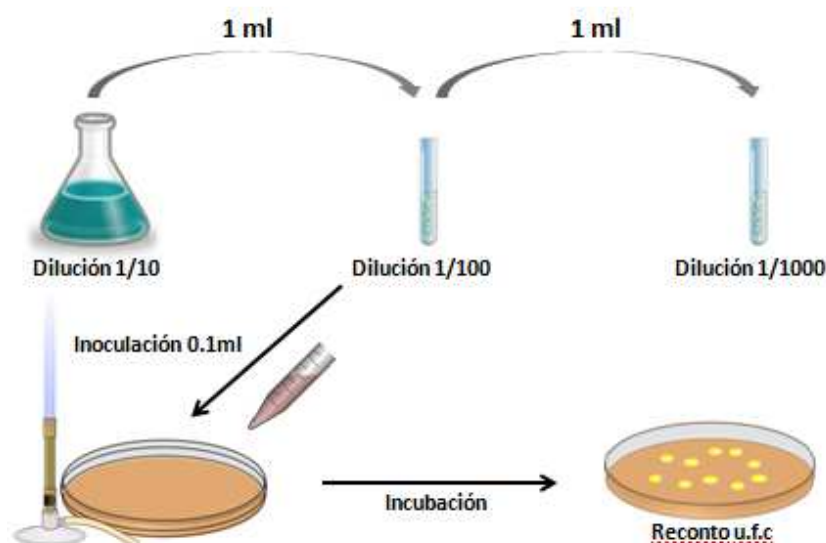
Para a sementeira empregáronse placas Petri estériles de 9cm de diámetro con 10mL de medio de cultivo autoclavado. Unha vez solidificados os medios de cultivos deixáronse arrefriar a temperatura ambiente (20-25°C) durante 24h (Germida, 1993). Tras isto, cada placa é inoculada con 0.1mL da dilución de solo axeitada (**Táboa 5**) coa axuda de pipetas automáticas e puntas de pipeta estériles (**Imaxe 4**).

Táboa 5. Dilucións de solo empregadas como inóculo dependendo do microorganismos a cultivar.

Microorganismo	Dilucións de solo empregadas para o cultivo
Bacterias heterotróficas aerobias	1/100 e 1/1000
Fungos	1/10 e 1/100
Bacterias fixadoras de nitróxeno	1/10

Cunha asa de Digralsky esténdese o inóculo de solución do solo para unha correcta dispersión e absorción do mesmo por todo o medio de cultivo (Olsen e Bakken, 1987). Todo isto realizado baixo condicións de asepsia para evitar contaminacións (Khan *et al.*, 2008), prestando especial atención á

esterilización con alcohol e posterior incineración da asa de Digrafsky para así evitar contaminacións cruzadas.



Imaxe 4. Esquema que ilustra o procedemento para a inoculación dos medios de cultivo

Cada mostra é sementada por triplicado para obter uns resultados finais máis fiables. Os tempos de incubación varían en función do tipo de microorganismo a cultivar, ao igual que as temperaturas de incubación (Táboa 6).

Táboa 6. Temperaturas e tempos de incubación dos distintos medios de cultivo utilizados. TSA (Oliveira e Pampulha, 2006), Sabouraud-cloranfenicol (Guinea *et al.*, 2005) e Ashby (Lin, 2012).

Medio de cultivo	Temperatura incubación (°C)	Tempo de incubación (Días)
TSA	25	4
Sabouraud-cloranfenicol	30	5
Ashby	30	3-5

## Medida de pH

A reacción do solo fai referencia ao grao de acidez ou basicidade do mesmo, xeralmente exprésase por promedio dun valor de pH. A forma máis usual de diagnosticar a condición de acidez ou basicidade dun solo, baséanse, pola súa rapidez e facilidade, na medida do pH nunha suspensión solo - auga. A concentración de protóns da solución do solo así medida proporciona un diagnóstico rápido dos efectos prexudiciais potenciais da acidez, mais non describe as causas (Porta, 1999).

Os efectos prexudiciais da acidez non se manifestan ata valores de pH inferiores a 5.5 pola toxicidade do aluminio e a pouca biodisponibilidade de elementos nutrientes. Os solos con carbonato cálcico, característicos de zonas semiáridas e áridas, teñen pH da orde de 7.5 a 8.5. Os termos sódico e alcalino deben de restrinxirse para aqueles solos de pH superiores a 8.5. Os que presentan pH de 9.0 a 12.0 conteñen carbonato sódico e as súas condicións tanto físicas coma químicas son moi desfavorables (Porta, 2009) (Táboa 7).



**Táboa 7. Principais efectos esperables para os distintos intervalos de pH en solos establecidos polo USDA en 1971 (United States Department of Agriculture).**

pH	Avaliación	Efectos esperables no intervalo
< 4.5	Extremadamente ácido	Condições moi desfavorables
4.5-5.0 5.1-5.5	Moi fortemente ácido Fortemente ácido	Posible toxicidade por Al <sup>3+</sup> e Exceso: Co, Cu, Fe, Mn, Zn Deficiencia: Ca, K, N, Mg, Mo, P, S Solos sen carbonato cálcico. Formigón ordinario atacado. Actividade microbiana escasa.
5.6-6.0 6.1-6.5 6.6-7.3	Medianamente ácido Lixeiramente ácido Neutro	Intervalo adecuado Máxima presenza de nutrientes Mínimos efectos tóxicos
7.4-7.8 7.9-8.4	Medianamente básico Básico	Solos xeralmente con CaCO <sub>3</sub> Diminúe a dispoñibilidade de P e B Deficiencia de: Co, Cu, Fe, Mn, Zn
8.5-9.0	Lixeiramente alcalino	En solos con carbonatos, estes pH altos poden deberse a MgCO <sub>3</sub>
9.1-10.0 <10	Alcalino Fortemente alcalino	Presenza de carbonato cálcico Toxicidade: Na, B Mobilidade do P como Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> Actividade microbiana escasa Os micronutrientes pouco dispoñibles, excepto Mo

Debido á gran importancia do pH sobre o solo, o cal repercute nas comunidades microbianas, realizouse a medida do mesmo nas distintas mostras. Para isto 10g de solo foron disoltos en 50ml de auga destilada en vasos de precipitado coa axuda dunha varíña de vidro, determinando o pH cun pHmetro marca *Crison Basic 20 pH*, en axitación continua tras o repouso da solución de solo durante 30min en auga destilada (Kamble *et al.*, 2014).

## Medida da humidade

Para realizar a medida da humidade de cada mostra empregouse un método de medida directo. O método empregado foi o método termogravimétrico, asumido coma o procedemento de referencia. Este método consiste en introducir a mostra de solo a analizar nunha estufa a 105 °C. O tempo que a mostra deberá de estar na estufa será de entre 24 e 48h ata que o peso da mesma sexa constante (Romano, 2014). Tras isto a humidade do solo é calculada da seguinte forma:

$$\% \text{ humidade} = \frac{Mh - (Ms - Mc)}{Mh} * 100$$

Onde:

\* *Mh* = masa do solo húmido

- \*  $M_s$  = masa do solo seco
- \*  $M_c$  = tarado ou peso da cápsula onde se introduce a mostra de solo

Deste xeito, 10g de cada mostra foron introducidos en recipientes termoestables, pesados, e introducidos na estufa a 105°C ata obter unha pesada estable. O medida da humidade é realizada por triplicado para cada mostra.

## Estatística: ANOVA e Test de Tukey

A análise de varianza (ANOVA) é un método de proba de igualdade de tres ou máis medidas poboacionais, por medio da análise das varianzas mostrales. Neste traballo empregouse a análise de varianza dun factor (ANOVA dun factor), que se emprega para probar as hipóteses de que tres ou máis medidas poboacionais son iguais, como en  $H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3$  (Triola, 2009). Para este test adoptamos un nivel de significación do 5% ( $\alpha=0.05$ ), o que significa que o resultado obtido ten un 95% de probabilidade de ser correcto. Como hipótese nula  $H_0$  e hipótese alternativa  $H_1$  tómanse os seguintes enunciados:

- \* Hipótese nula  $H_0$ : “Non existen diferenzas nas u.f.c/(g solo) entre os distintos puntos de mostraxe”
- \* Hipótese alternativa  $H_1$ : “Existen diferenzas nas u.f.c/(g solo) entre ao menos dous puntos de mostraxe”

A análise de varianza é tamén realizada sobre os datos de pH e humidade obtidos establecendo un valor de significación do 5% ( $\alpha=0.05$ ) e as seguintes hipóteses nula e alternativa:

### -Hipóteses pH

- \* Hipótese nula  $H_0$ : “Non existen diferenzas nos valores de pH entre os distintos puntos de mostraxe”
- \* Hipótese alternativa  $H_1$ : “Existen diferenzas nos valores de pH entre ao menos dous puntos de mostraxe”

### -Hipóteses humidade

- \* Hipótese nula  $H_0$ : “Non existen diferenzas nos valores de humidade entre os distintos puntos de mostraxe”
- \* Hipótese alternativa  $H_1$ : “Existen diferenzas nos valores de humidade entre ao menos dous puntos de mostraxe”

No caso de que unha proba ANOVA, rexeite a hipótese nula, e polo tanto se acepte que existen diferenzas nas u.f.c/(g solo), pH ou humidade entre os distintos puntos de mostraxe cunha probabilidade do 95%, realízase o Test de Tukey ou Test HSD (Honestly-Significant-Difference) de Tukey. Con esta proba trátase de perfilar e especificar unha hipótese alternativa. Neste caso, trátase de coñecer entre que puntos da mostraxe existen diferenzas no tocante as u.f.c/g solo de bacterias heterotróficas aerobias, fungos e bacterias fixadoras de nitróxeno, valores de pH e % humidade. Adóptase ao igual que na proba da análise de varianza un nivel de significación do 5% ( $\alpha=0.05$ ).

O programa empregado para esta labor foi Microsoft Office Excel 2007.



## Resultados

### Recontos

Os recontos para cada un dos tres tipos de microorganismos estudados son expresados en Log (u.f.c/g solo)  $\pm$  Log (Desviación estándar -S.D-), indicando o punto de mostraxe e a distancia no gradiente de solo correspondente a cada reconto de microorganismos. (Táboa 8).

Táboa 8. Recontos de bacterias heterotróficas totais, fungos e bacterias fixadoras de nitróxeno expresadas en Log u.f.c/(g solo) en relación co punto de mostraxe e distancia no gradiente de solo.

Punto de mostraxe/Distancia gradiente (m)	Promedio bacterias heterotróficas totais Log (u.f.c/g solo) $\pm$ Log (S.D)	Promedio fungos Log (u.f.c/g solo) $\pm$ Log (S.D)	Promedio bacterias fixadoras de nitróxeno Log (u.f.c/g solo) $\pm$ Log (S.D)
M0/100	4.40 $\pm$ 0.060	3.48 $\pm$ 0.056	1.78 $\pm$ 0.426
M1/200	4.49 $\pm$ 0.137	3.73 $\pm$ 0.032	2.02 $\pm$ 0.337
M2/300	4.59 $\pm$ 0.016	3.66 $\pm$ 0.131	2.96 $\pm$ 0.078
M3/400	4.81 $\pm$ 0.071	3.52 $\pm$ 0.018	3.28 $\pm$ 0.027
M4/500	4.86 $\pm$ 0.025	3.43 $\pm$ 0.042	2.73 $\pm$ 0.101
M5/600	4.88 $\pm$ 0.040	3.34 $\pm$ 0.074	3.35 $\pm$ 0.011
M6/700	5.03 $\pm$ 0.037	2.78 $\pm$ 0.320	3.75 $\pm$ 0.010

Para facilitar a observación e a análise dos datos obtidos, empregáronse representacións gráficas dos tres tipos de microorganismos analizados: bacterias heterotróficas totais (Figura 1), fungos (Figura 2) e bacterias fixadoras de nitróxeno (Figura 3).

### Bacterias Heterotróficas Totais

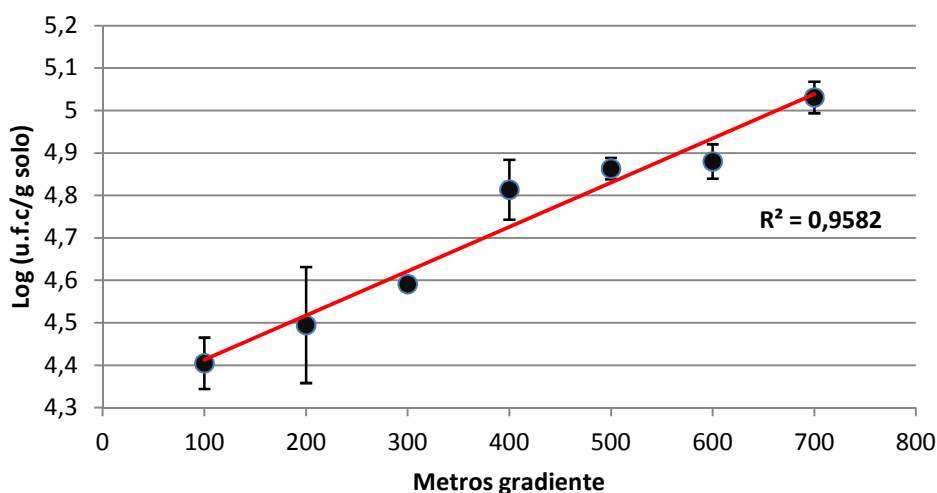
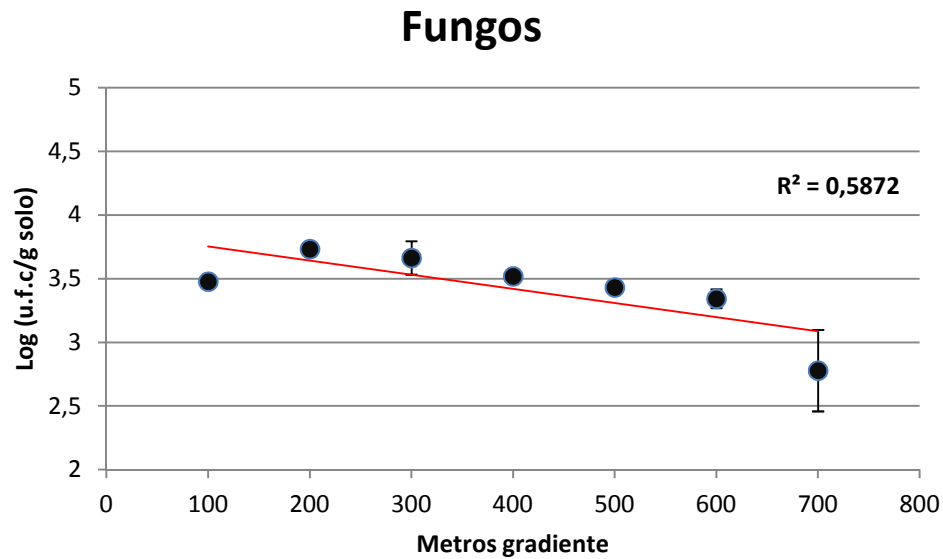


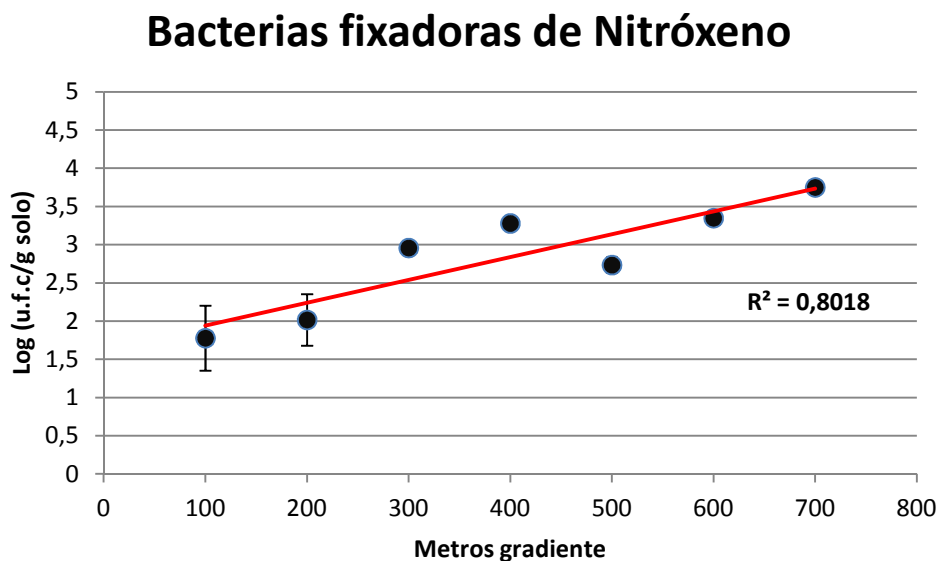
Figura 1. Representación gráfica da distancia no gradiente de solo en metros fronte a bacterias heterotróficas totais expresadas en u.f.c/(g solo) coa súa desviación estándar.

Na Figura 1 pódese observar como a medida que se aumenta no gradiente (afastándose do núcleo industrial), o contido de bacterias heterotróficas aerobias totais aumenta de forma case proporcional. De feito o valor de  $R^2=0.9582$  apoia o dito anteriormente, pois o grado de relación entre as dúas variables distancia - u.f.c/(g solo) é moi alto.

Na **Figura 2** pódese observar como as u.f.c de fungos diminúen a medida que se avanzano gradiente. Aínda que se observan datos puntuais que non se axustan a unha diminución continua e constante, observamos unha tendencia a redución do número de u.f.c/(g solo) de fungos no gradiente.



**Figura 2.** Representación gráfica da distancia no gradiente de solo en metros fronte a fungos expresados en u.f.c/(g solo) coa súa desviación estándar.



**Figura 3.** Representación gráfica da distancia no gradiente de solo en metros fronte a bacterias fixadoras de nitróxeno expresadas en u.f.c/(g solo) coa súa desviación estándar.

Na **Figura 3** vese como a medida que aumenta a distancia no gradiente, tamén aumenta o número de u.f.c de bacterias fixadoras do nitróxeno, feito similar ao que acontece co reconto de bacterias heterotróficas totais (**Figura 1**). Obtemos neste caso un  $R^2=0.8018$ , o cal é un valor o suficientemente alto como para considerar unha relación entre as dúas variable distancia - u.f.c/(g solo).

Todos estes resultados deben de ser interpretados coa axuda da estatística, de forma que se poida confirmar verdadeiramente, como se ven afectadas as distintas comunidades de microorganismos estudadas.

## pH

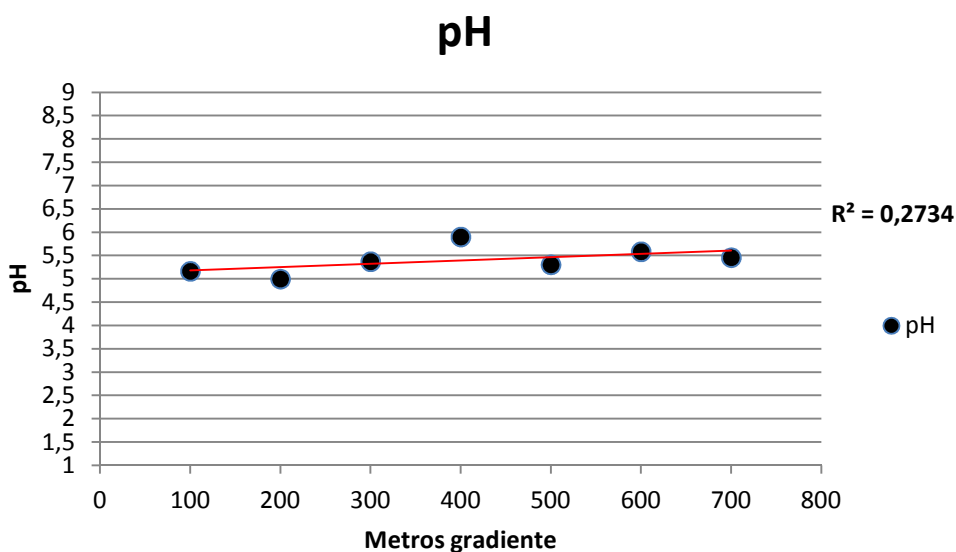
A medida de pH realízase coa intención de observar valores máis ou menos constantes ao longo de todo o gradiente. Deste xeito podemos descartalo como unha fonte “problema” dos datos obtidos nos recontos de microorganismos. Os datos do pH preséntanse como o promedio dos valores obtidos en cada punto de mostraxe acompañados da súa desviación estándar (S.D) (**Táboa 9**).

**Táboa 9.** Valores de pH en función de cada mostra de solo.

Punto de mostraxe	Promedio pH $\pm$ S.D
M0	5.25 $\pm$ 0.078
M1	5.24 $\pm$ 0.067
M2	5.32 $\pm$ 0.204
M3	5.48 $\pm$ 0.297
M4	5.23 $\pm$ 0.116
M5	5.49 $\pm$ 0.154
M6	5.39 $\pm$ 0.066

Os valores de pH no solo mostreado, establécense nun rango entre o valor de 5.23 e 5.49 cun promedio de  $5.34 \pm 0.140$ , podendo clasificalo como un solo fortemente ácido ou medianamente ácido (**Táboa 7**). Mediante a representación gráfica dos datos de pH, podemos obter un  $R^2=0.2734$ , o que nos indica a pouca relación que se establece entre as dúas variables representadas metros gradiente - pH (**Figura 4**).

A desviación estándar resulta tan mínima que é imposible de representar na gráfica con éxito en moitos casos, o cal aporta maior rigor ao feito de que os valores de pH se manteñen dunha forma constante nas mostras recollidas en cada punto de mostraxe (**Táboa 9**). Grazas a representación gráfica, pódese observar con máis facilidade a constancia deste parámetro ao longo do solo mostreado, podendo concluír que non causa un impacto importante nos resultados, pois todos os organismos se verán afectados coa mesma magnitude de pH, variando só en 0.140 puntos (**Figura 4**). Isto debe de ser comprobado coas probas estatísticas.



**Figura 4.** Representación gráfica da distancia no gradiente do solo en metros fronte ao promedio das medidas de pH para cada punto de mostraxe.

## Humidade do solo

Os datos referentes a humidade do solo exprésanse en tanto por cento, facendo referencia a cantidade de auga presente no mesmo. O cálculo para a porcentaxe de humidade realizouse de acordo coa fórmula do apartado de “Medida de humidade”. Os valores de humidade representáanse en función do punto de mostraxe analizado (**Táboa 10**).

Táboa 10. Valores de humidade expresados en % en función de cada punto de mostraxe.

Punto de mostraxe	% humidade $\pm$ S.D
M0	25.32 $\pm$ 0.266
M1	21.84 $\pm$ 0.327
M2	33.33 $\pm$ 0.330
M3	27.45 $\pm$ 0.391
M4	30.07 $\pm$ 0.086
M5	29.15 $\pm$ 0.244
M6	23.88 $\pm$ 0.272

A humidade ao longo do gradiente de solo non parece variar moito. Se nos apoiámos no valor de  $R^2 = 0.0192$  que nos aporta a representación gráfica pódese concluír que non existe relación entre as variables representadas metros gradiente - % humidade (**Figura 5**). Este parámetro resulta moi importante, pois a auga presente no solo inflúe moito na actividade microbiana (Paradelo e Barral, 2009), sen embargo, e debido a linearidade amosada ao longo do gradiente, pódese dicir que, neste caso, trátase dun factor que non inflúe nos resultados finais. Isto debe de ser comprobado coas probas estatísticas de varianza dun factor ANOVA. O promedio de % de humidade sitúase nun  $27.35\% \pm 0.084$ .

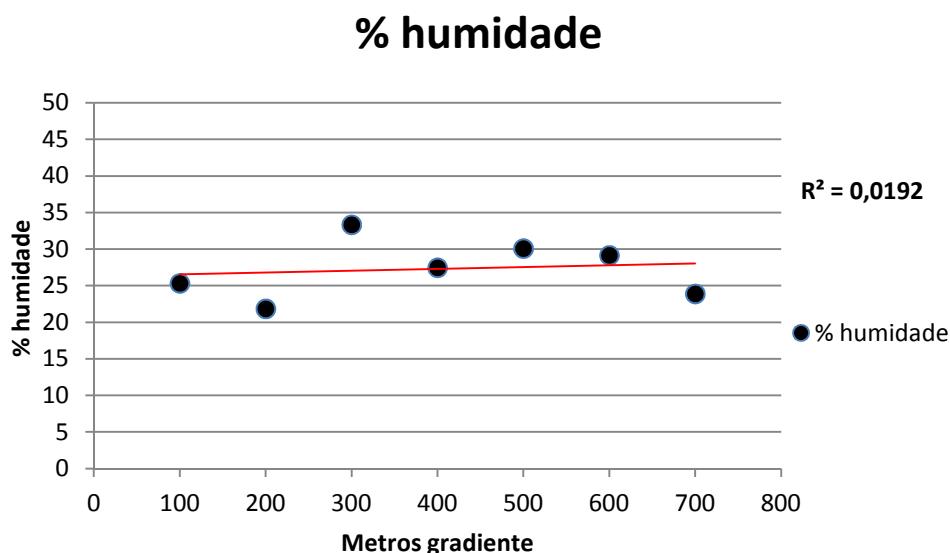


Figura 5. Representación gráfica da distancia no gradiente do solo en función da porcentaxe de humidade

## Probas estatísticas: ANOVA e Test de Tukey

As probas ANOVA realizáronse para cada un dos tres grupos de microorganismos analizados. Establécese un nivel de significación de  $\alpha=0.05$ , co cal os p-valor obtidos menores de 0.05 levan ao rexeitamento da hipótese nula (“Non existen diferenzas nas u.f.c/(g solo) entre os distintos puntos de

mostraxe”), aceptando a hipótese alternativa (“Existen diferenzas nas u.f.c/(g solo) entre ao menos dous puntos de mostraxe”) (Táboa 11).

**Táboa 11. Resultados das probas estatísticas ANOVA para cada un dos tres tipos de microorganismos analizados.**

Probas ANOVA				
Microorganismo	Nivel significación $\alpha$		p-valor ANOVA	Resultado
Bacterias heterotróficas aerobias	0.05	>	0.0001	Rexeito $H_0$
Fungos	0.05	>	0.003	Rexeito $H_0$
Bacterias fixadoras de nitróxeno	0.05	>	4.09E-09	Rexeito $H_0$

En todos os casos se rexeita a hipótese nula aceptando a hipótese alternativa: “Existen diferenzas nas u.f.c/(g solo) entre ao menos dous puntos de mostraxe”. Debido a isto, realizase o Test de Tukey ou Test HSD. Deste xeito pódese saber entre que puntos de mostraxe se atopan esas diferenzas, podendo así confirmar a existencia dun gradiente de concentración de u.f.c/(g solo). Ao igual que o ANOVA, o Test de Tukey realizase para cada un dos tres grupos de microorganismos estudados.

pH e humidade son dous parámetros sobre os que se realizou da mesma forma o análise da varianza ANOVA, establecendo un nivel de significación de  $\alpha=0.05$ . Os p-valores obtidos en ámbolos dous casos non son significativos (Táboa 12), polo que se aceptan as hipóteses nulas establecidas para pH e humidade. Deste xeito podemos afirmar que non existen diferenzas entre os valores de pH e humidade medidos ao longo do gradiente de solo analizado.

**Táboa 12. Resultados das probas estadísticas ANOVA para os parámetros de pH e humidade.**

Probas ANOVA				
Parámetros	Nivel de significación $\alpha$		p-valor ANOVA	Resultado
pH	0.05	<	0.2723	Acepto $H_0$
Humidade	0.05	<	0.9563	Acepto $H_0$

Os resultados do Test de Tukey son interpretados da seguinte forma :

Para cada grupo de microorganismo realízase a comparación entre os distintos puntos de mostraxe. Os resultados son expresados nunha táboa para unha mellor comprensión, permitindo observar de forma sinxela entre que puntos de mostraxe de cada grupo de microorganismos analizados existen diferenzas cunha probabilidade do 95%. As comparacións nas que o Test de Tukey resulta significativo indícanse cun asterisco (\*) (Anexo I. Táboa I).

## Discusión

A cantidade de metais acumulados en solos dependen moito do nivel de emisión, transporte do metal dende a fonte ao lugar de acumulación e da retención do metal unha vez alcanza o solo (Alloway, 1995). Algúns metais coma zinc, cobre, níquel e cromo son esenciais ou beneficiosos micronutrientes para plantas, animais e microorganismos, sen embargo outros coma o cadmio, chumbo ou mercurio non teñen funcións biolóxicas/fisiolóxicas coñecidas. Sen embargo, todos estes metais poden ser tóxicos a certas concentracións (Gadd, 1992). Cando os microorganismos son expostos a moderadas concentracións de metais, pódese observar a súa gran sensibilidade aos mesmos (Guiller et al., 1998). Moitos estudos amosan a adversa influencia dos metais sobre os microorganismos, afectando ao seu crecemento, morfoloxía e actividades (Baath et al., 1998, Khan and Scullion, 2002), incluíndo a fixación de nitróxeno (McGrath et al., 1988). Os metais mencionados anteriormente, coinciden coas emisións atmosféricas da industria siderúrxica adxacente ao terreo sobre o que se realizou o estudo (**Táboa 1**).

As concentracións anómalas de metais en solos son provocadas en gran parte por factores antropoxénicos, de feito existen moitos estudos nos que se demostra a acumulación de metais en solos por deposición aérea de partículas emitidas por actividades industriais (Fabiatti et al., 2009). Un exemplo do mencionado anteriormente é aportado por Klumpp et al., (2003), onde a contaminación do aire resulta na acumulación de sulfuro, cobre e arsénico en follas de árbores froiteiras e os efectos destes metais nas propiedades microbiolóxicas do solo.

As actividades industriais de minería, fundición e procesamento contaminan o solo e os recursos acuíferos con metais ao longo de todo o mundo (Valery e Eugene, 1998). Os procesos xeoquímicos que actúan sobre as perdas de produtos derivados da metalurxia, inician procesos de transporte e redistribución de metais dende áreas contaminadas a solos próximos, correntes de aire e auga subterránea (Wang et al., 2006). Esta contaminación por metais en solos é un risco importante para a saúde humana e o medio ambiente, a cal cada vez se incrementa máis (Yanez et al., 2002) debido a rápida industrialización e urbanización no desenvolvemento de moitos países (Xu et al., 2014). Os solos así contaminados resultan na redución da diversidade microbiana e a súa actividade (Lasat, 2002). Os microorganismos do solo afectados, levan a cabo importantes papeis na reciclaxe de nutrientes, mantemento da estrutura do solo e detoxificación do mesmo (Filip, 2002). Deste xeito, as alteracións na composición microbiana son propostas a miúdo coma un bo indicador dos efectos antropoxénicos na ecoloxía do solo (Renella et al., 2005). De feito, Wang et al. (2007), observaron que o 54% da variación na actividade microbiolóxica nun gradiente de solo contaminado con zinc e cobre, pode ser explicada polas concentracións de metais extraídas do solo.

En canto as concentracións de u.f.c/(g de solo) dos tres grupos de microorganismos analizados, coinciden de forma aproximada, cos datos aportados por Oliveira e Pampulha (2006), no seu estudio sobre os efectos da contaminación por metais sobre as características microbianas. Isto pode inspirar conclusións sobre que efectivamente nos solos analizados se establece un gradiente microbiano debido a contaminación por metais da industria próxima debido as emisións atmosféricas.

As bacterias heterotróficas aerobias xunto coas bacterias fixadoras de nitróxeno seguen unha mesma dinámica poboacional, aumentando a medida que nos desprazamos no gradiente de solo (**Figuras 1 e 3**). Pola contra, os fungos amosan unha dinámica totalmente oposta, diminuindo a medida que nos desprazamos no gradiente de solo (**Figura 2**). Esta diversidade microbiana atípica xunto coa súa actividade, a miúdo proporcionan un mellor indicador do ambiente físico e químico do solo que os simples análises físico - químicos (Bardhan *et al.*, 2012), o cal non fai máis que apoiar a posibilidade de que o solo sobre o que se realizou o estudo, está sendo alterado dalgunha forma.

Os factores ambientais que controlan a distribución e abundancia de plantas e animais ao longo dos biomas terrestres foron estudados durante séculos, máis os factores ambientais que controlan a distribución e abundancia dos microorganismos do solo, seguen aínda sen entenderse (Rousk et al., 2010). En relación con isto, a humidade, factor moi importante na actividade microbiana (Paradelo e Barral, 2009), resulta constante ao longo de todo o gradiente de solo analizado cun promedio de

27.35% e unha desviación de 0.084 puntos. A proba estatística ANOVA apoia a constancia do parámetro humidade por presentar resultados non significativos ( $p$ -valor  $> 0.05$ ) (**Táboa 12**). Recentes estudos demostraron que cambios na microbiota do solo atópanse fortemente correlacionados coas diferenzas na composición química do solo (Frey et al., 2004). Coñécese que o pH do solo ten un efecto considerable na actividade das comunidades microbianas e nos procesos bioquímicos que estas levan a cabo (Nicol et al., 2010) ademais de afectar a concentración, forma química e dispoñibilidade de substratos (Kemmitt et al., 2006) influenciando o crecemento de ditas comunidades. O pH do solo resulta constante ao longo do gradiente de solo ( $p$ -valor  $> 0.05$ ) (**Táboa 12**), amosando un rango de valores entre 5.23 e 5.49 cun promedio de 5.34 e unha desviación de tan só 0.140 puntos, valores tolerables para os microorganismos. Son valores ácidos, aínda que sen grandes variacións debido ao poder tamponador do solo. Por outra parte, os fungos son moito máis tolerantes a pH's ácidos que as bacterias (Porta, 1999) sendo tamén miles de veces máis tolerantes a exposición a metais que as bacterias, presentando un 45% da súa variabilidade debida a concentración de metais (Rajapaksha, 2010). A distribución de grupos microbianos funcionais no solo, pode estar gobernada pola interacción entre o ambiente do solo e a presenza ou ausencia de formas competidoras ou facilitadoras, de feito os fungos están correlacionados coa distribución de grupos funcionais de bacterias, incluíndo algúns grupos que median na produción e consumo de importantes gases de efecto invernadoiro (Burke *et al.*, 2012). Ademais está comprobado que os fungos, son capaces de desprazar totalmente as comunidades bacterianas ante a concentración inusual dun composto fronte ao cal non son competidoras, dándose casos tan extremos coma o estudado por Mumtaz *et al.* (2013), onde os fungos desprazan as bacterias en medios co incremento da concentración de uranio no medio. Isto sucede pola gran capacidade de biorremediación que posúen os fungos do solo, debido as características descritas anteriormente, sendo capaces incluso de eliminar arsénico de solos destinados a agricultura (Srivastava et al., 2011). Isto coincide cos resultados obtidos neste traballo, onde a concentración de fungos é moito máis abundante nas zonas próximas (**Figura 2**) a industria siderúrxica sospeitosa de contaminación por metais debido a súas emisións atmosféricas (**Táboa 1**), por ser moito máis competitivos e resistentes. Do mesmo xeito explicaría o feito de que as concentracións de bacteria heterotróficas aerobias e fixadoras de nitróxeno sexan maiores canto máis afastadas se atopen do foco industrial (**Figura 1 e 3**).

Todo o anterior apoia a hipótese de que existe algún tipo de contaminación por metais ou alteración do solo, o que explicaría a dinámica poboacional que seguen as bacteria heterotróficas aerobias, fungos e bacterias fixadoras de nitróxeno.

Os resultados obtidos neste traballo contribúen ao avance na comprensión da dinámica de poboacións microbianas en solos industriais, importante característica da saúde e calidade do solo. Aínda así os resultados tan só permiten a observación dun gradiente de concentración en canto as u.f.c/(g de solo) de bacterias heterotróficas aerobias, fungos e bacterias fixadoras de nitróxeno a medida que nos afastamos do punto de concentración industrial, dende o cal se producen emisión atmosféricas de distintas características (**Táboa 1**). Deste xeito tan só se observa a posible repercusión destas emisións sobre a microbiota de solos próximos, non así a causa ou causas directas que a inflúen.

Segundo autores coma Blake *et al.* (1999), aínda que moitos esforzos foron postos para reducir a contaminación do aire nos últimos anos, moitas rexións entre as que se inclúen moitas zonas de Estados Unidos e Europa, seguen sufrindo serios problemas medioambientais resultado de actividades industriais e combustión de combustibles fósiles. Isto segue sendo un problema a tratar hoxe en día, 15 anos despois de que Blake *et al.* o fixeran ver no ano 1999.

## Conclusi3ns/ Conclusions

- \* A concentraci3n no solo de bacterias heterotr3ficas aerobias (u.f.c/g solo) aumenta a medida que avanzamos no gradiente de solo.
- \* A concentraci3n no solo de bacterias fixadoras de nitr3xeno (u.f.c/g solo) aumenta a medida que avanzamos no gradiente de solo.
- \* A concentraci3n no solo de fungos (u.f.c/g solo) diminúe a medida que avanzamos no gradiente de solo.
- \* A dinámica poboacional de bacterias heterotr3ficas aerobias e bacterias fixadoras de nitr3xeno mostra unha clara isomería con respecto a dinámica poboacional de fungos no gradiente de solo industrial analizado.

- 
- \* Aerobic heterotrophic bacteria concentration (u.f.c/g soil) increase as we move in the soil gradient.
  - \* Nitrogen-fixing bacteria concentration (u.f.c/g soil) increase as we move in the soil gradient.
  - \* Fungi concentration (u.f.c/g soil) decrease as we move in the soil gradient.
  - \* Aerobic heterotrophic bacteria and nitrogen-fixing bacteria populations dynamics, show a clear isomeric mode respect to fungi population dynamic in the analyzed industrial soil gradient.



## Bibliografía

- ABED, R. M. M., ZEIN, B., AL-THUKAIR, A. e DE BEER, D. (2006). Phylogenetic diversity and activity of aerobic heterotrophic bacteria from a hypersaline oil-polluted microbial mat. *Systematic and Applied Microbiology* 30, pp. 319-330.
- ALLOWAY, B. J. (1995). Introduction. In: Alloway, B. J. (Ed.), *Heavy Metals in Soils*. Blackie Academic & Professional, pp. 3-9.
- ASHBY, S. F. (1907). Some observations on the assimilation of atmospheric nitrogen by a free living soil organism-Azobacter chroococcum of Beijerinck. *Journal of Agriculture Science* 2, pp. 35-51.
- BAATH, E., DÍAZ-RAVINA, M., FROSTEGARD, A. e CAMPBELL, C. D. (1998). Effect of metal-rich sludge amendments on the soil microbial community. *Applied Environmental Microbiology* 64, pp. 238-245.
- BARDHAN, S., JOSE, S., JENKINS, M. A., WEBSTER, C. R., UDAWATTA, R. P. e STEHN, S. E. (2012). Microbial community diversity and composition across a gradient of soil acidity in spruce-fir forests of the southern Appalachian Mountains. *Applied Soil Ecology* 61, pp. 60-68.
- BLAKE, L., GOULDING, K. W. T., MOTT, C. J. B. e JHNSTON, A. E. (1999). Changes in soil chemistry accompanying acidification over more than 100 years under woodland and grass at Rothamsted Experimental Station, UK. *European Journal of Soil Science* 50, pp. 401-412.
- BOUDREAULT, J. P., DUBÉ, J. S., SONA, M. e HARDY, E. (2012). Analysis of procedures for sampling contaminated soil using Gy's Sampling Theory and Practice. *Science of the Total Environment* 425, pp. 199-207.
- BROOKES, P. C. (1995). The use of microbial parameters in monitoring soil pollution by heavy metals. *Biology and Fertility of Soils* 19.4, pp. 269-179.
- BROWN, R., GRAY, D. J. e TYE, D. (1995). Hydride generation ICPMS (HG-ICP-MS) for ultra low level determination of mercury in biota. *Water Air Soil Pollut* 80, pp. 1237-1245.
- BURKE, D. J., SMEMO, K. A., LÓPEZ-GUTIÉRREZ, J. C. e DEFOREST, J. L. (2012). Soil fungi influence the distribution of microbial functional groups that mediate forest greenhouse gas emissions. *Soil Biology & Biochemistry* 53, pp. 112-119.
- CANFIELD, D. E. e DES MARAIS, D. J. (1994). Cycling of carbon, sulfur, oxygen and nutrients in a microbial mat. *Science* 251, pp. 1471-1473.
- COOK, F. J. e ORCHARD, V. A. (2008). Relationships between soil respiration and soil moisture. *Soil Biology & Biochemistry* 40, pp. 1013-1018.
- CRÉPIN, J. e JOHNSON, R. L. (1993). Soil sampling for environmental assessment. In: Carter, M. R. (Ed.), *Soil Sampling and Methods of Analysis*. Lewis Publishers, pp. 5-24.
- DÖBEREINER, J. (1996). Biological nitrogen fixation in the tropics: social and economic contributions. *Soil Biology Biochemistry* 29, pp. 771-774.
- DORAN, J.W. e SAFLEY, M. (1997). Defining and assessing soil health and sustainable productivity. In: Pankhurst, C. E., Doube, B. M. e Gupta, V. V. S. R. (Eds.), *Biological Indicators of Soil Health*. CAB International, Wallingford, pp. 1-28.
- EGAMBERDIEVA, D. e KUCHAROVA, Z. (2008). Cropping effects on microbial population and nitrogenase activity in saline arid soil. *Turkish Journal of Biology* 32, pp. 85-90.

- ELLIOT, L. F., LYNCH, J. M. e PAPENDICK, R. I. (1996). The microbial component of soil quality. In: Stotzky, G. e Bollag, J. -M. (Eds.), *Soil Biochemistry*. Marcel Dekker, New York, pp. 1-21.
- FABIETTI, G., BIASIOLI, M., BARBERIS, R. e AJMONE-MARSAN, F. (2009). Soil contamination by organic and inorganic pollutants at the regional scale: the case of Piedmont, Italy. *Journal of Soils Sediments* 10, pp. 290-300.
- FOSTER, J. C. (1995). Soil sampling, handling, storage and analysis. *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press, London, pp. 49-121.
- FREY, B., STEMMER, M., WIDMER, F., LUSTER, J. e SPERISEN, C. (2006). Microbial activity and community structure of a soil after heavy metal contamination in a model forest ecosystem. *Soil Biology & Biochemistry* 38, pp. 1745-1756.
- FREY, S. D., KNORR, M., PARRENT, J. L. e SIMPSON, R. T. (2004). Chronic nitrogen enrichment affects the structure and function of the soil microbial community in temperate hardwood and pine forests. *Forest Ecology and Management* 196, pp. 159-171.
- GADD, G. M. (1992). Metals and microorganisms: a problema of definition. *FEMS Microbiology Letters* 100, pp. 197-204.
- GERMIDA, J. J. (1993). Soil sampling for enviromental assessment. In: Carter, M. R. (Ed.), *Soil Sampling and Methods of Analysis*. Lewis Publishers, pp. 263-275.
- GONZÁLEZ, L. L., PÉREZ GUTIÉRREZ, M. I., MENÉNDEZ LUCIO-VILLEGAS, M. E., LLUCH, N. A., AGUSTÍ MORATÓ, M. L e CACHAFEIRO, S. P. (2014). Introducción a los antisépticos. *Atención primaria* 46, pp. 1-9.
- GUILLER, K. E., WITTER, E. e MCGRATH, S. P. (1998). Toxicity of heavy metals to microorganims and microbial process in agricultural soils: a review. *Soil Biology and Biochemistry* 30, pp. 1389-1414.
- GUILLER, K. E., WITTER, E. e MCGRATH, S. P. (2009). Heavy metals and soil microbes. *Soil Biology & Biochemistry* 41, pp. 2031-2037.
- GUINEA, J., PELÁEZ, T., ALCALÁ, L. e BOUZA, E. (2005). Evaluation of Czapeck agar and Sabouraud dextrose agar for the cultura of airborne *Aspergillus* conidia. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 53, pp. 333-334.
- HALVORSON, J. J., SMITH, J. L. e PAPENDICK, R. I. (1997). Issues of scale for evaluating soil quality. *Journal of Soil and Water Conservation*, pp. 26-30.
- HAYAT, R., ALI, S., AMARA, U., KHALID, R. e AHMED, I. (2010). Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Annals of Microbiology* 60. 4, pp. 579-598.
- INSAM, H. (2001). Developments in soil microbiology since the mid 1960s. *Geoderma* 100, pp. 389-402.
- KAMBLE, P. N., GAIKWAD, V. B., KUCHEKAR, S. R. e BAATH, E. (2014). Microbial growth biomass, community structure and nutrient limitation in high pH and salinity soils from Pravaranagar (India). *European Journal of Soil Biology* 64, pp. 87-95.
- KEMMITT, S. J., WRIGHT, D., GOULDING, K. W. T. e JONES, D. L. (2006). pH regulation of carbon and nitrogen dynamics in two agricultural soils. *Soil Biology & Biochemistry* 38, pp. 898-911.
- KHAN, M. e SCULLION, J. (2002). Effects of metal (Cd, Cu, Ni, Pb or Zn) enrichment of sewage-sludge on soil micro-organisms and their activities. *Applied Soil Ecology* 20, pp. 145-155.

- KHAN, MD. H. R., MOHIUDDIN, MD. E RAHMAN, M. (2008). Enumeration, isolation and identification of nitrogen-fixing bacterial strains at seedling stage in rhizosphere of rice grown in non-calcareous grey flood. *Journal of the Faculty of Environmental Science and Technology* 13.1, pp. 97-101.
- KLUMPP, A., HINTEMANN, T., SANTANA-LIMA, J. e KANDELER, E. (2003). Bioindication of air pollution effects near a copper smelter in Brazil using mango trees and soil microbiological properties. *Environmental Pollution* 126, pp. 313-321.
- LASAT, M.M. (2002). Phytoextraction of toxic metals: a review of biological mechanisms. *Journal of Environmental Quality* 31, pp. 109-120.
- LEWIS, S. e MCLINDOE, A. K. (2004). Cleaning, disinfection and sterilization of equipment. *Equipment and Clinical Physics* 5.11, pp. 360-363.
- LIN, L., LI, Z., HU, C., ZHANG, X., CHANG, S., YANG, L., LI, Y. e AN, Q. (2012). Plant growth-promoting nitrogen-fixing enterobacteria are in association with sugarcane plant growing in Guangxi, China. *Microbes and Environment* 27.4, pp. 391-398.
- LINDAHL, V. (1996). Improved soil dispersion procedures for total bacterial counts, extraction of indigenous bacteria and cell survival. *Journal of Microbiological Methods* 25, pp. 279-286.
- MARTIN, J. K. (1975). Comparison of agar media for counts of viable bacteria. *Soil Biology Biochemistry* 7, pp. 401-402.
- MCGRATH, S. P., BROOKES, P. C. e GILLER, K. E. (1988). Effects of potential toxic metals in soil derived from past applications of sewage sludge on nitrogen fixation by *Trifolium repens* L. *Soil Biology and Biochemistry* 20, pp. 415-424.
- MERLO, C., REYNA, L., ABRIL, A., AMÉ, M. V. e RAIMONDI, S. G. (2014). Environmental factors associated with heterotrophic nitrogen-fixing bacteria in water, sediment, and riparian soil of Suquia River. *Limnologia* 48, pp. 71-79.
- MUGICA, V., AMADOR, M. A., TORRES, M. e FIGUEROA, J.J. (2003). Mercurio y metales tóxicos en cenizas provenientes de procesos de combustión e incineración. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 19.2, pp. 93-100.
- MUMTAZ, S., STRETEN-JOYCE, C., PARRY, D. L., MCGUINNESS, K. A., LU, P. e GIBB, K. S. (2013). Fungi outcompete bacteria under increased uranium concentration in culture media. *Journal of Environmental Radioactivity* 120, pp. 39-44.
- NANNIPIERI, P., ASCHER, J., CECCHERINI, M. T., LANDI, L., PITRAMELLARA, G. e RENELLA, G. (2003). Microbial diversity and soil functions. *European Journal of Soil Science* 54, pp. 655-670.
- NANNIPIERI, P. e BADALUCCO, L. (2003). Biological processes. In: *Processes in the Soil-Plant System: Modelling Concepts and Applications* (eds D. K. Nambi & R. Nieder). The Haworth Press, Binghamton, NY, in press.
- NYBROE, O., BRANDT, K. K., NICOLAISEN, M. H. e SØRENSEN, J. (2007). Methods to detect and quantify bacteria in soil. In: Van Elsas, J. D., Jansson, J. K. e Trevors, J. T. (Eds.), *Modern Soil Microbiology*, second edition. CRC Press, pp. 303-305.
- NICOL, G. W., LEININGER, S., SCHLEPER, C. e PROSSER, J. I. (2006). The influence of soil pH on the diversity, abundance and transcriptional activity of ammonia oxidizing archaea and bacteria. *Environmental Microbiology* 10.11, pp. 2966-2978.
- NRIAGU, J. O. e PACYNA, J. M. (1988). Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. *Nature* 333, pp. 134-139.

- OLSEN, R. A. e BAKKEN, L. R. (1987). Viability of soil bacteria: optimization of plate-counting technique and comparison between total counts and plate counts within different size groups. *Microbial Ecology* 13, pp. 59-74.
- PANKHURST, C. E., HAWKE, B. G., McDONALD, H. J., KIRKBY, C. A., BUCKERFIELD, J. C., MICHELSEN, P., O'BRIEN, K. A., GRUPTA, V. V. S. R. e DOUBE, B. M. (1995). Evaluation of soil biological properties as potential bioindicators of soil health. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 35, pp. 1015-1028.
- PARADELO, R. e BARRAL, M. T. (2009). Effect of moisture and disaggregation on the microbial activity of soil. *Soil & Tillage Research* 104, pp. 317-319.
- PARR, J. F., PAPENDICK, R. J., HORNICK, S. B. e MEYER, R. E. (1992). Soil quality: Attributes and relationship to alternative and sustainable agriculture. *American Journal of Alternative Agriculture* 7, pp. 5-11.
- PORTA, J. (1999). Acidez, basicidad y reacción del suelo. In: Porta, J., López-Acevedo, M. e Roquero, C. (Eds.), *Edafología para la agricultura y el medio ambiente, segunda edición*. Ediciones Mundi-Prensa, pp. 217-220.
- PORTA, J. (1999). Introducción. In: Porta, J., López-Acevedo, M. e Roquero, C. (Eds.), *Edafología para la agricultura y el medio ambiente*. Ediciones Mundi-Prensa, pp. V-VI.
- RAJAPAKSHA, R. M. C. P. (2010). Heavy metal tolerance of culturable bacteria and fungi in a long-term cultivated tropical ultisol. *European Journal of Soil Biology* 47, pp. 9-15.
- RENELLA, G., MENCH, M., LANDI, L. e NANNIPIERI, P. (2005). Microbial activity and hydrolase synthesis in long-term Cd-contaminated soils. *Soil Biology and Biochemistry* 37, pp. 133-139.
- REZA, R. e SINGH, G. (2010). Heavy metal contamination and its indexing approach for river water. *International Journal of Environment Science and Technology* 7.4, pp. 785-792.
- ROMANO, N. (2014). Soil moisture at local scale: Measurements and simulations. *Journal of Hydrology* 516, pp. 6-20.
- ROUSK, J., BAATH, E., BROOKES, P. C., LAUBER, C. L., LOZUPONE, C., CAPORASO, J. G., KNIGHT, R. E FIERER, N. (2010). Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. *The ISME Journal* 4, pp. 1340-1351.
- SHRIDHAR, B. S. (2012). Review: nitrogen fixing microorganisms. *International Journal of Microbiological Research* 3.1, pp. 46-52.
- SRIVASTAVA, P. K., VAISH, A., DWIVEDI, S., CHAKRABARTY, N. S. e TRIPATHI, R. D. (2011). Biological removal of arsenic pollution by soil fungi. *Science of the Total Environment* 409, pp. 2430-2442.
- TILLES, G. (2006). L'invention du "milieu de Sabouraud", un progrès décisif en mycologie médicale. *La Presse Médicale* 35, pp. 1403-1405.
- TRIOLA, M. F. (2009). Análisis de varianza. In: Triola, M. F. (Ed.), *Estadística, décima edición*. Pearson, pp. 637.
- TRUU, M., JUHANSON, J. e TRUU, J. (2009). Microbial biomass, activity and community composition in constructed wetlands. *Sci. Total Environment* 407, pp. 3958-3971.
- VALERY, B. e EUGENE, K. (1998). Soil surface geochemical anomaly around the copper-nickel metallurgical smelter. *Water Air Soil Pollut* 103, pp. 197-218.

WANG, Y-P., SHI, J-Y., LIN, Q., CHEN, X-C. e CHEN, Y-X. (2007). Heavy metal availability and impact on activity of soil microorganisms along a Cu/Zn contamination gradient.

WINDING, A., HUND-RINKE, K. e RUTGERS, M. (2005). The use of microorganisms in ecological soil classification and assessment concepts. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 62, pp. 230-248.

WENT, F. W. e STARK, N. (1968). *The biological and mechanical role of soil fungi*. University of Nevada, Reno.

XU, C.-W., YANG, M.-Z., CHEN, Y.-J., CHEN, L.-M., ZHANG, D.-Z., MEI, L., SHI, Y.-T. e ZHANG, H.-B. (2012). Changes in non-symbiotic nitrogen-fixing bacteria inhabiting rhizosphere soils of an invasive plant *Ageratina adenophora*. *Applied Soil Ecology* 54, pp. 32-38.

XU, X., ZHAO, Y., ZHAO, X., WANG, Y. e DENG, W. (2014). Sources of heavy metal pollution in agricultural soils of a rapidly industrializing area in the Yangtze Delta of China. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 108, pp. 161-167.

YANEZ, L., ORTIZ, D., CALDERÓN, J., BATRES, L., CARRIZALES, L., MEJÍA, J., MARTÍNEZ, L., GARCÍA-NIETO, E. e DÍAZ-BARRIGA, F. (2002). Overview of human health and chemical mixtures: problems facing developing countries. *Environmental Health Perspectives* 10. 6, pp. 901-909.

## Anexo I

Táboa I. Resultado da proba Test de Tukey dos tres grupos de microorganismos analizados. As relacións entre puntos de mostraxe que resultan en diferenzas significativas en canto a u.f.c/(g de solo) cunha probabilidade do 95% indícanse cun asterisco (\*).

Microorganismo	Bacterias heterotróficas aerobias							
		M <sub>0</sub>	M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>3</sub>	M <sub>4</sub>	M <sub>5</sub>	M <sub>6</sub>
Bacterias heterotróficas aerobias	M <sub>0</sub>				*	*	*	*
	M <sub>1</sub>				*	*	*	*
	M <sub>2</sub>					*	*	*
	M <sub>3</sub>	*	*				*	*
	M <sub>4</sub>	*	*	*				*
	M <sub>5</sub>	*	*	*				*
	M <sub>6</sub>	*	*	*	*	*	*	
Fungos	Fungos							
		M <sub>0</sub>	M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>3</sub>	M <sub>4</sub>	M <sub>5</sub>	M <sub>6</sub>
	M <sub>0</sub>		*	*	*	*	*	*
	M <sub>1</sub>	*		*	*	*	*	*
	M <sub>2</sub>	*	*		*	*	*	*
	M <sub>3</sub>	*	*	*		*	*	*
	M <sub>4</sub>	*	*	*	*		*	*
	M <sub>5</sub>	*	*	*	*	*		*
M <sub>6</sub>	*	*	*	*	*	*		
Bacterias Fixadoras nitróxeno	Bacterias fixadoras de nitróxeno							
		M <sub>0</sub>	M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>3</sub>	M <sub>4</sub>	M <sub>5</sub>	M <sub>6</sub>
	M <sub>0</sub>		*	*	*	*	*	*
	M <sub>1</sub>	*		*	*	*	*	*
	M <sub>2</sub>	*	*		*	*	*	*
	M <sub>3</sub>	*	*	*		*	*	*
	M <sub>4</sub>	*	*	*	*		*	*
M <sub>5</sub>	*	*	*	*	*		*	
M <sub>6</sub>	*	*	*	*	*	*		

