

Estudio correlacional entre las propiedades físico-químicas y microbiológicas de los suelos de Puchuncaví aledaños a la refinería CODELCO Ventanas

Natali Zamora Bugueño

15-10-2020

Introducción

Chile basa gran parte de su economía en la extracción, refinación y exportación de metales como el cobre y zinc, posicionándose a nivel mundial entre los primeros países con mayor producción, llegando a aportar hasta un 31,5% de demanda mundial de cobre (Comisión Chilena de Cobre, <http://www.cochilco.cl>), cuya producción que se genera principalmente entre las regiones norte a centro del país. Los problemas ambientales asociados con la minería son ampliamente conocidos, particularmente en relación a la contaminación de suelos con metales, elementos que disminuyen la calidad y presentan riesgo para el buen funcionamiento de este (Bloem et al. 2005). Gran parte de esta producción se centra en las regiones centrales y sur del país, donde ocurre un solapamiento de los sectores productivos generando contaminación de metales en suelos de carácter agrícola; como lo reporta (Parra et al. 2014). Si bien se conoce la respuesta de algunas bacterias a la presión causada por elevadas concentraciones de metales, no existen estudios que evalúen cómo se comportan aislados ambientales que se encuentran en suelos que ya tienen altas concentraciones de estos elementos. Es por esto que el presente estudio es del tipo exploratorio con alcance correlacional y descriptivo en donde se caracterizará las características físico-químicas y biológicas medidas en los suelos aledaños a empresas mineras. Conociendo la problemática que se presenta en los suelos de la región de Valparaíso los cuales tienen registro de actividad minera y refinadora de cobre por los últimos 60 años, nos preguntamos qué ocurre la diversidad bacteriana de los suelos aledaños a las refinerías de cobre y cómo les afecta la presencia de altas concentraciones de metales pesados, lo cual será proyectado a través de un modelo lineal simple o múltiple desarrollado en la investigación.

Metodología:

Área de estudio: Para el presente estudio, se seleccionaron los sectores de Puchuncaví pertenecientes a la Región de Valparaíso, como áreas de estudio ya que presentan suelos de carácter agrícola históricamente contaminados. Para cada muestra se registraron las coordenadas y el tipo de cultivo presente. En cada punto se tomaron cuatro muestras de igual tamaño las cuales fueron mezcladas y posteriormente tamizadas en una malla de 2 mm para obtener una sola muestra compuesta. Las muestras fueron conservadas a 4°C hasta su uso. Cabe mencionar que los muestreos y ensayos realizados fueron realizados durante el año 2015 bajo el alero del proyecto FONDECYT 1150503 en el laboratorio de Microbiología de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso (PUCV).

Determinación de las características físico-químicas: Para determinar las características físico-químicas generales de los suelos, se recolectó 1 kg desub-muestra la cual fue guardada en bolsas resellables y una alícuota de 50 gr fue guardada en tubo falcon bajo condiciones estériles para los análisis microbiológicos. Cada sub-muestra fue secada a 40°C por 48 horas. Las características físico-químicas generales de los suelos

(conductividad eléctrica, pH, contenido de materia orgánica, relación carbono-nitrógeno y texturas) fueron determinadas por métodos de rutina (Verdejo et al. 2015). Las concentraciones de cobre disponible y de metales totales y solubles fueron determinadas por espectroscopia atómica de masas. Los análisis fueron realizados por el Laboratorio de Suelos y Análisis Foliar de la Facultad de Agronomía de la PUCV durante el año 2015.

Determinación del número de bacterias en las muestras de suelo: Para la determinación del número de bacterias totales presentes en los suelos en estudio se realizó un recuento de bacterias totales mediante microscopía de epifluorescencia usando las tinciones SYTOX y SYTOX 13 (Dahal et al. 2017).

Determinación de la diversidad de las muestras de suelos: Los datos de diversidad obtenidos en este estudio son a partir del análisis del índice de diversidad alfa Shannon-Wiener (H) cuyo índice fue obtenido mediante la incubación a 25°C por 168 horas de placas EcoPlate (BIOLOG). A la cuales se les midió la absorbancia a una longitud de onda de 592 nm en el lector de placas TECAN. Tras obtener las absorbancias, estos valores eran empleados en la fórmula de diversidad de Shannon-Wiener en donde pi corresponde a la relación de la actividad sobre cada sustrato (absorbancia de ese determinado sustrato) sobre la suma de las actividades de todos los sustratos (suma de todas las absorbancias). Considerándose los sustratos con una OD > 0,25 (Boshoff et al. 2014; Viti et al. 2008).

Análisis estadísticos: Los análisis estadísticos descriptivos, inferenciales y modelos, empleados en este estudio fueron realizados en RStudio versión 1.3.959 mediante el uso de los paquetes como “bookdown”, “tidyverse”, “dplyr”, “kableExtra”, “knitr”, “tinytex”, “FactoMineR”, “factoextra”, “broom” y “ggplot2” para la posterior visualización gráfica de los resultados.

Resultados

Descripción de datos

A partir de los resultados presentados en la tabla 1. Se puede determinar que el pH promedio de las muestras de suelos es 6,34. Mientras que el promedio del porcentaje de materia orgánica es 3,19%, el promedio de conductividad eléctrica que poseen los suelos es 1,01. En cuanto a la textura de los suelos, estos poseen un porcentaje promedio de arena del 82,4%, de limo 13,38% y arcilla, 4,22%. Por otra parte, la concentración de metales pesados, los suelos de Puchuncaví poseen en promedio 42,77 mg/kg de plomo, 380,95 mg/Kg de cobre, 140,15 mg/Kg de Zinc, 1,16 mg/kg de cadmio y 23,03 mg/kg de arsénico, cuyos resultados se presentan en la tabla 1. En términos de parámetros biológicos, en promedio los suelos muestreados poseen $9,45 \times 10^6$ UFC/g suelo y además, poseen una diversidad promedio de 2,83. Los resultados mencionados anteriormente presentados en la tabla 2.

Table 1: Medias de las variables físico-químicas medidas en las muestras de los suelos de Puchuncaví. Cabe mencionar que EC corresponde a la electroconductividad, OM se refiere al porcentaje de materia orgánica en los suelos analizados, sand corresponde al porcentaje de arena, clay al porcentaje de arcilla y silt es el porcentaje de limo. En cuanto a los metales pesados estos son presentados en unidades de mg/Kg

pH	EC	OM	sand	clay	silt	plomo	cobre	zinc	cadmio	arsenico
6.34	1.01	3.19	82.4	4.22	13.38	42.77	380.95	140.15	1.16	23.03

Table 2: Medias de las variables biológicas medidas en las muestras de los suelos de Puchuncaví. Cabe mencionar que la columna bacterias corresponde al recuento bacteriano presente en los suelos expresado en UFC/gr de suelo

bacterias	diversidad
945000	2.83

Análisis de correlación:

En términos del análisis de correlación de Pearson ($P < 0,05$) entre las variables físico-químicas y biológicas se obtuvieron correlaciones débiles a moderadas y algunas con tendencia negativa. En este caso nos enfocaremos en los valores de los coeficientes de correlación entre las variables físico-químicas y biológicas, cuya visualización es presentada a través de una matriz en la figura 1. En dicha figura se puede destacar existe una correlación moderada entre pH y el recuento de bacterias en los suelos. Mientras que existe una relación débil entre el recuento bacteriano y el porcentaje de arena, porcentaje de arcilla (inversa), concentración total de cobre, concentración total de Zinc y concentración total de Cadmio. Además, se observa que existe una correlación muy débil o inexistente entre las variables de recuento bacteriano y Electroconductividad, porcentaje de materia orgánica, porcentaje de nitrógeno (inversa), porcentaje de carbono, porcentaje de limo (inversa), concentración total de plomo, concentración total de arsénico y la variable diversidad. Por otra parte, en el caso de la variable diversidad, se observa que existe una correlación débil entre esta variable y electroconductividad, porcentaje de materia orgánica, porcentaje de carbono, porcentaje de nitrógeno, porcentaje de arena (inversa), porcentaje de limo y concentración total de cobre. También, se observa la presencia de correlaciones muy débiles o inexistente entre la variable diversidad y pH (inversa), porcentaje de arcilla, concentración total de plomo, concentración total de zinc, concentración total de cadmio, concentración total de arsénico y la variable de recuento bacteriano en los suelos implicados en el estudio.

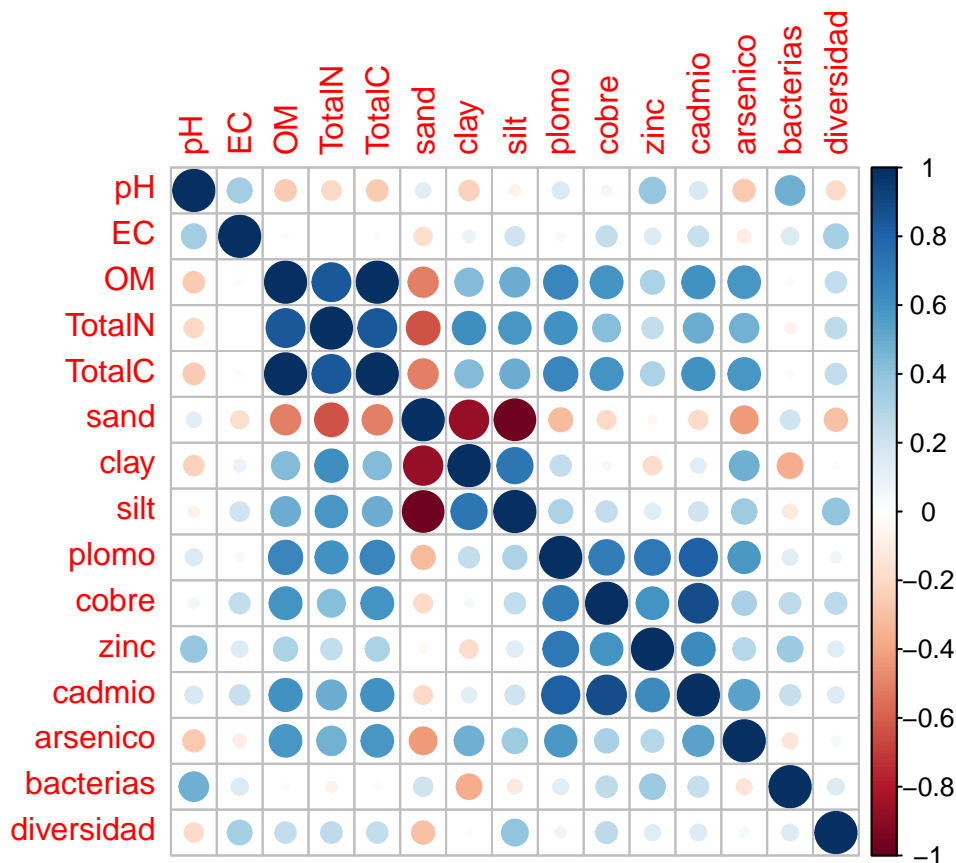


Figure 1: Matriz de análisis de correlación entre variables físico-químicas y biológicas.

Modelo propuesto entre las variables físico-químicas y biológicas:

A la hora de proponer un modelo resulta interesante explicar la diversidad bacteriana en términos del valor del pH, pues se ha observado que los sitios contaminados con metales pesados son lugares que varían desde pH ácidos a ligeramente ácidos. Por lo que sería importante tener un modelo lineal que permita predecir la diversidad bacteriana en términos del pH. Ante esta premisa, es importante observar como están relacionadas dichas variables de manera lineal. Por lo que en la figura 2, se puede observar una gráfica de dispersión que denota una relación lineal muy débil o inexistente e inversa.

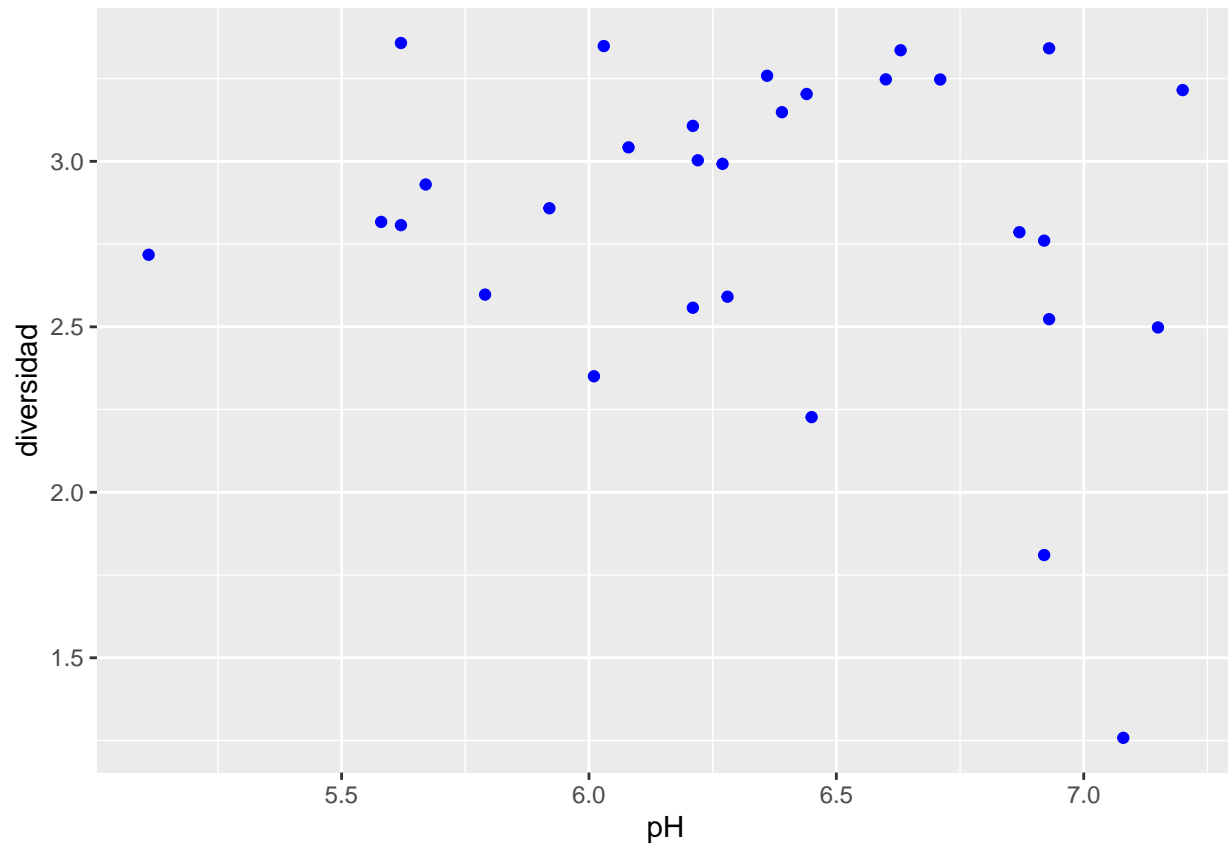


Figure 2: Gráfica de dispersión de variables pH y diversidad bacteriana.

En la sección anterior, se demostró que existe una correlación muy débil o inexistente entre ambas variables, lo cual es importante a la hora de proponer modelos ya que no debe existir el problema de multicolinealidad entre las variables, esto quiere decir, que no debe existir un coeficiente de correlación muy alto entre las variables, lo cual se cumple en este caso. Los indicadores estadísticos del modelo de diversidad explicado por pH presentados en la tabla 3 y tabla 4, indican que el modelo planteado no es el más correcto debido al valor de r cuadrado, al alto valor del criterio de información de Akaike y al valor de p-value. Además, al observar la gráfica presentada en la figura 3 construida a partir de los valores de los residuales presentados en la tabla 5, se obtiene una gráfica que no posee una distribución normal, obteniéndose una gráfica desplazada hacia la derecha y con asimetría, lo cual indica que el modelo propuesto, no es el mejor. Por lo que, se deben proponer nuevos modelos, proponiendo modelos de regresión múltiples con otras variables regresoras que pudiesen explicar de mejor forma la variable diversidad.

Table 3: Indicadores estadísticos de modelo propuesto diversidad explicado por la variable pH

r.squared	adj.r.squared	sigma	statistic	p.value	df	logLik	AIC	BIC	deviance	df.residual	nobs
0.04	0	0.48	1.14	0.3	1	-19.46	44.91	49.12	6.43	28	30

Table 4: Indicadores estadísticos de modelo propuesto donde la diversidad es explicada a partir de la variable pH obtenidos mediante tidy.

term	estimate	std.error	statistic	p.value
(Intercept)	3.96	1.06	3.74	0.0
pH	-0.18	0.17	-1.07	0.3

Table 5: Predicciones y residuales del modelo propuesto en el estudio: diversidad explicada por la variable pH.

diversidad	pH	.fitted	.resid	.std.resid	.hat	.sigma	.cooks
3.25	6.60	2.79	0.46	0.99	0.04	0.48	0.02
3.34	6.93	2.73	0.62	1.33	0.08	0.47	0.07
3.34	6.63	2.78	0.56	1.19	0.04	0.48	0.03
3.20	6.44	2.81	0.39	0.83	0.03	0.48	0.01
3.25	6.71	2.77	0.48	1.03	0.05	0.48	0.03
3.35	6.03	2.89	0.46	0.99	0.04	0.48	0.02
3.36	5.62	2.96	0.40	0.87	0.10	0.48	0.04
3.22	7.20	2.68	0.54	1.20	0.12	0.48	0.10
3.26	6.36	2.83	0.43	0.91	0.03	0.48	0.01
3.11	6.21	2.85	0.25	0.54	0.04	0.49	0.01
2.52	6.93	2.73	-0.20	-0.44	0.08	0.49	0.01
2.99	6.27	2.84	0.15	0.32	0.03	0.49	0.00
2.76	6.92	2.73	0.03	0.07	0.07	0.49	0.00
2.60	5.79	2.93	-0.33	-0.72	0.07	0.48	0.02
2.82	5.58	2.97	-0.15	-0.33	0.10	0.49	0.01
1.81	6.92	2.73	-0.92	-1.99	0.07	0.45	0.16
2.79	6.87	2.74	0.05	0.11	0.07	0.49	0.00
3.15	6.39	2.82	0.33	0.69	0.03	0.48	0.01
1.26	7.08	2.70	-1.44	-3.17	0.10	0.39	0.55
2.56	6.21	2.85	-0.30	-0.63	0.04	0.48	0.01
2.59	6.28	2.84	-0.25	-0.53	0.03	0.49	0.00
2.86	5.92	2.91	-0.05	-0.10	0.05	0.49	0.00
2.81	5.62	2.96	-0.15	-0.33	0.10	0.49	0.01
3.00	6.22	2.85	0.15	0.32	0.04	0.49	0.00
2.93	5.67	2.95	-0.02	-0.04	0.09	0.49	0.00
2.35	6.01	2.89	-0.54	-1.15	0.05	0.48	0.03
2.72	5.11	3.05	-0.33	-0.78	0.22	0.48	0.08
3.04	6.08	2.88	0.16	0.35	0.04	0.49	0.00
2.23	6.45	2.81	-0.58	-1.24	0.03	0.47	0.03
2.50	7.15	2.69	-0.19	-0.42	0.11	0.49	0.01

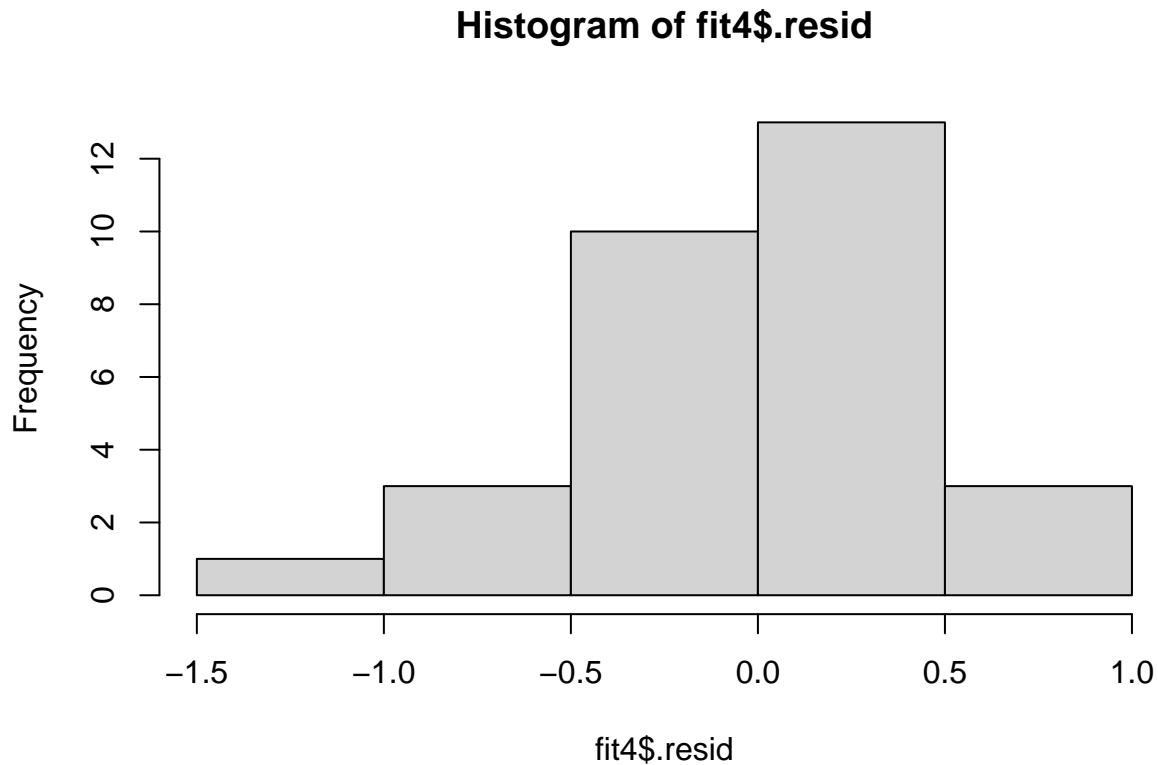


Figure 3: Histograma residuales

Dado los resultados presentados anteriormente, dejan a la vista que deben proponerse nuevos modelos que se ajusten mejor a las variables. Por lo que explicaremos la diversidad con otras variables, como por ejemplo, la presencia de las variables de concentración de metales pesados que fueron medidos en el estudio (cobre, Zinc, plomo y arsénico). En la tabla 6, se presentan diversos modelos que fueron propuestos: $\text{Diversidad} \sim \text{pH} + \text{Cobre}$, $\text{Diversidad} \sim \text{pH} + \text{Cobre} + \text{Plomo}$, $\text{Diversidad} \sim \text{pH} + \text{Cobre} + \text{Plomo} + \text{Arsénico}$ y $\text{Diversidad} \sim \text{pH} + \text{Cobre} + \text{Plomo} + \text{Arsénico} + \text{Zinc}$.

Cabe mencionar que para realizar la elección de un buen modelo, se deben tener las siguientes consideraciones:

1. Elegir el modelo que posee el valor de delta AIC mayor a 2.
2. Elegir el modelo con el valor AIC más bajo.
3. elegir el modelo que contenga la menor cantidad de variables predictoras entre los modelos clasificados AIC (por respeto al principio de parsimonia).

A partir de los resultados de la tabla 6, se logró observar mediante el valor de AIC y delta AIC (mayor a 2) que entre los diferentes modelos propuestos, los mejores modelos eran: $\text{Diversidad} \sim \text{pH} + \text{Cobre} + \text{Plomo} + \text{Arsénico}$ y $\text{Diversidad} \sim \text{pH} + \text{Cobre} + \text{Plomo} + \text{Arsénico} + \text{Zinc}$. Si bien estos dos modelos poseen altos valores de AIC con respecto a los demás modelos, cabe destacar que poseen mayores valores de delta AIC por lo que estarían cumpliendo con las primeras dos consideraciones. En términos de elegir cual es el mejor entre los dos. El mejor es el modelo: $\text{Diversidad} \sim \text{pH} + \text{Cobre} + \text{Plomo} + \text{Arsénico}$, ya que además, posee un menor número de variables predictoras con respecto al modelo $\text{Diversidad} \sim \text{pH} + \text{Cobre} + \text{Plomo} + \text{Arsénico} + \text{Zinc}$, por lo que respeta el principio de parsimonia.

Table 6: Tabla con valores de r^2 y valor del criterio de información de Akaike (AIC) de los diferentes modelos propuestos en el estudio

r.squared	AIC	Modelo	DeltaAIC
0.11	44.49	Diversidad ~ pH + Cobre	0.00
0.04	44.91	Diversidad ~ pH	0.43
0.13	45.90	Diversidad ~ pH + Cobre + Plomo	1.41
0.13	47.85	Diversidad ~ pH + Cobre + Plomo + Arsénico	3.36
0.16	48.85	Diversidad ~ pH + Cobre + Plomo + Arsénico + Zinc	4.36

Discusiones y conclusión

En (Kuppusamy et al. 2016), se describieron los efectos de los metales y de los hidrocarburos aromáticos en la diversidad y abundancia de las comunidades microbianas a largo plazo, encontrando que en un periodo de disturbio, las comunidades bacterianas se ven fuertemente influenciadas generando una gran reducción en la diversidad, partiendo con una selección de bacterias resistentes (Chibuike and Obiora 2014). Sin embargo, cuando se presenta una periodicidad de disturbio (contaminación) durante un tiempo prolongado, las comunidades bacterianas resistentes de estos suelos tienden a desarrollarse y en un periodo largo de tiempo no se observan diferencias significativas entre las abundancias de un suelo poco contaminado a uno altamente contaminado (Aleem, Isar, and Malik 2003; Kuppusamy et al. 2016). Los suelos 30 analizados en este estudio han sido afectados por contaminantes durante aproximadamente 60 años con periodos de contaminación constante (Altimira et al. 2012; Parra et al. 2014; Salmanighabeshi et al. 2015). Los suelos de los diferentes biomas alojan distintos ensamblajes de taxas microbianas, cuya estructura y composición se ve fuertemente influenciado por el parámetro ambiental de pH. Los suelos con pH neutro poseen una mayor diversidad a nivel de phylum con respecto a los suelos que poseen mayor acidez y alcalinidad (Fierer et al. 2012). Debido a la elevada contaminación y al interés que generan estos suelos por ser de carácter agrícola, es de vital importancia poseer un mecanismo de recuperación que restaure la salud de estos ecosistemas.

En conclusión, los factores abióticos como los metales pesados influyen el valor de las variables biológicas como la diversidad. Los metales pesados generan una presión selectiva sobre la estructura y composición de las comunidades bacterianas. Donde aquellas que poseen mecanismos de resistencia hacia altas concentraciones de los metales implicados en el estudio, lograrán subsistir en la comunidad. Si bien en el presente trabajo, se cumplieron los objetivos propuestos en un principio, en futuros estudios realizaría otros modelos con otras variables físico-químicas complementado con análisis multivariados como análisis de componentes principales (PCA), de manera de determinar la relación e influencia de las variables físico-químicas sobre las variables biológicas.

Referencias

- Aleem, Asma, Jasmine Isar, and Abdul Malik. 2003. "Impact of Long-Term Application of Industrial Wastewater on the Emergence of Resistance Traits in *Azotobacter Chroococcum* Isolated from Rhizospheric Soil." *Bioresource Technology* 86 (1): 7–13.
- Altimira, Fabiola, Carolina Yanez, Guillermo Bravo, Myriam Gonzalez, Luis A Rojas, and Michael Seeger. 2012. "Characterization of Copper-Resistant Bacteria and Bacterial Communities from Copper-Polluted Agricultural Soils of Central Chile." *BMC Microbiology* 12 (1): 1–12.
- Bloem, J, AJ Schouten, Soren Johannes Sorensen, M Rutgers, AK van der Werf, and AM Breure. 2005. "Monitoring and Evaluating Soil Quality." In *Microbiological Methods for Assessing Soil Quality*, 23–49. CABI.

- Boshoff, Magdalena, Maarten De Jonge, Freddy Dardenne, Ronny Blust, and Lieven Bervoets. 2014. "The Impact of Metal Pollution on Soil Faunal and Microbial Activity in Two Grassland Ecosystems." *Environmental Research* 134: 169–80.
- Chibuike, Grace U, and Smart C Obiora. 2014. "Heavy Metal Polluted Soils: Effect on Plants and Bioremediation Methods." *Applied and Environmental Soil Science* 2014.
- Dahal, Bibha, Gitanjali NandaKafle, Lora Perkins, and Volker S Brozel. 2017. "Diversity of Free-Living Nitrogen Fixing Streptomyces in Soils of the Badlands of South Dakota." *Microbiological Research* 195: 31–39.
- Fierer, Noah, Jonathan W Leff, Byron J Adams, Uffe N Nielsen, Scott Thomas Bates, Christian L Lauber, Sarah Owens, Jack A Gilbert, Diana H Wall, and J Gregory Caporaso. 2012. "Cross-Biome Metagenomic Analyses of Soil Microbial Communities and Their Functional Attributes." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (52): 21390–5.
- Kuppusamy, Saranya, Palanisami Thavamani, Mallavarapu Megharaj, Kadiyala Venkateswarlu, Yong Bok Lee, and Ravi Naidu. 2016. "Pyrosequencing Analysis of Bacterial Diversity in Soils Contaminated Long-Term with Pests and Heavy Metals: Implications to Bioremediation." *Journal of Hazardous Materials* 317: 169–79.
- Parra, Sonia, Manuel A Bravo, Waldo Quiroz, Teresa Moreno, Angeliki Karanasiou, Oriol Font, Victor Vidal, and Francisco Cereceda. 2014. "Distribution of Trace Elements in Particle Size Fractions for Contaminated Soils by a Copper Smelting from Different Zones of the Puchuncavi Valley (Chile)." *Chemosphere* 111: 513–21.
- Salmanighabeshi, Soroush, M Rosario Palomo-Marin, Elena Bernalte, Fernando Rueda-Holgado, Conrado Miro-Rodriguez, Ximena Fadic-Ruiz, Victor Vidal-Cortez, Francisco Cereceda-Balic, and Eduardo Pinilla-Gil. 2015. "Long-Term Assessment of Ecological Risk from Deposition of Elemental Pollutants in the Vicinity of the Industrial Area of Puchuncavi-Ventanas, Central Chile." *Science of the Total Environment* 527: 335–43.
- Verdejo, Jose, Rosanna Ginocchio, Sebastien Sauve, Eduardo Salgado, and Alexander Neaman. 2015. "Thresholds of Copper Phytotoxicity in Field-Collected Agricultural Soils Exposed to Copper Mining Activities in Chile." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 122: 171–77.
- Viti, Carlo, Davide Quaranta, Roberto De Philippis, Giuseppe Corti, Alberto Agnelli, Rosanna Cuniglio, and Luciana Giovannetti. 2008. "Characterizing Cultivable Soil Microbial Communities from Copper Fungicide-Amended Olive Orchard and Vineyard Soils." *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24 (3): 309–18.