



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

TRABAJO FIN DE GRADO

**Medida de actividades enzimáticas y poblaciones
microbianas en suelos sometidos a remediación por
bentonita tras contaminación por Cd y Pb**

Autor: María García Ledesma

D.N.I.: 05316322-X

Tutor: Concepción González Huecas

Convocatoria: Junio de 2015

RESUMEN

El crecimiento de las áreas urbanas supone un incremento de la contaminación por metales pesados en los suelos. Los metales pesados son unos de los contaminantes más tóxicos que pueden estar presentes en los suelos, entre ellos, se encuentran el cadmio (Cd) y el plomo (Pb).

El suelo es un componente esencial de la biosfera, por lo que cualquier contaminación sobre este ha de ser controlada para poder preservarlo. Sus propiedades bioquímicas y microbiológicas son las primeras afectadas por la contaminación, por lo que son utilizadas como indicadores de contaminación y, también, la aplicación de técnicas enzimáticas se utiliza en la valoración de los suelos sometidos a procesos de remediación.

Hay diversos métodos de remediación de suelos, entre ellos, se encuentra la estabilización “*in situ*” de metales pesados. La bentonita es utilizada para la estabilización de metales pesados en suelos contaminados.

Para evaluar la efectividad de la bentonita inmovilizando Cd y Pb en los suelos se utiliza el análisis de un conjunto de parámetros como las características bioquímicas, las fracciones de los metales, las actividades enzimáticas del suelo y la comunidad microbiana.

La disminución de la actividad catalasa y el aumento de las actividades invertasa y ureasa y de las bacterias, hongos y actinomicetos en el suelo implica la recuperación metabólica del suelo por las adiciones de bentonita.

Estos resultados indican que la bentonita tiene potencial para reducir la biodisponibilidad de los metales pesados en suelos agrícolas; siendo necesaria la investigación y remediación de los suelos para evitar contaminaciones que pueden llegar hasta la cadena trófica.

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

En la actualidad, las áreas metropolitanas como consecuencia de la rápida urbanización e industrialización, el elevado número de industrias, la eliminación inadecuada de residuos y actividades agrícolas, han experimentado un incremento en la contaminación por metales pesados de los suelos (Zhou y Song, 2004; Sun et al., 2009), lo que puede tener, a largo plazo, un grave impacto ambiental y para la salud humana (Batjes, 2000).

Los metales pesados son los contaminantes inorgánicos más tóxicos que se encuentran en los suelos, siendo algunos de ellos tóxicos incluso a muy bajas concentraciones. El cadmio es un metal pesado que proviene de actividades agrícolas, mineras e industriales, siendo uno de los contaminantes más peligrosos en el suelo debido a su persistencia, toxicidad y potencial de bioacumulación (Zhou y Song, 2004). Afecta principalmente a los riñones, especialmente a las células de los túbulos contorneados proximales. La enfermedad Itai-Itai, que se manifestó en Japón por primera vez, es un ejemplo clásico de los problemas creados por los altos niveles de Cd en el medio ambiente de origen antrópico.

La mayor contaminación por plomo en el medioambiente ha sido a través de las prácticas inadecuadas en la fabricación y almacenamiento de baterías, pinturas, municiones, soldaduras, revestimientos de cables, industria automóviles, etc. (Ake et al., 2001; Tunali et al., 2006). El plomo (Pb) es perjudicial para los seres humanos, animales y plantas, la intoxicación por plomo puede causar hipertensión, nefritis, dolor abdominal, estreñimiento, náuseas, vómitos, cambios de comportamiento, discapacidad en el aprendizaje, defectos de desarrollo y dificultades en el lenguaje.

El suelo, componente esencial en la biosfera, actúa como soporte físico de plantas y seres vivos y forma parte de los ecosistemas en estrecha relación con el medio acuático y el medio atmosférico. La importancia de sus funciones productivas, su indiscutible valor social junto a su naturaleza no renovable a corto plazo, hacen que este recurso deba ser controlado, preservado y remediado de daños.

Para medir la salud del suelo se toma en cuenta la eficiencia de procesos como los ciclos de nutrientes y los flujos de energía. No obstante, estos se ven alterados a medio y largo plazo. Sin embargo, las propiedades bioquímicas y microbiológicas de los suelos son las primeras que se ven afectadas por cualquier tipo de perturbación y, por ello, han sido frecuentemente propuestas como indicadores tempranos y sensibles de estrés ecológico en todo tipo de

ecosistemas. En este contexto, uno de los indicadores que se utiliza es el análisis de la actividad de diferentes enzimas involucradas, en particular bajo la influencia de contaminación por metales pesados (Badiane et al., 2001; Filip, 2002; Hinojosa et al.; 2004; Chaperon y Sauve, 2007; Khan et al., 2007). Actividades enzimáticas del suelo, como arilsulfatasa, β -glucosidasa, fosfatasas ácida y alcalina, proteasa, ureasa, deshidrogenasa, celulasa, proteasa e invertasa son sensibles a la presencia de metales pesados (Kunito et al., 2001; Effron et al., 2004; Oliveira y Pampulha, 2006; Wang et al., 2008; de Santiago et al., 2013, Martín-Calvarro et al., 2014). Por otra parte, la aplicación de técnicas enzimáticas, también se ha utilizado en la evaluación de suelos sometidos a procesos de remediación.

Se han propuesto numerosas tecnologías para la remediación de suelos contaminados por metales pesados, (Adriano et al., 2004; Kumpiene et al., 2008; Malandrino et al., 2011; Peng et al., 2009; Sun et al., 2013; Xenidis et al., 2010; Zhou y Song, 2004). Una de ellas es la estabilización “*in situ*” de metales en las partículas del suelo, como por ejemplo, la inmovilización por modificaciones químicas y la fitoestabilización. Otra es la extracción “*ex situ*” o separación de los metales de suelos contaminados, como por ejemplo, la fitoextracción, lavado, flotación y vertido. Sin embargo, remediar suelos contaminados por metales pesados mediante métodos de ingeniería convencionales es un proceso lento y caro. La estabilización “*in situ*” de elementos metálicos por aditivos naturales o sintéticos, tales como compuestos de fosfato (Cao et al., 2002; Sukandar et al., 2009), compuestos alcalinos (Ma et al., 2012), minerales de arcilla (Liang et al., 2013; Sun et al., 2013) y biosólidos (Tandy et al., 2009) es considerada como una alternativa prometedora a los métodos de recuperación disponibles en la actualidad debido a su rentabilidad y fácil implementación, así como su aplicación a una amplia variedad de sitios contaminados (Garau et al., 2007). La adsorción, el intercambio iónico, la complejación y la precipitación son los principales mecanismos implicados en la conversión de formas solubles y potencialmente solubles de los metales pesados a fases sólidas estables (Adriano et al., 2004; Cao et al., 2008), reduciendo la cantidad de metales pesados disponibles para las plantas en los suelos.

Los materiales de estabilización se pueden agrupar en agentes reguladores de pH o agentes de sorción (Kim et al., 2012). Agentes reguladores de pH, como la calcita y la cal, pueden inducir la precipitación de hidróxidos o carbonatos debido a sus propiedades alcalinas o causar una reacción de desprotonación en la superficie del suelo, proporcionando más sitios de adsorción (Appel y Ma, 2002). Los agentes de sorción, también llamados adsorbentes, incluyen el carbón activo, zeolitas y arcillas, entre otros. Tienen grupos funcionales como, por

ejemplo, el grupo hidroxilo que absorbe o forma complejos con los metales pesados (Kosobucki et al., 2008; Zhou y Haynes, 2010).

La bentonita ($\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot 4\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$) es un aluminosilicato que pertenece al grupo de arcillas expandibles tipo montmorillonita. Se caracteriza por presentar cargas negativas permanentes y gran superficie específica. Es un adsorbente eficiente para algunos metales pesados, especialmente para Pb y Cd (Karapinar y Donat, 2009; Hamidpour et al., 2010; Li et al., 2010).

El objetivo de este trabajo ha sido realizar una revisión bibliográfica de artículos científicos, sobre suelos contaminados por cadmio y plomo y sometidos a una posterior remediación utilizando bentonita. También se discute la evaluación ecotoxicológica de los suelos remediados a través de la medida de actividades enzimáticas y de las poblaciones microbianas presentes en estos, y así poder establecer los cambios que han sufrido estos suelos. Además se identificarán las necesidades de investigación inmediatas en este campo y se sugerirán futuras direcciones para la investigación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para la realización de este trabajo se revisaron artículos científicos de la última década consultando la base de datos Science Direct. Se revisaron los abstracts y en los casos necesarios los artículos completos, teniéndose en cuenta finalmente todos los artículos que hablaban sobre suelos contaminados por metales pesados y que fueron sometidos a una posterior remediación (de un total de 50 artículos), haciendo especial hincapié en aquellos en los que se utilizó la bentonita como adsorbente.

En la mayoría de los trabajos revisados, las muestras de suelos se recogieron de zonas agrícolas, debido a la importancia que estos suelos tienen como recurso base de la seguridad alimentaria. Las muestras fueron pasadas a través de un tamiz de luz de malla <2 mm y en ellas se realizaron análisis físicos y químicos necesarios de acuerdo con los métodos propuestos por ISRIC (2002) y según las especificaciones del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA) (Schoeneberger et al., 2002). Se analizaron las propiedades físicas, como análisis granulométrico (contenidos en arcilla, arenas y limo). A su vez se determinaron las propiedades químicas: pH, capacidad de intercambio catiónico (CIC), materia orgánica (MO), nitrógeno total, fósforo disponible y potasio disponible. El contenido total de cadmio y plomo se determinó por digestión ácida, con una solución de HNO₃-HClO₄ y HCl-HNO₃-HF-HClO₄, respectivamente.

En gran parte de los artículos consultados, las muestras de suelo son contaminadas y remediadas en el laboratorio. En base a ello, y para el presente trabajo, se ha seleccionado el estudio realizado por Sun et al. (2015) en suelos agrícolas de China. Para ello, tomaron, aproximadamente 6 Kg de muestra de suelo, previamente homogeneizada, y se depositaron en macetas de plástico diferentes submuestras en las que se realizaron los distintos ensayos. El nivel de contaminación se fijó en 5 mg Cd.Kg⁻¹ y 2000 mg Pb/Kg⁻¹, lo que equivaldría a una contaminación moderada, ya que los valores límites están fijados aproximadamente en 1,0 y 1000 mg.Kg⁻¹, respectivamente, según la norma de calidad medioambiental (Grado III) para Cd y Pb en suelos de China (GB 15618-1995). El adsorbente utilizado, bentonita, fue incorporado en las muestras de suelo contaminadas con las siguientes proporciones: 0%, 0,5%, 1%, 3% y 5%. Cada tratamiento se realizó por triplicado, y los suelos tratados se incubaron durante 5 semanas.

El fraccionamiento de Cd y Pb del suelo se realizó mediante extracción secuencial de Tessier (Tessier et al., 1979) en la que se distingue las siguientes fracciones: fracción intercambiable soluble en agua (SE) (1 mol/L MgCl₂ extraíble), unido a carbonato o débilmente adsorbido (WSA) (1 M NaAc extraíble), unido a la fracción oxidada Fe-Mn (OX) (M NH₂ • HCl extraíble), unido a fracción orgánica (MO) (30% H₂O₂ y 3.2 M NH₄Ac extraíble) y fracción residual (RES, diferencia del contenido metálico total menos los anteriores).

Se utilizó material de referencia de suelo acreditado para verificar la exactitud y precisión del procedimiento de digestión y el análisis subsiguiente. Las concentraciones de Cd y Pb en todos los casos fueron determinadas por espectrofotometría de absorción atómica de llama. La longitud de onda para el análisis de Cd y Pb fue 228,8 y 283,3 nm, respectivamente.

La actividad ureasa se ensayó con urea como sustrato, incubándose en un tampón fosfato 0,2 M a pH 7,1 y 37°C durante 24 h. La urea residual se determinó por colorimetría. La actividad enzimática se expresó en mg NH₄-N g⁻¹ h⁻¹ (Sun et al., 2013). La actividad catalasa fue analizada por valoración con KMnO₄ (Stepniewska et al., 2009), y expresada en mg KMnO₄ por gramo de suelo seco. La actividad invertasa fue medida mediante la incubación de suelo y sacarosa a 37°C durante 24 h y midiendo posteriormente la producción de glucosa por colorimetría, expresado en mg g⁻¹ h⁻¹ (Kandeler et al., 1999).

La población microbiana del suelo (bacterias, hongos y actinomicetos) fue estimada mediante la técnica de placa de dilución (tres repeticiones para cada dilución y plato de suelo) (Shen et al., 2005).

Todos los tratamientos se repitieron tres veces. Se calcularon las medias y desviaciones estándares (SD) mediante programas informáticos, así como los análisis de varianza.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A menudo, los procedimientos de extracción secuencial se aplican para investigar la biodisponibilidad relativa de un metal en la fase sólida de suelo, y con ello evaluar la efectividad de los tratamientos de remediación. En el caso de estudio y como se muestra en la Figura 1, en el suelo control (CK), la concentración de Cd obtenida en las distintas fracciones fue la siguiente OX>WSA>SE>RES>OM, mientras que para el Pb fue RES>SE>OM>WSA>OX. Al aplicar bentonita disminuyó la concentración de Cd intercambiable pero aumentó la de Cd residual en comparación con el control, lo que indica que, gran parte de la fracción intercambiable de Cd pasa a forma residual, menos disponible. Del mismo modo, las adiciones de bentonita redujeron el contenido de Pb soluble en agua respecto al control. En el caso del Pb, la adición de bentonita provocó la transformación del Pb intercambiable en distintas fracciones poco disponibles como: fracciones carbonatadas, unidas a Fe-Mn y/o compuestos orgánicos y en forma residual. La alta inmovilización de Cd y Pb en formas no disponibles indicó que la bentonita tiene un alto potencial de estabilización de metales pesados en los suelos contaminados.

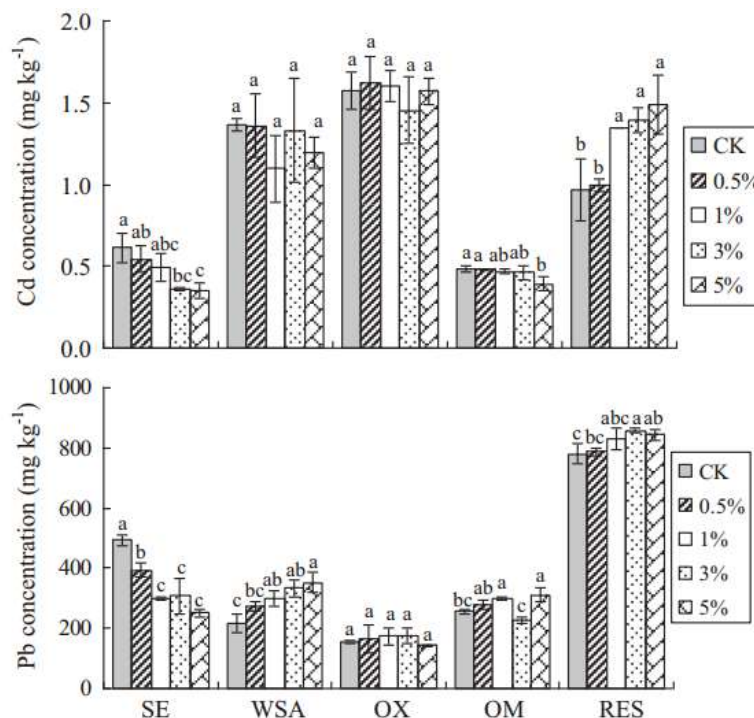


Fig 1. Fracciones de Cd y Pb bajo los diferentes tratamientos con bentonita.

Las enzimas del suelo desempeñan un papel fundamental en los procesos de descomposición de materia orgánica y en el ciclo de nutrientes (Sardar et al., 2007; Tao et al.; 2009). Las

actividades enzimáticas del suelo se han propuesto como indicadores potenciales de los efectos adversos de diversos contaminantes en la calidad de la tierra (Hinojosa et al., 2004; Sun et al., 2013). Como se muestra en la Figura 2, la actividad catalasa disminuyó gradualmente con el aumento de las concentraciones de bentonita, aunque no se inhibió drásticamente hasta el tratamiento con bentonita al 3%. Comparado con la muestra de suelo control, la actividad catalasa se redujó entre 6,5%-15,0%, tras la aplicación de la bentonita. Las actividades ureasa e invertasa aumentaron entre 0,5%-8,3% y 23,4%-46,9%, respectivamente, tras la aplicación de bentonita en comparación con la muestra de suelo control. Los metales pesados pueden inhibir las actividades enzimáticas a través de la interacción con los complejos de la enzima sustrato, desnaturalizando las proteínas enzimáticas y ocupando sus sitios activos (Megharaj et al., 2003). Las altas actividades invertasa y ureasa registradas en los suelos enmendados pusieron de manifiesto un buen estado funcional del suelo y, por tanto, la determinación de estas actividades enzimáticas supone una correcta herramienta para ser utilizada en la evaluación de la recuperación de suelos contaminados por metales pesados tras la remediación por estabilización mediante técnicas de adsorción.

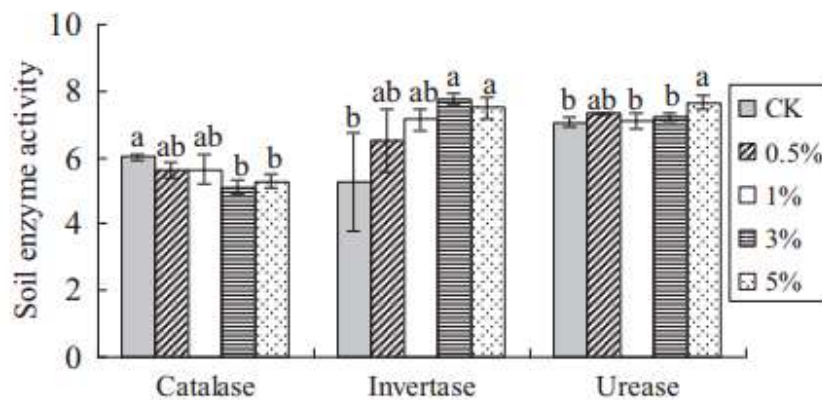


Fig 2. Actividades enzimáticas bajo diferentes tratamientos.

Otro parámetro que emplearon los autores para evaluar la efectividad de la bentonita en la inmovilización de Cd y Pb fue el análisis de la comunidad microbiana de los suelos, en los distintos tratamientos ensayados. Tal y como se muestra en la Tabla 1, la población de bacterias, hongos y actinomicetos, incrementó tras la aplicación de bentonita, con máximos en las adiciones del 3%, 1% y 0,5% de bentonita respectivamente para, posteriormente disminuir con el incremento de la concentración de bentonita añadida. Por lo tanto, los efectos positivos de la bentonita en la población microbiana, como se observa por la recuperación de la

diversidad biológica de los suelos, pueden ser atribuidos a la reducción de la toxicidad de los metales que ocasiona la enmienda ensayada (de Mora et al, 2005).

Tabla 1. Cantidad de microorganismos tras la aplicación de bentonita:

Tratamiento	Cantidad microbiana CFU g ⁻¹		
	Bacterias (10 ⁷)	Hongos (10 ⁴)	Actinomicetos (10 ⁶)
CK	1.43 ± 0.04 a	3.66 ± 1.18 ab	1.43 ± 0.28 a
0,5%	1.45 ± 0.11 a	5.19 ± 0.33 a	1.50 ± 0.15 a
1%	1.63 ± 0.18 a	5.26 ± 0.33 a	1.14 ± 0.08 ab
3%	1.79 ± 0.26 a	4.21 ± 0.62 ab	1.02 ± 0.35 ab
5%	1.59 ± 0.08 a	3.05 ± 0.28 b	0.74 ± 0.09 b

CONCLUSIONES

- La extracción secuencial realizada mostró que las adiciones de bentonita convirtieron las fracciones intercambiables de Cd y Pb en formas poco disponibles y formas residuales (fracción no disponible).
- La enmienda ensayada recuperó las propiedades funcionales del suelo tal y como se refleja en el análisis de la actividad de las enzimas del suelo y la población microbiana.
- Los resultados experimentales indican que el uso de la bentonita para inmovilizar los metales pesados es una forma efectiva para la remediación de suelos contaminados por estos. Por ello, la aplicación de bentonita puede ser una solución rentable y sostenible para la remediación *in situ* de suelos contaminados por metales pesados.
- Sin embargo, los metales pesados inmovilizados permanecen aún en el suelo y podrían ser liberados al suelo y en el agua cuando las condiciones del suelo cambien. Por lo tanto, se hace necesario monitorizar los suelos enmendados con esta metodología para prevenir el riesgo potencial de contaminación que representan.

En base a las revisiones realizadas, cuando un suelo está contaminado es importante decidir si es necesaria su recuperación. Esto dependerá de distintos factores como, por ejemplo, el uso que se va a destinar a ese suelo y, sobre todo, si existe la posibilidad de transmitir la contaminación a la cadena trófica; también es importante valorar la proximidad de ese suelo a poblaciones, a industrias y la naturaleza del suelo. Cuando se ha determinado la necesidad de la remediación se debe tener en cuenta el foco de contaminación, el mecanismo de infiltración y el tipo de contaminante. A la vista de los problemas que plantea la contaminación de los suelos, las alternativas para su solución son muy variadas, y actualmente se están desarrollando nuevas posibilidades basadas en diversas tecnologías, económicamente viables, que puedan llevarse acabo "*in situ*" y que sean respetuosas con la salud humana y con el medioambiente.

BIBLIOGRAFÍA

- Adriano, D.C.; Wenzel, W.W.; Vangronsveld, J.; Bolan, N.S.; 2004. Role of assisted natural remediation in environmental cleanup. *Geoderma* 122, 121-142.
- Ake, C.L.; Mayura, K.; Huebner, H.; Bratton, G.R.; Phillips, T.D.; 2001. Development of porous clay- based composites for the sorption of lead from water. *Environ. Health Part A* 63 (6), 459–475.
- Appel, C.; Ma, L.; 2002. Concentration, pH, and surface charge effects on cadmium and lead in three tropical soils. *J. Environ. Qual.* 31 (2), 581-589.
- Badiane, N.N.Y.; Chotte, J.L.; et al., 2011. Use of soil enzyme activities to monitor soil quality in natural and improved fallows in semi-arid tropical regions. *Appl. Soil Ecol.* 18 (3), 229-238.
- Baker, L.R.; White, P.M.; et al.; 2011. Changes in microbial properties after manure, lime, and bentonite application to a heavy metal-contaminated mine waste. *Appl. Soil Ecol.*
- Cao, X.; Ma, L.Q., Chen, M.; Singh, S.P.; Harris, W.G.; 2002. Impacts of phosphate amendments on lead biogeochemistry at a contaminated site. *Environ. Sci. Technol.* 36, 5296-5304.
- Cao, X.; Dermatas, D.; Xu, X.; Shen, G.; 2008. Immobilization of lead in shooting range soils by means of cement, quicklime, and phosphate amendments. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 15, 120-127.
- Chaperon, S.; Sauve, S.; 2007. Toxicity interaction of metals (Ag, Cu, Hg, Zn) to urease and dehydrogenase activities in soils. *Soil Biol. Biochem.* 39 (9), 2329-2338.
- D'Ascoli, R.; Rao, M.A.; et al.; 2006, Impact of river overflowing on trace element contamination of volcanic soils in south Italy: part II. Soil biological and biochemical properties in relation to trace element speciation. *Environ. Pollut.* 144 (1), 317-326.
- de Santiago-Martín A, Cheviron N, Quintana JR, González C, Lafuente AL, Mougin C., 2013a. Metal contamination disturbs biochemical and microbial properties of calcareous agricultural soils of the Mediterranean area. *Arch Environ Contam Toxicol* 64(3):388–398.

- Effron, D.; de la Horra, A.M.; et al.; 2004. Effect of cadmium copper, and lead on different enzyme activities in a native forest soil. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 35 (9-10), 1309-1321.
- Filip, Z.; 2002. International approach to assessing soil quality by ecologically-related biological parameters. *Agric. Ecosyst. Environ.* 88 (2), 169-174.
- Garau, G.; Castaldi, C.; Santona, L.; Deiana, P.; Melis, P.; 2007. Influence of red mud, zeolite and lime on heavy metal immobilization, culturable heterotrophic microbial populations and enzyme activities in a contaminated soil. *Geoderma* 142, 47-57.
- Hamidpour, M.; Kalbasi, M.; Afyuni, M.; Shariatmadari, H.; Holm, P.E.; Hansen, G.C.B.; 2010. Sorption hysteresis of Cd (II) and Pb (II) on natural zeolite and bentonite. *J. Hazard. Mater.* 181, 686-691.
- Hinojosa, M.B.; Carreira, J.A.; García- Ruiz, R.; Dick, R.P.; 2004. Soils moisture pre-treatment effects on enzyme activities as indicators of heavy metal-contaminated and reclaimed soils. *Soil. Biochem.* 2004 (36), 1559-1568.
- Hinojosa, M.B.; Carreira, J.A.; Rodríguez-Maroto, J.M.; García-Ruiz, R.; 2008. Effects of pyrite sludge pollution on soil enzyme activities: ecological dose-response model. *Sci. Total Environ.* 369, 89-99.
- Iannelli, M.A.; Pietrini, F.; Fiore, L.; Petrilli, L.; Massacci, A.; 2002. Antioxidant response to cadmium in *Phragmites australis* plants. *Plant. Physiol. Biochem.* 40, 977-982.
- ISRIC (International Soil Reference and Information Center), 2002. Procedures for Soil Analysis, 3th ed. International Soil Reference and Information Center, Wageningen.
- Kandeler, E.; Luxhor, J.; Tschërko, D.; Magid, J.; 1999. Xylanase, invertase and protease at the soil-litter interface of a loamy sand. *Soil Biol. Biochem.* 31, 1171-1179.
- Karaca, A.; Turgay, O.; et al.; 2006. Effects of a humic deposit (gyttja) on soil chemical and microbiological properties and heavy metal availability. *Biol. Fertil. Soils* 42 (6), 585-592.

- Karapinar, N.; Donat, R.; 2009. Adsorption behaviour of Cu²⁺ and Cd²⁺ onto natural bentonite. *Desalination* 249, 123-129.
- Khan, S.; Cao, Q.; et al.; 2007. Soil enzymatic activities and microbial community structure with different application rates of Cd and Pb. *J. Environ. Sci.* 19 (7), 834-840.
- Kim, K.R.; Kim, J.G.; Park, J.S.; Kim, M.S.; Owens, G.; Youn, G.H.; Lee, J.S.; 2012. Immobilizer-assisted management of metal-contaminated agricultural soils for safer food production. *J. Environ. Manag.* 102, 88-95.
- Kosobucki, P.; Kruk, M.; Buszewski, B.; 2008. Immobilization of selected heavy metals in sewage sludge by natural zeolites. *Bioresour. Technol.* 99 (13), 5972-5976.
- Kumpiene, J.; Lagerkvist, A.; Maurice, C.; 2008. Stabilization of As, Cr, Cu, Pb and Zn in soil using amendments- A review. *Waste Management*, 28 (1): 215-225.
- Kunito, T.; Saeki, K., et al., 2001. Copper and zinc fractions affecting microorganisms in long-term sludge-amended soils. *Bioresour. Technol.* 79 (2), 135-146.
- Li, J.F.; Li, Y.M.; Meng, Q.L.; 2010. Removal of nitrate by zero-valent iron and pillared bentonite. *J. Hazard. Mater.* 174, 188-193.
- Liang, X.F.; Xu, Y.M.; Wang, L.; Sun, Y.B.; Lin, D.S.; Sun, Y.; Qin, X.; Wan, Q.; 2013. Sorption of Pb²⁺ on mercapto functionalized sepiolite. *Chemosphere* 90, 548-555.
- Ma, X.M.; Li, L.P.; Yang, L.; Su, C.Y.; Wang, K.; Yuan, S.B.; Zhou, J.G.; 2012. Adsorption of heavy metal ions using hierarchical CaCO₃-maltose. *J. Hazard. Mater.* 209-210, 467-477.
- Malandrino, M.; Abollina, O.; Buosa, S.; Giacomina, A.; La Gioia, C.; Mentasti, E.; 2011. Accumulation of heavy metals from contaminated soil to plants and evaluation of soil remediation by vermiculite. *Chemosphere*, 82 (2): 167-178.
- Martín-Calvarro, L., de Santiago-Martín, A., Quirós Gómez, J., González-Huecas, C., Quintana, J.R., Vázquez, A., Lafuente, A.L., Rodríguez-Fernández, M.T., Ramírez-Vera, R. 2014. Biological activity in metal-contaminated calcareous agricultural soils:

the role of the organic matter composition and the particle size distribution. *Environ Sci Pollut Res.* 21:6176–6187.

- Megharaj, K.V.M.; Sethunathan, N.; Naidu, R.; 2003. Bioavailability and toxicity of cadmium to microorganisms and their activities in soil: a review. *Adv. Environ. Res.*, 8, 121-135.
- Mora, A.P.; Ortega-Calvo, J.J.; et al.; 2005. Changes in enzyme activities and microbial biomass after “in situ” remediation of a heavy metal-contaminated soil. *Appl. Soil Ecol*, 28 (2), 125-137.
- Oliveira, A.; Pampulha, M.E.; 2006. Effects of long-term heavy metal contamination on soil microbial characteristics. *J. Biosci. Bioenergy* 102 (3), 157-161.
- Peng, J.F.; Song, Y.H.; Yuan, P.; Cui, X.Y.; Qiu, G.L.; 2009. The remediation of heavy metals contamination sediment. *J. Hazard. Mater.* 161, 633-640.
- Safa Özcan, A.; Özer Gök, Adnan Özcan, 2009. Adsorption of lead (II) ions onto 8-hydroxy quinoline-immobilized bentonite. *Journal of Hazardous Materials.* 161, 499-509.
- Sardar, K.; Qing, C.; El-Latif, H.A.; Yue, X.; 2007. Soil enzymic activities and microbial community structure with different application rates of Cd and Pb. *J. Environ. Sci.* 19, 834-840.
- Schoeneberger, P.J., Wysocki, D.A., Benham, E.C., Broderson, W.D., 2002. Field book for describing and sampling soils, Version 2.0. Natural Resources Conservation Service, National Soil Survey Center, Lincoln, NE.
- Shen, G.Q.; Cao, L.K.; Lu, Y.T.; Hong, J.B.; 2005. Influence of phenanthrene on cadmium toxicity to soil enzymes and microbial growth. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 12, 259-263.
- Stepniewska, Z.; Wolinska, A.; Ziomek, J.; 2009. Response of soil catalase activity to chromium contamination. *J. Environ. Sci.* 21, 1142-1147.
- Sukandar, Padmi, T.; Tanaka, M.; Aoyama, I.; 2009. Chemical stabilization of medical waste fly ash using chelating agent and phosphates: Heavy metals and ecotoxicity evaluation. *Waste Manag.* 29, 2065-2070.

- Sun, Y.B.; Zhou Q.X., An, J.; Liu, W.T., Liu, R., 2009. Chelator-enhanced phytoextraction of heavy metals from contaminated soil irrigated by industrial wastewater with the hyperaccumulator plant (*Sedum alfredii* Hance). *Geoderma* 150, 106-112.
- Sun, Y.; Sun, G; Xu, Y.; Wang, L.; Lin, D.; Liang, X.; Shi, X., 2012. *In situ* stabilization remediation of cadmium contaminated soils of wastewater irrigation region using sepiolite, *Journal of Environmental Sciences*, 24(10), 1799-1805.
- Sun, Y.B.; Sun, G.H.; Xu, Y.M.; Wang, L.; Liang, X.F.; Lin, D.S.; Hu, F.Z.; 2013. Assessment of natural sepiolite on cadmium stabilization, microbial communities and enzyme activities in an acidic soil. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20, 3290-3299.
- Sun, Yuebing; Li, Ye; Xu, Yingming; Liang, Xuefeng; Wang, Lin; 2015. *In situ* stabilization remediation of cadmium (Cd) and lead (Pb) co-contaminated paddy soil using bentonite, *Applied Clay Science* 105-105, 200-206.
- Tandy, S.; Healey, J.R.; Nason, M.A.; Willianson, J.C.; Jones, D.L.; 2009. Heavy metal fractionation during the co-composting of biosolids, deinking paper fibre and green waste. *Bioresour. Technol.* 100, 4220-4226.
- Tao, J.; Griffiths, B.; Zhang, S.J.; Chen, X.Y.; Liu, M.Q.; Hu, F.; Li, H.X.; 2009. Effects of earth-worms on soil enzyme activity in an organic residue amended rice wheat rotation agro-ecosystem. *Appl. Soil. Ecol.* 42, 221-226.
- Tessier, A.; Campbell, P.G.C.; Bisson, M.; 1979. Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals. *Anal. Chem.* 51 (7), 844-850.
- Tunali, S.; Akar, T., Özcan, A.S.; Kitan Özcan, I.; 2006. Equilibrium and kinetics of biosorption of lead (II) from aqueous solutions by *Cephalosporium aphidicola*, *Sep. Pruf. Technol.* 47 (3), 105-112.
- Violante, A; Huang, P.M; Gadd, G.M., 2007. Impacts of physicochemical-biological interactions on metal and metalloid transformations in soils: an overview. In Violante, A; Huang, P.M. (Eds), *Biophysico-chemical processes of heavy metals and metalloids in soils environments*. John Wiley & Sons, Inc, New York, pp 1-52.

- Wang, Y.; Li, Q; et al.; 2008. Assessment of microbial activity and bacterial community composition in the rhizosphere of a copper accumulator and a non-accumulator. *Soil Biol. Biochem.* 40 (5), 1167-1177.
- Wang, B.C.; Wang, J.B.; Zhao, H.C.; Zhao, H.; 2006. Stress induced plant resistance and enzyme activity varying in cucumber. *Colloid. Surface. B.* 48, 138-142.
- Wu, X.Y.; von Tiedemann, A.; 2002. Impact of fungicides on active oxygen species and antioxidant enzymes in spring barley (*Hordeum vulgare L.*) exposed to ozone. *Environ. Pollut.* 116, 37-47.
- Xenidis, A.; Stouraiti, C.; Papassiopi, N.; 2010. Stabilization of Pb and As in soils by applying combined treatment with phosphates and ferrous iron. *Journal of Hazardous Materials*, 177 (1-3): 929-937.
- Xuefeng Liang, Jun Han, Yinming Xu, Yuebing Sun, Lin Wang, Xin Tan; 2014. In situ field-scale remediation of Cd polluted paddy soil using sepiolite and palygorskite, *Geoderma* 235-236, 9-18.
- Yu Xian, Meie Wang, Weiping Chen, 2015. Quantitative assessment on soil enzyme activities of heavy metal contaminated soils with various soil properties, *Chemosphere*.
- Zhou, Q.X., Song, Y.F, 2004. *Principles and Methods of Contaminated Soil Remediation*. Science Press, Beijing, China.
- Zhou, Y.F.; Haynes, R.J.; 2010. Sorption of heavy metals by inorganic and organic components of solid wastes: significance to use of wastes as low-cost adsorbents and immobilizing agents. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 40 (11), 909-977.