

**EMPLEO DE *Apis mellifera* COMO BIOINDICADOR  
DE LA CONTAMINACIÓN POR METALES PESADOS  
EN EL TÉRMINO MUNICIPAL DE CÓRDOBA**



**TESIS DOCTORAL**

**Inmaculada  
Gutiérrez Tirado**

**Córdoba, 2015**



**Departamento de Zoología  
Universidad de Córdoba**



**E.B.T.  
Universidad de Córdoba**

TITULO: *Empleo de Apis mellífera como bioindicador de la contaminación de metales pesados en el término municipal de Córdoba*

AUTOR: *Inmaculada Gutiérrez Tirado*

---

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2016  
Campus de Rabanales  
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A  
14071 Córdoba

[www.uco.es/publicaciones](http://www.uco.es/publicaciones)  
[publicaciones@uco.es](mailto:publicaciones@uco.es)

---





**TÍTULO DE LA TESIS:** Empleo de *Apis mellifera* como bioindicador de la contaminación por metales pesados en el término municipal de Córdoba

**DOCTORANDO/A:** Inmaculada Gutiérrez Tirado

**INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS**

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

La Tesis Doctoral realizada por Inmaculada Gutiérrez Tirado presenta suficientes indicios de calidad científica y rigor metodológico para poder ser presentada para su defensa pública y en ese contexto ser evaluada para la obtención del grado de Doctor.

La Doctoranda ha realizado una investigación original y de calidad, enfrentándose con éxito a la dificultad que supone la integración de distintas disciplinas en el análisis de la contaminación atmosférica por metales pesados mediante el biomonitorio con colonias de *Apis mellifera*.

Los resultados obtenidos son relevantes desde el punto de vista científico y han sido difundidos entre la comunidad científica en varios congresos nacionales e internacionales, y a través de un artículo científico, todos los cuales cumplen los criterios normativos actualmente vigentes para que la Doctoranda pueda optar al grado de Doctor.

Para finalizar este informe quisiéramos resaltar que durante el periodo de realización de la Tesis, la Doctoranda ha mostrado una gran capacidad de trabajo y resiliencia en unas condiciones no especialmente fáciles.

Por todo lo anterior, los directores consideran que la presente Tesis Doctoral debe ser autorizada para su presentación y defensa.

Córdoba, 27 de noviembre de 2015.

Fdp.: José Antonio Ruiz Martínez

Firma del/de los director/es

Fdo.: Rafael Molero Baltanás



# ÍNDICE

Agradecimientos.....	i
Resumen.....	ii
Abstract.....	iii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVOS.....	10
3. ANTECEDENTES DEL EMPLEO DE ABEJAS COMO BIOINDICADORES. EL USO DE <i>APIS MELLIFERA</i> PARA EVALUAR LA CONTAMINACIÓN POR METALES PESADOS....	11
3.1. Situación medioambiental.....	11
3.2. Contaminación atmosférica por metales pesados.....	11
3.3. Métodos estándar de evaluación de la contaminación por metales pesados.....	13
3.4. Utilización de bioindicadores en evaluación medioambiental.....	15
3.5. Colonias de <i>A. mellifera</i> como bioindicadores. Ventajas y Limitaciones.....	18
3.6. El proceso de biomonitordeo.....	22
3.7. Tipos de estudios realizados con <i>A. mellifera</i> .....	29
3.8. La colonia de abejas como bioindicador de metales pesados.....	36
3.9. Estudios previos de biomonitordeo con <i>A. mellifera</i> para evaluar la contaminación por metales pesados.....	38
3.9.1. Metodología empleada en los estudios de biomonitordeo.....	43
3.9.1.1. Metales pesados.....	43
3.9.1.2. Matrices apícolas.....	43
3.9.1.3. Estaciones y número de colmenas.....	46
3.9.1.4. Periodo de muestreo.....	46
3.9.2. Resultados y conclusiones de los estudios de biomonitordeo.....	47
3.9.2.1. Nivel de contaminación.....	47
3.9.2.2. Comparación con métodos estándar.....	48
3.9.2.3. Comparación con otros marcadores bióticos o abióticos.....	49
3.9.2.4. Efectividad de las matrices apícolas.....	49
3.9.2.5. Correlación entre matrices apícolas.....	50
3.9.2.6. Diferencias espaciales.....	51
3.9.2.7. Diferencias temporales.....	52
3.9.3. Utilidad y aplicación.....	53

4.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	54
4.1.	Localización y composición de las estaciones de biomonitoreo.....	54
4.2.	Muestreo de abejas.....	57
4.3.	Muestreo de néctar.....	59
4.4.	Análisis de metales pesados.....	61
4.4.1.	En abejas.....	61
4.4.2.	En néctar.....	62
4.5.	Análisis e interpretación de los datos.....	62
5.	RESULTADOS.....	66
5.1.	Resultados obtenidos a partir de la matriz de bioconcentración en abejas.....	66
5.1.1.	Plomo, cromo y níquel.....	66
5.1.2.	Variación espacial.....	68
5.1.3.	Variación temporal.....	68
5.1.4.	Niveles de contaminación.....	69
5.1.5.	Cadmio.....	73
5.2.	Resultados obtenidos a partir de la matriz de bioconcentración en néctar.....	75
5.2.1.	Plomo, cromo y níquel.....	75
5.2.2.	Variación espacial.....	77
5.2.3.	Variación temporal.....	78
5.2.4.	Niveles de contaminación.....	79
5.2.5.	Cadmio.....	81
6.	DISCUSIÓN.....	85
7.	CONCLUSIONES.....	97
8.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	99

## **AGRADECIMIENTOS**

**MIL GRACIAS** a todas las personas que, de una manera u otra, han contribuido a la realización de este trabajo.

Especialmente a mis directores de tesis, José Antonio Ruiz y Rafael Molero.

Mi gratitud igualmente a Miquel Gaju, responsable del Grupo PAI RNM134 de la Junta de Andalucía en el Departamento de Zoología de la Universidad de Córdoba, y a Claudio Porrini, investigador del Departamento de Ciencias Agrícolas de la Universidad de Bolonia, en Italia.

Todos ellos siempre disponibles a escucharme, ayudarme y contribuir a resolver todo tipo de cuestiones.

A José Antonio Ruiz quiero agradecer específicamente su apoyo continuo desde que inicié camino en la investigación apícola. Su inquietud por avanzar y su tesón han sido claves en el inicio y fin de este trabajo.

Gracias igualmente a los amigos y amigas por saber escuchar y por su ánimo.

Y, por supuesto, gracias a mis padres y hermanos por su respaldo incondicional, a quienes quiero dedicar esta tesis.

## RESUMEN

Las colonias de *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 se han utilizado para estudiar la contaminación ambiental debido a sus excepcionales características como bioindicadores. El principal objetivo de este estudio fue utilizar colonias de abejas para identificar metales pesados y determinar su utilidad en la gestión medioambiental. Para analizar el nivel y la variación espacial y temporal de la contaminación por Pb, Cr, Ni y Cd, cinco estaciones con dos colmenas de *A. mellifera* fueron ubicadas estratégicamente en el término municipal de Córdoba, en zonas urbanas, industriales, agrarias y forestales. Durante los años 2007, 2009 y 2010, se recogieron muestras de abejas pecoreadoras y néctar. La concentración de metales, en mg/kg de abejas y néctar, fue determinada mediante espectrometría de emisión atómica de plasma acoplado inductivamente y espectrofotometría de absorción atómica en horno de grafito. Se evidenciaron diferencias significativas entre localizaciones y periodos, en abejas y en néctar, ofreciendo una valoración cualitativa relevante. Desde el punto de vista cuantitativo, abejas y néctar coincidieron en registrar las mayores frecuencias de valores Aceptables para el Pb, la Estación agrícola S2, el año 2010 y el mes de Mayo. Del mismo modo coincidieron en registrar las mayores frecuencias de valores Merecedores de atención para la Estación industrial S5, el año 2007 y el mes de Junio, pero no así en el metal (Cr en abejas y Ni en néctar). Por último, en cuanto a los valores Preocupantes, las dos matrices difirieron en el metal (Ni en abejas y Cr en néctar), la Estación (urbana S4 en abejas y forestal S3 en néctar), y el año (2007 en abejas y 2009 en néctar), coincidiendo sólo en el mes (Julio). En este caso, las dos matrices ofrecieron una información complementaria. La concentración de Cd en abejas y néctar alcanzó altas frecuencias de valores Preocupantes, aunque sólo fue analizado en el año 2010. El biomonitoreo con *A. mellifera* podría formar parte del sistema de vigilancia y control de la contaminación atmosférica, ya que puede integrar valoraciones cualitativas y cuantitativas, facilitando la gestión tanto de manera preventiva como ante la aparición de alertas y crisis ambientales.

## ABSTRACT

Due to features that make them outstanding environmental bioindicators, colonies of *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 are being used to study environmental pollution. The primary objective of this research was to use honeybee colonies to identify heavy metals and determine their utility for environmental management. Five stations, each with two *A. mellifera* hives, were strategically located in urban, industrial, agricultural and forested areas within the municipality of Córdoba (Spain), and foraging bees and nectar were collected in 2007, 2009 and 2010 to analyse the levels and spatial and temporal variations in Pb, Cr, Ni and Cd pollution. Metal concentrations, in mg/kg of honeybee and nectar, were determined using inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry and graphite furnace atomic absorption spectrophotometry. Significant differences were found among the various locations and periods, providing a significant qualitative assessment. From a quantitative viewpoint, bees and nectar agreed to show that Pb, the agricultural station S2, year 2010 and the month of May showed the highest frequencies of Acceptable values. Similarly, they agreed to show that industrial station S5, year 2007 and the month of June, showed the highest frequency of values Worthy of attention, but not in the metal (Cr in bees and Ni in nectar). Finally, regarding Worrisome values, the two matrices differed in the metal (Ni in bees and Cr in nectar), the station (urban S4 in bees and forest S3 in nectar), and the year (2007 in bees and 2009 in nectar), coinciding in the month (July). In this case, the two matrices offered additional information. The concentration of Cd in bees and nectar had a high frequency of Worrisome values, although Cd was only analysed in 2010. Biomonitoring with colonies of *A. mellifera* could contribute to improved surveillance and control systems for atmospheric pollution by integrating qualitative and quantitative assessments, thus facilitating prevention and readiness in the event of environmental crises.

# 1. INTRODUCCIÓN

La Tesis Doctoral que se presenta, en su parte experimental, fue llevada a cabo entre el 2007 y 2010, dentro de un contexto normativo de aprobación de leyes sobre la protección del medio ambiente y de un interés creciente en el uso de indicadores biológicos.

Dichas investigaciones fueron llevadas a cabo porque formaron parte de proyectos financiados parcialmente por distintas instituciones y convocatorias.

Con este trabajo se ha pretendido rescatar algunos de los resultados más interesantes y resaltar su valor e importancia, en relación a la contaminación atmosférica por metales pesados en el entorno del municipio de Córdoba.

## **Municipio de Córdoba.**

Córdoba es una ciudad con una población de 328.773 habitantes según el censo de 2012. Su situación geográfica y orográfica en plena depresión del Valle del Guadalquivir y al pie de Sierra Morena predispone a la formación de una bolsa de contaminación, especialmente en aquellas épocas con circunstancias meteorológicas de escasas precipitaciones y vientos.

De hecho, según el Informe de Medio Ambiente del 2004 de la Junta de Andalucía, y dejando a un lado la comarca de Bailén, Córdoba fue considerada la segunda ciudad en contaminación atmosférica, con un 28% de los días con una situación o índice de calidad no admisible.

En este sentido, las partículas menores de 10 micras ( $PM_{10}$ ) es el parámetro que más negativamente influye en el índice de calidad ambiental, pues sobrepasa el valor límite más el margen de tolerancia. Puntualmente las concentraciones elevadas de partículas tienen su origen en el transporte eólico

de las mismas desde otras regiones, incluidas los desiertos del norte del continente africano, que son fuentes naturales.

Hay que destacar también que otros importantes contaminantes como SO<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>, Pb y CO también están presentes, aunque por debajo del valor límite. Además de ello, el empleo inadecuado o abusivo de pesticidas procedentes de las tierras agrarias de la campiña y la vega, así como del tratamiento de jardines y parques de la propia ciudad, pueden contribuir a agravar la baja calidad ambiental del aire, cuestión ésta aún no tenida en cuenta.

### **Responsabilidad de la Administración Local.**

El documento Agenda 21, aprobado en 1992 por los Gobiernos en la Cumbre de la Tierra en Río de Janeiro, destacaba el papel de las Administraciones Locales como agentes clave para la promoción de la sostenibilidad (Naciones Unidas, 1992). La Carta de Aalborg de 1994, firmada por más de 400 autoridades locales europeas en la I Conferencia Europea de Ciudades Sostenibles establecía una serie de principios y objetivos que fueron ratificados en el Plan de Acción de Lisboa, aprobado tras la II Conferencia Europea de Ciudades y Pueblos Sostenibles en 1996, constituyéndose en elementos básicos para el desarrollo sostenible local.

Los problemas ambientales que percibían entonces, y aún hoy en día, la mayoría de los habitantes de Andalucía, se concentran precisamente en las ciudades. Las soluciones a los problemas ambientales radican, de una forma u otra, en la esfera de los municipios, en cuyo ámbito se genera una buena parte de estos problemas, y por ello resulta de especial trascendencia para la protección ambiental el papel realizado por los Gobiernos Locales.

Por ello, una comunidad sostenible debe hacerse responsable del bienestar de la generación siguiente y contribuir a la reducción de los

problemas medioambientales mundiales. Entre ellos, podemos citar que la contaminación atmosférica produce un aumento de problemas sanitarios de los ciudadanos (en particular procesos respiratorios en los niños y ancianos), y tiene además efectos nocivos en la vegetación, daña los edificios, y a escala planetaria, contribuye a potenciar el efecto invernadero, el cambio climático, la lluvia ácida y otros fenómenos.

### **Contexto normativo.**

El Consejo de Ministros aprobó la **Ley de Calidad del Aire y Protección de la Atmósfera** para lograr un aire más limpio (España, 2007a).

- La Ley de Calidad del Aire y Protección de la Atmósfera se enmarcó en la Estrategia Española de Calidad del Aire y sustituyó a la Ley de Protección del Medio Ambiente Atmosférico de 1972, que quedó desfasada.

- La nueva norma se inspiró en los principios de cautela y acción preventiva, de corrección de contaminación en la fuente y de “quien contamina paga”.

- Se pretendía que la lucha contra la contaminación fuese determinante en las decisiones en materia de urbanismo y ordenación del territorio que pudieran adoptar las comunidades autónomas y los ayuntamientos.

- La Ley establecía que, además de las Comunidades Autónomas, los municipios de más de 250.000 habitantes deberían disponer de instalaciones y redes de evaluación e informar a la población sobre los niveles de contaminación.

Según dicha norma, si se superaran los niveles de contaminación, las comunidades autónomas y ayuntamientos deberían elaborar planes de reducción. Esta obligación estaba ya vigente para un número limitado de

contaminantes, pero la nueva Ley la extendió a todos los contaminantes para los que se fijan objetivos de calidad del aire. Asimismo, la Ley reforzó de modo muy importante la efectividad de dichos planes al considerarlos determinantes para los instrumentos de planeamiento urbanístico y de ordenación del territorio, de modo que si estos instrumentos contradijeran a los planes de calidad del aire, la decisión debería motivarse y hacerse pública.

Asimismo el Ministerio de Medio Ambiente aprobó la **Ley de Responsabilidad Medioambiental** (España, 2007b) como transposición de la Directiva 2004/35/CE, del Parlamento Europeo y del Consejo, de 21 de abril, sobre responsabilidad medioambiental en relación con la prevención y reparación de daños medioambientales, incorporando a nuestro ordenamiento jurídico un régimen administrativo de responsabilidad ambiental de carácter objetivo e ilimitado basado en los principios de prevención y de “quien contamina paga”.

Según el artículo 2 de esta Ley se define «Daño medioambiental» como los daños a las especies silvestres y a los hábitats, concretándose en cualquier daño que produzca efectos adversos significativos en el número de individuos de una especie, su densidad o la extensión de su zona de presencia. Esto, en resumidas cuentas, significa la necesidad de empezar a evaluar los daños ambientales con bioindicadores.

Finalmente, la **Ley del Patrimonio Natural y la Biodiversidad** (España, 2007c) fue una exigente normativa de conservación para uno de los países europeos más ricos en flora y fauna. Los grandes objetivos de esta ley eran: la conservación de la biodiversidad, el uso sostenible de los recursos y la garantía del acceso a los recursos y reparto de los beneficios que ellos generen.

La nueva normativa formaba parte del conjunto de medidas promovidas por el Gobierno para reforzar la protección de los ecosistemas y realizar una gestión y ordenación del territorio racional y sostenible. Se estableció, en este sentido, que la protección ambiental prevalecería sobre la ordenación territorial

y los planes de urbanización. Es decir, no se podría construir, urbanizar o realizar actuaciones de ordenación del territorio en aquellas zonas donde se podría provocar un daño significativo al medio ambiente, a la fauna o a la flora silvestres.

### **Proyectos Desarrollados.**

En un primer momento, gracias a la Concejalía de Medio Ambiente del Ayuntamiento de Córdoba, se llevó a cabo el proyecto de “Evaluación de la contaminación urbana en el municipio de Córdoba mediante el empleo de abejas (*Apis mellifera*) como bioindicadores ambientales”, desde marzo del 2007 a mayo del 2008.

A continuación se aprobó el proyecto presentado al Programa Nacional de Proyectos de Desarrollo Experimental en el marco Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica 2008-2011 (Convocatoria de la Orden PRE/1007/2008 11 abril), Subprograma de Medio ambiente y ecoinnovación y Subsector de Prevención de la contaminación atmosférica.

Este proyecto, que se llevó a cabo entre 2008 y 2010, dio continuidad al realizado en el 2007.

Las prioridades temáticas que justificaron su aprobación se encuadraron en la siguiente línea y sublíneas.

En concreto en la **línea 18**, en la que tenían cabida “Proyectos destinados a la evaluación de los efectos de la contaminación atmosférica en los sistemas naturales y sus implicaciones en la gestión medioambiental”. Y en cuanto a las sublíneas:

**Sublínea 18.1** Proyectos de evaluación de la concentración y depósito de los contaminantes atmosféricos a escala nacional para determinar los riesgos en la salud y el medio ambiente.

**Sublínea 18.2** Proyectos de determinación de relaciones dosis-respuesta de los contaminantes atmosféricos y sus efectos en la salud y en medio ambiente.

### **Empleo de bioindicadores.**

De acuerdo a Porrini *et al.* (2002), el principal objetivo del control de la contaminación ambiental es la protección de la salud humana y del resto de seres vivos. La mayor parte de metodologías de supervisión aplicadas están basadas en los procedimientos fisicoquímicos que proporcionan, por su alta capacidad analítica, datos exactos en cuanto a la concentración de contaminantes en el ambiente.

Sin embargo, esta información no es completa porque sólo una parte de la contaminación tiene una importancia toxicológica para los organismos. No hay datos sobre la cantidad asimilable o los efectos biológicos de los agentes contaminantes.

Por esta razón los indicadores biológicos, como las abejas de la miel, *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 pueden ser muy útiles. Ellos pueden responder, de acuerdo a la naturaleza del contaminante, con variaciones demográficas, cambios de comportamiento y su bioacumulación, al interceptar y asimilar la fracción biodisponible.

Hasta ahora, estas asunciones no son consideradas por las agencias y organismos de control ambientales, probablemente porque la evaluación de la calidad ambiental con bioindicadores, está basada sólo en la comparación con

instrumentos fisicoquímicos. Así por ejemplo, el hecho de que las abejas estén presentes y visiten todos los sectores ambientales, no es tenido en cuenta.

Las diferentes metodologías e instrumentos encuentran cantidades diferentes de contaminación ambiental, que no necesariamente siempre coinciden. Es posible que el sistema fisicoquímico llegue a encontrar la cantidad total de los contaminantes, sin embargo las abejas encuentran los contaminantes de *modo pragmático*, es decir, considerando la fracción biodisponible y los efectos relacionados.

Se trató que el diseño y desarrollo experimental de las investigaciones aquí planteadas se adecuara a la filosofía de las leyes mencionadas con anterioridad, en cuanto al uso de nuevos métodos de evaluación de la contaminación, como son los bioindicadores.

En este sentido, los resultados de las investigaciones que se presentan en este trabajo nos han permitido disponer de una valiosa información complementaria hasta ahora no tenida en cuenta por los métodos fisicoquímicos de referencia. Así, al inicio de nuestras investigaciones la ciudad de Córdoba contaba con una estación de control de parámetros fisicoquímicos, no habiendo desarrollado hasta ese momento estudio alguno con bioindicadores ambientales.

Entre las ventajas que presenta un estudio con bioindicadores ambientales puede destacarse que:

➤ La mayoría de los estudios, tanto con un objetivo ecológico como sanitario demandan, para resultar significativos, conocer **si la realidad físico-química del medio se está reflejando en la realidad biótica**. Los bioindicadores podrían utilizarse para asegurarnos esta relación.

- Los bioindicadores permitirían conocer la **“biodisponibilidad”** de los contaminantes, es decir, la cantidad de éstos con la que los organismos entran en contacto realmente.
- El enfoque químico no tiene en cuenta ningún **efecto aditivo, sinérgico o antagónico** que pudiera producirse.
- En los datos químicos sólo se cuantifican determinadas sustancias, pero éstas, dentro de los seres vivos pueden experimentar transformaciones (**biotransformación**), dando lugar a metabolitos, muchas veces más agresivos que los productos iniciales (**bioactivación**).
- Las medidas físicas y químicas sólo dan información sobre las condiciones que existen en los instantes en que se obtienen las muestras. La vigilancia biológica permite el estudio de las **condiciones existentes durante un periodo largo de exposición** a un contaminante.
- Los bioindicadores son capaces, además, de **evaluar los efectos de impactos** no relacionados directamente con la contaminación.

Probablemente en el futuro, la sociedad va a sentir la necesidad y va a ir demandando cada vez más un “parte de bioseguridad”, además del meteorológico, para decidir dónde vivir, a dónde poder ir durante las vacaciones y de qué zona consumir alimentos.

<b>SIETE PUNTOS DE INTERÉS PARA CONTEXTUALIZAR ESTA TESIS</b>	
<b>1. ¿Cuál es la finalidad de medir la contaminación?</b>	Evitar que se dañe la salud del ser humano y de los demás seres vivos (plantas y animales).
<b>2. ¿Cómo se mide habitualmente?</b>	Con parámetros físico-químicos.
<b>3. ¿Es suficiente?</b>	No.
<b>4. ¿Por qué?</b>	Porque esos indicadores no nos dicen realmente si la contaminación llega o no a los seres vivos, penetra o no en su interior y de qué manera actúa.
<b>5. ¿Entonces...?</b>	Si la finalidad es evitar que se dañen los seres vivos... ¿por qué no se usan los propios seres vivos? O sea, bioindicadores.
<b>6. ¿Y las abejas?</b>	Tienen muchas ventajas. Las más importantes: <ul style="list-style-type: none"> <li>- Todos los productos químicos requieren para su comercialización pruebas de ecotoxicidad sobre abejas.</li> <li>- Son los bioindicadores del territorio por excelencia. Traen muestras de aire, suelo, vegetación y agua.</li> <li>- Permiten establecer protocolos y estudios fácilmente estandarizables y reproducibles.</li> </ul>
<b>7. ¿Qué podemos esperar en el futuro?</b>	Los SIG (Sistemas de Información Geográfica) nos permitirán elaborar Mapas de Bioseguridad con la información suministrada por las colonias de abejas.  Con las TICs (Tecnologías de la Información y Comunicación) podremos tener información a tiempo real de lo que ocurre en cada estación y colmena.

## 2. OBJETIVOS

En este estudio, se ha investigado el potencial de las colonias de *Apis mellifera*, como bioindicadores ambientales, a través de dos de sus matrices (bioconcentración en abejas y en néctar) para lograr los siguientes objetivos:

1.- Determinar el tipo de información que acerca de la contaminación por metales pesados pueden proporcionar las abejas y el néctar procedentes de estaciones de biomonitorio con *Apis mellifera*.

2.- Evaluar la contaminación de metales pesados en la ciudad de Córdoba (España) e identificar las localizaciones y fechas preocupantes.

3.- Basados en esos resultados, considerar si las estaciones de biomonitorio de *A. mellifera* pueden ser integradas en programas habituales de control de la contaminación del aire en ciudades y usadas como herramientas de certificación.

Con estos objetivos pensamos que se puede contribuir a la mejora de la gestión de la calidad medioambiental en el entorno urbano, mediante la elaboración de mapas de bioseguridad y la facilitación de información para la toma de decisiones, la planificación de distintos usos del territorio y la propuesta de medidas preventivas.

### **3. ANTECEDENTES DEL EMPLEO DE ABEJAS COMO BIOINDICADORES. EL USO DE *APIS MELLIFERA* PARA EVALUAR LA CONTAMINACIÓN POR METALES PESADOS**

#### **3.1. Situación medioambiental.**

La producción, uso y consumo de productos químicos ha sido uno de los indicadores de desarrollo desde el s. XIX con la Revolución Industrial y posteriormente en el s. XX con la Revolución Verde. Durante estos periodos ha habido un aumento de la calidad de vida, de la seguridad agroalimentaria y la longevidad de la población. Sin embargo, nadie puede negar hoy en día que la contaminación ambiental, el cambio climático y la pérdida de la biodiversidad se han convertido en un grave problema para la salud pública y una amenaza para los equilibrios ecológicos que sustentan la vida (Acuña, 2011).

Por este motivo, actualmente, a nivel general, se incide en la necesidad de reducir emisiones, implantar medidas preventivas y establecer sistemas de vigilancia y seguimiento de los contaminantes (Unión Europea [UE], 2010).

#### **3.2. Contaminación atmosférica por metales pesados.**

En relación a la calidad atmosférica, la contaminación por partículas finas ( $PM_{2,5}$ ) y gruesas ( $PM_{10}$ ) constituye uno de los principales problemas asociados a los medios urbanos. Este hecho se refleja en el Informe Técnico de la calidad del aire en Europa 2012, donde se estima que, durante el periodo 2001-2010, entre el 18 y el 41% de la población urbana de la UE estuvo potencialmente expuesta a concentraciones que superan el valor límite fijado para la protección de la salud humana (Agencia Europea de Medio Ambiente [AEMA], 2013).

En este sentido, la Organización Mundial para la Salud (2007) advierte además sobre la importancia de identificar la composición química de estas partículas para determinar su toxicidad, pues en ellas se incluye tanto partículas de polvo en suspensión arrastrado largas distancias por el viento, como metales pesados de actividades de origen antropogénico.

Los metales pesados, son peligrosos porque no son química ni biológicamente degradables y pueden persistir en el medio ambiente durante mucho tiempo (Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición [AECOSAN], s.f.). En diferentes procesos industriales, de combustión o agrícolas, los metales pesados pueden ser liberados al aire, a las aguas y/o al suelo, y transferirse de un compartimento medioambiental a otro (Järup, 2003; Gall *et al.*, 2015).

Los metales pesados pueden depositarse o acumularse en los organismos, siendo las plantas en los ecosistemas terrestres un punto de conexión importante entre la parte abiótica y biótica del ecosistema en la transferencia de metales (Hamilton, 1995).

Con carácter general, elevadas concentraciones de metales pesados pueden producir efectos nocivos en los humanos (Duruibe *et al.*, 2007) y causar daños en otros seres vivos y en la salud de los ecosistemas (Sánchez, 2008). Además, la combinación de estos elementos potencialmente tóxicos puede actuar aditiva, sinérgica o antagónicamente (Boyd, 2010).

A pesar de los recortes en las emisiones de metales pesados estimadas desde 2001 en la UE, la deposición atmosférica de metales pesados como Cd, Pb o Hg, que son reconocidos como tóxicos para la biota (AEMA, 2011), ocasiona que una parte de los ecosistemas esté en riesgo (AEMA, 2013).

Desde 1998, estos tres metales son específicamente contemplados en el Protocolo de Aarhus, derivado del Convenio de Ginebra de 1979 sobre Contaminación Atmosférica Transfronteriza de la Comisión Económica de las

Naciones Unidas para Europa (UNECE), el cual obliga a las partes firmantes a reducir sus emisiones (España, 2011a).

Según el Plan de Mejora de la Calidad del Aire de la Ciudad de Córdoba, las partículas  $PM_{10}$  constituyeron el contaminante más problemático de la ciudad en el periodo 2003-2008, superándose la media anual en el año 2006, y el valor límite diario para la protección de la salud humana en los años 2006 y 2007 (Andalucía, 2014).

De acuerdo al Observatorio de la Sostenibilidad en España (OSE), las partículas procedentes del Sahara que pueden aumentar la contaminación de fondo en ciertos lugares e influir de manera puntual en los niveles máximos diarios de  $PM_{10}$ , no influyen en la media anual (OSE, 2007).

En cuanto a la caracterización química del material particulado (componentes mayoritarios y elementos traza), un estudio realizado en los años 2007 y 2008 reflejó que para muchos elementos traza, los valores medidos en la estación cordobesa son superiores a los valores medios registrados en otras estaciones de fondo urbano de España, siendo Ga, Zn y Cd los elementos con mayor abundancia relativa. (Andalucía, 2014).

### **3.3. Métodos de evaluación de los metales pesados.**

El control y análisis de la contaminación atmosférica está basada principalmente en el establecimiento de estaciones automáticas de vigilancia que proporcionan información precisa de la concentración físico-química de los principales parámetros ( $SO_2$ ,  $NO_2$ ,  $NO_x$ ,  $PM_{10}$ ,  $PM_{2.5}$ , benceno, CO and Pb).

Como los metales pesados pueden estar unidos a las partículas, la legislación requiere que As, Cd y Ni sean medidos en la fracción de partículas  $PM_{10}$  (España, 2011b).

Específicamente, la monitorización de metales pesados emitidos al aire, a las aguas o al suelo (Cd, Tl, Hg, Sb, As, Pb, Cr, Co, Cu, Mn, Ni, V) debe ser realizada en las fuentes emisoras por los responsables de las instalaciones o actividades industriales con elevado potencial de contaminación como medida de autocontrol (UE, 2010).

Los organismos responsables de la administración eligen localizaciones adecuadas de acuerdo a las directivas de calidad del aire, para monitorizar las concentraciones en el aire de los metales pesados que generan mayor preocupación por su exposición medioambiental (Pb, As, Cd, Hg and Ni), con la finalidad de evaluar el cumplimiento de los valores límite establecidos para la protección de la salud humana (UE, 2005; UE, 2008). Además de estos metales, la propia OMS propone valores guía para Mn y V, y destaca el posible impacto sobre la salud humana del Cr (Querol, 2008).

En algunos lugares se cuenta también con estaciones móviles que se utilizan para calibrar las estaciones fijas, o para realizar mediciones puntuales ante circunstancias especiales en zonas no cubiertas por las estaciones fijas (Boquete *et al.*, 2013).

El número de estaciones en Europa es aún relativamente pequeño (AEMA, 2013), tienen un coste elevado, y requieren calibraciones frecuentes (Boquete *et al.*, 2013).

En el Real Decreto relativo a la mejora de la calidad del aire, se establecen los criterios para determinar el número de puntos de muestreo (España, 2011b). En las aglomeraciones de entre 250.000 y 490.000 habitantes, la normativa exige al menos una estación para la medición fija de Pb, y en las que tengan entre 0 y 749.000 habitantes, una estación para la medición fija de As, Cd y Ni. El número de estaciones puede aumentar en función de que se superen o no ciertos umbrales establecidos para estos contaminantes, así como de las densidades de emisión, los patrones probables de distribución de la contaminación y de la exposición potencial de la población.

Como las estaciones de vigilancia proporcionan datos de contaminación en puntos geográficos fijos, la propia normativa insta al uso de técnicas de modelización para calcular el grado de exposición colectiva de la población residente en zonas intermedias (España, 2011b), lo que supone una estimación indirecta de la exposición real a los contaminantes.

En este sentido, la caracterización de “puntos calientes” y la representatividad de las estaciones de muestreo como indicadores de niveles de exposición de la población se han convertido en puntos esenciales en las técnicas de diseño de redes de muestreo (Pérez, 2005).

### **3.4. Utilización de bioindicadores en evaluación medioambiental.**

En la Ley de Responsabilidad Ambiental se define daño ambiental como aquel que afecta a las especies y hábitats naturales y que, entre otros aspectos, produce efectos adversos significativos en el número de individuos de una especie, su densidad, o la extensión de su zona de presencia; también se incluyen aquí los daños provocados por los elementos transportados por el aire (España, 2007b).

Por ello, conocer las concentraciones de contaminantes a partir de los métodos físico-químicos, siendo importante, significa conocer sólo una parte del problema puesto que no permite extraer conclusiones directas del daño ambiental en el ser humano y demás seres vivos (Klumpp y Klumpp, 2004; Ordóñez *et al.*, 2007).

Esto conduce a la necesidad de utilizar bioindicadores, ya que si la evaluación de la contaminación medioambiental tiene por finalidad evitar que se afecte la salud de los seres vivos, entonces es lógico que de alguna manera

los propios seres vivos sean tenidos en cuenta en esta valoración (Klumpp y Klumpp, 2004).

Un bioindicador puede ser definido entonces, como una especie o grupo de especies que reflejan los estados bióticos y abióticos del medio ambiente y cuya observación o seguimiento nos permite detectar e interpretar los cambios y alteraciones producidos en un hábitat, una comunidad o un ecosistema (McGeoch, 1998 en Hodgkinson y Jackson, 2005).

La historia de los bioindicadores es tan antigua como la del propio ser humano (Figura 1).

En el Libro de Agricultura General de Alonso de Herrera (1513) se dice: “Quando salen gusanos y lombrices so tierra, y las hormigas con prisa ponen en cobro sus vituallas, o sus huevos, muestran agua, y es señal de ser duradera”.

El caso de melanismo industrial de la especie de *Biston betularia* Linnaeus, 1758, con dos variantes de color claro y oscuro, es un típico ejemplo en la revolución industrial de Inglaterra en el siglo XIX (Kettlewell, 1958).

“Observar animales evitó muerte de tribus” (Axxón, 2004). El gorjeo de los pájaros o el inusual comportamiento de iguanas y delfines salvó al parecer a las tribus autóctonas de las islas indias de Andaman y Nicobar de los mortales tsunamis que asolaron el sur de Asia.

## Ejemplos de Bioindicadores

La historia de los bioindicadores se remonta hasta los orígenes de la humanidad.

Tratado de Agricultura General de Alonso Herrera (1513).

"Quando salen gusanos y lombrices so tierra, y las hormigas con prisa ponen en cobro sus vituallas, o sus huevos, muestran agua, y es señal de ser duradera".



*Biston betularia*

Con dos variantes de color claro y oscuro (melanismo industrial).

"Observar animales evitó muerte de tribus"

El gorjeo de los pájaros o el inusual comportamiento de iguanas y delfines salvó al parecer a las tribus autóctonas de las islas indias de Andaman y Nicobar de los mortales tsunamis que asolaron el sur de Asia. (Nueva Delhi, India, 26 de diciembre de 2004)



La utilización de *Apis mellifera* como bioindicador se remonta a 1935.

Figura 1. Ejemplos de bioindicadores.

A menudo los cambios ambientales son atribuidos a perturbaciones antropogénicas por lo que los bioindicadores son frecuentemente estudiados para evaluar la evolución de la calidad ambiental (Holt and Miller, 2010).

Existen campos o sectores ambientales, como la política de aguas, donde los bioindicadores se vienen empleando desde el año 2000. Así en este marco, el estado de las aguas se clasifica y evalúa en base a un conjunto de indicadores biológicos, hidromorfológicos y de carácter físico-químico (UE, 2000).

Hodkinson y Jackson (2005) consideraron que los invertebrados terrestres comparten con los acuáticos muchas de las características que los hacen valiosos para ser utilizados como bioindicadores, por lo que auguran que en un futuro la implantación de los invertebrados terrestres será similar a la de los acuáticos.

Lo cierto es que en relación a los ambientes terrestres, los bioindicadores aún no cuentan con suficiente aceptación por parte de los responsables políticos, la administración pública o el sector privado. Esto puede deberse a la insuficiente estandarización de los métodos empleados y la consecuente baja comparabilidad de los resultados obtenidos (Klumpp y Klumpp, 2004), así como a la ausencia de regulación específica para los ambientes terrestres (Hodkinson y Jackson, 2005).

### **3.5. Colonias de *A. mellifera* como bioindicadores.**

La utilización de la abeja melífera como bioindicador se remonta a 1935, cuando Svoboda presintió que este insecto podría proveernos con importante información sobre el impacto medioambiental de ciertas industrias en un área determinada (Crane, 1984).

Efectivamente *Apis mellifera* posee excepcionales cualidades y la mayoría de los requerimientos básicos que la convierten en un valioso instrumento de monitorización ambiental.

- A) Ser bien conocida taxonómicamente, fácilmente identificable.
- B) Estar ampliamente estudiada.
- C) Ser una especie abundante con una amplia área de distribución geográfica.
- D) Permitir su seguimiento a lo largo de un periodo prolongado de tiempo.
- E) Responder a los cambios que se producen en el medio.
- F) Ofrecer información sobre los riesgos para otros organismos.
- G) Tener importancia económica.
- H) Ser fácilmente manipulable.
- I) Suponer un coste reducido.

A) La abeja melífera es una especie **bien conocida taxonómicamente** (Ruttner y Louveaux, 1988), **fácilmente identificable** por personas no especialistas y no declarada como especie amenazada.

B) Se trata del **insecto social mejor estudiado** y existen abundantes datos sobre muchos aspectos de su biología, fisiología, comportamiento y ecología, incluyendo los agentes patógenos que las afectan (Von Frish, 1969; Seeley, 1995). En 2006 un equipo internacional de científicos logró secuenciar el genoma de este insecto (The Honeybee Genome Sequencing Consortium, 2006).

C) Es una **especie abundante**, que tiene una **amplia área de distribución geográfica**. Es la abeja más utilizada en las prácticas apícolas de todo el mundo. Este insecto, nativo de Europa, Oriente Medio y África, ha sido introducido por los apicultores desde el siglo XVII al XIX en América, Asia, Australia y las islas del Pacífico (Seeley, 1995). Por lo tanto puede ser utilizada en ambientes diversos y prácticamente a nivel mundial, posibilitando la realización de protocolos reproducibles y estandarizables. Además, las colmenas pueden ser **deliberadamente transportadas** a la zona de estudio y dispuestas según los objetivos perseguidos. El número de colmenas y los emplazamientos seleccionados dependerá igualmente del propósito del estudio y de la relación coste-eficacia (Bromenshenk y Preston, 1986).

D) Su alta tasa de reproducción, y una vida media relativamente corta (entre 4-5 semanas en primavera-verano y 3-4 meses en otoño-invierno), hace que la colonia se vea sujeta a una rápida y continua regeneración (Porrini *et al.*, 2003), de manera que puede proporcionar muestras representativas regularmente, a diario inclusive, y **asegurar la continuidad de estudios a largo plazo**. Esto también permite que se puedan medir los contaminantes que se vierten al medio ambiente en un determinado período de tiempo, así como medir su bioacumulación en los diferentes productos apícolas a más largo plazo (Market *et al.*, 2011).

E) Las abejas melíferas pueden **responder a determinadas alteraciones ambientales** de diferentes maneras. De una parte son tolerantes a ciertos contaminantes, como por ejemplo a metales pesados, por lo que pueden acumularlos en sus cuerpos o en sus productos; por otra parte, presentan extrema sensibilidad a otros grupos de contaminantes, como son los plaguicidas, causándoles en muchas ocasiones la muerte (Porrini *et al.*, 2002). En ambas respuestas, los parámetros estudiados (residuos y mortalidad) pueden ser cuantificados.

F) La abeja melífera ofrece también **información sobre los riesgos para otros organismos** debido a su sensibilidad a los plaguicidas e insecticidas (Devillers, 2002a), explicada recientemente por una deficiencia en el número de genes encargados de codificar enzimas de detoxificación con respecto al genoma de otros insectos (Claudianos *et al.*, 2006). Ello la convierte en una herramienta muy interesante para su uso como organismo centinela o sistema de alerta temprana ante los riesgos ambientales derivados de la utilización de productos fitosanitarios (Bomenshenk y Preston, 1986). De esta manera, siguiendo a Kevan (1999), elevadas cantidades de abejas muertas delante de las colmenas y la observación de comportamientos anómalos en las colonias son síntomas o signos de serios problemas ambientales.

G) Se trata de una especie de **gran importancia ecológica y económica**, al ser relevante su función en la ecología y en la seguridad agroalimentaria de nuestro planeta, puesto que forma parte de ese conjunto de animales que llevan a cabo la polinización de numerosas especies botánicas, tanto silvestres como de interés para la alimentación de personas y animales.

Desde el punto de vista ecológico, los polinizadores juegan un papel crucial para el mantenimiento de la integridad funcional de los ecosistemas terrestres (Gallai *et al.*, 2009; Potts *et al.*, 2010), y las abejas, en concreto, ocupan un lugar central en las redes de biodiversidad de los ecosistemas (Bascompte *et al.*, 2006, Tautz, 2008). Es conocido que los impactos negativos sobre especies clave que cumplen un importante servicio ecológico pueden

acarrear graves problemas ambientales, por lo que los polinizadores han sido estudiados como bioindicadores de la salud y biodiversidad de los ecosistemas (Kevan 1999).

Desde el punto de vista de la seguridad agroalimentaria, según la FAO (s.f.) los polinizadores animales, entre ellos las abejas (silvestres y domésticas), son responsables del 35% de la producción mundial de cultivos y aumentan el rendimiento de 87 de los cultivos alimenticios más importantes a nivel mundial, estimándose el valor económico de la polinización en 153 mil millones de euros.

H) Las colonias de abejas son **sencillas de manipular** y la toma de muestras es muy asequible. Además, su alta tasa de reproducción (3 semanas) origina numerosos individuos que presentan similares características (Devillers, 2002b). El incremento del número de muestras permite discernir entre las respuestas estadísticamente significativas (Bromenshenk y Preston, 1986).

I) Por todo lo anterior, la utilización de estaciones de biomonitoreo con *Apis mellifera* es un sistema para evaluar la contaminación ambiental de costes reducidos, especialmente en relación al número de muestras que pueden ser tomadas (Porrini *et al.*, 2002). Según los responsables de la administración andaluza, una estación para el seguimiento de la contaminación atmosférica por métodos físico-químicos en la ciudad de Córdoba, tenía un coste aproximado de 120.000€ al inicio de nuestras investigaciones, en el año 2007 (A. Lozano 2007, com. pers. de 2 febrero).

En la Tabla 1 se comparan características de parámetros físico-químicos, bioindicadores en general y abejas.

**Tabla 1.** Comparación entre indicadores fisicoquímicos, bioindicadores en general y abejas de la miel.

CARACTERÍSTICAS	FÍSICO-QUÍMICOS	BIOINDICADORES	ABEJAS
1. Efectos sobre seres vivos.	No	Sí	Sí
2. Muestreo amplio, uniforme y fiable.	No	Zonal	Sí
3. Origen de la contaminación.	No	Depende	Sí
4. Acumulación.	No	Depende	Sí
5. Cualquier hábitat.	Sí	No	Sí
6. Coste razonable.	No	Depende	Sí
7. Beneficios ambientales	No	Sí	Sí

### 3.6. El proceso de biomonitorio.

El biomonitorio o biomonitorización consiste en la observación y seguimiento en el tiempo de un bioindicador y se manifiesta por la presencia o ausencia del ser vivo y la influencia de los cambios en su ciclo de vida, por las modificaciones estructurales y/o morfológicas, por las variaciones demográficas y/o cambios de comportamiento y por la acumulación de sustancias contaminantes particulares en sus tejidos en cantidades medibles (Porrini *et al.*, 2002).

Si bien ambos términos se usan indistintamente en muchos trabajos, algunos autores distinguen entre **bioindicadores**, si éstos muestran la situación medioambiental desde el punto de vista cualitativo, y **biomonitorio**, si además lo hacen en términos cuantitativos, mediante comparación de rangos o en relación a un valor considerado de “background” o estándar (Hawksworth *et al.*, 2005; Anze *et al.*, 2007).

También se diferencia, desde el punto de vista operativo entre biomonitoreo activo y pasivo, siendo el **biomonitoreo activo**, cuando los bioindicadores son introducidos deliberadamente en el medio ambiente para ser examinado, y **biomonitoreo pasivo** cuando se aprovecha de individuos que ya están en el territorio (Market *et al.*, 2011).

Sin embargo, para algunos organismos, incluidas las abejas, las definiciones de pasivo y activo pueden tener otro significado. Así por ejemplo, en el **biomonitoreo pasivo** se detectan sustancias para las que el bioindicador, por su propia naturaleza, está capacitado para capturar en un entorno determinado, mientras que en el **biomonitoreo activo** se detecta una única sustancia para la que el bioindicador ha sido condicionado a percibir, como por ejemplo los explosivos o las drogas en el caso de las abejas. (C. Porrini, 2015 com. pers., de 23 enero).

Una particularidad muy interesante de las abejas melíferas durante el biomonitoreo es que visitan **la mayoría de los compartimentos ambientales** (aire, vegetación, suelo y agua) (Porrini *et al.*, 2002) recogiendo los contaminantes que circulan en los medios gaseosos, sólidos y líquidos (Simmons *et al.*, 1990).

Si la colonia quiere tener éxito en la recogida de **polen y néctar** (aproximadamente 20 y 120 kg al año respectivamente), debe desplegar sus abejas recolectoras entre la vegetación para poder recogerlos de manera eficiente, en suficiente cantidad y con la correcta calidad nutricional, lo que las obliga a supervisar cuidadosamente las fuentes de alimento dentro de su área de pecoreo (Seeley, 1995).

Las especies vegetales también son visitadas para la recolección de secreciones de las partes vivas de las plantas o de las excreciones de insectos chupadores, que utilizan las abejas para elaborar los **mielatos**, y acuden a varias especies botánicas con objeto de recolectar resinas de los brotes para la

elaboración de propóleo (Celli y Maccagnani, 2003) o recoger el agua del proceso de gutación (Girolami *et al.*, 2009).

Además de la vegetación, las abejas visitan diversos **recursos hídricos** (pozos, zanjas de irrigación, charcas...) para proveer a la colonia de los aproximadamente 25 kg anuales de agua que necesitan para la dilución del alimento de la cría y el enfriamiento de los panales de cría en temporadas calurosas (Seeley, 1995). Según Balestra *et al.*, (1992), la cantidad puede llegar a ser de medio litro por día y colmena en climas templados.

Junto con los recursos necesarios para la supervivencia de la colonia, **diversas sustancias, contaminantes o no, pueden ser recogidas** involuntariamente y llevadas a un punto fijo, la colmena, donde dichos recursos son utilizados, distribuidos y/o almacenados y quedan disponibles para ser analizados (Porrini *et al.*, 2002; Celli *et al.*, 2003).

Además de todo ello, el cuerpo de las abejas está **cubierto de quetas** ramificadas que se cargan electrostáticamente con el vuelo, y esto las convierte en colectoras extremadamente efectivas de sustancias químicas o biológicas con las que entra en contacto (Erickson 1975; Bromenshenk *et al.*, 2002). Y así, durante los vuelos que realizan en busca de recursos, las abejas pueden atrapar casualmente las partículas del aire en sus quetas o inhalar diversas sustancias que pueden quedar retenidas en su interior (Porrini *et al.*, 2002; Celli *et al.*, 2003).

Así, para satisfacer sus necesidades, una colonia de abejas funciona como una gran **entidad ameboide** y difusa, que puede extenderse a una gran distancia en múltiples direcciones simultáneamente (Seeley, 1995). El área en el cual las abejas pecorean e interceptan contaminantes depende de la calidad de los recursos disponibles (Couvillon *et al.*, 2014). La distancia que pueden recorrer las recolectoras desde la colmena puede variar entre menos de 1 km (Garbuzov *et al.*, 2014) hasta aproximadamente 10 km si los recursos escasean o es detectada una floración muy atractiva (Beekman y Ratnieks, 2000),

abarcando entonces un área media que puede alcanzar los 100 km<sup>2</sup>. En situaciones con una buena alimentación se estima una superficie de unos 7 km<sup>2</sup> con radios de pecoreo de entre 1,5 km y 2 km (Crane, 1984).

**Miles de “micromuestras”** de la zona circundante a la colonia son traídas por estas abejas cuando regresan a la colmena. Cada abeja puede hacer hasta diez vuelos al día (Winston, 1987) visitando aproximadamente 1000 flores de las que toman néctar (Porrini *et al.*, 2002), o en torno a 800 para llenar las cestillas de polen (Celli *et al.*, 2003).

Alrededor de una cuarta parte de los miembros de la colonia son **abejas recolectoras** (Seeley, 1995). Eso significa que, diariamente, un número considerable de individuos están “recolectando información” si se tiene en cuenta que, la población media de una colonia, oscila entre 20.000 y 40.000 individuos, aunque ésta aumenta o disminuye según la época del año.

Con las colonias de *Apis mellifera* podemos además trabajar con **distintas matrices**. Así muestras de abejas, larvas, polen, miel, propóleo y/o cera pueden utilizarse para evaluar distintas características de la salud ambiental de una zona determinada. Por ejemplo, en ambientes contaminados, un análisis del polen recogido por las abejas puede aportar información de la procedencia de los contaminantes (Porrini *et al.*, 2002) si se cuenta con un mapa florístico de la zona.

Además, como las colonias pueden ser inspeccionadas y son fáciles de manejar, se pueden tomar datos sobre la influencia de algunas perturbaciones ambientales en el **desarrollo de la colonia**. Parámetros como la población de abejas adultas, la cantidad de cría, la producción de cera o la cantidad de miel y polen cosechados, pueden ser medidos cuantitativamente y establecer diferencias entre colonias expuestas o no a determinados riesgos (Bromenshenk *et al.*, 1991).

Es preciso señalar, por último, que siendo la apicultura una actividad ganadera extendida por todo el mundo, los **apicultores** pueden convertirse en formidables aliados en la evaluación medioambiental. Bromenshenk y Preston (1986), por ejemplo, coordinaron una red de apiarios profesionales, localizados en más de 40 puntos diferentes, con el propósito de monitorizar una amplia gama de contaminantes en una vasta región de la costa noroeste del estado americano de Washington.

Más recientemente, durante la pasada década, miles de apicultores en Europa y EEUU advirtieron irregularidades en el desarrollo de las colonias que les causaron numerosas pérdidas de colmenas. La alerta suscitada por los cuantiosos perjuicios económicos en agricultura y por el posible impacto medioambiental de la pérdida de colonias, condujo a numerosos investigadores a estudiar a fondo las causas de lo que se denominó posteriormente en EEUU “Colony Collapse Disorder” (Van Engelsdorp *et al.*, 2009; Pettis y Delaplane, 2010) y en Europa “Síndrome de Despoblamiento de las Colmenas” (Genersch *et al.*, 2010; Maini *et al.*, 2010).

Pese a todas las ventajas destacadas en el biomonitoreo con abejas melíferas como organismos bioindicadores, existen sin embargo algunas limitaciones (Porrini *et al.*, 2002):

- En días lluviosos las abejas no salen de la colmena y la temperatura debe ser al menos de 10°C para permitir el vuelo, por lo que en determinadas latitudes no pueden ser usadas en invierno.
- Las abejas recolectoras pueden no regresar a su colmena al desviarse hacia otras colmenas por el fenómeno de la deriva o al morir en el exterior de forma natural o por algún tipo de xenobiótico.
- No es fácil hacer un censo real de la colonia, sobre todo en cuanto a la edad y etapa de desarrollo de sus miembros.

- La tendencia incontrolada de las familias a escoger su fuente de alimento de forma autónoma.

Como muestra la Tabla 2, en la biomonitorización ambiental con abejas melíferas existen distintos niveles, de acuerdo a su complejidad técnica y metodológica (Accorti, 1994).

**Tabla 2.** Niveles de monitorización ambiental con abejas melíferas (según Accorti, 1994). a=colmena tradicional, b=colmena especial, c=trampa para abejas muertas, d=trampa de polen, e=recolección de pecoreadoras, f=fuerza de la colmena, g=contador de abejas electrónico.

Nivel	I	II	III	IV	V	VI
<b>Contexto</b>	Apicultura	Polinizac.	Polinización Monitorizac.	Monitorizac.	Monitorizac.	Monitorizac.
<b>Método contaje</b>	Manual	Manual	Manual	Manual	Manual	Automático
<b>Equipo y técnica</b>	a, c	a, c	a, c, d	a, c, d, e	a, c, d, e, f	b, c, d, e, f, g
<b>Frecuencia muestreo</b>	1 X 7 días	1-2 X 7 días	1-3 X 7 días	1-5 X 7 días	3-5 X 7 días	Continuo
<b>Tiempo requerido</b>	+	+ / +++	+ / +++	+++	+++	+ / +++++
<b>Cualificación requerida operador</b>	+	+	+	++	+++ / +++++	++++
<b>Sensibilidad</b>	+	+ / +++	++ / +++++	++ / +++++	++++	++++
<b>Coste</b>	+	+	++	++	+++	++++
<b>Aplicabilidad en el campo</b>	++++	+++	+++	++	+	+

El desarrollo tecnológico puede ayudar a remediar algunas de las limitaciones mencionadas. Actualmente se dispone, por ejemplo, de **contadores de abejas electrónicos** (Beescan®) que se colocan en la piquera y registran la entrada y salida de abejas mediante unos sensores. Este contador, de alta resolución entre dos grabaciones sucesivas y buena compatibilidad con el software estadístico estándar, comprende 32 canales

bidireccionales con paso individual para evitar un flujo continuo de abejas. Este sistema añade información al método tradicionalmente usado para contabilizar abejas muertas, que consiste en la colocación de una jaula “underbasket” bajo la colmena (Accorti *et al.*, 1991).

Además se han desarrollado métodos de evaluación no invasivos de la población del interior de la colmena mediante una **cámara de infrarrojos**, encontrando que los mejores resultados se obtienen al amanecer, cuando el contraste térmico entre la colmena y el suelo es mayor (Shaw *et al.*, 2011).

Asimismo, se han desarrollado avances tecnológicos para el seguimiento de las abejas pecoreadoras en sus vuelos de inspección y forrajeo.

El método desarrollado por Riley *et al.*, (1996) basado en el **radar armónico**, es un ejemplo de ello. Utilizando diminutos detectores electrónicos pegados al tórax de abejas pecoreadoras, las siguieron en un rango de 700 metros y a una altitud de entre pocos centímetros sobre el suelo hasta cerca de 3 metros.

Shaw *et al.* (2005) desarrollaron varios métodos mediante la tecnología **LIDAR** (acrónimo del inglés *Light Detection and Ranging Laser Imaging Detection and Ranging*), por la cual se pueden obtener datos de la posición y elevación de los insectos en el territorio.

Las técnicas de Identificación por Radiofrecuencia o **RFID** (acrónimo del inglés *Radio Frequency Identification*) ofrecen, según Decourtye *et al.*, (2010), numerosas ventajas para el seguimiento de abejas, ya que permiten monitorizar e identificar a un gran número de individuos simultáneamente, y registrar y almacenar la información de forma rápida.

De esta forma, puede verse cómo las nuevas tecnologías van a ir incorporando nuevas formas de medición que complementen el convencional biomonitoreo a pie de campo. A través de las **TICs** (Tecnologías de la

Información y la Comunicación), será posible obtener información en tiempo real, en cualquier parte del mundo, de estaciones preparadas para ello. Es posible disponer de cámaras de visión, micrófonos, sensores de temperatura, humedad y peso por control remoto, agilizando la toma de decisiones en estudios de monitoreo ante situaciones anómalas (Ruiz *et al*, 2013).

### **3.7. Tipos de estudios realizados con *A. mellifera*.**

Por las ventajas descritas anteriormente, muchos investigadores están utilizando las abejas melíferas y sus productos en distintos tipos de estudios de calidad y contaminación medioambiental.

#### **Cambio climático y biodiversidad.**

Colonias de abejas han sido empleadas en estudios de **cambio climático**. Así por ejemplo Esaias *et al.* (2009) utilizaron el peso de una red de colmenas para definir la fenología del flujo de néctar y recogieron información de la Tierra vía satélite, para entender el impacto del Cambio Climático y de las cubiertas vegetales en las relaciones planta-polinizador. Comprobaron que en la región Mid-Atlantic (EEUU) el flujo de néctar es ahora 25 días antes que en 1970, y que este hecho está muy relacionado con el aumento de las temperaturas mínimas de invierno.

La iniciativa de CSI Pollen del grupo de investigadores de la asociación Coloss, pretende estudiar la nutrición de las colonias de *Apis mellifera* pero supone además una información muy importante sobre la **biodiversidad** de plantas fanerógamas y flora apícola (COLOSS, 2015).

## **Partículas (PM).**

Durante el vuelo de las abejas, las **partículas del aire** pueden ser adheridas a su cuerpo, o pueden ser ingeridas. Negri *et al.* (2015) analizaron la morfología y características químicas de las partículas del aire encontradas en distintas partes de las abejas, mediante técnicas de microscopía electrónica de barrido y radiografía espectroscópica. En menos de tres semanas el cuerpo de las abejas estuvo cubierto por miles de partículas. Su análisis le permitió identificar tres categorías de partículas procedentes de la industria, de yacimientos mineros abandonados y del suelo, respectivamente.

## **Metales pesados.**

Por su tolerancia y posibilidad de acumulación, las colonias de abejas también han sido utilizadas para la detección y evaluación de otros contaminantes tales como **metales pesados** (ver más adelante).

## **Isótopos radiactivos.**

Colonias de *A. mellifera* se han empleado en la detección y evaluación ambiental de **isótopos radiactivos** por su tolerancia a estos elementos y su posibilidad de acumularlos, tanto en los individuos como o en los productos.

El uso de la abeja para monitorizar isótopos radiactivos data de 1950 pero no fue hasta el accidente de Chernobyl en 1986, cuando quedó demostrada la eficacia de este insecto para detectarlos. Con este propósito, Tonelli *et al.* (1990) dispusieron una red de colmenas en el norte de Italia concluyendo que las abejas y especialmente el polen resultaron ser buenos indicadores. Barišić *et al.* (1999), en Croacia, determinaron que, en el caso del Cs<sup>137</sup>, los mielatos pueden ser buenos bioindicadores y mostrar las consecuencias de sucesos de

contaminación a escala global y local, incluso mucho tiempo después de que hayan acontecido.

En 1998, las estaciones de biomonitorio permanente de la Universidad de Bolonia detectaron una inusual presencia de Cs<sup>137</sup> en las abejas, atribuida posteriormente a un accidente nuclear que tuvo lugar en Algeciras (España), a más de 2000 km de distancia (Porrini *et al.*, 2002)

Por su parte Haarmann (1998), que estudió la colonia de abejas para explorar los movimientos de material radiactivo desde los componentes abióticos a los sistemas biológicos, pudo determinar el origen de la contaminación en una laguna de residuos radiactivos.

Según Ravetto *et al.* (1988), las colonias de abejas podrían considerarse para tener bajo control una estación nuclear desde antes de su construcción, durante la misma y, posteriormente, durante el tiempo de vida productiva.

### **Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP).**

Estos contaminantes pueden ser también acumulados en los tejidos de las abejas o en sus productos. Dobrinas *et al.* (2008) utilizaron muestras de miel y propóleo para evaluar la presencia de **hidrocarburos aromáticos policíclicos**, y Amorena *et al.* (2009) utilizaron a las abejas con el mismo fin, no detectando niveles alarmantes de estos compuestos en ningún caso. Lambert *et al.* (2012a), que emplearon muestras de abejas, miel y polen, concluyó que las abejas fueron la matriz más sensible, tanto para detectar bajas concentraciones de HAP en el ambiente como los picos de contaminación.

## **Dióxido de azufre (SO<sub>2</sub>).**

Ponikvar *et al.* (2005) comprobaron cómo el contenido de **SO<sub>2</sub>** en miel se redujo proporcionalmente a como lo hicieron las emisiones de una central eléctrica (de carbón) tras tomar medidas correctoras.

## **Compuestos orgánicos volátiles o semi-volátiles.**

Utilizando tubos con tamices moleculares de carbón, Smith *et al.* (2002) extrajeron aire del interior de colmenas situadas en una antigua zona militar en proceso de restauración. Además de detectar los compuestos liberados por la fisiología de las abejas, las reservas de la colmena, y los componentes de su construcción, encontraron una amplia gama de **compuestos orgánicos volátiles o semi-volátiles** que son contaminantes, tales como los derivados de combustibles fósiles, disolventes industriales, plaguicidas y explosivos.

## **Plaguicidas.**

Además de organismo test, las colonias de *A. mellifera* han sido usadas como bioindicadoras de la calidad ambiental derivada del uso de **plaguicidas** por su sensibilidad o su acumulación en los productos apícolas. La mortalidad de abejas y el análisis de las mismas (Porrini *et al.*, 1998; 2002; 2014; Ghini *et al.*, 2004), el análisis de la miel (Balayannis y Balayiannis, 2008), o el análisis de abejas del interior de las colmenas, del polen y de la cera (Chauzat *et al.*, 2011), pueden utilizarse para ello. La identificación del ingrediente activo, su nivel de peligro, su distribución espacial y temporal, la determinación de periodos o lugares en los que fue utilizado inapropiadamente o la detección de sustancias no autorizadas, son algunas de las posibilidades que ofrece este sistema y mencionadas por estos investigadores.

Recientemente la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) ha llevado a cabo una importante revisión de la guía para la evaluación del riesgo de los plaguicidas en abejas, en línea con las preocupaciones expresadas por miembros del Parlamento Europeo y asociaciones de apicultores a la Comisión, por las implicaciones que pudieran tener los plaguicidas en el despoblamiento de las colmenas, haciéndose también extensiva a los abejorros y a las abejas solitarias (Comisión Europea, 2010; EFSA, 2013). La conveniencia de incluir programas de monitoreo y vigilancia en toda la UE para evaluar el desarrollo de las colonias, los efectos subletales de los plaguicidas y la mortalidad real de abejas en campo comienza a ser una necesidad imprescindible (EFSA, 2014).

### **Microorganismos.**

Por su cuerpo velludo y comportamiento forrajero, las colonias de abejas también han sido utilizadas para detectar diversos tipos de **microorganismos**. La presencia de agentes patógenos de plantas cultivadas que causan graves perjuicios tanto en términos fitosanitarios como económicos, pueden ser detectadas por las abejas, incluso en ausencia de síntomas, como es el caso de la bacteria *Erwinia amylovora* (Burril, 1882) Winslow *et al.*, 1920, un hongo que afecta a la familia de las rosáceas (Sabatini *et al.*, 2006), del Virus del Mosaico del Pepino, o de *Phytophthora infestans* (Mont). de Bary, 1876, que infecta a plantas de la familia de las solanáceas (Ruiz, 2013).

Otra estrategia de muestreo fue utilizada por Ergin *et al.*, (2004), quienes analizaron muestras del raspado del interior de colmenas fabricadas con espuma de poliestireno para la **detección del hongo** *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (San Felice) Vuillemin, 1894. Este hongo puede encontrarse en determinadas plantas y es responsable de infecciones graves potencialmente mortales en pacientes inmunodeprimidos. El método utilizado resultó ser más práctico, rápido y efectivo para cribar un área determinada que el muestreo de plantas con el mismo fin. En ensayos controlados Lighthart *et al.* (2004; 2005) demostraron la adsorción de las esporas de la **bacteria**

*Bacillus atrophaeus* Nakamura, 1989 y del **bacteriófago** MS2 de *Escherichia coli* (Migula, 1895) al cuerpo de la abeja durante sus vuelos, sugiriendo que esta metodología podría permitir realizar un screening (cribado) de una zona para la detección precoz de agentes usados en bioterrorismo o guerra biológica.

### **Cultivos transgénicos.**

Los efectos directos de OGM (Organismos Modificados Genéticamente) sobre las abejas no parecen muy claros. Algunos investigadores, como Malone y Phan-Delègue (2002), consideran que dichos efectos dependerían de la naturaleza de la nueva proteína expresada por la planta, su especificidad y su modo de acción, y que algunas de ellas podrían afectar a la longevidad del insecto. En este caso, las abejas podrían servir para evaluar el impacto de los **cultivos transgénicos** en otros polinizadores. Tesoriero *et al.* (2004), que trabajaron con semillas de colza modificadas, no observaron, sin embargo, comportamientos anómalos en las abejas pecoreadoras.

En el año 2005, un apicultor descubrió en su miel trazas de maíz OGM MON810. Tras varios años de polémica por la inclusión o no de esta circunstancia en la etiqueta del envase, el Parlamento Europeo, en enero de 2014, aprobó finalmente una enmienda de la Directiva de la miel 110/2001, en la que se define al polen como un componente de la miel, en vez de como un ingrediente (UE, 2014). Independientemente de la repercusión en la calidad de la miel y otros productos apícolas, este hecho indica que las colonias de *Apis mellifera* pueden detectar campos de cultivo con plantas transgénicas a través de un análisis polínico de las propias abejas o sus productos, especialmente en aquellos países donde el cultivo de estas plantas esté prohibido o restringido a ciertas áreas.

## Otras aplicaciones.

Por la respuesta refleja de la **extensión de la probóscide** en abejas entrenadas, *A. mellifera* también ha sido utilizada para la detección de distintas sustancias. Esta respuesta ocurre naturalmente cuando las antenas, el tarso o partes de la boca de la abeja entran en contacto con una solución azucarada. Tan sólo el olor de la sustancia problema provoca esta respuesta en la abeja si previamente aprenden a asociarlo al alimento que se les ofrece (Bitterman *et al.*, 1983).

Bromenshenk *et al.* (2002) aprovecharon este comportamiento para investigar sobre la detección de **explosivos y minas**. Según este investigador, las ventajas respecto a otros animales utilizados con este objetivo, como es el perro, radican en que pueden ser entrenadas en uno o dos días, miles de abejas recorren un área extensa en menos tiempo, lo hacen de forma autónoma y, en consecuencia, sin riesgo alguno para el perro y las personas que lo llevan.

Se han desarrollado diversos protocolos de entrenamiento o adiestramiento para la detección de efectos subletales en el comportamiento causadas por factores ambientales estresantes, toxinas y pesticidas (Smith y Burden, 2014), así como en estudios ecológicos, neurobiológicos y psicológicos (Matsumoto *et al.*, 2012).

Otros autores han utilizado la respuesta refleja de la extensión de la probóscide para la detección de narcóticos (Thwaites, 2010).

### **3.8. La colonia de abejas como bioindicador de metales pesados.**

Al igual que las abejas melíferas, otros bioindicadores han sido utilizados para evaluar la contaminación por metales pesados.

En el siglo XIX los líquenes fueron reconocidos por primera vez como posibles bioindicadores, aunque hasta 1960 no se identificó al SO<sub>2</sub> como factor principal de su declive. Actualmente se conoce que detectan también otra serie de contaminantes, entre ellos los metales pesados (Hawksworth *et al.*, 2005).

Junto con los líquenes, los musgos pueden ser considerados los organismos bioindicadores más comúnmente utilizados en estudios de biomonitoreo de la contaminación atmosférica, fundamentalmente por su capacidad de obtener los nutrientes de fuentes aéreas más que del sustrato (Wolterbeek, 2002).

Gran variedad de plantas han sido también ampliamente utilizadas con este fin. Por ejemplo en EuroBionet, Red Europea para la Evaluación de la Calidad del Aire a través del Uso de Plantas Bioindicadoras, se utilizaron dos especies de plantas, *Populus nigra* Linnaeus, 1753 y *Lolium multiflorum* Lamarck, 1779, durante tres años (1999-2001), en ciudades como Valencia y Barcelona (Klumpp y Klumpp, 2004).

Muchas especies de invertebrados terrestres son conocidas por ser eficientes acumuladoras de metales pesados, así como por sus respuestas fisiológicas y bioquímicas frente a su exceso. Entre ellos, las lombrices de tierra, los caracoles y los artrópodos, especialmente isópodos y colémbolos, son de uso común como indicadores de la contaminación de metales pesados en el suelo (Martin y Coughtrey, 1982; Dallinger, 1994; Cortet *et al.*, 1999)

Entre los animales vertebrados, los pequeños roedores y las aves son los utilizados con más frecuencia, y los cuernos de venado y las plumas de urraca

han sido también valorados como buenos indicadores de la contaminación por metales pesados (Zakrzewska *et al.*, 2010).

Desde la década de los 70, el número de estudios sobre el uso de las colonias de abejas para monitorizar la contaminación por metales pesados se ha ido incrementando (Celli y Maccagnani, 2003).

Las abejas y sus productos se utilizan como bioacumuladores en los estudios de biomonitorio de metales pesados:

- La bioconcentración de metales pesados en el cuerpo de las abejas es un parámetro indicador adecuado porque en sus vuelos de pecoreo, pueden capturar involuntariamente estos elementos en las quetas de la superficie de su cuerpo o, por ingestión o inhalación, acumularlos en su interior (Porrini *et al.*, 2003).
- La bioconcentración de metales pesados en la miel es, igualmente, un parámetro apropiado ya que estos elementos presentes en el suelo pueden ser transferidos desde éste a las flores o a otras partes de las plantas visitadas por las abejas, alcanzando el néctar (Leita *et al.*, 1996; Boyd, 2009) y las melazas (Barišić *et al.*, 1999), que son transportados a las colmenas para la formación de la miel o los mielatos. El tipo de planta, la movilidad de estos elementos y su disponibilidad en el suelo influyen en dicha transferencia (Gall *et al.*, 2015). La naturaleza higroscópica de la miel puede también facilitar la absorción de elementos contaminantes (Bibi *et al.*, 2008).
- Tanto la miel como el polen también pueden acumularlos si el polvo metálico del aire se asienta por deposición atmosférica o se diluye por la lluvia o el rocío en las partes de las plantas visitadas por las abejas (Kalbande *et al.*, 2008; Boyd, 2010). Las propias abejas pueden incorporarlos a los productos si sus cuerpos están cargados de metales pesados (Bogdanov *et al.*, 2007). Factores naturales como el origen

botánico y geográfico tienen una importante influencia en el contenido de metales pesados en los productos (Bogdanov *et al.*, 2007).

Pocos conocimientos se tienen sobre los efectos que pudiera tener la acumulación de estos elementos en el insecto. En este sentido, Hladun *et al.* (2012) comprobaron en laboratorio que las abejas sometidas a dosis crónicas de seleniato (forma inorgánica de Se que aparece en plantas que acumulan este elemento), tienen menor respuesta al gusto por los azúcares, lo que podría influir en la entrada de recursos a la colonia. Se ha destacado que aunque inicialmente las abejas tendrían tolerancia a los metales pesados, podrían tener lugar algunas interferencias en rutas metabólicas y reacciones enzimáticas y bioquímicas por parte de determinados iones metálicos (Ruiz, 2013). Ambos autores, señalan la necesidad de seguir investigando sobre estos supuestos.

### **3.9. Estudios previos de biomonitorio con *A. mellifera* para evaluar la contaminación por metales pesados.**

En las Tablas 3 y 4 se hace una recapitulación de los principales estudios de biomonitorio de metales pesados con colonias de *Apis mellifera*, donde se señala la metodología empleada, los resultados obtenidos y las conclusiones de estos estudios.

Es necesario destacar que en esta relación, no se han tenido en cuenta los trabajos en los que se ha recolectado una sola muestra, en un determinado momento, aunque se haya recogido en un territorio muy extenso y diverso. La metodología empleada en este tipo de estudios es apropiada para hacer un interesante *screening* de la zona, pero no pueden ser considerados como estudio de biomonitorio porque no existe un seguimiento a través del tiempo, que es un factor clave y diferenciador entre biomonitorio y toma de muestras puntual.

En las mencionadas Tablas se puede ver que se han seleccionado investigadores fundamentalmente del hemisferio norte y, de entre ellos, destaca el gran número de estudios realizado en Italia. Puede decirse que este país ha sido pionero en la puesta en marcha de investigaciones en este campo, tanto de metales pesados como de otros xenobióticos. En concreto, desde la década de los 70 la Universidad de Bolonia ha contado con una red de estaciones con este fin. En los últimos años la red de estaciones también ha sido utilizada para el estudio y seguimiento de los factores que influyen en el “despoblamiento de las colonias”, a través de proyectos como Apenet y Beenet, desarrollados en los últimos años.

**Tabla 3.** Resumen de la Metodología en estudios de biomonitorio con *A. mellifera* para la evaluación de contaminación por metales pesados.

**Notas:** **Ab, Ne, Mi, Po, La, Ja, Pro, Ce, Mf:** Abejas, Néctar, Miel, Polen, Larvas, Jalea, Propóleo, Cera, Masa Fecal

INVESTIGADORES	METALES PESADOS	MATRICES	LOCALIZACIONES	PERIODOS
Balestra <i>et al.</i> , 1992 Italia	Cd Cr Ni Pb	<b>Ne; Po; La.</b> Aire	5 estaciones (Roma) 2 colmenas / estación	Abr a Sep Mensual
Bilalov <i>et al.</i> , 2015 Rusia	Cd Cu Fe Mn Pb Zn	<b>Ab</b> (cuadros reservas)	18 apiarios (9 control y 9 industria o carretera) 1 colmena / apiario	Jun y Oct Mensual
Conti y Botrè, 2001 Italia	Cd Cr Pb	<b>Ab; Ne; Po; Pro; Ce.</b>	5 estaciones (1 en Roma y 4 alrededor ciudad, 1 próximo a carretera) 2 colmenas / estación	Abr a Jun <b>Ab:</b> Cada 6 semanas <b>Ne y Po:</b> Quincenal <b>Pro y Ce:</b> Mensual
Lambert <i>et al.</i> , 2012 Francia	Pb	<b>Ab; Mi; Po.</b>	18 apiarios (5 agrarios, 6 pastizal con setos, 5 urbanos y 2 islas) 8 colmenas / apiario	Abr a Oct. 2 años consecutivos Bimensual aprox. (4 veces)
Leita <i>et al.</i> , 1996 Italia	Cd Pb Zn	<b>Ab</b> vivas y muertas; <b>Mi; Ja; Po; Pro.</b> Marcadores ambientales (Agua, <i>Trifolium pratense</i> )	12 colmenas (encrucijada extraurbana)	Jul a Sep <b>Ab:</b> Semanal <b>Mi y Ja:</b> Semanal
Perugini <i>et al.</i> , 2011 Italia	Cd Cr Hg Pb	<b>Ab</b>	8 estaciones (4 silvestres y 4 urbanas) 3 colmenas / estación	May a Oct Mensual
Roman, 2009 Polonia	As Cd Hg Pb	<b>Po</b>	2 apiarios (1 agrícola-forestal, 1 campo aviación abandonado.) 36 colmenas / apiario	Jun a Ago. 2 años consecutivos Mensual
Roman, 2010 Polonia	Cd Cu Pb Se	<b>Ab</b> <b>Mi</b> (mezcla de colmenas)	14 apiarios (7 urbanos y 7 agrícola-forestales) 5 ó 10 colmenas / apiario	Otoño. 1er y 2º año Primav. y Verano. 2º año. <b>Ab:</b> 4 veces; <b>Mi:</b> 1 vez
Ruschioni <i>et al.</i> , 2013 Italia	Cd Cd Ni Pb	<b>Ab</b> <b>Ne</b>	11 estaciones (6 naturales, 3 naturales-agrícolas y 2 naturales-industria y urbano) 2 colmenas / estación	May a Oct. 3 años consecutivos Mensual
Satta <i>et al.</i> , 2012 Italia	Cd Cr Pb	<b>Ab</b> (cepillando piquera) <b>Ne; Po.</b> Agua; Suelo Diversidad de Hormigas	3 estaciones (2 en mina abandonada y 1 en control) 3 colmenas / estación	Mar, May, Jul, Nov. 3 años consecutivos Bimensual
Van der Steen <i>et al.</i> , 2012 Holanda	Al As Cd Co Cr Cu Li Mn Mo Ni Pb Sb Se Sn Sr Ti V Zn	<b>Ab</b> (cuadros reservas)	3 estaciones (1 urbana-industrializada, 1 rural-industrializada, y 1 costera-industrializada) 3 colmenas / estación	Jul a Sep Quincenal
Van der Steen <i>et al.</i> , 2015 Holanda	Cd Pb V	<b>Ab</b> (cuadros reservas) Aire	3 estaciones (1 urbana-industrializada, 1 rural-industrializada, y 1 costera-industrializada) 3 colmenas / estación	Jul y Ago Quincenal
Zhelyazkova, 2012 Bulgaria	Cd Co Cu Fe Mn Ni Pb Zn	<b>Ab</b> <b>Mf</b>	6 apiarios (diferentes distancias a zona militar) 3 colmenas / apiario	May y Jul Mensual
Zugravu <i>et al.</i> , 2009 Rumanía	Cd Pb	<b>Ne</b>	12 estaciones (6 carreteras e industria y 6 natural) 3 colmenas / estación	Verano (mes y medio) Quincenal

**Tabla 4.** Resumen de Resultados y Conclusiones en los estudios citados en la Tabla 3.

**Notas:** **Ab, Ne, Mi, Po, La, Ja, Pro, Ce, Mf:** Abejas, Néctar, Miel, Polen, Larvas, Jalea, Propóleo, Cera, Masa Fecal. **MP:** Metales Pesados. **(\*):** Diferencias estadísticamente significativas.

Investigadores	Metales pesados	Resultados	Conclusiones
Balestra <i>et al.</i> , 1992 Italia	Cd Cr Ni Pb	Tendencia similar de Pb en Aire y <b>Ne</b> Estimación de la proporción de MP en Aire ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ) y <b>Ne</b> (mg/kg): 1000/2000 para Ni y Pb; 2000/4000 para Cr; 3000/5000 para Cd.	<ul style="list-style-type: none"> <li>No correlación entre matrices biológicas y datos abiológicos.</li> </ul>
Bilalov <i>et al.</i> , 2015 Rusia	Cd Cu Fe Mn Pb Zn	<b>Diferencias espaciales:</b> Cd*, Pb* y Mn* > en industriales y carreteras. <b>Diferencias temporales:</b> Cd* y Mn* > en Jun.	<ul style="list-style-type: none"> <li><b>Ab</b> de Otoño no acumulan mayor cantidad de MP.</li> <li>% concentración de MP en <b>Ab</b> de Verano y Otoño para evaluar nivel de contaminación ambiental.</li> <li>Diferencias espaciales más marcadas que temporales</li> </ul>
Conti and Botré, 2001 Italia	Cd Cr Pb	<b>Diferencias espaciales:</b> <b>Ab:</b> Cd*, Cr* y Pb* > en Roma. <b>Po:</b> Cd* > en Roma, Pb* > en Roma y comparable carretera. <b>Pro:</b> Cd*, Cr* y Pb* > en Roma y comparable carretera. <b>Ce:</b> Cd*, Cr* y Pb* > en Roma.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Concentración de MP en áreas "limpias" correlacionado con niveles más bajos de la literatura.</li> <li>Zonas periurbanas considerados puntos de referencia con baja contaminación (menos para Pb)</li> <li><b>Ab, Po, Pro y Ce</b> más útiles que <b>Mi</b>.</li> </ul>
Lambert <i>et al.</i> , 2012 Francia	Pb	<b>Diferencias espaciales de Pb:</b> <b>Ab:</b> Pb > en urbanas y pastizales con setos. <b>Ne y Po:</b> Pb > en pastizales con setos. <b>Diferencias temporales de Pb:</b> <b>Ab:</b> Pb* > en Jun-Jul 2008, Jul-Ago 2008, Sep-Oct 2008. <b>Ne:</b> Pb > en Abr-May 2009, Jun-Jul 2009. <b>Po:</b> Pb* > en Jul-Ago 2008, Sep-Oct 2008, Jun-Jul 2009.	<ul style="list-style-type: none"> <li><b>Ab</b> y <b>Po</b> similares niveles y variaciones temporales.</li> <li><b>Ab</b> &gt; sensibles a los picos de contaminación.</li> <li><b>Mi</b> &lt; contaminada. No relación contaminación de <b>Ab</b> y <b>Po</b>.</li> <li>Urbanos y pastizales con setos &gt;contaminación que agrícolas e islas.</li> <li>Periodo de muestreo influye (altas concentraciones. en épocas).</li> </ul>
Leita <i>et al.</i> 1996 Italia	Cd Pb Zn	Cd y Zn > en superficie <b>Ab</b> (deposición). Pb > en interior. <b>Ab</b> muertas mostraron una acumulación progresiva. <b>Ja</b> y <b>Ne</b> , gran cantidad de MP. Relación lineal entre Cd en <b>Ne</b> y en flores de <i>Trifolium pratense</i> .	<ul style="list-style-type: none"> <li>Productos de <b>Ab</b> y marcadores ambientales son útiles para presencia de MP.</li> <li><b>Ab</b> muertas, útil para verificar acumulación de MP.</li> </ul>
Perugini <i>et al.</i> , 2011 Italia	Cd Cr Hg Pb	Hg: no presencia. <b>Diferencias espaciales:</b> Pb* > en urbano (> cerca del aeropuerto); Cd* > en urbano. <b>Diferencias temporales:</b> Cr* > en Ago que Sep y Oct.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Coincidencia entre declive de Cd e incremento de Cr observados en informes ambientales consultados.</li> <li><b>Ab</b> detectan concentraciones de MP en reservas naturales, consideradas "limpias".</li> </ul>
Roman, 2009 Polonia	As Cd Hg Pb	<b>Diferencias espaciales:</b> As* Cd* Hg* y Pb > en campo de aviación militar. <b>Excedieron el estándar aceptable en zona agraria:</b> Pb: 20 muestras en 2005 y 11 en 2006 <b>Excedieron el estándar aceptable en zona militar:</b> Pb: 33 muestras en 2005 y 21 en 2006. Cd: 31 muestras en 2005 y 36 en 2006.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Utilidad como bioindicadores, por diferencias entre zonas.</li> <li><b>Po</b> con alto contenido de Cd en agrícola.</li> <li>Analizar <b>Po</b> destinado a consumo humano</li> </ul>
Roman, 2010 Polonia	Cd Cu Pb Se	<b>Diferencias espaciales:</b> Cu, Pb y Se > en urbano; Cd > en agrícola-forestal. <b>Diferencias temporales:</b> Cd, Cu* y Pb* > en Primavera 2009; Se* > en Otoño 2008. <b>Secuencia de gama de metales:</b> Cu >> Se >> Pb > Cd.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Periodo influyó en rango de acumulación de MP.</li> <li>Concentración de Cu más estable y de Pb cambiante.</li> <li>Urbano con altas concentraciones de Cu, Se y Pb en <b>Ab</b>, y agrícola-forestales con altas concentraciones de Cd.</li> <li>No relación entre contenido de MP en <b>Mi</b> y cuerpo <b>Ab</b>.</li> </ul>

Tabla 4 (continuación)

Investigadores	Metales pesados	Resultados	Conclusiones
Ruschioni <i>et al.</i> , 2013 Italia	Cd Cd Ni Pb	<b>Excede los límites:</b> <b>Ab:</b> Cd en 11,6% de los casos; Cr en 19,7% de los casos; Ni en 5.1% de los casos; Pb en el 4,6% de los casos. <b>Ne:</b> Cr (11,1% de los casos); Ni en 1,5% de los casos. <b>Diferencias espaciales dentro de los años:</b> <b>Ab:</b> Cd* en 2009 y 2010; Ni* y Pb* en 2009; <b>Ne:</b> Ni* en 2009 y 2010. <b>Diferencias mensuales dentro de los años:</b> <b>Ab:</b> Cd* y Cr* en 2008 y 2009; <b>Ne:</b> Ni* en 2010. <b>Diferencias anuales dentro de cada sitio</b> <b>Ab:</b> Cr* y Ni* en sitio b; Cr* y Pb en sitio e; Cd* y Ni* en sitio f; Cr* en sitio h. <b>Ne:</b> Ni* en sitios c; d, e, f, i.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Ab</b>, con concentraciones más altas.</li> <li>• Medias estacionales, excedieron los límites: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Cr, más a menudo.</li> <li>• Cd y el Pb, a continuación.</li> <li>• Ni, nunca excedió los límites.</li> </ul> </li> </ul>
Satta <i>et al.</i> , 2012 Italia	Cd Cr Pb	<b>Diferencias espaciales:</b> <b>Ab:</b> Cd* y Pb* > en minas; <b>Ne:</b> Cd* > en minas. <b>Po:</b> Cd* y Pb* > en minas; Cr* > en control. <b>Diferencias temporales:</b> <b>Ab:</b> Pb > en Jul; <b>Ne:</b> Cr* > en May y Nov; Cr* > en 2009. <b>Po:</b> Cd* > Nov; Cr* > en May, Jul y Nov; Pb* > en May y Jul. <b>Correlaciones significativas entre media anual de:</b> Cd de Agua y <b>Po</b> ; Pb de Agua y <b>Ab</b> y <b>Po</b> . Cd de Suelo y <b>Ab</b> y <b>Po</b> ; Cr de Suelo y <b>Po</b> ; Pb de Suelo y <b>Ab</b> y <b>Po</b> . <b>Hormigas:</b> Baja variabilidad en minas (por escasez de vegetación)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Ab</b> como los bioindicadores más fiables de yacimientos mineros en desuso, mejor correlación con los datos del Suelo.</li> <li>• <b>Po</b> también información útil. <b>Mi</b>, no es representativa.</li> <li>• Combinación del biomonitoreo con <b>Ab</b> y Hormigas es fiable en estudios de impacto ambiental por MP.</li> </ul>
Van der Steen <i>et al.</i> , 2012 Holanda	Al As Cd Co Cr Cu Li Mn Mo Ni Pb Sb Se Sn Sr Ti V Zn	<b>Diferencias espaciales:</b> Co* > en rural industrializada. Sr* > en urbana y costera industrializada. V* > en costera industrializada. <b>Diferencias temporales:</b> Al*, Cd*, Co*, Cr*, Cu*, Mn*, Sr*, Ti* y V* al menos para 1 localiz.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Ab</b> detectan diferencias espaciales y temporales, incluso a bajos niveles de polución.</li> <li>• Mayores fluctuaciones temporales.</li> <li>• Diferencias espaciales limitada en zonas pequeñas y densamente pobladas.</li> </ul>
Van der Steen <i>et al.</i> , 2015 Holanda	Cd Pb V	<b>Correlaciones significativas:</b> Concentración de V en <b>Ab</b> y Aire y diferencias similares entre 3 localizaciones.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Ab</b> como alternativa útil si hay alta variación y nivel de concentración atmosférica de MP. No en Holanda.</li> </ul>
Zhelyazkova, 2012 Bulgaria	Cd Co Cu Fe Mn Ni Pb Zn	<b>MF</b> > que en cuerpo <b>Ab</b> . Ni, Cd, Co y Pb se acumularon en mayor medida. <b>Diferencias estacionales:</b> Cd, Co, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb y Zn > a 10 km Norte y Sur del centro militar.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Ab</b> con función biobarrera.</li> <li>• Altos niveles de MP en cuerpo de <b>Ab</b> y en <b>MF</b> por posible impacto antropogénico en toda estudio.</li> <li>• Resultados confirmados por otros estudios de Suelo, Aire y Plantas realizados en la misma zona.</li> </ul>
Zugravu <i>et al.</i> , 2009 Rumanía	Cd Pb	<b>Diferencias espaciales:</b> Cd* y Pb* > en carreteras e industria.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Diferencias espaciales pese a bajo n<sup>o</sup> muestras.</li> <li>• No se superaron los niveles propuestos en la UE</li> </ul>

### **3.9.1. Metodología empleada en los estudios de biomonitorio.**

#### **3.9.1.1. Metales pesados.**

Como se puede ver en la Tabla 3, los metales pesados que con más frecuencia se han estudiado han sido el Pb y el Cd. El motivo radica en que estos metales, junto con el Hg, están contemplados en convenios y reglamentaciones internacionales por la alta preocupación que generan. Asimismo, la elección de estos dos elementos y los siguientes que más se repiten, como Cr, Cu, Ni y Zn, se debe a su frecuente asociación con las zonas urbanas e industrializadas, dada la enorme pluralidad de usos que tienen (Machado *et al.*, 2008).

#### **3.9.1.2. Matrices apícolas.**

La colonia de abejas ofrece la posibilidad de utilizar diferentes matrices para evaluar la contaminación de metales pesados, tal y como se expone en la Tabla 3.

Las abejas han constituido una de las matrices más empleadas. Abejas muertas, abejas vivas en distinto estadio de desarrollo e incluso excrementos o material fecal han sido objeto de estudio.

Leita *et al.* (1996) recolectaron regularmente abejas muertas, expelidas de la colonia. Las colmenas estuvieron asentadas en áreas con abundante tráfico, y se pudo comprobar una progresiva acumulación de metales pesados en estas abejas, por lo que las consideró una herramienta útil para verificar la dinámica de la acumulación de estos elementos.

Debido al estrecho contacto entre los individuos de la colonia y al intercambio de alimento vía trofalaxis, Veleminsky *et al.* (1990) recopilaron datos sobre abejas muertas tras el invierno, abejas pecoreadoras que salen o

regresan a la colmena, abejas nodrizas, larvas y zánganos, concluyendo que, de entre los individuos vivos, las abejas pecoreadoras que regresan a las colmenas aportan una información más útil. Del mismo modo, Gajger *et al.* (2008) encontraron mayor cantidad de metales pesados en abejas adultas que en pupas, lo que atribuyó al mayor contacto de las primeras con los contaminantes en sus vuelos de pecoreo.

Por esta razón, la mayoría de los investigadores emplean las abejas de mayor edad (a partir de 4 ó 5 semanas), cuya función principal es la búsqueda de alimento. Gran parte de ellos las capturan cuando regresan a la colmena tras sus vuelos de pecoreo (Conti y Botrè, 2001; Perugini *et al.*, 2011), mientras que otros toman las muestras cepillando los cuadros con reservas y sin cría, por asumir que en estos espacios las pecoreadoras constituyen una muestra representativa y por ser un método más práctico (Satta *et al.*, 2012; Van der Steen *et al.*, 2012).

Incluso la masa fecal de las abejas ha sido también empleada como elemento bioindicador, encontrándose contenidos de metales y metaloides (especialmente Cd, Co, Pb y Ni) más elevados que los encontrados en el cuerpo de las abejas, hecho que fue explicado por la función biobarrera de su organismo (Zhelyazkova, 2012).

Otra matriz apícola usada frecuentemente en estudios de biomonitoreo de metales pesados con *A. mellifera* es la miel de flores. Dos tipos de muestras claramente diferenciadas por su contenido de humedad han sido utilizadas con este fin. Por un lado la miel inmadura o néctar (Conti y Botrè, 2001; Ruschioni *et al.*, 2013) caracterizada por tener mayor porcentaje de agua, ser de reciente recolección y encontrarse por lo general en celdillas abiertas, y por otro lado la miel madura (Zugravu *et al.*, 2009; Lambert *et al.*, 2012b), caracterizada por tener menor porcentaje de agua, ser almacenada en un espacio mayor de tiempo y encontrarse por lo general en celdillas operculadas. En este sentido, Roman (2004) analizó el contenido de Cu, Cd y Pb en muestras de néctar y

miel madura y obtuvo entre un 25%-33,3% menos de estos elementos en la miel madura en base a la materia seca.

Según las investigaciones de Özcan y Juhaimi (2012), cuando se toman las muestras de porciones en panal es necesario seleccionárselas correctamente para no interferir en los resultados. La miel de porciones de panal en contacto con el alambre usado para fijar y sostener dicho panal al marco, contiene mayor cantidad de Mo, Cd, Cr, Fe, Mn, Ni y Zn que la miel de porciones de panales que no han tenido contacto con el alambre.

Los mielatos o mieles de mielada, procedentes de excreciones de insectos chupadores de plantas, o de secreciones de partes vivas de las plantas, han sido menos utilizados en los estudios de biomonitorio, pero han sido considerados buenos bioindicadores para algunos elementos traza. En un estudio llevado a cabo en un área natural para evaluar la contaminación por deposición atmosférica, Barišić *et al.* (1999) determinaron el factor de transferencia del suelo a mieles de flores, mielatos y mezcla de ambas, concluyendo que dicho factor fue mayor en los mielatos para el Cu, el Rb, el Cr, y posiblemente el Ni.

La matriz polen ha sido también utilizada de dos formas diferentes. La más común ha sido la recolección de las cargas de polen mediante la colocación de una trampa-cazapolen a la entrada de la colmena (Roman, 2009; Satta *et al.*, 2012), y la menos frecuente la obtención de trozos de panal con reservas de polen, conocido también como “pan de abeja” (Zhelyazkova, 2012).

En menor medida se han utilizado otras matrices apícolas como es el caso de la cera, el propóleo o la jalea real. De entre estas la más utilizada ha sido la cera, que se ha obtenido raspando el interior de las colmenas (Conti y Botrè, 2001), o directamente de los panales (Veleminsky *et al.*, 1990; Zhelyazkova *et al.*, 2011). Según Jones (1987), la cera es probablemente más útil para detectar compuestos lipófilos que metales pesados. Por otro lado,

investigaciones realizadas por Taha *et al.* (2010) demostraron valores mayores de elementos traza en miel y cera de panales reutilizados por más de 4 años.

### **3.9.1.3. Estaciones y número de colmenas.**

La selección del tipo de estaciones y del número de colmenas puede verse en la Tabla 3.

En determinados estudios se ha optado por elegir algunas colonias que forman parte de un colmenar, elegidas o no al azar (Roman, 2010; Bilalov *et al.*, 2015). En otros estudios se ha preparado específicamente una “estación de biomonitoreo”, formada por dos o tres colonias, que es trasladada al lugar de estudio (Perugini *et al.*, 2011; Van der Steen *et al.*, 2012).

Balestra *et al.*, (1992), que trabajaron con estaciones de una o dos colmenas respectivamente, llegó a la conclusión de que es indispensable contar con al menos dos colmenas para mejorar la fiabilidad e interpretación de los resultados.

### **3.9.1.4. Periodo de muestreo.**

Como se puede ver en la Tabla 3, es común entre los estudios seleccionados que la mayoría de los investigadores aprovechan el periodo de mayor actividad de la colonia para llevarlos a cabo, es decir, la primavera y el verano. El frío o el invierno es considerado un factor limitante en el biomonitoreo con colonias de *A. mellifera*, especialmente para la recolección de muestras de miel, néctar o polen.

Sin embargo, como también puede observarse en la Tabla 3, la duración de los estudios y la frecuencia de muestreo son muy variables. La duración del biomonitoreo se prolonga desde mes y medio (Zugravu *et al.*, 2009), hasta 3

años (Satta *et al.*, 2012; Ruschioni *et al.*, 2013). En este sentido y según exponen Balestra *et al.* (1992), puesto que las colonias de *A. mellifera* aportan una información más compleja que los métodos físico-químicos, es preferible registrar muchos datos para mejorar la interpretación del “mensaje” proporcionado por estos insectos.

También la frecuencia de muestreo varía desde una periodicidad semanal (Leita *et al.*, 1996) hasta la toma de muestras cada dos o tres meses (Roman, 2010; Satta *et al.*, 2012).

### **3.9.2. Resultados y conclusiones de los estudios de biomonitorio.**

#### **3.9.2.1. Nivel de contaminación.**

Lo más importante en los estudios de contaminación es estimar el grado que alcanza dicha contaminación, para así conocer su riesgo o peligrosidad.

Algunos investigadores cotejan sus resultados con otros descritos en la literatura, estableciendo así una valoración de la zona objeto de estudio (Roman, 2010; Lambert *et al.*, 2012; Van der Steen *et al.*, 2012).

Otros han optado por seguir la metodología descrita por Porrini *et al.* (2002), en la que se establecen límites de riesgo ambiental en base al contenido de metales en abejas o en néctar (Satta *et al.*, 2012; Ruschioni *et al.*, 2013).

Por último, hay investigadores que evalúan sus resultados en relación a los informes emitidos por organismos públicos sobre la calidad atmosférica (Perugini *et al.*, 2011), o en relación a resultados previos obtenidos por estudios de otras disciplinas en la misma zona (Zhelyazkova, 2012).

### 3.9.2.2. Comparación con métodos estándar.

Otros investigadores han establecido comparaciones con los métodos estándar de medición de calidad del aire.

Balestra *et al.* (1992), por ejemplo, dispusieron dispositivos automáticos en el entorno de las estaciones de biomonitorio. Consideraron el valor medio de los registros físico-químicos de las dos últimas semanas del mes, y compararon este valor con las concentraciones de Cd, Cr, Ni y Pb obtenidas en tres matrices apícolas (néctar, polen y larvas). Sus resultados mostraron tendencias similares en las concentraciones de Pb en néctar y el sistema no biológico, concluyendo que de las tres matrices, el néctar se reveló como mejor bioindicador. Este investigador estimó además que la proporción entre las concentraciones medias registradas en el detector automático ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ) y las registradas en néctar ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) fue de 1000/2000 para el Ni y el Pb, de 2000/4000 para el Cr y de 3000/5000 para el Cd.

Van der Steen *et al.* (2015) también se propusieron contrastar la información aportada por las colonias de abejas y los sistemas automáticos, en este caso en relación al Pb, Cd y V. Las concentraciones medias de metales en abejas obtenidas de cada localización fueron comparadas con el valor medio de 14 días de registros de las estaciones automáticas oficiales, previos a la recogida de abejas. Sus resultados mostraron una correlación positiva en la concentración de V en abejas y aire, encontrando ambas matrices diferencias similares entre las tres localizaciones estudiadas. Según estos investigadores, la probabilidad de encontrar correlación entre los dos sistemas aumentaría en los casos en que el nivel y la variación de las concentraciones atmosféricas de metales fueran altos.

### **3.9.2.3. Comparación con otros marcadores bióticos o abióticos.**

En este sentido, algunos investigadores han llevado a cabo simultáneamente estudios con colonias de abejas melíferas y otros marcadores, con el objetivo de confirmar si los resultados aportados por la colonia reflejan los niveles de contaminación obtenidos a partir de dichos marcadores, con los que la ciencia está hoy en día más familiarizada. Esta comparación ha permitido, además, avanzar en la comprensión de la transferencia de metales de un compartimento medioambiental a otro.

Leita *et al.* (1996), por ejemplo, recolectaron flores de *Trifolium pratense* Linnaeus, 1753 a progresivas distancias de las colmenas encontrando relación significativa entre el Cd de las flores y la miel, hecho que fue explicado por el comportamiento químico de este metal, que muestra mayor reactividad y movilidad a través de los compartimentos medioambientales que otros elementos. Por su parte Satta *et al.* (2012), que tomaron muestras de agua de arroyo y suelo en yacimientos mineros abandonados, obtuvieron resultados en las matrices apícolas en línea con el grado de contaminación detectado en los sustratos abióticos.

### **3.9.2.4. Efectividad de las matrices apícolas.**

La efectividad y fiabilidad de cada matriz puede depender de la forma en que se tome la muestra, pero fundamentalmente de la propia naturaleza de la matriz. La mayoría de los investigadores que utilizaron más de una matriz para evaluar la contaminación por metales pesados resaltaron la eficacia de las abejas pecoreadoras en comparación con el resto de matrices (Conti y Botrè, 2001; Lambert *et al.*, 2012; Satta *et al.*, 2012).

Se puede decir que el polen ocupa una posición intermedia porque la concentración de metales pesados detectada en polen suele ser mayor que la encontrada en miel y menor que la encontrada en abejas (Lambert *et al.*, 2012, Satta *et al.*, 2012). Esto puede deberse a la mayor probabilidad de acumularlos

en el proceso de formación de las cargas, al cepillarse la superficie del cuerpo. Además, los órganos masculinos de las plantas suelen estar más expuestos a la deposición atmosférica que los femeninos, lo que también debe influir.

Sin tener en cuenta la cera, el propóleo y la jalea, la matriz miel, o néctar, ha sido considerada por varios investigadores la matriz de menor sensibilidad a las variaciones de metales pesados en el ambiente (Conti y Botrè, 2001; Lambert *et al.*, 2012, Satta *et al.*, 2012). Uno de los motivos considerados es que estos elementos se presentan generalmente a muy baja concentración, probablemente debido al “filtrado” de las propias abejas en el proceso de elaboración de la miel (Bogdanov, 2006). Otro motivo aludido es que la interpretación de los resultados puede verse enmascarada por múltiples factores como la especie de planta visitada, su morfología, el rango de forrajeo, la fecha o estación del año y las condiciones climáticas (Tuzen *et al.*, 2007; Jones, 1987). También es posible que la miel o el néctar reflejen la contaminación ambiental sólo cuando los niveles de metales pesados en el ambiente sean muy altos (Conti y Botrè, 2001; Ruschioni *et al.*, 2013). En algunos trabajos, no obstante, donde se ha utilizado solamente esta matriz, los resultados han sido satisfactorios, a pesar incluso del pequeño número de muestras recolectadas (Zugravu *et al.*, 2009).

### **3.9.2.5. Correlación entre matrices apícolas.**

Algunos investigadores han analizado la relación que pudiera haber entre las concentraciones de elementos detectadas en dos o más matrices. Roman (2010), por ejemplo, comparó las concentraciones de metales pesados obtenidas a partir de abejas y miel, advirtiendo que la secuencia de metales acumulados en las dos matrices fue la misma, pero no pudo demostrar ninguna correlación significativa. Y Lambert *et al.* (2012), que contrastaron los datos obtenidos a partir de las abejas, el polen y la miel, concluyeron que ésta no tuvo relación con la contaminación detectada en abejas y polen. Estas dos matrices, sin embargo, mostraron similares niveles y variaciones temporales.

### **3.9.2.6. Diferencias espaciales.**

Uno de los objetivos de los estudios de biomonitoreo consiste en identificar la presencia de metales pesados y, a la vez, discriminar zonas por su grado de contaminación. Por este motivo las colonias de abejas suelen distribuirse en localizaciones con diferentes usos del suelo, tal y como se aprecia en la Tabla 3.

Como se puede ver en la Tabla 4, diferencias espaciales han sido frecuentemente detectadas en diversos trabajos (Roman, 2010; Lambert *et al.*, 2012; Zhelyazkova, 2012). Las concentraciones de metales pesados en distintas matrices apícolas han sido por lo general mayores en las zonas urbanizadas, industrializadas, o con conocido nivel de impacto, que en las zonas control ,y en muchos casos estas diferencias han sido significativas (Conti y Botrè, 2001; Roman, 2009; Zugravu *et al.*, 2009; Bilalov *et al.*, 2015).

Sin embargo Van der Steen *et al.* (2012), que evaluaron la contaminación de 18 elementos en tres áreas diferentes, sólo encontraron diferencias significativas espaciales en tres de ellos, deduciendo que, en un territorio pequeño y densamente poblado, se limita la posibilidad de encontrar disparidad entre zonas.

No todos los metales se distribuyen homogéneamente en el territorio. Roman (2005 y 2010) pudo observar que las concentraciones de Cd en abejas fueron mayores en zonas agroforestales que en medios urbanos o industrializados, mientras que el resto de metales estudiados se presentaron en mayor medida en estos últimos. El mayor contenido de Cd en abejas de zonas agrarias fue atribuido al excesivo suministro de plaguicidas y fertilizantes en el entorno.

En algunos casos en los que no han sido detectadas diferencias significativas entre áreas con distintos usos del suelo, y las concentraciones de metales en abejas han sido elevadas en todas las zonas muestreadas, se ha

concluido que el metal está disperso o generalizado en el ambiente (Perugini *et al.*, 2011; Ruschioni *et al.*, 2013).

Metales, como el Cr, generalmente asociados a la polución urbana e industrial, han sido detectados por las abejas en reservas naturales, consideradas áreas “limpias”, incluso cuando las colmenas estuvieron localizadas lejos de las fuentes de contaminación. Esto demuestra, por una parte, la capacidad de las abejas para detectarlos y, por otra, la dispersión de los contaminantes por la atmósfera (Perugini *et al.*, 2011; Ruschioni *et al.*, 2013).

### **3.9.2.7. Diferencias temporales.**

Un objetivo especialmente importante en los estudios de biomonitoreo es el estudio de la fluctuación de los metales pesados en el tiempo.

De los resultados mostrados en la Tabla 4, destaca especialmente la tendencia a la acumulación de metales pesados, en distintas matrices apícolas, durante los meses de verano. Esta circunstancia podría estar ligada a periodos secos, con escasez de lluvias (Perugini *et al.*, 2011; Lambert *et al.*, 2012; Ruschioni *et al.*, 2013), por lo que en determinadas latitudes la situación se puede prolongar hasta los primeros meses del otoño.

Existen excepciones, no obstante, a esta tendencia, como es el caso de los resultados obtenidos por Roman (2010), que encontró mayor concentración de metales en la primavera que en el verano o el otoño, o los resultados obtenidos por Satta *et al.* (2012), que también obtuvieron algunos valores altos en el mes de noviembre.

Basándose en el hecho de que las abejas de otoño acumulan hasta 2-2,5 veces más grasa en sus cuerpos que las abejas de primavera, Bilalov *et al.* (2015) trataron de demostrar que la generación de invierno acumularía mayor

cantidad de metales. Sin embargo, esta hipótesis no pudo ser confirmada, ya que no encontró diferencias en el contenido de metales pesados entre ambas muestras en la zona testigo y, además, en la zona “problema”, el contenido de los metales pesados fue mayor en verano, coincidiendo con la mayoría de los estudios expuestos.

### **3.9.3. Utilidad y aplicación.**

La mayoría de los estudios e investigaciones consultados en esta revisión conducen a resaltar la capacidad de la colonia de *Apis mellifera* para proporcionar información de interés sobre la presencia, distribución y evolución de los metales pesados en el medio ambiente.

La armonización de criterios metodológicos, además de una mejora en la interpretación de los resultados, podría contribuir en el futuro a la integración de este sistema de biomonitorio con colonias de *Apis mellifera* en los programas oficiales de control de la contaminación atmosférica, como complemento a los métodos físico-químicos estándar.

## 4. MATERIAL Y MÉTODOS

### 4.1. Localización y composición de las estaciones de biomonitoreo

El estudio se ha llevado a cabo en el término municipal de Córdoba, al sur de España, durante los años 2007, 2009 y 2010. La ciudad se encuentra en el Valle del río Guadalquivir, entre Sierra Morena (al norte), y La Campiña (al sur). Se trata de un municipio de 1255,2 km<sup>2</sup> cuyo censo en el año 2010 fue de 328.547 habitantes (Instituto de Estadística y Cartografía de Andalucía, s.f.).

Estratégicamente, fueron seleccionados cinco emplazamientos para ubicar las estaciones de biomonitoreo (Figura 2). Dos de ellos se consideraron como control o “relativamente libres de contaminación” debido a que, por razones de ubicación geográfica y características naturales, se presuponen con baja contaminación (Porrini *et al.*, 2002).

La estación 1 se localizó en la zona oeste de Córdoba, en una parcela del Centro de Experimentación Agraria IFAPA. La proximidad del río Guadalquivir posibilitó el acceso de las abejas a la vegetación de ribera.

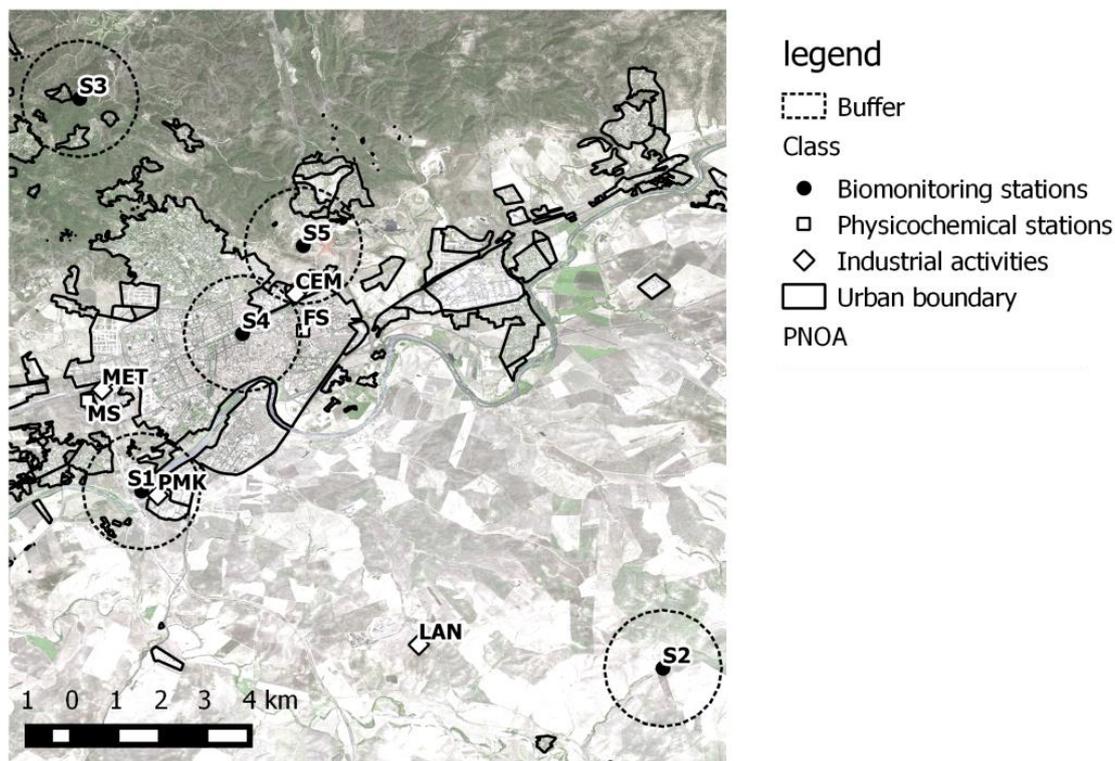
La estación 2 (control A) se ubicó en suelo agrícola, al sur de la ciudad y alejada de ella unos 15 km aproximadamente. Se trata de un paisaje despoblado y homogéneo, sin apenas vegetación silvestre, parcelado en grandes fincas donde dominan los cultivos de cereal y girasol, y donde los espacios no cultivados son prácticamente inexistentes. Esta estación se incluyó en los dos últimos años de muestreo (2009 y 2010) a sugerencia de los técnicos responsables de la administración, por contar con “el aire más limpio de la ciudad”, por lo que no se dispone de datos del año 2007.

La estación 3 (control B) se situó en Sierra Morena, a 8 km de distancia de la ciudad, en dirección norte, y a una altitud de 577 m. De uso forestal y recreativo, predomina la vegetación de tipo mediterráneo.

La estación 4 estuvo situada en pleno centro de Córdoba, en la terraza del monumento histórico “Torre de la Malmuerta”. Las plantas ornamentales de jardines y calles fueron las fuentes de alimento más accesibles para las abejas. El tráfico de vehículos es intenso en esta zona, especialmente en las horas punta.

La estación 5 se localizó al este de la ciudad, en una cantera abandonada que actualmente cuenta con vegetación de tipo mediterráneo, aunque con escasa representación del estrato arbóreo.

Las estaciones de biomonitorio y las estaciones físico-químicas fueron georreferenciadas, así como las principales actividades industriales y agrarias del entorno. En este estudio, las principales actividades de interés han sido los complejos industriales que desarrollan actividades de fundición de metales no férreos y producción de cobre, una fábrica de cemento, una fábrica de producción de papel y cartón, y el vertedero municipal (Figura 2 y Tabla 5).



**Figura 2.** Localizaciones geográficas de las estaciones de biomonitoreo: S1, S2, S3, S4 y S5; de las estaciones físico-químicas: FS (estación fija) y MS (estación móvil), y de las principales actividades industriales de interés para este estudio: MET (fábrica de metales no férreos y producción de cobre), CEM (fábrica cementera), PMK (fábrica de papel y cartón) y LAN (vertedero municipal). La línea discontinua (buffer) que rodea a cada estación de biomonitoreo tiene aproximadamente 3 km de diámetro, y se corresponde con el área de pecoreo de las abejas.

**Tabla 5.** Coordenadas de las estaciones de biomonitoreo, de las estaciones físico químicas y de las principales actividades industriales.

COORDENADAS		Long (°)	Lat (°)	Alt (m)
Estación de biomonitoreo	S1	-4.8035	37.8513	95
	S2	-4.6703	37.8057	211
	S3	-4.8193	37.9522	577
	S4	-4.7777	37.8918	139
	S5	-4.7622	37.9145	172
Estación fisico-química	FS	-4.7622	37.8926	102
	MS	-4.8174	37.8746	116
Principal actividad industrial	MET	-4.8137	37.8773	118
	CEM	-4.7642	37.9019	123
	PMK	-4.7993	37.8502	98
	LAN	-4.7326	37.8117	192

Cada estación estuvo compuesta por dos colmenas Dadant, orientadas hacia el sur-sureste, y colocadas sobre un soporte de madera a 40 cm del suelo, con una separación entre sí de 60 cm. Las colmenas estaban protegidas con baño de parafina o pinturas sin componentes metálicos, que no interfieren en este estudio (Van der Steen *et al.*, 2012). Las colonias fueron tratadas con productos autorizados contra el ácaro *Varroa destructor* Anderson and Trueman e inspeccionadas preliminarmente al comienzo de los ensayos anuales para asegurar un desarrollo adecuado.

## **4.2. Muestreo de abejas.**

Se recogieron muestras de abejas tal y como se expone a continuación (Figura 4).

Tras el cierre de la piquera, se utilizó un aspirador modificado para atrapar a las abejas que regresaban en esos momentos a sus colmenas, evitando aspirar aquellas que trajeran polen en sus patas traseras ya que estas bolitas de polen dificultan los procedimientos analíticos. Entre muestra y muestra, cada pieza del aspirador modificado fue cuidadosamente limpiada con alcohol. Las muestras se mantuvieron a -28°C en espera de su análisis.

Las muestras de abejas fueron recogidas mensualmente de las dos colmenas que componían cada estación durante un periodo de tiempo que varió según los años. Así, se tomaron un total de 192 muestras con 125 abejas pecoreadoras cada una, distribuidas de la siguiente manera: 32 en el año 2007 durante los meses de mayo, junio, julio y diciembre, 90 en el 2009 desde abril a diciembre, y 70 en el año 2010 desde abril a octubre.

Siempre que fue posible se recolectaron el mismo día en las cinco estaciones de biomonitorio. En ningún momento se empleó el ahumador para evitar cualquier riesgo de contaminación.



**Figura 4.** Recogida y preparación de muestras de abejas.

1. Estación de biomonitoreo.
2. Recolección de abejas pecoreadoras.
3. Traspase de abejas.
4. Transporte en nevera portátil.
3. Selección de abejas.
4. Muestras para enviar a laboratorio.

### **4.3. Muestreo de néctar.**

Se recogieron muestras de néctar tal y como se expone a continuación (Figura 5).

Se seleccionaron y cortaron trozos de panal en base a los registros de humedad del néctar proporcionados por un refractómetro. Se eligió una porción de panal con néctar y sin polen, cuyo contenido tuviera más del 19% de humedad. Las muestras se obtuvieron a partir del prensado mecánico de los trozos de panal e, igualmente, se mantuvieron a -28°C en espera de su análisis.

Las muestras de néctar fueron recogidas mensualmente de las dos colmenas que componían cada estación, coincidiendo con los periodos de mayor acopio de miel por parte de las abejas. De modo general hubo un intervalo de entre 1 a 10 días entre la recogida de abejas y de néctar. Solo en 2007 las abejas fueron recolectadas en julio y el néctar en septiembre y, en mayo de 2010, las muestras de néctar fueron recolectadas 3 días antes que las de abejas.

Así, se tomaron un total de 84 muestras de 10 ml cada una, distribuidas como sigue: 24 en el año 2007 en los meses de mayo, junio y septiembre, 30 muestras en 2009 y 30 en el 2010 durante los meses de mayo, junio y julio.

Siempre que fue posible se recolectaron el mismo día en las cinco estaciones de biomonitorio. En ningún momento se empleó el ahumador para evitar cualquier riesgo de contaminación.



**Figura 5.** Recogida y preparación de muestras de néctar.

1. Cuadro con néctar.
2. Medición de la humedad con un refractómetro.
3. Corte y extracción del trozo de panal seleccionado.
4. Registro e identificación de las muestras.
3. Extracción del néctar por presión manual.
4. Muestras para enviar a laboratorio.

#### **4.4. Análisis de metales pesados.**

Los metales pesados analizados fueron Pb, Cr y Ni porque se presentan con frecuencia tanto en la contaminación urbana como en la procedente de distintos procesos industriales (Machado *et al.*, 2008). El análisis de Cd se incorporó durante el 2010 debido a una denuncia de contaminación ambiental con este metal pesado durante el año 2009 (Medicina TV, 2009).

Los análisis fueron realizados por el Centro Studi Ambientali (CSA) en Rimini, Italia, y la metodología fue validada por el Proyecto para la Certificación de Elementos Traza en miel, que fue apoyado por el Instituto Nacional de Salud de Italia (C. Volta 2015, com. pers. de 29 de julio). Cuando se realizaron las pruebas, no existía material de referencia certificado sobre abejas o miel ni de los parámetros investigados. Por este motivo, se realizaron pruebas repetidas en las muestras de abejas y de néctar y se añadieron algunos estándares para testar metales pesados usando los métodos descritos en Betinelli y Terni (2000) y Gnes *et al.* (2004).

##### **4.4.1. Análisis de metales pesados en abejas.**

Las muestras de abejas fueron digeridas con un sistema de microondas, y las concentraciones de metales pesados en mg/kg de abeja (peso húmedo) se cuantificaron utilizando espectrometría atómica. Una cantidad representativa de 0.5 g de cada muestra se trató con 2 ml de HNO<sub>3</sub> (65%) (Merck, Darmstadt, Alemania) y 0.5 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%) (Merck, Darmstadt, Alemania), y después fue sometida a un proceso de digestión ácida asistida por microondas (Milestone, MLS Mega 1200). El material resultante se mezcló posteriormente con agua destilada hasta obtener un volumen final de 25 ml. Las concentraciones de metales pesados (Pb, Cr, Ni y Cd) se determinaron utilizando la técnica de espectrometría de emisión atómica de plasma acoplado inductivamente (Varian, ICP 720ES), según el Método 6010C de la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (US-EPA) (2007a), y mediante

espectrofotometría de absorción atómica con horno de grafito y corrección de fondo por efecto Zeeman (Varian, SpectrAA220Z), de acuerdo con el Método 7010 de la US-EPA (2007b). Se obtuvieron recuperaciones de entre el 90% y el 105%.

Los límites de cuantificación (LOQ, acrónimo en inglés) fueron 0.05 mg/kg para el Pb, 0.02 mg/kg para el Cr, 0.15 mg/kg para el Ni y 0.005 mg/kg para el Cd. Los límites de detección (LOD, acrónimo en inglés) fueron 0.02 mg kg para el Pb, 0.01 mg kg para el Cr, 0.05 mg/kg para el Ni y 0.002 mg/kg para el Cd.

#### **4.4.2. Análisis de metales pesados en néctar.**

Antes de proceder al análisis instrumental, el néctar se diluyó en una proporción 1:2 con solución de 1% de Triton-X (Merck, Darmstadt, Alemania); la matriz fue digerida en el tubo de grafito durante la incineración. Los metales pesados (Pb, Cr, Ni y Cd) fueron determinados por espectrometría de absorción atómica con horno de grafito y corrección de fondo con efecto Zeeman (Varian, SpectrAA220Z), de acuerdo con el Método 7010 de la US-EPA (2007b). La muestra se cuantificó mediante adiciones estándar. Se obtuvieron recuperaciones entre 90% y 105%.

Los límites de cuantificación (LOQ) fueron de 0.002 mg/kg para el Pb, de 0.0008 mg/kg para el Cr, de 0.008 mg/kg para el Ni y de 0.002 mg/kg para el Cd. Los límites de detección (LOD) fueron de 0.001 mg/kg para el Pb, de 0.0003 mg/kg para el Cr, de 0.003 mg/kg para el Ni y de 0.001 mg/kg para el Cd.

#### **4.5. Análisis e interpretación de los datos.**

Uno de los objetivos de la vigilancia de la contaminación del medio ambiente es el de establecer un umbral de riesgo que activa una alarma si sus

límites son sobrepasados. Por tanto, para el análisis e interpretación de los resultados se han tenido en cuenta valores de referencia del Pb, Cr, Ni y Cd en abejas y miel proporcionados por el Departamento de Ciencias Agrícolas de la Universidad de Bolonia (Italia). Estos valores de referencia se obtuvieron a partir de una base de datos que es actualizada anualmente con la nueva información relacionada con los cambios en las condiciones ambientales, con las mejoras metodológicas, o con los nuevos equipos de análisis (Porrini *et al.*, 2002)

Estos valores de referencia se han calculado en base a los datos registrados por las estaciones experimentales de los proyectos llevados a cabo por el Departamento de Ciencias Agrícolas de la Universidad de Bolonia durante un periodo de diez años (Figura 6). Los datos fueron cuantitativamente divididos en cuatro cuartiles. El primer cuartil ( $Q_1$ ) es el valor en el cual, o por debajo del cual, quedaron el 25% de todos los datos; el segundo cuartil ( $Q_2$ ) es el valor en el cual, o por debajo del cual, quedaron el 50% de los datos; el tercer cuartil ( $Q_3$ ) es el valor en el cual, o por debajo del cual, quedaron el 75% de los datos. El primer cuartil ( $Q_1$ ) fue usado como límite de referencia bajo (LRB) y el tercer cuartil ( $Q_3$ ) como límite de referencia alto (LRA).

En el caso de que los resultados sean iguales o inferiores al LRB son considerados “Aceptables”, y probablemente correspondan a estaciones testigo o control situadas en territorios naturales con poca contaminación. En cambio, si los resultados superan al LRA son considerados “Preocupantes”, y probablemente corresponden a estaciones próximas a territorios problemáticos o conflictivos con elevada contaminación. Por último, si los resultados superan al LRB pero son iguales o menores que el LRA, son considerados “Merecedores de atención”, y corresponden a estaciones localizadas en territorios con contaminación intermedia.

Para las abejas, los límites de referencia bajos fueron 0.3 mg/kg para el Pb, 0.04 mg/kg para el Cr, 0.1 mg/kg para el Ni, and 0.052 mg/kg para el Cd, y los límites de referencia altos fueron 0.7 mg/kg para el Pb, 0.12 mg/kg para el Cr, 0.3 mg/kg para el Ni and 0.1 mg/kg para el Cd.

Para el néctar, los límites de referencia bajos fueron 0.01 mg/kg para el Pb, 0.005 mg/kg para el Cr, 0.02 mg/kg para el Ni, and 0.004 mg/kg para el Cd, y los límites de referencia altos fueron 0.05 mg/kg para el Pb, 0.015 mg/kg para el Cr, 0.2 mg/kg para el Ni and 0.014 mg/kg para el Cd.

Cuartil:		Q <sub>1</sub>	Q <sub>2</sub>	Q <sub>3</sub>		
% Datos:		0%	25%	50%	75%	100%
Límite de Referencia (LR):		LRB (Bajo)		LRA (Alto)		
Interpretación:		<b>Aceptable</b> Polución baja	<b>Merecedor de atención</b> Polución intermedia	<b>Preocupante</b> Polución Alta		
Abejas	Pb	0.3 mg/kg		0.7 mg/kg		
	Cr	0.04 mg/kg		0.12 mg/kg		
	Ni	0.1 mg/kg		0.3 mg/kg		
	Cd	0.052 mg/kg		0.1 mg/kg		
Néctar	Pb	0.01 mg/kg		0.05 mg/kg		
	Cr	0.005 mg/kg		0.015 mg/kg		
	Ni	0.02 mg/kg		0.2 mg/kg		
	Cd	0.004 mg/kg		0.14 mg/kg		

**Figura 6.** Representación gráfica de los cuartiles y límites de referencia para la interpretación de los resultados.

Para el análisis estadístico, se han tomado como base las concentraciones medias de metales pesados, en una fecha determinada, calculadas a partir de las dos muestras procedentes de las dos colmenas que constituyen cada estación de biomonitorio. Se utilizó el programa estadístico SPSS 15.0 para Windows y se aplicaron los test de contraste de Kruskal-Wallis y Mann-Whitney, así como el coeficiente de correlación de Spearman.

Se han utilizado dos tipos de evaluación de los resultados tal y como se expone a continuación:

a. Evaluación cualitativa.

Las diferencias significativas espaciales y temporales (Mann-Whitney,  $p \leq 0.05$  o  $p \leq 0.01$ ) han sido representadas mediante letras, de manera que para cada metal pesado, la coincidencia de una sola letra entre dos o más estaciones indicó que entre éstas no hubo diferencias significativas. En cambio, si no hubo ninguna letra coincidente, las diferencias entre estaciones fueron significativas, siendo la concentración de metal pesado mayor en la estación que contenga una letra más cercana al final del alfabeto. El análisis cualitativo temporal (entre años y meses) ha sido interpretado del mismo modo.

b. Evaluación cuantitativa.

Los niveles de polución de las estaciones, los años y los meses han sido representados por números, siendo 1. "Aceptable" (igual o menor que LRB), 2. "Merecedor de atención" (mayor que LRB e igual o menor que el LRA), y 3. "Preocupante" (mayor que LRA).

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Resultados obtenidos a partir de la matriz de bioconcentración en abejas.

#### 5.1.1. Plomo, cromo y níquel.

Las concentraciones de Pb, Cr y Ni en abejas para cada estación y fecha de muestreo puede observarse en la Tabla 6.

ABEJAS	EST	MES									MEDIA	
		Abr	May	Jun	Jul	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic		
Pb	2007	S1	-	0.4450	0.6150	0.5350	-	-	-	-	0.4550	0.5125
		S3	-	0.1850	0.3050	0.5650	-	-	-	-	0.2250	0.3200
		S4	-	1.1450	0.6650	1.0400	-	-	-	-	0.7500	0.9000
		S5	-	0.6050	0.3900	0.7450	-	-	-	-	0.4550	0.5488
	2009	S1	0.2350	0.2350	0.3300	0.4600	0.6550	0.5100	0.3000	0.6100	0.4000	0.4150
		S2	0.1550	0.1500	0.1750	0.1550	0.3100	0.2500	0.3050	0.2900	0.2950	0.2317
		S3	0.1450	0.3500	0.3800	0.3650	0.2750	0.4250	0.2150	0.4150	0.4300	0.3333
		S4	0.2600	0.4950	0.5350	0.6300	0.4300	0.8550	0.4550	0.8900	0.6000	0.5722
		S5	0.2850	0.3450	0.3150	0.3750	0.3550	0.4650	0.1950	0.4100	0.2750	0.3356
	2010	S1	0.1200	0.2250	0.1500	0.2050	0.3100	0.2950	0.2150	-	-	0.2171
		S2	0.0750	0.2100	0.1000	0.0850	0.1300	0.1250	0.0375	-	-	0.1089
		S3	0.2700	0.1200	0.1500	0.2550	0.2600	0.1100	0.0900	-	-	0.1793
		S4	0.3000	0.3700	0.3300	0.2300	0.3550	0.2650	0.2450	-	-	0.2993
		S5	0.2250	0.2050	0.2700	0.2400	0.1750	0.2400	0.2200	-	-	0.2250
	Cr	2007	S1	-	0.2000	0.0550	0.0450	-	-	-	-	0.0800
S3			-	0.0500	0.0350	0.0350	-	-	-	-	0.0300	0.0375
S4			-	0.4000	0.0600	0.0550	-	-	-	-	0.0500	0.1413
S5			-	0.1900	0.0400	0.0550	-	-	-	-	0.0400	0.0813
2009		S1	0.0400	0.0200	0.0500	0.0850	0.0850	0.0650	0.0550	0.0700	0.0250	0.0550
		S2	0.0250	0.0300	0.0400	0.0400	0.0850	0.0900	0.0550	0.0650	0.0200	0.0500
		S3	0.0100	0.0300	0.0450	0.0550	0.0450	0.0550	0.0350	0.0600	0.0400	0.0417
		S4	0.0250	0.0550	0.0500	0.0850	0.0750	0.2450	0.0600	0.0900	0.0350	0.0800
		S5	0.0300	0.0350	0.0500	0.1000	0.0500	0.0500	0.0400	0.0500	0.0100	0.0461
2010		S1	0.0200	0.0800	0.0650	0.1250	0.0900	0.0550	0.0250	-	-	0.0657
		S2	0.0450	0.1050	0.0550	0.0900	0.0900	0.0900	0.0150	-	-	0.0700
		S3	0.0150	0.0500	0.0550	0.0500	0.0500	0.0200	0.0400	-	-	0.0400
		S4	0.1100	0.0950	0.1050	0.1200	0.1150	0.0500	0.0950	-	-	0.0986
		S5	0.1500	0.0900	0.1000	0.0850	0.0250	0.0500	0.0500	-	-	0.0786
Ni		2007	S1	-	0.1225	0.2525	0.3600	-	-	-	-	0.0750
	S3		-	0.1925	0.1175	0.1175	-	-	-	-	0.0750	0.1256
	S4		-	0.1975	0.3075	0.1125	-	-	-	-	0.2600	0.2194
	S5		-	0.3100	0.2200	0.1275	-	-	-	-	0.0750	0.1831
	2009	S1	0.0750	0.0750	0.0750	0.2350	0.1950	0.0750	0.0750	0.1325	0.0750	0.1125
		S2	0.0750	0.0750	0.0750	0.1225	0.2300	0.2150	0.1425	0.1175	0.0750	0.1253
		S3	0.0750	0.1225	0.2200	0.3900	0.1425	0.1175	0.0750	0.0750	0.1225	0.1489
		S4	0.0750	0.0750	0.1675	0.0750	0.0750	0.1725	0.0750	0.0750	0.0750	0.0961
		S5	0.0750	0.2000	0.1275	0.1875	0.0750	0.0750	0.0750	0.0750	0.0750	0.1072
	2010	S1	0.0750	0.0750	0.0750	0.0750	0.0750	0.1525	0.0750	-	-	0.0861
		S2	0.1275	0.0750	0.3600	0.0750	0.1725	0.1125	0.0750	-	-	0.1425
		S3	0.0750	0.0750	0.0750	0.0750	0.1175	0.0750	0.0750	-	-	0.0811
		S4	0.0750	0.0750	0.0750	0.0750	0.0750	0.0750	0.1875	-	-	0.0911
		S5	0.1500	0.1325	0.0750	0.0750	0.0750	0.0750	0.0750	-	-	0.0939

**Tabla 6.** Concentración de Pb, Cr y Ni (mg/kg) en abejas, por estaciones (EST) y meses durante 2007, 2009 y 2010. El nivel de contaminación se indica mediante el sombreado de cada casilla: color blanco significa Aceptable (polución baja), gris claro significa Mercedor de atención (polución intermedia) y gris oscuro significa Preocupante (polución alta). Nota: la Estación S2 no estuvo disponible en el año 2007.

El análisis de Kruskal-Wallis reveló diferencias significativas entre estaciones y fechas con un 95% o 99% de nivel de significación. Se detectaron diferencias espaciales y mensuales en la concentración Pb ( $p \leq 0.01$  entre estaciones y  $p \leq 0.05$  entre meses) y Cr ( $p \leq 0.01$  entre estaciones y meses) encontrado en abejas. Se detectaron también diferencias anuales en la concentración de Pb ( $p \leq 0.01$ ) y de Ni ( $p \leq 0.01$ ).

Un análisis más detallado (Mann-Whitney, ( $p \leq 0.01$  o  $p \leq 0.05$ ) permitió detectar diferencias estadísticamente significativas entre localizaciones y periodos específicos, para cada uno de los metales pesados estudiados (Tabla 7).

Metal pesado		Pb	Cr	Ni
Estación	S1	b-2	cb-2	a-2
	S2	a-1	cba-2	a-2
	S3	b-2	a-2	a-2
	S4	c-2	c-2	a-2
	S5	b-2	ba-2	a-2
Uso del suelo	Urbano	c-2	b-2	a-2
	Industrial	b-2	a-2	a-2
	Agr-for	a-1	a-2	a-2
Año	2007	c-2	ba-2	b-2
	2009	b-2	a-2	a-2
	2010	a-1	b-2	a-1
Periodo estacional	Primavera	a-2	ba-2	ba-2
	Verano	a-2	cb-2	cb-2
	Oto-Inv	a-2	a-2	a-1
Mes	Abr	dc-1	fd-2	a-1
	May	gfedcba-2	gca-2	ba-2
	Jun	gba-2	gca-2	b-2
	Jul	gba-2	gca-2	ba-2
	Ago	gba-2	gca-2	ba-2
	Sep	gfedcba-2	gca-2	ba-2
	Oct	edb-1	dc-2	ba-1
	Nov	gf-2	fba-2	ba-1
Dic	fa-2	ed-1	ba-2	

**Tabla 7.** Evaluación cualitativa y cuantitativa de la contaminación de metales pesados en abejas en Córdoba, por Estación, Uso del suelo y Periodo (Año, Periodo estacional y Mes). Ver Material y Métodos para la interpretación de las letras y números.

### **5.1.2. Variación espacial.**

Como se observa en la Tabla 7, la posibilidad de disponer de cinco puntos de muestreo en la ciudad ha permitido apreciar diferencias espaciales de la concentración de Pb y Cr que de otro modo hubieran pasado inadvertidas. En el caso de la concentración de Ni, no se detectaron diferencias significativas.

En concreto, la concentración de Pb en abejas de la Estación S4 fue significativamente mayor a la del resto de estaciones. En contraposición, la Estación S2 presentó una cantidad de Pb en abejas significativamente menor a la de las demás localizaciones. No se observaron tales diferencias, sin embargo, entre las Estaciones S1, S5 y S3.

Las abejas de la Estación S4 presentaron una cantidad de Cr significativamente mayor a la que presentaron las Estaciones S5 y S3, y la cantidad de Cr encontrado en las abejas de la Estación S1 fue significativamente mayor a la encontrada en la Estación S3.

Analizando los datos en función del uso del suelo, las concentraciones de Pb y Cr en abejas del núcleo urbano (Estación S4) fueron significativamente mayores a las encontradas en la zona industrial (agrupación de Estaciones S1 y S5) o en la zona agroforestal (agrupación de las Estaciones S2 y S3). Además, la concentración de Pb en abejas de la zona industrial fue significativamente mayor que en la zona agroforestal. No hubo diferencias significativas, sin embargo, en la cantidad de Ni en abejas en relación al uso del suelo.

### **5.1.3. Variación temporal.**

Como se muestra en la Tabla 7, la accesibilidad de las muestras ha permitido realizar un seguimiento continuo en el tiempo de la contaminación, detectándose variaciones anuales, estacionales y mensuales.

Anualmente, la concentración de Pb en abejas decreció significativamente a lo largo de los tres años de estudio. El valor de Cr fue significativamente mayor en 2010 que en 2009, y el valor de Ni fue significativamente mayor en 2007 que en el resto de años.

Analizando los datos según los periodos estacionales se observó que las concentraciones de Cr y Ni en abejas fueron significativamente más altas en verano (Julio, Agosto y Septiembre) que en otoño-invierno (Octubre, Noviembre y Diciembre), aunque similares a las de la primavera (Abril, Mayo y Junio).

En el mes de Abril, los valores de Pb en abejas fueron significativamente menores que en los meses de Junio, Julio, Agosto, Noviembre y Diciembre. Además, las cantidades de Pb en las abejas del mes de Octubre fueron significativamente menores a las de Noviembre y Diciembre.

Las concentraciones de Cr en abejas en el mes de Abril fueron significativamente menores que la de los meses de Mayo, Junio, Julio, Agosto y Septiembre, y en Octubre, el valor de Cr fue significativamente menor que en Julio y Noviembre. Además, en el mes de Diciembre se obtuvieron cantidades de Cr en abejas significativamente menores que el resto de meses, a excepción de los meses de Abril y Octubre.

En el mes de Abril se obtuvieron cantidades de Ni en abejas significativamente más bajas que en el mes de Junio, mientras que no se detectaron diferencias significativas entre los meses restantes.

#### **5.1.4. Niveles de contaminación.**

En la Tabla 8, se muestra el número de veces y la frecuencia (%) de las concentraciones de Pb, Cr y Ni en abejas que fueron consideradas Preocupantes, Merecedoras de atención o Aceptables. En esta tabla se incluye

también una valoración por localizaciones (estaciones) y periodos (años y/o meses). Los valores absolutos y los niveles de polución pueden verse en la Tabla 6.

NIVEL DE CONTAMINACIÓN		Preocupante	Merecedor de atención	Aceptable	N
METAL PESADO	Pb	6 (6,25%)	40 (41,66%)	50 (52,08%)	96
	Cr	6 (6,25%)	60 (62,50%)	30 (31,25%)	96
	Ni	5 (5,21%)	36 (37,50%)	55 (57,29%)	96
ESTACIÓN	S1	3 (5,00%)	30 (50,00%)	27 (45,00%)	60
	S2	1 (2,08%)	20 (41,60%)	27 (56,25%)	48
	S3	1 (1,67%)	27 (45,00%)	32 (53,33%)	60
	S4	8 (13,33%)	32 (53,33%)	20 (33,33%)	60
	S5	4 (6,67%)	27 (45,00%)	29 (48,33%)	60
AÑO	2007	10 (20,83%)	28 (58,34%)	10 (20,83%)	48
	2009	4 (2,96%)	70 (51,85%)	61 (45,19%)	135
	2010	3 (2,85%)	38 (36,19%)	64 (60,95%)	105
MES	Apr	1 (3,33%)	4 (13,33%)	25 (83,33%)	30
	May	5 (11,90%)	19 (45,24%)	18 (42,86%)	42
	Jun	2 (4,77%)	26 (61,90%)	14 (33,33%)	42
	Jul	5 (11,90%)	23 (54,76%)	14 (33,34%)	42
	Aug	0 (0%)	20 (66,67%)	10 (33,33%)	30
	Sep	2 (6,67%)	16 (53,33%)	12 (40,00%)	30
	Oct	0 (0%)	9 (30,00%)	21 (70,00%)	30
	Nov	1 (6,67%)	10 (66,67%)	4 (26,67%)	15
	Dic	1 (3,70%)	9 (33,33%)	17 (62,97%)	27

**Tabla 8.** Frecuencia de concentraciones de Pb, Cr y Ni en abejas Preocupantes, Merecedoras de atención y Aceptables expresadas por Metal Pesado, Estación y Periodo (Año y Mes). El valor de "N" se corresponde con el número de datos según la Tabla 6.

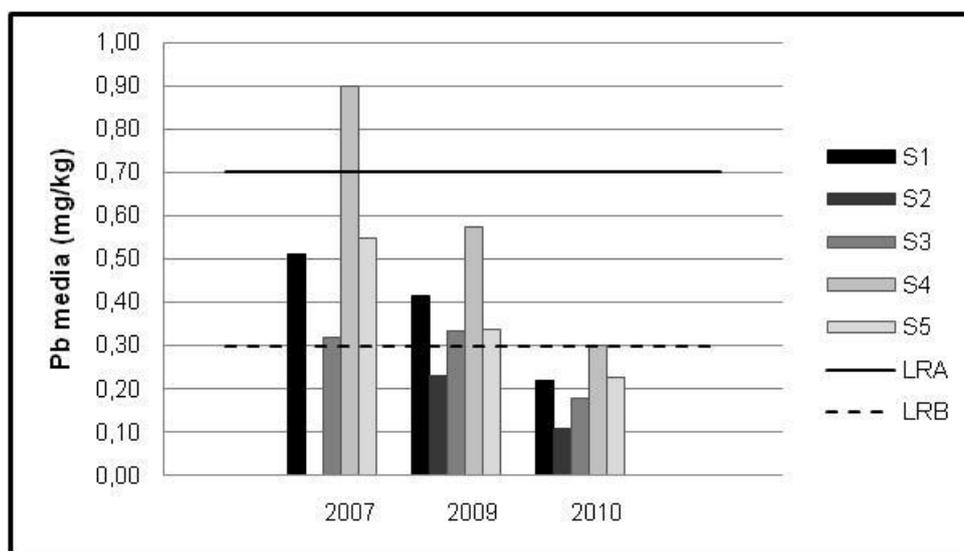
Como se puede ver en la Tabla 8, el Cr y el Pb fueron los metales pesados que alcanzaron mayores frecuencias de valores Preocupantes (6.25% cada uno); la localización con mayor frecuencia de valores Preocupantes fue la Estación S4 (13.33%); el año con mayor frecuencia de valores Preocupantes fue el 2007 (20.83%); y los meses en los que se obtuvieron mayores frecuencias de valores Preocupantes fueron los de Mayo y Julio (11.90% cada uno).

El metal pesado que alcanzó mayor frecuencia de valores Merecedores de atención fue el Cr (62.50%); la localización con mayor frecuencia de valores Merecedores de atención fue la Estación S4 (53.33%), el año con mayor

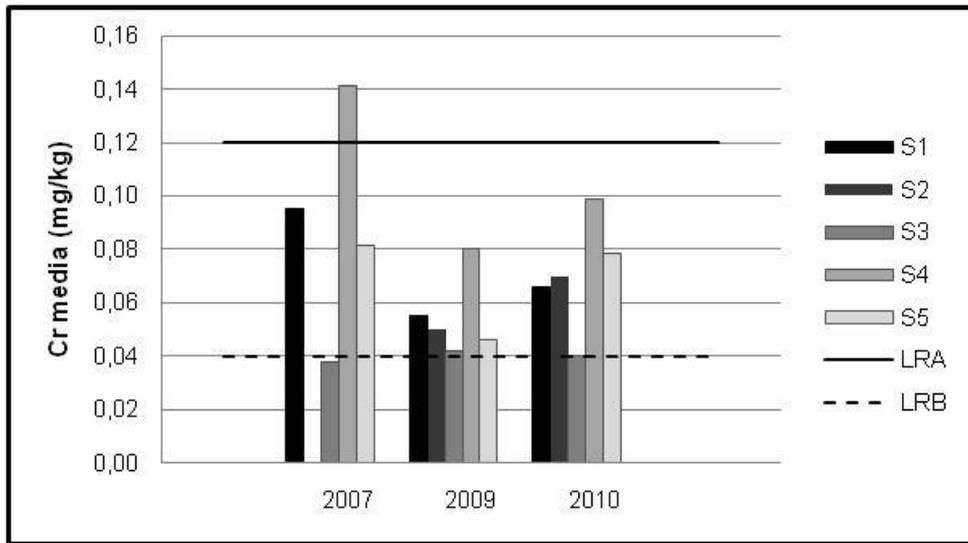
frecuencia de valores Mercedores de atención fue el 2009 (51.85%); y los meses en los que se obtuvieron mayores frecuencias de valores Mercedores de atención fueron los de Agosto y Noviembre (66.67% cada uno).

Finalmente, el metal pesado que alcanzó mayor frecuencia de valores Aceptables fue el Ni (57.59%); la localización con mayor frecuencia de valores Aceptables fue la Estación S2 (56.25%); el año con mayor frecuencia de valores Aceptables fue el 2010 (60.95%); y el mes en el que se obtuvo mayor frecuencia de valores Aceptables fue el de Abril (83.33%).

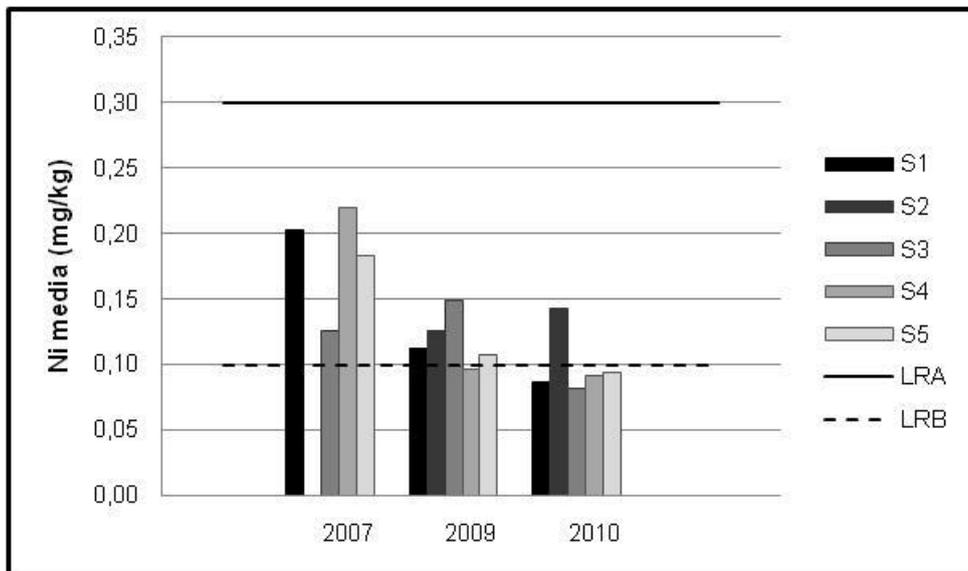
La variabilidad y severidad de la contaminación por metales pesados en la ciudad de Córdoba según la matriz de bioconcentración en abejas puede verse gráficamente en las Figuras 7, 8 y 9, donde se representa la concentración media anual de Pb, Cr y Ni en abejas en cada estación y en cada año en relación a los límites de referencia especificados en la Figura 6.



**Figura 7.** Variabilidad de las concentraciones medias anuales de Pb en abejas (mg/kg) en relación a los límites de referencia (LRA y LRB) en cada estación, y durante los años 2007, 2009 y 2010. Nota: la Estación S2 no estuvo disponible en el año 2007.

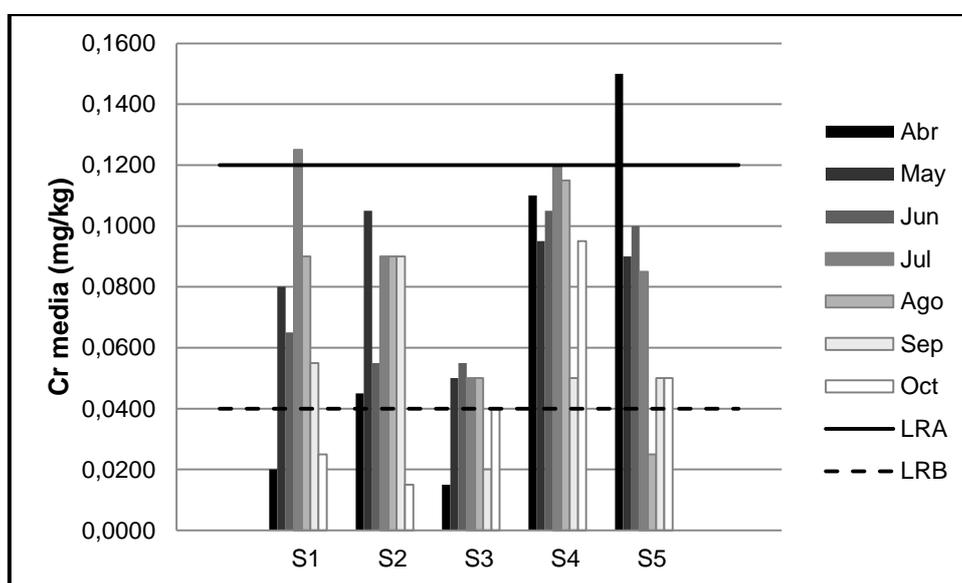


**Figura 8.** Variabilidad de las concentraciones medias anuales de Cr en abejas (mg/kg) en relación a los límites de referencia (LRA y LRB) en cada estación, y durante los años 2007, 2009 y 2010. Nota: la Estación S2 no estuvo disponible en el año 2007.



**Figura 9.** Variabilidad de las concentraciones medias anuales de Ni en abejas (mg/kg) en relación a los límites de referencia (LRA y LRB) en cada estación, y durante los años 2007, 2009 y 2010. Nota: la Estación S2 no estuvo disponible en el año 2007.

En la Tabla 6 se puede ver con más detalle las estaciones y los meses concretos donde los valores de metales pesados sobrepasaron el LRA y fueron Preocupantes. El análisis de los datos desde esta perspectiva, permitió detectar situaciones preocupantes que podrían pasar inadvertidas en una valoración global o más general. Así, aunque el año 2010 fue calificado globalmente como el menos contaminado por metales pesados, presentó estaciones y periodos puntuales con valores Preocupantes. Por ejemplo, la concentración de Cr en abejas de la Estación S1 durante el mes de Julio y de la Estación S5 durante el mes de Abril (Figura 10).



**Figura 10.** Variabilidad mensual de la concentración de Cr en abejas (mg/kg) en cada estación durante el año 2010 en relación a los límites de referencia (LRA y LRB) especificados en la Figura 6.

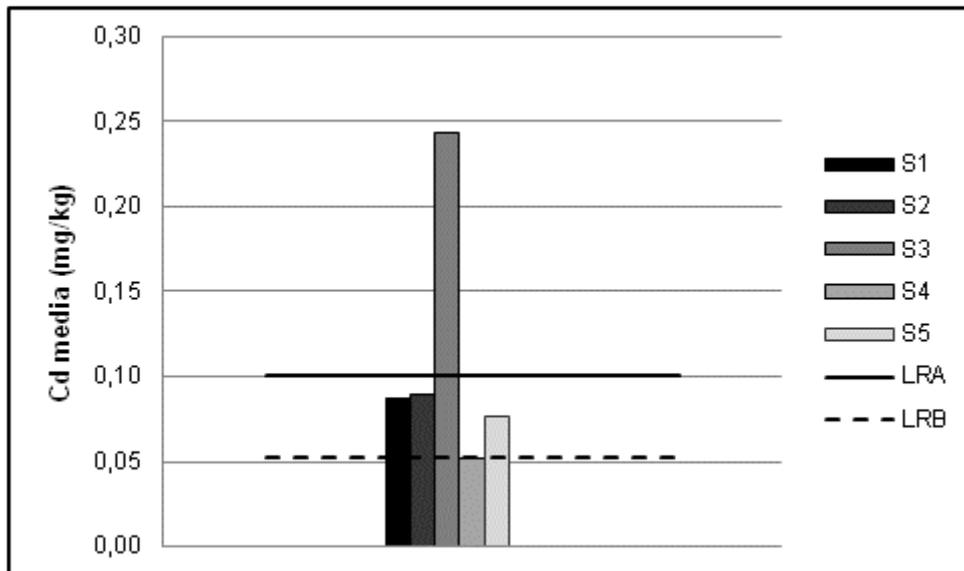
### 5.1.5. Cadmio.

Ante una denuncia de contaminación ambiental durante el año 2009, el Cd fue incorporado al protocolo de muestreo y análisis durante el año 2010. Como se puede ver en la Tabla 9, el 40% de las muestras de abejas excedieron el LRA para el Cd, y fueron considerados por tanto como valores Preocupantes. En las Figuras 11 y 12 se muestra que la concentración de Cd

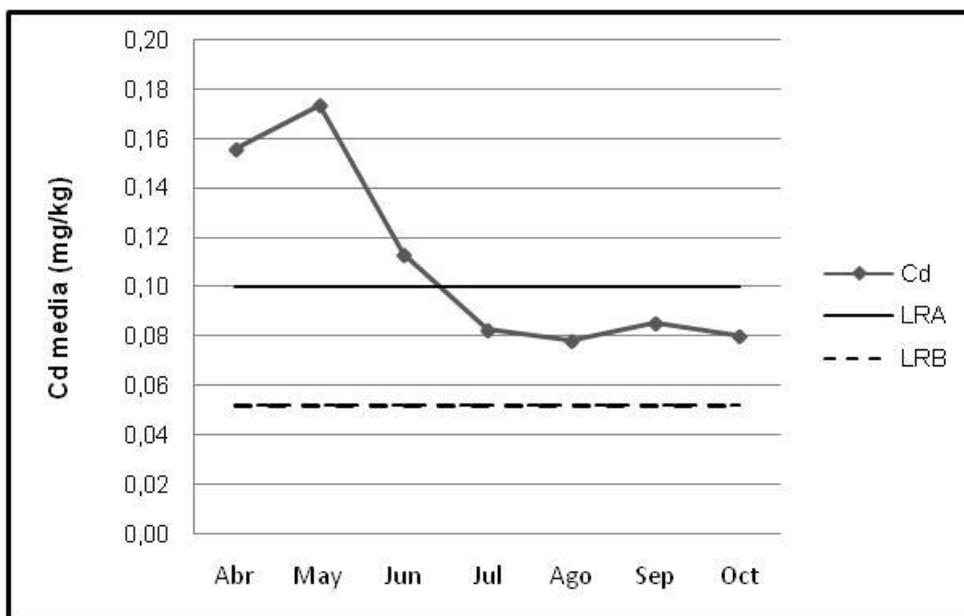
en abejas alcanzó valores Preocupantes en la Estación S3, siendo los meses de Abril, Mayo y Junio los más afectados.

ABEJAS	EST.	MES							MEDIA
		Abr	May	Jun	Jul	Ago	Sep	Oct	
Cd 2010	S1	0.1085	0.0370	0.0730	0.0905	0.1040	0.1035	0.0905	0.0867
	S2	0.1955	0.2480	0.0895	0.0225	0.0235	0.0310	0.0190	0.0899
	S3	0.2980	0.4445	0.3050	0.1350	0.1590	0.2120	0.1505	0.2434
	S4	0.0680	0.0505	0.0415	0.0295	0.0595	0.0375	0.0745	0.0516
	S5	0.1080	0.0870	0.0555	0.1350	0.0450	0.0425	0.0660	0.0770

**Tabla 9.** Concentración de Cd en abejas (mg/kg) según Estaciones (EST) y Meses durante 2010. El sombreado de las casillas se interpreta del mismo modo que en la Tabla 2.



**Figura 11.** Variabilidad de la concentración media de Cd en abejas (mg/kg) por Estaciones durante 2010 en relación a los límites de referencia (LRA y LRB) especificados en la Figura 6.



**Figura 12.** Variabilidad de la concentración media de Cd en abejas (mg/kg) por Meses durante 2010 en relación a los límites de referencia (LRA y LRB) especificados en la Figura 6.

## 5.2. Resultados obtenidos a partir de la matriz de bioconcentración en néctar.

### 5.2.1. Plomo, cromo y níquel.

Las concentraciones de Pb, Cr y Ni en néctar para cada estación y fecha de muestreo puede observarse en la Tabla 10.

NÉCTAR	EST.	MES			MEDIA	
		May	Jun	Jul*		
Pb	2007	S1	0,0010	0,0300	0,0135	0,0148
		S3	0,0025	0,0190	0,0090	0,0102
		S4	0,0105	0,0130	0,0180	0,0138
		S5	0,0045	0,0140	0,0075	0,0087
	2009	S1	0,0080	0,0475	0,0090	0,0215
		S2	0,0010	0,0025	0,0030	0,0022
		S3	0,0750	0,0190	0,0160	0,0367
		S4	0,0025	0,0085	0,0030	0,0047
	2010	S1	0,0020	0,0030	0,0140	0,0063
		S2	0,0010	0,0025	0,0015	0,0017
		S3	0,0050	0,0065	0,0035	0,0050
		S4	0,0030	0,0140	0,0080	0,0083
Cr	2007	S1	0,0018	0,0125	0,0334	0,0159
		S3	0,0009	0,0093	0,0114	0,0072
		S4	0,0033	0,0074	0,0171	0,0093
		S5	0,0014	0,0374	0,0103	0,0164
	2009	S1	0,0053	0,0141	0,0171	0,0121
		S2	0,0064	0,0093	0,0302	0,0153
		S3	0,0117	0,0131	0,0319	0,0189
		S4	0,0355	0,0101	0,0182	0,0213
	2010	S1	0,0030	0,0041	0,0063	0,0045
		S2	0,0025	0,0038	0,0018	0,0027
		S3	0,0060	0,0040	0,0051	0,0050
		S4	0,0020	0,0061	0,0067	0,0049
Ni	2007	S1	0,0040	0,1545	0,0590	0,0725
		S3	0,0915	0,1160	0,0625	0,0900
		S4	0,0160	0,0070	0,0335	0,0188
		S5	0,0695	0,0340	0,0460	0,0498
	2009	S1	0,0485	0,1035	0,1160	0,0893
		S2	0,0040	0,0185	0,0185	0,0137
		S3	0,2900	0,3555	0,3205	0,3220
		S4	0,0100	0,0310	0,0300	0,0237
	2010	S1	0,1620	0,0170	0,0380	0,0723
		S1	0,0100	0,0090	0,0585	0,0258
		S2	0,0120	0,0885	0,0135	0,0380
		S3	0,0575	0,0685	0,3635	0,1632
2010	S4	0,0040	0,0280	0,0065	0,0128	
	S5	0,0185	0,0680	0,0165	0,0343	

\*Septiembre en 2007

**Tabla 10.** Concentración de Pb, Cr y Ni (mg/kg) en néctar, por estaciones (EST) y meses durante 2007, 2009 y 2010. El nivel de contaminación se indica mediante sombreado de cada casilla: color blanco significa Aceptable (polución baja), gris claro significa Merecedor de atención (polución intermedia) y gris oscuro significa Preocupante (polución alta). Nota: la Estación S2 no estuvo disponible en el año 2007.

El análisis de Kruskal-Wallis reveló diferencias significativas entre estaciones y fechas con un 95% o 99% nivel de significación. Diferencias espaciales fueron detectadas en la concentración de Pb ( $p \leq 0.05$ ) y de Ni ( $p \leq 0.01$ ) encontrado en el néctar. También fueron detectadas diferencias

mensuales y anuales en la concentración de Cr ( $p \leq 0.05$  entre meses y  $p \leq 0.01$  entre años).

Un análisis más detallado (Mann-Whitney, ( $p \leq 0.01$  o  $p \leq 0.05$ ) permitió detectar diferencias estadísticamente significativas entre localizaciones y periodos específicos, para cada uno de los metales pesados estudiados (Tabla 11).

Metal Pesado		Pb	Cr	Ni
Estación	S1	b-2	a-2	ba-2
	S2	a-1	a-2	ba-2
	S3	b-2	a-2	c-2
	S4	b-1	a-2	a-2
	S5	b-2	a-2	b-2
Uso del suelo	Urban	a-1	a-2	a-1
	Indust	a-2	a-2	b-2
	Agr-for	a-2	a-2	b-2
Año	2007	a-2	ab-2	a-2
	2009	a-2	b-3	a-2
	2010	a-1	a-1	a-2
Mes	May	a-2	a-2	a-2
	Jun	b-2	b-2	a-2
	Jul	ab-2	b-3	a-2
	Sep	ab-2	b-3	a-2

**Tabla 11.** Evaluación cualitativa y cuantitativa de la contaminación de metales pesados en néctar en Córdoba, por Estación, Uso del suelo y Periodo (Año y Mes). Ver Material y Métodos para la interpretación de las letras y números.

### 5.2.2. Variación espacial

Como se observa en la Tabla 11, la posibilidad de disponer de cinco puntos de muestreo en la ciudad ha permitido apreciar diferencias espaciales de la concentración de Pb y Ni que de otro modo hubieran pasado inadvertidas. En el caso de la concentración de Cr, no se detectaron diferencias significativas.

Concretamente, la concentración de Pb en el néctar de la Estación S2 fue significativamente menor que la del resto de estaciones.

El néctar procedente de la Estación S3 tuvo una concentración de Ni significativamente más alta que la de las demás estaciones, y la concentración de Ni en el néctar de la Estación S5 fue significativamente mayor que la de la Estación S4.

Analizando los datos en función del uso del suelo, no se detectaron diferencias significativas entre la concentración de Pb y Cr en el néctar del área urbana (Estación S4), la zona industrial (agrupación de las Estaciones S1 y S5) y la zona agroforestal (agrupación de estaciones S2 y S3). Sin embargo, la concentración de Ni en néctar de la zona industrial y de la zona agrícola forestal fue significativamente mayor que la encontrada en el área urbana.

### **5.2.3. Variación temporal.**

Como se muestra en la Tabla 11, la accesibilidad de las muestras ha permitido realizar un seguimiento continuo en el tiempo de la contaminación, detectándose variaciones anuales y mensuales.

Anualmente, sólo se detectaron diferencias significativas en cuanto al Cr. La concentración de Cr fue significativamente mayor en el año 2009 que en el 2010.

Analizando los datos por meses, los valores de Pb en néctar fueron significativamente más bajos en Mayo que en Junio. Además, los valores de Cr fueron significativamente más bajos en Mayo que en el resto de meses. Respecto a las concentraciones de Ni, no se detectaron diferencias significativas entre meses.

#### 5.2.4. Niveles de contaminación.

En la Tabla 12 se muestra el número de veces y la frecuencia (%) de las concentraciones de Pb, Cr y Ni en néctar que fueron consideradas Preocupantes, Merecedoras de atención y Aceptables. En esta tabla se incluye también una valoración por localizaciones (estaciones) y periodos (años y meses). Los valores absolutos y los niveles de polución pueden verse en la Tabla 10.

NIVEL DE CONTAMINACIÓN		Preocupante	Merecedor de atención	Aceptable	N
METAL PESADO	Pb	1 (2.38%)	16 (38.10%)	25 (59.52%)	N=42
	Cr	9 (21.43%)	21 (50.00%)	12 (28.57%)	N=42
	Ni	4 (9.52%)	22 (52.38%)	16 (38.10%)	N=42
ESTACIÓN	S1	2 (7.41%)	14 (51.85%)	11 (40.74%)	N=27
	S2	1 (5.55%)	3 (16.67%)	14 (77.78%)	N=18
	S3	6 (22.22%)	14 (51.85%)	7 (25.93%)	N=27
	S4	3 (11.12%)	12 (44.44%)	12 (44.44%)	N=27
	S5	2 (7.41%)	16 (59.26%)	9 (33.33%)	N=27
AÑO	2007	3 (8.33%)	21 (58.34%)	12 (33.33)	N=36
	2009	10 (22.22%)	21 (46.67%)	14 (31.11%)	N=45
	2010	1 (2.22%)	17 (37.78%)	27 (60.00%)	N=45
MES	May	3 (7.14%)	12 (28.57%)	27 (64.29%)	N=42
	Jun	2 (4.76%)	27 (64.29%)	13 (30.95%)	N=42
	Jul*	9 (23.68%)	18 (47.37%)	11 (28.95%)	N=38
	Sep	0 (0%)	2 (50.00%)	2 (50.00%)	N=4

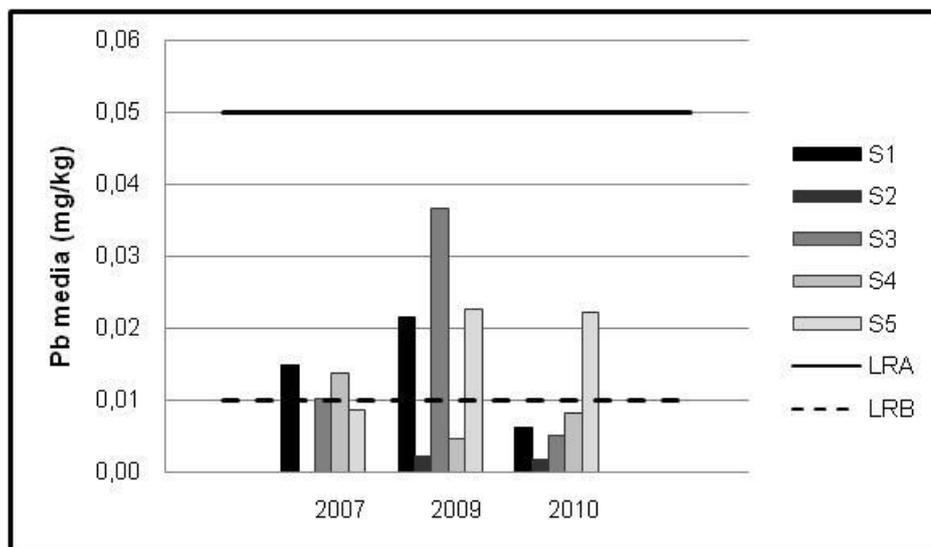
**Tabla 12.** Frecuencia de concentraciones de Pb, Cr y Ni en néctar Preocupantes, Merecedoras de atención y Aceptables expresadas por Metal Pesado, Estación y Periodo (Año y Mes). El valor de "N" se corresponde con el número de datos según la Tabla 10.

Como se observa en la Tabla 12, el Cr fue el metal pesado con la mayor frecuencia de valores Preocupantes (21.43%); la localización con la mayor frecuencia de valores Preocupantes fue la Estación S3 (22.22%); el año con mayor frecuencia de valores Preocupantes fue el 2009 (22.22%); y el mes en el que se alcanzó la mayor frecuencia de valores Preocupantes fue el de Julio (21.43%).

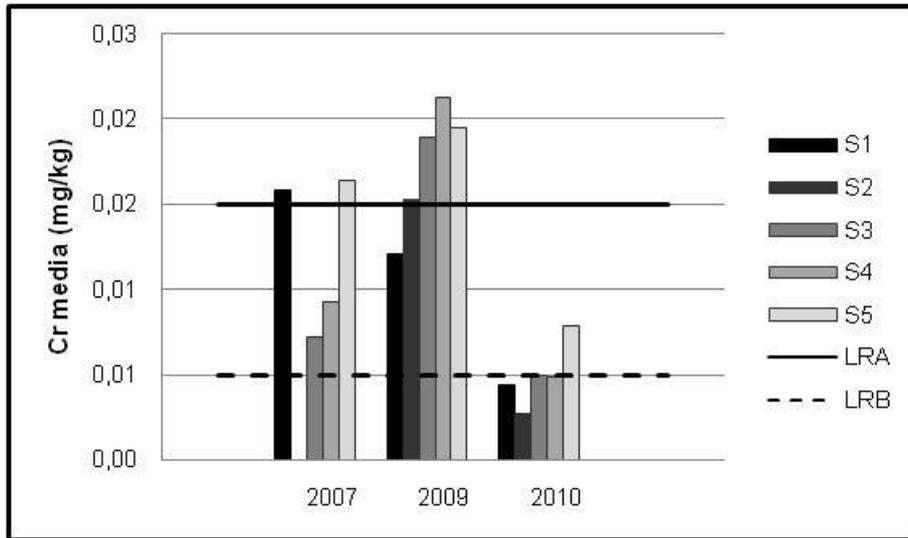
El metal pesado que obtuvo la mayor frecuencia de valores Merecedores de atención fue el Ni (52.38%); la localización con mayor frecuencia de valores Merecedores de atención fue la Estación S5 (59.26%); el año con la mayor frecuencia de valores Merecedores de atención fue el 2007 (58.34%); y el mes donde se obtuvo la mayor frecuencia de valores Merecedores de atención fue el de Junio (64.29%).

Finalmente, el metal pesado que alcanzó mayor frecuencia de valores Aceptables fue el Pb (59.52%); la localización con mayor frecuencia de valores Aceptables fue la Estación S2 (77.78%); el año con mayor frecuencia de valores Aceptables fue el 2010 (60.00%); y el mes en el que se obtuvo mayor frecuencia de valores Aceptables fue el de Mayo (64.29%).

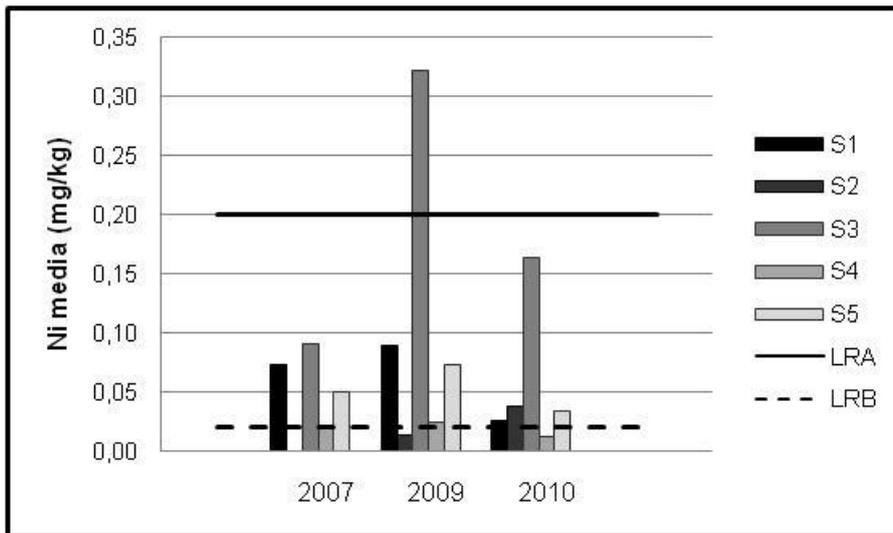
La variabilidad y severidad de la contaminación por metales pesados en la ciudad de Córdoba según la matriz néctar puede verse gráficamente en las Figuras 13, 14 y 15, donde se representa la concentración media anual de Pb, Cr y Ni en el néctar de cada estación y de cada año en relación a los valores de referencia especificados en la Figura 6.



**Figura 13.** Variabilidad de las concentraciones medias anuales de Pb en néctar (mg/kg) en relación a los límites de referencia (LRA y LRB) en cada estación, y durante los años 2007, 2009 y 2010. Nota: la Estación S2 no estuvo disponible en el año 2007.



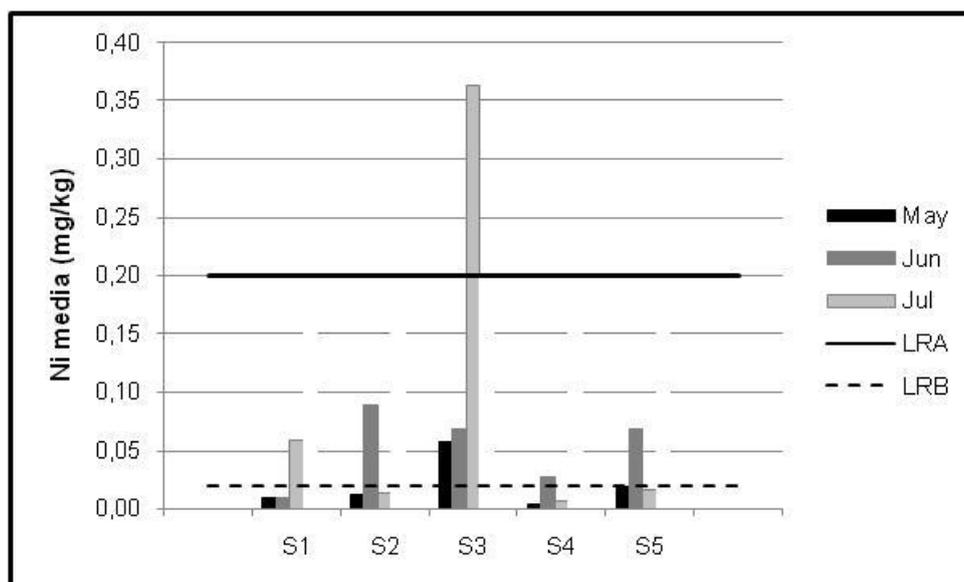
**Figura 14.** Variabilidad de las concentraciones medias anuales de Cr en néctar (mg/kg) en relación a los límites de referencia (LRA y LRB) en cada estación, y durante los años 2007, 2009 y 2010. Nota: la Estación S2 no estuvo disponible en el año 2007.



**Figura 15.** Variabilidad de las concentraciones medias anuales de Ni en néctar (mg/kg) en relación a los límites de referencia (LRA y LRB) en cada estación, y durante los años 2007, 2009 y 2010. Nota: la Estación S2 no estuvo disponible en el año 2007.

La Tabla 10 muestra las estaciones y los meses concretos donde los valores de metales pesados excedieron el LRA y fueron Preocupantes. El

análisis de los datos a este nivel, permitió detectar situaciones preocupantes que podrían pasar inadvertidas en una valoración más general. Así, aunque el año 2010 fue calificado globalmente como el menos contaminado por metales pesados, presentó estaciones y periodos puntuales con valores Preocupantes. Por ejemplo, la concentración de Ni en néctar de la Estación S3 durante el mes de Julio (Figura 16).



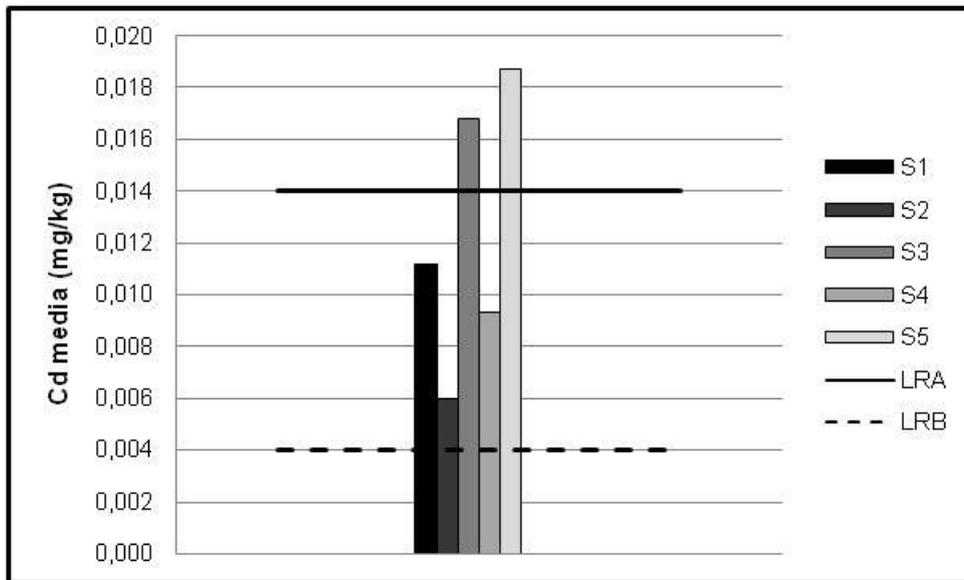
**Figura 16.** Variabilidad mensual de la concentración de Ni en néctar (mg/kg) en cada estación durante el año 2010 en relación a los límites de referencia (LRA y LRB) especificados en la Figura 6.

### 5.2.5. Cadmio.

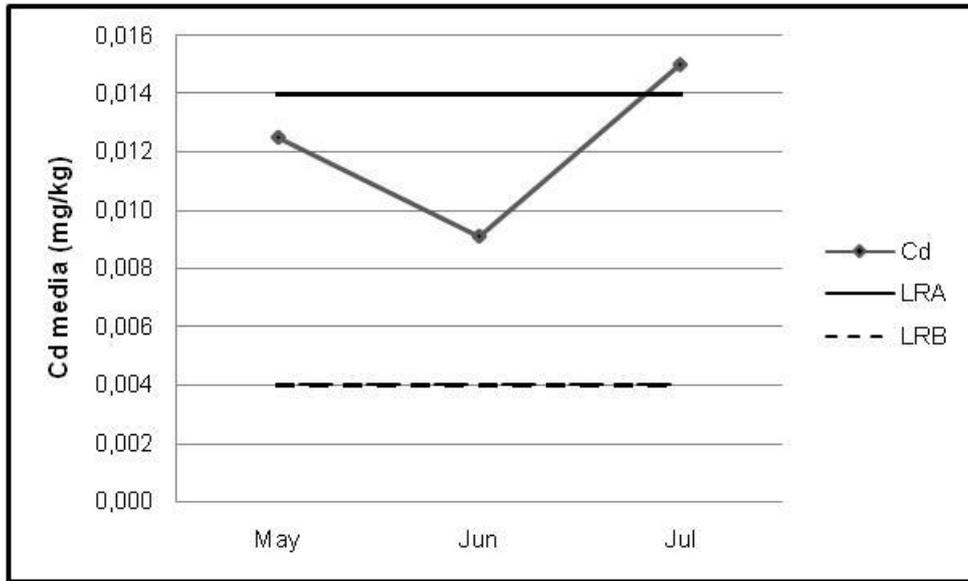
Como se comentó con anterioridad, el Cd fue incorporado al protocolo de muestreo en el año 2010 tras una denuncia de contaminación ambiental ocurrida en el año 2009. Como se muestra en la Tabla 13, el 33.33% de las muestras de néctar excedieron el LRA para el Cd y fueron, por tanto, Preocupantes. Las Figuras 17 y 18 muestran que el Cd en néctar alcanzó concentraciones Preocupantes en las Estaciones S3 y S5, siendo el mes de Julio el más afectado.

NÉCTAR	EST.	MES			MEDIA
		May	Jun	Jul	
Cd 2010	S1	0,0090	0,0050	0,0195	0,0112
	S2	0,0070	0,0030	0,0080	0,0060
	S3	0,0210	0,0120	0,0175	0,0168
	S4	0,0060	0,0130	0,0040	0,0077
	S5	0,0150	0,0125	0,0260	0,0178

**Tabla 13.** Concentración de Cd en néctar (mg/kg) según Estaciones (EST) y Meses durante 2010. El sombreado de las casillas se interpreta del mismo modo que en la Tabla 10.



**Figura 17.** Variabilidad de la concentración media de Cd en néctar (mg/kg) por Estaciones durante 2010 en relación a los límites de referencia (LRA y LRB) especificados en la Figura 6.



**Figura 18.** Variabilidad de la concentración media de Cd en néctar (mg/kg) por Meses durante 2010 en relación a los valores de referencia (LRA y LRB) especificados en la Figura 6.

## 6. DISCUSIÓN

Se puede afirmar que los resultados obtenidos con las estaciones de *A. mellifera* han aportado una información relevante sobre la variabilidad y complejidad de situaciones ambientales que pueden darse a nivel local.

Dos tipos de análisis complementarios pueden ser tenidos en cuenta en la valoración de los resultados. En primer lugar, las diferencias significativas permiten estudiar e investigar la evolución de la contaminación en el espacio y el tiempo de manera preventiva, con vistas a controlar y mejorar continuamente la calidad ambiental. En este sentido, recuérdese por ejemplo la relación establecida en este estudio entre la presencia de distintos metales pesados en abejas y el uso del suelo, o la mayor o menor presencia de los mismos en diferentes estaciones climatológicas del año. Y en segundo lugar, es necesario considerar los límites de referencia, particularmente para identificar los valores Preocupantes, ya que éstos pueden ser tenidos en cuenta en la gestión de la calidad ambiental como una llamada de alerta ante una situación de gravedad y urgencia. Esta llamada de alerta, puede ayudar y orientar al organismo competente a actuar rápidamente en la solución o mitigación de crisis ambientales.

De acuerdo a los resultados expuestos, la ausencia de diferencias significativas entre datos de contaminación no indica que no se alcancen valores Preocupantes. Del mismo modo, cuando existen diferencias significativas, aquellos datos de contaminación significativamente mayores no se corresponden necesariamente con valores Preocupantes.

Así por ejemplo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la concentración de Ni en abejas entre Estaciones ni entre Meses durante los tres años de estudio (Tabla 7), sin embargo en cinco ocasiones se alcanzaron valores Preocupantes. Concretamente, durante el 2007, en la Estación S1 en Julio, en la Estación S4 en Junio y en la Estación S5 en Mayo; durante el año 2009, en la Estación S3 en Julio; y durante el 2010,

en la Estación S2 en Junio (Tabla 6). En el otro sentido, la concentración de Pb en abejas presentó diferencias significativas entre las Estaciones S1 y S3, pero en ningún caso se alcanzaron valores Preocupantes.

Tampoco se encontraron diferencias significativas en la concentración de Cr en néctar entre Estaciones ni entre Meses durante los tres años de estudio (Tabla 11), sin embargo en nueve ocasiones se alcanzaron valores Preocupantes. Concretamente durante el año 2007, en la Estación S5 en Junio, y en las Estaciones S1 y S4 en Septiembre; durante el 2009, en la Estación S4 en Junio y en las Estaciones S1, S2, S3, S4 and S5 en Julio (Tabla 10). En el otro sentido, la concentración de Pb en néctar fue significativamente diferente en las Estaciones S2 y S1, pero en ningún caso se registraron valores Preocupantes.

Otros trabajos desarrollados con estaciones de *A. mellifera* también han obtenido, como en este estudio, diferencias espaciales y temporales de las concentraciones de metales pesados en abejas o néctar. Son frecuentes, por ejemplo, los estudios que relacionan mayores niveles de estos metales en abejas con estaciones ubicadas en el centro de las ciudades, próximas a ellas, cercanas a zonas industriales o colindantes a carreteras con mucho tráfico (Conti y Botrè, 2001; Zugravu *et al.*, 2009; Perugini *et al.*, 2011; Satta *et al.*, 2012; Bilalov *et al.*, 2015).

El biomonitoreo del néctar fue llevado a cabo simultáneamente en las mismas estaciones y fechas que el de abejas, entre 1 a 10 días después de la recogida de éstas. Esto permitió comparar y evaluar los resultados obtenidos con las abejas (Gutiérrez *et al.*, 2015). Para ello se tuvieron en cuenta los resultados obtenidos en abejas en los meses de mayo, junio y julio (Tabla 14).

NIVEL DE CONTAMINACIÓN		Preocupante	Merecedor de atención	Aceptable	N
METAL PESADO	Pb	3 (7.14%)	21 (50.50%)	18 (42.86%)	N=42
	Cr	4 (9.52%)	29 (69.05%)	9 (21.43%)	N=42
	Ni	5 (11.90%)	18 (42.86%)	19 (45.24%)	N=42
ESTACIÓN	S1	3 (11.11%)	14 (51.85%)	10 (37.04%)	N=27
	S2	1 (5.56%)	3 (16.67%)	14 (77.78%)	N=18
	S3	1 (3.70%)	16 (59.26%)	10 (37.04%)	N=27
	S4	4 (14.80%)	17 (62.96%)	6 (22.22%)	N=27
	S5	3 (11.11%)	17 (62.96%)	7 (25.93%)	N=27
AÑO	2007	9 (25.00%)	23 (63.81%)	4 (11.11%)	N=36
	2009	1 (2.22%)	25 (55.56%)	6 (13.33%)	N=45
	2010	2 (4.44%)	17 (37.78%)	26 (57.78%)	N=45
MES	May	5 (11.90%)	19 (45.24%)	18 (42.86%)	N=42
	Jun	2 (4.76%)	26 (61.90%)	14 (33.33%)	N=42
	Jul*	5 (13.15%)	23 (60.53%)	14 (36.86%)	N=38
	Sep	0 (0%)	2 (50.00%)	2 (50.00%)	N=4

**Tabla 14.** Frecuencia de concentraciones de Pb, Cr y Ni en abejas Preocupantes, Merecedoras de atención y Aceptables expresadas por Metal Pesado, Estación y Periodo (Año y Mes) durante los meses de Mayo, Junio y Julio.

Analizando los datos en su conjunto y utilizando el análisis de correlación de Spearman, los resultados mostraron una correlación positiva entre ambas matrices en la concentración de Pb ( $p < 0,01$ ;  $\rho = 0.399$ ) y de Ni ( $p < 0,01$ ;  $\rho = 0.402$ ), y una correlación negativa en la concentración de Cr ( $p < 0,01$ ;  $\rho = -0.401$ ), si bien todas ellas pueden considerarse de carácter débil. En el caso del Cd, que fue analizado sólo en el 2010, no se detectó correlación alguna.

Respecto a los niveles globales de contaminación alcanzados en los tres años de estudio, ambas matrices coincidieron en indicar que el Pb, la Estación S2, el año 2010 y el mes de Mayo fueron, respectivamente, el metal pesado, la localización y los periodos con mayores porcentajes de valores aceptables.

En relación a los valores Merecedores de atención, ambas matrices coincidieron en indicar que la Estación S5, el año 2007 y el mes de Junio fueron, respectivamente, la localización y los periodos con mayores porcentajes de valores Merecedores de atención. Difieron, sin embargo, en indicar que el

metal con mayor porcentaje de valores Merecedores de atención fue Cr en abejas y Ni en néctar.

Y en cuanto a los valores Preocupantes, las dos matrices difirieron en el metal, la Estación y el año donde se detectaron las mayores frecuencias de valores Preocupantes (Ni en abejas y Cr en néctar; S4 en abejas y S3 en néctar; 2007 en abejas y 2009 en néctar), y coincidieron en el mes (Julio).

En cuanto a la valoración cualitativa, ambas matrices revelaron diferencias significativas espaciales y temporales, siendo las abejas las que detectaron mayor número de ellas. En los casos en que mediante una matriz se detectaron diferencias significativas, la otra matriz las confirmó o, como ocurrió en la mayoría de los casos, simplemente no reveló esas diferencias. Tan sólo la cantidad de Cr encontrada en abejas fue significativamente mayor en el año 2010 que en el 2009, mientras que la encontrada en néctar fue mayor en el 2009 que en el 2010. Este hecho podría tener vinculación con la correlación negativa de Cr que fue detectada entre las dos matrices.

Como se ha visto, las coincidencias entre ambas matrices han sido notables, especialmente cuando los niveles de contaminación han sido Aceptables y Merecedores de atención, y no han coincidido cuando los niveles han sido Preocupantes. Esta circunstancia puede ser debida a que en los episodios con alta contaminación sean más determinantes la dinámica de cada metal pesado en el medio ambiente, las diferentes vías de exposición a la polución y la naturaleza de la propia matriz (Bogdanov, 2006). Se puede decir a partir de estos hechos que, en los casos en los que la contaminación alcanza niveles Preocupantes, las dos matrices ofrecen una información complementaria.

Por otro lado, desde el punto de vista de la higiene e inocuidad alimentaria aún no se han establecido niveles máximos de metales pesados para la miel (Comisión del Codex Alimentarius, 2001). Byrne (2000) propuso a la Unión Europea valores límite de 1 mg/kg para el Pb y 0.1 mg/kg para el Cd.

Como puede observarse en las Tablas 6 y 10, los valores de Pb y Cd en el néctar están por debajo de dichos límites.

Proporcionar medidas de calidad del aire que reflejen el estado de la ciudad en su conjunto resulta difícil de conocer a través de las estaciones físico-químicas o estándar, ya que su número suele ser reducido y, por lo general, permanecen en lugares fijos. En el término municipal de Córdoba, por ejemplo, existía una única estación permanente de medición de metales pesados durante el tiempo en que se realizó este estudio. Esta estación estaba ubicada en la zona centro del núcleo urbano, entre las Estaciones S4 y S5 de *A. mellifera*. Tan sólo durante el año 2010 la ciudad contó con una estación adicional, de carácter móvil, que fue ubicada en la zona oeste de la ciudad (Figura 2).

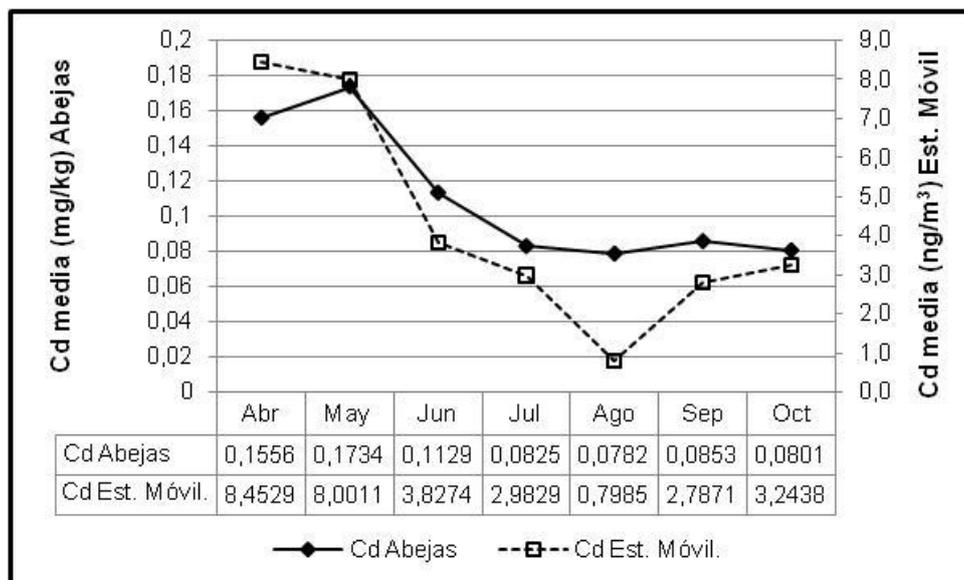
Los registros de metales pesados de ambas estaciones estándar fueron proporcionados por el Organismo Oficial responsable del control de la contaminación atmosférica (Consejería de Agricultura, Pesca y Medio Ambiente de la Junta de Andalucía). Los valores medios mensuales de Pb, Ni y Cd obtenidos a partir de las dos estaciones físico-químicas (Tabla 15) resultaron ser estadísticamente diferentes en una estación y otra durante al año 2010 (Mann-Whitney,  $p \leq 0.05$  para el Ni y  $p \leq 0.01$  para el Pb y el Cd). En algunos meses, la estación móvil mostró valores medios de Pb hasta 20 veces superiores a los que se registraron en la estación fija, y valores medios de Ni y Cd hasta 2-3 veces mayores.

ESTACIÓN	FIJA			MÓVIL		
	Mes	Pb	Ni	Cd	Pb	Ni
Ene	4.76	0.91	0.19	128.87	0.34	3.63
Feb	-	-	-	270.40	1.49	13
Mar	10.27	1.25	0.32	129.28	3.54	8.78
Abr	5.36	3.11	0.25	131.27	5.02	8.45
May	10.38	1.29	0.6	82.92	3.06	8,00
Jun	5.65	2.49	1.03	47.91	3.82	3.83
Jul	7.46	2.50	0.45	59.74	3.19	2.98
Ago	4.49	1.95	0.10	25.58	2.86	0.80
Sep	9.04	1.60	0.39	70.28	2.05	2.79
Oct	5.96	0.91	0.36	94.61	3.68	3.24
Nov	6.15	0.80	0.32	142.01	2.18	8.46
Dic	5.25	1.16	0.40	138.82	2.03	12.61
Media ng/m <sup>3</sup>	7.71	1.63	0.40	110.14	2.77	6.38

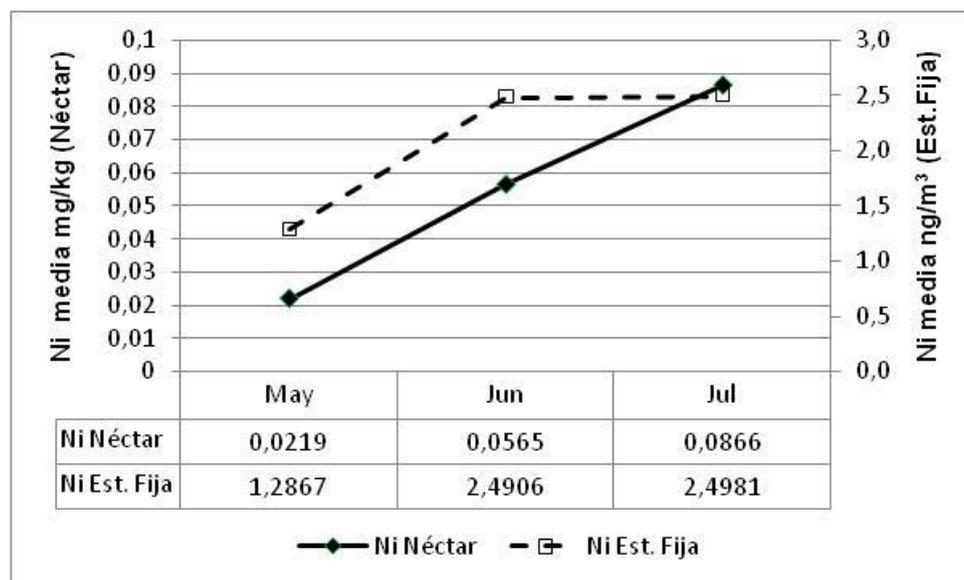
**Tabla 15.** Concentraciones medias mensuales de Pb, Ni and Cd (ng/m<sup>3</sup>) en las estaciones físico-químicas durante 2010 (Datos proporcionados por la Consejería de Agricultura, Pesca y Medio Ambiente de la Junta de Andalucía).

Esto quiere decir que los resultados obtenidos a partir de las mediciones físico-químicas también han revelado importantes diferencias locales a tener en cuenta en la ciudad. Por tanto, la presencia habitual de una sola estación de vigilancia de metales pesados hace discutible la representatividad de estas mediciones en la evaluación de la calidad del aire de toda la ciudad. Contar con varios puntos de muestreo significaría un mayor conocimiento y una mejor gestión de la política de calidad del aire. Sin embargo, esto no siempre es posible dada la inviabilidad económica de instalar varios equipos instrumentales de este tipo en una ciudad de tamaño medio, ya que son caros y requieren personal muy especializado

Cabe destacar la coincidencia en los altos valores de Cd encontrados en las abejas de las estaciones de biomonitorio y los registrados por la estación físico-química móvil (Figura 19), o los altos valores de Ni encontrados en el néctar y los registrados en la estación físico-química fija (Figura 20).



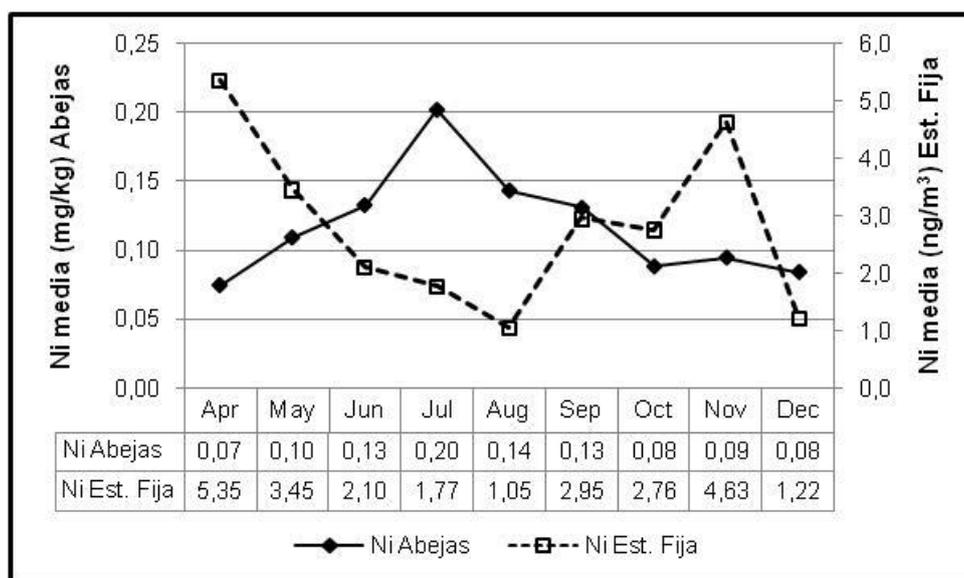
**Figura 19.** Cd encontrado en abejas y registrado en la estación físico-química móvil (media mensual) en 2010.



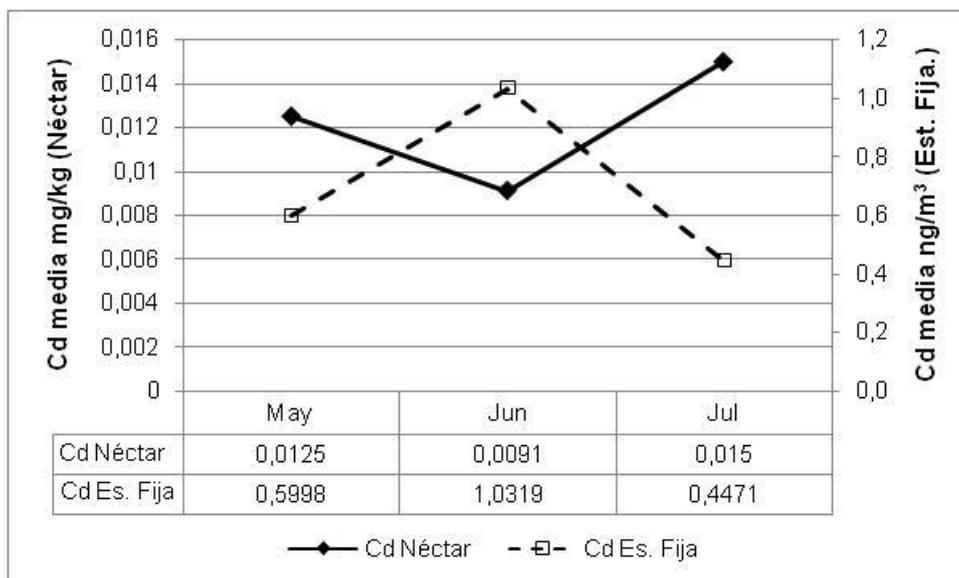
**Figura 20.** Ni encontrado en néctar y registrado en la estación físico-química fija (media mensual) en 2010.

En otros casos, los datos aportados por las estaciones de biomonitorio y las estaciones físico-químicas fueron diferentes. En la Figura 21 se puede

observar un pico en la concentración de Ni en abejas que ocurrió en Julio de 2009 y que no se reflejó en los datos físico-químicos. Este pico estuvo relacionado con la concentración de Ni encontrada en las abejas de la Estación S3, en la que el metal alcanzó valores Preocupantes en Julio (Tabla 6), y fue también observado en las Estaciones S1 y S5, aunque con menor intensidad. Del mismo modo, también existieron casos en los que los datos aportados por el néctar y las estaciones físico-químicas fueron diferentes. En la Figura 22 se puede ver un incremento en la concentración de Cd en néctar que ocurrió en los meses de Mayo y Julio de 2010 no reflejado en los datos físico químicos. Este incremento está relacionado con la concentración de Cd detectada en el néctar de las Estaciones S3 y S5, donde el metal alcanzó valores Preocupantes durante dos meses (Tabla 10).



**Figura 21** Ni encontrado en abejas y registrado en la estación física-química fija (media mensual) en 2009



**Figura 22.** Cd encontrado en néctar y registrado en la estación físico-química fija (media mensual) en 2010.

Estos hallazgos demuestran que las estaciones de biomonitorio pueden complementar la información obtenida a través de las estaciones estándar. De hecho, la utilidad de las estaciones de biomonitorio no consiste en llegar a ser una alternativa a estos dispositivos porque, de acuerdo a Van der Steen *et al.* (2015), sería improbable establecer una relación entre la concentración de metales pesados en abejas y en el aire si la variación y niveles de concentración atmosférica de metales pesados fuera demasiado baja. Este argumento podría ser razonablemente aplicado en el caso del néctar.

El biomonitorio con colonias de *A. mellifera* es una metodología que puede ser consistentemente aplicada para obtener información útil y precisa sobre la calidad ambiental existente en cada momento. No obstante, se considera necesario seguir investigando para, en primer lugar, armonizar y estandarizar a nivel internacional la metodología empleada y, en segundo lugar los resultados obtenidos deberían seguir siendo estudiados en relación a los registrados por los métodos físico-químicos de referencia. Probablemente así, pueda normalizarse su uso en el futuro y pueda ser incluida en protocolos

oficiales de evaluación de calidad ambiental, complementando así la información derivada de los métodos estándar (Ruiz *et al.*, 2013).

En cuanto al origen de la contaminación, el tipo de industrias instaladas en Córdoba podrían incrementar la presencia de Pb, Cr y Ni en el medio, fundamentalmente las dedicadas a la fundición de metales no férreos y a la fabricación de cemento. El tráfico de vehículos motorizados también puede haber contribuido (Machado *et al.*, 2008). En este sentido, un análisis palinológico de las abejas capturadas o del néctar podría precisar las plantas visitadas por los insectos y aportar información sobre el origen de los contaminantes (Porrini *et al.*, 2002).

Un aspecto importante a destacar es que, probablemente debido a la dirección de los vientos, las estaciones asignadas como control estuvieron expuestas en ocasiones a riesgos ambientales similares o incluso superiores al de resto de estaciones. Es el caso, por ejemplo, de las Estaciones S2 (zona agrícola - control A) y S3 (zona forestal – control B) durante el año 2009, que alcanzaron una media anual de Ni en abejas mayor a la del resto de estaciones (Figura 9); durante el 2010, la concentración media anual de Ni en abejas más alta fue observada en la Estación S2 (Figura 9), y la Estación S3 mostró una concentración media anual de Cd en abejas que fue Preocupante (Figura 11).

También el néctar de las estaciones control estuvo expuesto. Así, durante los años 2009 y 2010, la Estación S3 registró concentraciones medias anuales de Ni en néctar mayores a las del resto de estaciones (Figura 15). Además, en el año 2009 las Estaciones S2 y S3 alcanzaron valores medios anuales Preocupantes de Cr, comparables a los de las demás estaciones (Figura 14), y en el año 2010, la Estación S3 reveló una concentración media anual de Cd que fue Preocupante (Figura 17).

La alta presencia de metales en abejas y néctar en el periodo estival, es acorde con la dinámica que estos elementos muestran en periodos secos. La falta de lluvia limita el potencial de autodepuración de la atmósfera,

favoreciendo la acumulación de partículas en el aire (Andalucía, 2014), la deposición y la continua resuspensión del polvo que queda sedimentado sobre la superficie urbana (Machado *et al.*, 2008).

Por supuesto, para un análisis o valoración más rigurosa del riesgo ambiental de metales pesados en la ciudad de Córdoba sería preciso contar con una secuencia mayor de datos que incluya más anualidades y variables estacionales, así como estudios comparativos con otras ciudades españolas, en particular las más próximas, con la finalidad de adquirir límites de referencia propios de nuestro entorno.

Parece evidente, por tanto, que el biomonitoreo con colonias de *A. mellifera* constituye un enfoque útil en la valoración de la contaminación del aire por metales pesados. Esta utilidad está justificada tanto por su viabilidad técnica, ya que las abejas tienen la capacidad de recorrer un número indefinido de zonas y cubrir un área de 7 km<sup>2</sup> por estación (Crane, 1984), proporcionando muestras de forma continua (Porrini *et al.*, 2002), como también porque el coste de los equipos y materiales es más económico y asumible para las distintas administraciones que el de los métodos físico-químicos convencionales. Sin embargo, se ha de tener en cuenta que el biomonitoreo con *A. mellifera* no sería posible en ciudades con inviernos muy fríos y la recolección de néctar no es posible cuando la primavera o las floraciones hayan terminado.

Otros bioindicadores, como los líquenes, pueden también aportar información de la contaminación por metales pesados en referencia a puntos geográficos concretos (Garty, 2002) y así, en épocas donde las bajas temperaturas mantengan a las abejas en el interior de las colmenas sin poder volar ni recoger néctar, podrían representar una alternativa viable. En el futuro, líquenes y colonias de abejas melíferas podrían ser usados como bioindicadores complementarios.

Otras matrices apícolas, como el propóleo, pueden ser tenidas en cuenta para valorar la contaminación por metales pesados (Serra-Bonvehí y Orantes,

2013). Desde el punto de vista de la calidad ambiental, el binomio abejas y néctar es suficiente para obtener una información complementaria en el tiempo, respecto a corto y medio plazo respectivamente. El propóleo podría mejorar esta información en aquellas épocas en las que no se pudiera recoger néctar.

Por último, especialmente interesante resultó la presencia de abejas muertas en algunas estaciones durante el 2007. Este hecho hizo sospechar de la presencia de otros contaminantes y, por ello, a partir de ese momento se incluyó el biomonitorio de pesticidas en la red de estaciones, pero su estudio no se ha incluido en esta tesis.

## 7. CONCLUSIONES

1ª El biomonitoreo con abejas y néctar de colonias de *A. mellifera*, ha ofrecido una información cualitativa muy relevante, al establecer diferencias espaciales y temporales de metales pesados y detectarlos en lugares no siempre previsibles por las estaciones de medición estándar.

2ª Los valores de bioconcentración en abejas y en néctar coincidieron al cuantificar la contaminación por metales pesados cuando los niveles de dicha contaminación fueron Aceptables. En concreto coincidieron en indicar que el Pb, la Estación agrícola S2, el año 2010 y el mes de Mayo fueron, respectivamente, el metal pesado, la localización y los periodos con mayores porcentajes de valores Aceptables.

3ª Abejas y néctar coincidieron en la valoración cuantitativa de la contaminación por metales pesados cuando los niveles de dicha contaminación fueron Merecedores de atención. En concreto coincidieron en indicar que la Estación industrial S5, el año 2007 y el mes de Junio fueron, respectivamente, la localización y los periodos con mayores porcentajes de valores Merecedores de atención. Difieron, sin embargo, en indicar el metal (Cr en abejas y Ni en néctar).

4ª En cuanto a los valores Preocupantes, las dos matrices difirieron en el metal (Ni en abejas y Cr en néctar), la Estación (Estación urbana S4 en abejas y Estación forestal S3 en néctar) y el año (2007 en abejas y 2009 en néctar), coincidiendo solo en el mes (Julio). En este caso, las dos matrices ofrecen una información complementaria.

5ª El biomonitoreo con estaciones de *A. mellifera* puede formar parte efectiva de un sistema de vigilancia y control de la contaminación atmosférica de las ciudades, complementando la información aportada por los métodos físico-químicos de referencia. En primer lugar, porque es viable técnicamente e integra una valoración cualitativa y cuantitativa, a través de diferencias significativas y límites de referencia, que facilita la gestión tanto de manera preventiva como ante la aparición de alertas y crisis ambientales. En segundo lugar, porque identifica la biodisponibilidad de los contaminantes estudiados. Y en tercer lugar, porque puede contribuir a optimizar los recursos, ya que su coste económico es más bajo que el de la metodología convencional.

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Accorti, M. (1994). Influenza dell'ambiente sul comportamento e sulla biologia delle api nel monitoraggio ambientale.- En: D'ambrosio, M.T. y Accorti, M. (eds), *Atti del convegno "L'ape come insetto test dell'inquinamento agricolo"*. P. F. "Lotta biologica e integrata per la difesa delle colture agrarie e delle piante forestali" del Ministero Agricoltura e Foreste, Firenze, Italy, March 28, 1992, pp. 45-57.
- Accorti, M., Luti, F. y Tarducci, F. (1991). Methods for collecting data on natural mortality in bee. *Ethology, Ecology and Evolution*, 1: 123-126.
- Acuña, R. (2011). Productos químicos, salud y medio ambiente. <http://www.osman.es/noticia/549> (consultada el 12 de enero de 2012).
- AEMA. Agencia Europea de Medio Ambiente (2011). Heavy metal (HM) emissions (APE 005). <http://www.eea.europa.eu/data-and-maps/indicators/eea32-heavy-metal-hm-emissions-1/assessment-1> (consultada el 8 de marzo de 2012).
- AEMA. Agencia Europea de Medio Ambiente (2013). *La calidad del aire en Europa – Informe 2012*. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, Madrid, p. 104.
- AECOSAN. Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición. (s.f.). Metales pesados. [http://www.aesan.mspsi.gob.es/AESAN/web/cadena\\_alimentaria/subdetalle/qui\\_metales\\_pesados.shtml](http://www.aesan.mspsi.gob.es/AESAN/web/cadena_alimentaria/subdetalle/qui_metales_pesados.shtml) (consultada el 7 de febrero de 2012).
- Alonso de Herrera, G. (1513). *Libro de Agricultura General*. Ed.1994. Universidad Politécnica de Madrid, p. 244.
- Amorena, M., Visciano, P., Giacomelli, A., Marinelli, E., Sabatini, A.G., Medrzycki, P., Persano Oddo, L., De Pace, F.M., Belligoli, P., Di Serafino, G., Saccares, S., Formato, G., Langella, V. y Perugini, M. (2009). Monitoring of levels of polycyclic aromatic hydrocarbons in bees caught from beekeeping: remark 1. *Veterinary Research Communications*, 33 (Suppl 1): 61-67.
- Andalucía (2014). Decreto 231/2013, de 3 de diciembre, por el que se aprueban planes de mejora de la calidad del aire en determinadas zonas de Andalucía. Anexo 10. Plan de Mejora de la Calidad del Aire de la

Aglomeración de Córdoba. *Boletín Oficial de la Junta de Andalucía* nº 46 de 10.03.2014, pp. 1668-1874.

Anze, R., Franken, M., Zaballa, M., Pinto, M.R., Zeballos, G., Cuadros, M.A., Canseco, A., De la Rocha, A., Estellano, V.H. y del Granado, S. (2007). Bioindicadores en la detección de la contaminación atmosférica en Bolivia. *Revista virtual REDESMA*, junio: 54-74.

Axxón (2004). Un sistema de alarma ancestral evitó la muerte de tribus indígenas en Asia. Noticia 26.12.2004. <http://axxon.com.ar/not/146/c-1460050.htm>. (consultada el 3 de mayo de 2007).

Balayiannis, G., y Balayiannis, P. (2008). Bee honey as an environmental bioindicator of pesticides'occurrence in six agricultural areas of Greece. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 55:462–470.

Balestra, V., Celli, G. y Porrini, C. (1992). Bees, honey, larvae and pollen in biomonitoring of atmospheric pollution. *Aerobiologia*, 8: 122-126.

Barišić, D., Vertačnik, A., Bromenshenk, J.J., Kezić, N., Lulić, S., Hus, M., Kraljević, P., Šimpraga, M. y Seletković, Z. (1999). Radionuclides and select elements in soil and honey from Gorski Kotar, Croatia. *Apidologie*, 30: 277-287.

Bascompte J., Jordano, P. y Olesen, J.M. (2006). Asymmetric coevolutionary networks facilitate biodiversity maintenance. *Science*, 312: 431-433.

Beekman, M. y Ratnieks, W. (2000). Long-range foraging by the honey bee, *Apis mellifera* L. *Functional Ecology*, 14: 490-496.

Bettinelli, M. y Terni, C. (2000). Determination of trace elements in honey by ICP-MS. En: Minoia, C., Bettinelli, M., Ronchi, A. y Spezia, S. (eds.), *Application of ICP-MS in chemical and toxicological laboratory*. Morgan, Milán, pp. 341-349.

Bibi, S., Husain, S.Z. y Malik, R.N. (2008). Pollen analysis and heavy metal detection in honey samples from seven selected countries. *Pakistan Journal of Botany*, 40: 507-516.

Bilalov, F., Skrebneva, L., Nikitin, O., Shuralev, E.A. y Mukminov, M. (2015). Seasonal variation in heavy-metal accumulation in honey bees as an indicator of environmental pollution. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 6: 2215-221.

- Bitterman, M.E., Menzel, R., Fietz, A. y Schäfer, S. (1983). Classical conditioning of proboscis extension in honeybees (*Apis mellifera*). *Journal of Comparative Psychology*, 97: 107-119.
- Bogdanov, S. (2006). Contaminants of bee products. *Apidologie*, 37: 1-18.
- Bogdanov, S., Haldimann, M., Luginbühl, W. y Gallmann, P. (2007). Minerals in honey: environmental, geographical and botanical aspects. *Journal of Apicultural Research and Bee World*, 46: 269-275.
- Boquete, L., Barea, R., Rodríguez, J.M., Fando, R., Cuervo, G., Fernández, B., Tordera, L., de Diego, M., Gómez, M. y Parra, I. (2013). Medio ambiente y sensorización. *Ciudad 2020: hacia un nuevo modelo de ciudad inteligente y sostenible*, IPT 20111006.
- Boyd, R. (2009). High-nickel insects and nickel hyperaccumulator plants: a review. *Insect Science*, 16: 19-31.
- Boyd, R. (2010). Heavy metal pollutants and chemical ecology: exploring new frontiers. *Journal of Chemical Ecology*, 36: 46-58.
- Bromenshenk, J.J., Gudatis, J.L., Carlson, S.R., Thomas, J.M. y Simmons, M.A. (1991). Population dynamics of honey bee nucleus colonies. *Apidologie*, 22: 359-369.
- Bromenshenk, J.J., Henderson, C.B. y Smith, G.C. (2002). Biological System, paper II. En: MacDonald, J.A. y Lockwood, J.R. (eds.), *Alternatives for Landmine Detection*. RAND, MR-1608-OSTP, pp. 273-283
- Bromenshenk, J.J. y Preston, E.M. (1986). Public participation in environmental monitoring: a means of attaining networks capability. *Environmental Monitoring and Assessment*, 6: 35-47.
- Byrne, D. (2000). Amending Annex II to Council directive 92/118/EEC b (draft).
- Celli, G. y Maccagnani, B. (2003). Honey bees as bioindicators of environmental pollution. *Bulletin of Insectology*, 56: 137-139.
- Chauzat, M.P., Martel, A.C., Cougoule, N., Porta, P., Lachaize, J., Zeggane, S., Aubert, M., Carpentier, P. y Faucon, J.P. (2011). An assessment of honeybee colony matrices, *Apis mellifera* (Himenoptera: Apidae) to monitor pesticide presence in continental France. *Environmental Toxicology*, 30: 103-111.

- Claudianos, C., Ranson H., Johnson, R.M., Biswas, S., Schuler, M.A., Berenbaum, M.R., Feyereisen, R. y Oakeshott, J.G. (2006). A deficit of detoxification enzymes: pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee. *Insect Molecular Biology*, 15: 615–636.
- COLOSS. Prevention of honey bee COlony LOSSes (2015). C.S.I. Pollen (Citizen Scientist Investigation on pollen diversity forage available to honey bees). <http://www.coloss.org/taskforces/csi> (consultada el 3 de marzo de 2014).
- Comisión del Codex Alimentarius (2001). Revised codex standard for honey. *Codex Stan 12-1981, Rev 1 (1987), Rev. 2 (2001)*, adopted by the 24th Session.
- Comisión Europea (2010). *Communication from the Commission to the European Parliament and the Council in honeybee health*. COM (2010) 714 final, 6.12.2010, Brussels, pp. 13.
- Conti, M.E. y Botrè, F. (2001). Honeybees and their products as potential bioindicators of heavy metals contamination. *Environmental Monitoring and Assessment*, 69: 267-282.
- Cortet, J., De Vauflery, A.G., Balaguer, N.P., Gomot, L., Texier, C. y Cluzeau, D. (1999). The use of invertebrate soil fauna in monitoring pollutant effects. *European Journal of Soil Biology*, 35: 115-134.
- Couvillon, M.J., Schürch y Ratnieks, F.L.W. (2014). Dancing bees communicate a foraging preference for rural lands in high-level agri-environment schemes. *Current Biology*, 24: 1212-1215.
- Crane, E. (1984). Bees, honey and pollen as indicators of metals in the environment. *Bee World*, 55: 47-49.
- Dallinger, R. (1994). Invertebrate organisms as biological indicators of heavy metal pollution. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 48: 27-31.
- Decourtye, A., Bagnis, C., Devillers, J., Brun, F., Aupinel; P., Fourriert, J. y Gauthier, M. (2010). A methodology to evaluate the effects of pesticides to honeybees: recording Individual behaviour using microchips. *Proceedings of the fourth European Conference of Apidology, EurBee*. Sept. 7-9. Ankara, Turkey.
- Decourtye, A. y Pham-Delègue (2002). The proboscis extension response: assessing the sublethal effects of pesticides on the honey bee. En: Devillers

- J. y Pham-Delègue, M.H. (eds), *Honeybees: estimate the environmental impact of chemicals*. Taylor & Francis, London and New York, pp. 67-84.
- Devillers, J. (2002a). Acute toxicity of pesticides to honey bees. En: Devillers J. y Pham-Delègue, M.H. (eds), *Honeybees: estimate the environmental impact of chemicals*. Taylor & Francis, London and New York, pp. 56-66.
- Devillers, J. (2002b). The ecological importance of honey bees and their relevance to ecotoxicology. En: Devillers J. y Pham-Delègue, M.H. (eds), *Honeybees: estimate the environmental impact of chemicals*. Taylor & Francis, London and New York, pp.1-11.
- Dobrinás, S., Birghila, S. y Coatu, V. (2008). Assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons in honey and propolis produced from various flowering trees and plants in Romania. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21: 71-77.
- Duruibe, J.O., Ogwuegbu, M.O.C. y Egwurugwu, J.N. (2007). Heavy metal pollution and human biotoxic effects. *International Journal of Physical Sciences*, 2: 112-118.
- EFSA (European Food Safety Authority) (2013). Guidance on the risk assessment of plant protection products on bees (*Apis mellifera*, *Bombus* spp. and solitary bees). *EFSA Journal*, 11(7): 3295.
- EFSA (European Food Safety Authority) (2014). Towards an integrated environmental risk assessment of multiple stressors on bees: review of research projects in Europe, knowledge gaps and recommendations. *EFSA Journal*, 12(3): 3594.
- Ergin, Ç., Ilkit, M. y Kaftanoğlu, O. (2004). Detection of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* in honeybee (*Apis mellifera*) colonies. *Mycoses*, 47: 431-434.
- Erickson, E.H. (1975). Surface electric potential on worker honey bees leaving the entering the hive. *Journal of Apicultural Research*, 14:141-147.
- Esaias, W.E., Wolfe, R., Nightingale, J., Nickeson, J. y Ma, P.L.A. (2009). Scale hive network and satellites reveal shifts in néctar flows due to climate and land cover. NASA. Goddard Space Flight Center, Greenbelt, Maryland, USA. *Book of Abstracts 41 Congress Apimondia*. Sept 15-20. Montpellier, France.

- España (2007a). Ley 34/2007, de 15 de noviembre, de calidad del aire y protección de la atmósfera. *Boletín Oficial del Estado* nº 275 de 16.11.2007, pp. 46962-46987.
- España (2007b). Ley 26/2007, de 23 de octubre, de Responsabilidad Medioambiental. *Boletín Oficial del Estado* nº 255 de 24.10.2007, pp. 43229-43250.
- España (2007c). Ley 42/2007, de 13 de diciembre, del Patrimonio natural y de la Biodiversidad. *Boletín Oficial del Estado* nº 299 de 14.12.2007, pp. 51275-51327.
- España (2011a). Instrumento de Ratificación del Protocolo al Convenio de 1979 sobre contaminación atmosférica transfronteriza en materia de metales pesados, hecho en Aarhus (Dinamarca) el 24 de junio de 1998. *Boletín Oficial del Estado* nº 268, sec. I de 7.11.11, pp. 116037-116068.
- España (2011b). Real Decreto 102/2011, de 28 de enero, relativo a la mejora de la calidad del aire. *Boletín Oficial del Estado* nº 25 sec. I de 29.11.2011, pp. 9574-9626.
- FAO (s.f.). Polinizadores. <http://www.fao.org/biodiversity/componentes/polinizadores/es/> (consultada el 7 de marzo de 2012).
- Gajger, I.T., Matasin, Z., Orescanin, V. y Petrinc, Z. (2008). Heavy metals in adult honey bees and older bee brood. *Proceeding of the third European Conference of Apidology, Eurbee*. Sept. 8-11. Belfast, Ireland.
- Gall, J., Boyd, R.S. y Rajakaruna, N. (2015). Transfer of heavy metals through terrestrial food webs: a review. *Environmental Monitoring Assessment*, 187: 200-221.
- Gallai, N., Salles, J.M., Settele, J. y Vaissière B.E. (2009). Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecological Economics*, 68: 810–821.
- Garbuzov, M., Schürch, R., Ratnieks, F.L.W. (2014). Eating locally: dance decoding demonstrates that urban honey bees in Brighton, UK, forage mainly in the surrounding urban area. *Urban Ecosystems*, 18: 411-418.
- Garty, J. (2002). Biomonitoring heavy metals pollution with lichens. En: Kranner, I.C., Beckett, R.P. y Varma, A.K. (eds.), *Protocols in lichenology. Culturing, Biochemistry, Ecophysiology and use in Biomonitoring*. Springer, Berlin, pp. 458-482.

- Genersch, E., Von der Ohe, W., Kaatz, H., Schroeder, A., Otten, C., Buchler, R., Berg, S., Ritter W., Muhle, W., Gisder, S., Meixner, M., Liebig, G. y Rosenkranz, P. (2010). The German bee monitoring project: a long term study to understand periodically high winter losses of honey bee colonies. *Apidologie*, 41: 332-352.
- Ghini, S., Fernández, M., Picó, Y., Martín, R., Fini, F., Mañes, J., y Girotti, S. (2004). Occurrence and distribution of pesticides in the province of Bologna, Italy, using Honeybees as Bioindicators. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 47: 479-488.
- Girolami, V., Mazzon, L., Squartini, A., Mori, N., Marzaro, M., Di Bernardo, A., Grati, M., Giorio, C. y Tapparo, A. (2009). Translocation of neonicotinoid insecticides from coated sedes to seedling guttation drops: a novel way of intoxication for bees. *Journal of Economic Entomology*, 103: 1808-1815.
- Gnes, A., Rondinini, T., Pari, E., Fonti, P., Vincenzi, D., Speranza, A., y Calzoni, G.L. (2004). Mason bees and environment. *Insect Social Life*, 5: 111-16.
- Gutiérrez, M., Molero, R., Gaju, M., Van der Steen, J., Porrini, C. y Ruiz, J.A. (2015). Assessment of heavy metal pollution in Córdoba (Spain) by biomonitoring foraging honeybee. *Environmental Monitoring and Assessment*, 187: 651-665.
- Haarmann, T.K. (1998). Honey bees as indicators of radionuclide contamination: comparative studies of contaminant levels in forager and nurse bees and in the flowers of three plant species. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 35: 287-294.
- Hamilton, E.I. (1995). State of the art of trace element determinations in plant matrices: determination of the chemical elements in plant matrices, an overview. *The Science of the Total Environment*, 176: 3-14.
- Hawksworth, D., Iturriaga, T. y Crespo, A. (2005). Líquenes como bioindicadores inmediatos de la contaminación y cambios medio-ambientales en los trópicos. *Revista Iberoamericana de Micología*, 22: 71-82.
- Hladun, K.R., Smith, B.H., Mustard, J.A., Morton, R.R., y Trumble, J.T. (2012). Selenium toxicity to honey bee (*Apis mellifera* L.) pollinators: effects on behaviors and survival. *PLoS ONE*, 7(4), e34137. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0034137>.

- Hodkinson, I.A. y Jackson, J.K. (2005). Terrestrial and aquatic invertebrates as bioindicators for environmental monitoring, with particular reference to mountain ecosystems. *Environmental Management*, 35: 649-666.
- Holt, E.A. y Miller, S.W. (2010). Bioindicators: Using organisms to measure environmental impacts. *Nature Education Knowledge*, 3: 8.
- Honeybee Genome Sequencing Consortium (2006). Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature*, 443: 931-949.
- Instituto de Estadística y Cartografía de Andalucía (s.f.). <http://www.juntadeandalucia.es/institutodeestadisticaycartografia> (consultada el 4 de diciembre de 2011).
- Järup, L. (2003). Hazards of heavy metal contamination. *British Medical Bulletin*, 68: 167-182.
- Jones, K.C. (1987). Honey as an indicator of heavy metal contamination. *Water, Air, and Soil Pollution*, 33: 179-189.
- Kalbande, D.M., Dhadse, S.N., Chaudhari, P.R. y Wate, S.R. (2008). Biomonitoring of heavy metals by pollen in urban environment. *Environmental Monitoring Assessment*, 138: 233-238.
- Kettlewell, H.B.D. (1958). A survey of the frequencies of *Biston betularia* (L.) (Lep.) and its melanic forms in Great Britain. *Heredity*, 12: 51-72.
- Kevan P.G. (1999). Pollinators as bioindicators of the state of the environment: species, activity and diversity Agriculture. *Ecosystems and Environment*, 74: 373–393.
- Klumpp, A. y Klumpp, G. (eds.) (2004). *European network for the assessment of air quality by the use of bioindicator plants (Eurobionet). Final report*. University of Hohenheim, Stuttgart.
- Lambert, O., Piroux, M., Puyo, S., Thorin, C., Larhantec, M., Delbac, F. y Pouliquen, H. (2012b). Bees, honey and pollen as sentinels for lead environmental contamination. *Environmental Pollution*, 170: 254-259.
- Lambert, O., Veyrand, B., Durand, S., Marchand, P., Le Bizec, B., Piroux, M., Puyo, S., Thorin, C., Delbac, F. y Pouliquen H. (2012a). Polycyclic aromatic hydrocarbons: Bees, honey and pollen as sentinels for environmental chemical contaminants. *Chemosphere*, 85: 98-104.

- Leita, L., Muhlbachova, G., Cesco, S., Barbattini, R. y Mondini, C. (1996). Investigation of the use of honey bees and honey bee products to assess heavy metals contamination. *Environmental Monitoring and Assessment*, 43: 1-9.
- Lighthart, B., Prier, K.R.S. y Bromenshenk, J.J. (2004). Detection of aerosolized bacterial spores (*Bacillus atrophaeus*) using free-flying honey bees (Hymenoptera: Apidae) as collectors. *Aerobiologia*, 20: 191-195.
- Lighthart, B., Prier, K.R.S. y Bromenshenk, J.J. (2005). Flying honey bees adsorb airborne viruses. *Aerobiologia*, 21: 147-149.
- Machado, A., García, N., García, C., Acosta, L., Cordova, A., Linares, M., Giraldoth, D. y Velásquez, H. (2008). Contaminación por metales (Pb, Zn, Ni y Cr) en aire, sedimentos viales y suelo en una zona de alto tráfico vehicular. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 24: 171-182.
- Maini, S., Medrzycki, P. y Porrini, C. (2010). The puzzle of honey bee losses: a brief review. *Bulletin of Insectology*, 63:153-160.
- Malone, L.A. y Pham-Delègue, M.H. (2002). Using proteins to assess the potential impacts of genetically modified plants on honey. En: Devillers J. y Pham-Delègue, M.H. (eds), *Honeybees: estimate the environmental impact of chemicals*. Taylor & Francis, London and New York, pp. 290-311.
- Market, B., Wuenschmann, S., Fraenzle, S., Figueiredo, A.M.G., Ribeiro, A. y Wang, M. (2011). Bioindication of atmospheric trace metals – With special references to megacities. *Environmental Pollution*, 159:1991-1995.
- Martin, M.H., y Coughtrey, P.J. (1982). *Biological monitoring of heavy metal pollution: Land and air*. Applied Science Publishers, London, p. 475.
- Matsumoto, Y., Menzel, R., Sandoz, J.C. y Giurfa, M. (2012). Revisiting olfactory classical conditioning on the proboscis extension response in honey bees: a step towards standardized procedures. *Journal of Neuroscience Methods*, 211: 159-167.
- Medicinatv.com. (2009). Parque Azahara está en contacto con salud por riesgos de enfermedades a causa de las emisiones contaminantes. Noticia 27-08-2009. <http://www.medicinatv.com/noticias/andalucia-parque-azahara-esta-en-contacto-con-salud-por-riesgos-de-enfermedades-a-causa-de-las-emisiones-contaminantes-200569> (consultada el 7 de septiembre de 2009).

Naciones Unidas (1992). Agenda 21  
<http://www.un.org/spanish/esa/sustdev/agenda21/agenda21sptoc.htm>  
(consultada el 14 de mayo de 2007).

Negri, I., Mavris, C. Di Prisco, G., Caprio, E. y Pellecchia, M. (2015). Honey bees (*Apis mellifera*, L.) as active samplers of airborne particulate matter. *PLoS ONE* 10(7): e0132491. doi:10.1371/journal.pone.0132491.

Observatorio de la Sostenibilidad en España (2007). *Calidad del aire en las ciudades: clave de sostenibilidad urbana*. Universidad de Alcalá, Madrid, p. 379.

Ordóñez, J.M., Iriso, A. y Aránguez, E. (2007). Propuesta de vigilancia de la exposición a sustancias químicas ambientales en población española (Biomonitorización). <http://www.msssi.gob.es/ciudadanos/saludAmbLaboral/docs/Biomonitorizacion.pdf> (obtenido el 30 noviembre de 2011).

Organización Mundial para la Salud (2007). *Health relevance of particulate matter from various sources*. Report on a WHO Workshop. 26-27 Marzo. Bonn, Germany., p. 21.

Özcan, M.M. y AL Juhaimi, F.Y. (2012). Determination of heavy metals in bee honey with connected and not connected metal wires using inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES). *Environmental Monitoring and Assessment*, 184: 2373-2375.

Pérez, P. (2005). Retos futuros de la exposición personal a contaminantes en aire. *Revista de Salud Ambiental*, 5: 175-180.

Perugini, M., Manera, M., Grotta, L., Abete, M.C., Tarasco, R. y Amorena, M. (2011). Heavy metal (Hg, Cr, Cd and Pb) contamination in urban areas and wildlife reserves: honeybees as bioindicators. *Biological Trace Element Research*, 140: 170-176.

Pettis, J.S. y Delaplane, K.S. (2010). Coordinated responses to honey bee decline in the USA. *Apidologie*, 41: 256–263.

Ponikvar, M., Šnajder, J. y Sedej, B. (2005) Honey as a bioindicator for environmental pollution with SO<sub>2</sub>. *Apidologie*, 36: 403-409.

Porrini, C., Caprio, E., Tesoriero, D. y Di Prisco, G. (2014). Using honey bee as bioindicator of chemicals in Campanian agroecosystems (South Italy). *Bulletin of Insectology*, 67: 137-146.

- Porrini, C., Celli, G. y Radeghieri, P. (1998). Monitoring of pesticides through the use of honeybees as bioindicators of the Emilia-Romagna coastline (1995-1996). *Annali di Chimica*, 88: 243-252.
- Porrini, C., Ghini, S., Girotti, S., Sabatini, A.G., Gattavecchia, E. and Celli, G. (2002). Use of honey bees as bioindicators of environmental pollution in Italy. En: Devillers J. y Pham-Delègue, M.H. (eds), *Honeybees: estimate the environmental impact of chemicals*. Taylor & Francis, London and New York, pp. 186-247
- Porrini, C., Sabatini, A.G., Girotti, S., Ghini, S., Medrzycki, P., Grillenzoni, F., Bortolotti, L., Gattavecchia, E. and Celli, G. (2003). Honey bees and bee products as monitors of the environmental contamination. *Apiacta*, 38: 63-70.
- Potts, S.G., Biesmeijer, J.C., Kremen, C., Neumann, P., Schweiger, O. y Kunin, W.E. (2010). Global pollinators declines: trends, impacts and drivers. *Trends in Ecology and Evolution*, 25: 345-353.
- Querol, X. (2008). Calidad del aire, partículas en suspensión y metales. *Revista Española de Salud Pública*, 82: 447-454.
- Ravetto, P., Cavaglia, D., Colombo, V. y Peila, D. (1988). Proposal for the utilization of honeybee as an efficient indicator of radioactive contamination. *Apiacta*, 1988 (1), pp. 4.
- Riley, J.R., Smith, A.D., Reynolds, D.R., Edwards, A.S , Osborne, J.L., Williams, I.H., Carreck, N.L. y Poppy, G.M. (1996). Tracking bees with harmonic radar. *Nature*, 379: 29-30.
- Roman, A. (2004). The heavy metals content in bees' nectar and mature honey. *Zootechnika*, LI, Nr 501: 297-302.
- Roman, A. (2005). The influence of environment on accumulation of toxic elements in honey bees body. [http://www.isah-soc.org/documents/2005/sections/99\\_vol\\_2.pdf](http://www.isah-soc.org/documents/2005/sections/99_vol_2.pdf) (obtenido el 23 de diciembre de 2011).
- Roman, A. (2009). Concentration of chosen trace elements of toxic properties in bee pollen loads. *Polish Journal of Environmental Studies*, 18: 265-272.
- Roman, A. (2010). Levels of copper, selenium, lead, and cadmium in forager bees. *Polish Journal of Environmental Studies*, 19: 663-669.

- Ruiz, J.A. (2013). COLOSS. Actualización de las investigaciones sobre la salud de las abejas. *Apicultura Ibérica*, 0: 22-27.
- Ruiz, J.A., Gutiérrez, M. y Porrini, C. (2013). Biomonitoring of bees as bioindicators. *Bee World*, 90: 61-63.
- Ruschioni, S., Riolo, P., Minuz, R.L., Stefano, M., Cannella, M., Porrini, C. e Isidoro, N. (2013). Biomonitoring with honeybees of heavy metals and pesticides in nature reserves of the Marche Region (Italy). *Biological Trace Element Research*, 154: 226-233.
- Ruttner, F. y Louveaux, J. (1988). Biometrical-statistical analysis of the geographic variability of *Apis mellifera* L. *Apidologie*, 9: 363-381.
- Sabatini, A.G., Alexandrova, M., Carpana, E., Medrzycki, P., Bortolotti, L., Ghini, S., Girotti, S., Porrini, C., Bazzi, C., Baroni, F. y Alessandrini, A. (2006). Relationships between *Apis mellifera* and *Erwinia amylovora*: bioindication, bacterium dispersal and quarantine procedures. *Acta Horticulturae*, 704: 155-162.
- Sánchez, M.L. (ed.) (2008). *Causes and effects of heavy metals pollution*. Nova, New York, p. 392.
- Satta, A., Verdinelli, M., Ruiu, L., Buffa, F., Salis, S., Sassu, A. y Floris, I. (2012). Combination of beehive matrices analysis and ant biodiversity to study heavy metal pollution impact in a post-mining area (Sardinia, Italy). *Environmental Science and Pollution Research*, 19: 3977-3988.
- Seeley, T.D. (1995). *The wisdom of the hive: The social physiology of honey bee colonies*. Harvard University Press, Cambridge, p. 295.
- Serra-Bonvehí J. y Orantes, F.J. (2013). Element content of propolis collected from different areas of South Spain. *Environmental Monitoring and Assessment*, 185: 6035-6047.
- Shaw, J.A., Nugent, P.W., Johnson, J., Bromenshenk, J.J., Henderson, C.B. y Debnam, S. (2011). Long-wavw infrared imaging for non-invasive beehive population assessment. *Optics Express*, 19: 399-408.
- Shaw, J.A., Seldomridge, N.L., Dunkle, D.L., Nugent, P.W., Spangler, L.H., Bromenshenk, J.J., Henderson, C.B. y Wilson, J.J. (2005). Polarization lidar measurements of honey bees in flight for locating land mines. *Optics Express*, 13: 5853-5863.

- Simmons M.A., Bromenshenk, J.J. y Gudatis, J.L. (1990). Honey bees as monitors of low levels of radioactivity. Report. <http://www.osti.gov/scitech/servlets/purl/6702610-81A77L/> (consultada el 3 de marzo de 2012).
- Smith, G.C., Bromenshenk, J.J., Jones, D.C. y Alnasser, G.H. (2002). Volatile and semi-volatile organic compounds in beehive atmospheres. En: Devillers J. y Pham-Delègue, M.H. (eds), *Honeybees: estimate the environmental impact of chemicals*. Taylor & Francis, London and New York, pp. 12-41.
- Smith, B.H. y Burden, C.M. (2014). A proboscis extension response protocol for investigating behavioral plasticity in insects: application to basic, biomedical and agricultural research. *Journal of Visualized Experiment*, (91), e51057, doi:10.3791/51057.
- Taha, E.A., Manosur, H.M. y Shower, M.B. (2010). The relationship between comb age and the amounts of mineral elements in honey and wax. *Journal of Apicultural Research*, 49: 202-207.
- Tautz, J. (2008). *The Buzz about Bees. Biology of a Superorganism*. Springer, Berlin, p. 272.
- Tesoriero, D., Sgolastra, F., Dall'asta, S., Venier, F., Sabatini, A., Burgio, G. y Porrini, C. (2004). Effects of Bt-oilseed rape on the foraging activity of honey bees in confined environment. *Redia*, LXXXVII: 195-198.
- Thwaites, T. (2010). Policing Genes. <http://www.thomasthwaites.com/policing-genes/> (consultada el 12 de diciembre de 2011).
- Tonelli, D., Gattavecchia, E., Ghini, S., Porrini, C., Celli, G. y Mercuri, A.M. (1990). Honey bees and their products as indicators of environmental radioactive pollution. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 141: 427-436.
- Tuzen, M., Silici, S., Mendil, D. y Soylak, M. (2007). Trace element levels in honeys from different regions of Turkey. *Food Chemistry*, 103: 325-330.
- UE (2000). Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 23 de octubre, por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas. *Diario Oficial* L 327 de 22.12.2000, pp. 1-72.
- UE (2005). Directiva 2004/107/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 15 de diciembre, relativa al arsénico, el cadmio, el mercurio y los

- hidrocarburos aromáticos policíclicos en el aire ambiente. *Diario Oficial* L 23 de 26.1.2005, pp. 3-16.
- UE (2008). Directiva 2008/50/EC del Parlamento Europeo y del Consejo. de 21 de mayo, relativa a la calidad del aire ambiente y a una atmósfera más limpia en Europa. *Diario Oficial* L 152 de 11.6.2008, pp. 1-44.
- UE (2010). Directiva 2010/75/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 24 de noviembre, sobre las emisiones industriales (prevención y control integrados de la contaminación)) (versión refundida) (Texto pertinente a efectos del EEE). *Diario Oficial* L 334 de 17.12.2010, pp. 17-119.
- UE (2014). Enmiendas aprobadas por el Parlamento Europeo el 15 de enero de 2014, sobre la propuesta de Directiva del Parlamento Europeo y del Consejo por la que se modifica la Directiva 2001/110/CE relativa a la miel (COM(2012)0530– C7-0304/2012 –2012/0260(COD)).
- US-EPA. U.S. Environmental Protection Agency (2007a). Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry - Method 6010C 2007.
- US-EPA. U.S. Environmental Protection Agency (2007b). Graphite furnace atomic absorption Spectrophotometry - Method 7010 2007.
- Van der Steen, J.J.M., de Kraker, J. y Grotenhuis, T. (2012). Spatial and temporal variation of metal concentrations in adult honeybees (*Apis mellifera* L.). *Environmental Monitoring and Assessment* 184: 4119-4126.
- Van der Steen, J.J.M., de Kraker, J. y Grotenhuis, T. (2015). Assessment of the potential of honeybees (*Apis mellifera* L.) in biomonitoring of air pollution by cadmium, Lead and vanadium. *Journal of Environmental Protection*, 6: 96-102.
- Velemínský, M., Láznička, P. Starý, P. (1990). Honeybees (*Apis mellifera*) as environmental monitors of heavy metals in Czechoslovakia. *Acta Entomologica Bohemoslovaca*, 87: 37-44.
- Van Engelsdorp, D., Evans, J.D., Saegerman, C., Mullin, C., Haubruge, E., Nguyen, B.K., Frazier, M., Frazier, J., Cox-Foster, D., Chen, Y., Underwood, R., Tarpay, D.R. y Pettis, J.S. (2009). Colony Collapse Disorder: A Descriptive Study. *PLoS ONE* 4(8): e6481. doi:10.1371/journal.pone.0006481.
- Von Frish, K. (1969). *La vida de las abejas*. Ed. 1994. RBA, Barcelona, p.217.

- Winston, M.L. (1987). *The biology of the honey bee*. Harvard University Press, Cambridge, pp. 281.
- Wolterbeek, B. (2002). Biomonitoring of trace element air pollution: principles, possibilities and perspectives. *Environmental Pollution*, 120: 11-21.
- Zakrzewska, M., Sawicka-Kapusta, K, Szarek, J., Bydłoń, G., Baran, P., Dudzińska, K., Skibniewska, K.A., Guziur, J., Grzybowski, M. y Babińska, I. (2010). Bioindication of the Environment Contamination by Heavy Metals. En: Skibniewska, K.A. (ed.), *Influence of the pesticide dump on the environment*. Department of Land Reclamation and Environmental Management, University of Warmia and Mazury, Olsztyn, pp. 107-120.
- Zhelyazkova, I. (2012). Honeybees – Bioindicators for environmental quality. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 18: 435-442.
- Zhelyazkova, I., Atanasova, S., Barakova, V. y Mihaylova, G. (2011). Content of heavy metals and metalloids in bees and bee products from areas with different degree of anthropogenic impact. *Agricultural Science and Technology*, 3: 136-142.
- Zugravu, C.A., Parvu, M., Patrascu, D. y Stoian, A. (2009). Correlations between lead and cadmium pollution of honey and environmental heavy metal presence in two Romanian counties. *Bulletin UASVM Agriculture*, 66: 230-233.