

Métodos para determinar la actividad enzimática en suelos contaminados

Methods to determine enzymatic activity in contaminated soils

Armando Vélez^{1*} , Maricielo Vera² , Sayda Valdez² ,
Danely Martínez²  y Fiorela Cutipa² 

1 Facultad de Ciencias Naturales y Matemática, Escuela de Biología, Universidad Nacional Federico Villarreal. Lima, Perú.

2 Carrera de Ingeniería Ambiental, Universidad Científica del Sur. Lima, Perú.



Citar como: Vélez *et al.* (2024). «Métodos para determinar la actividad enzimática en suelos contaminados». *South Sustainability*, 5(1), e092. DOI: 10.21142/SS-0501-2024-e092

Artículo recibido: 22/11/2023
Arbitrado por pares
Artículo aceptado: 20/2/2024



© Los autores, 2024. Publicado por la Universidad Científica del Sur (Lima, Perú)

*E-mail de correspondencia:
avelez@unfv.edu.pe

RESUMEN

El suelo es impactado por diversas actividades antropogénicas, como la minería, la agricultura y la ganadería, lo que afecta negativamente a la biodiversidad y la seguridad alimentaria debido a la contaminación. La actividad enzimática representa uno de los indicadores más importantes del estado del suelo. Además, permite realizar procesos de biorremediación y restauración, sin generar residuos. Por ello, el objetivo de esta investigación fue analizar la información bibliográfica disponible sobre los principales métodos para determinar la actividad enzimática en suelos contaminados, en los portales de SciELO, Redalyc, Google Académico y Dialnet. En este trabajo fueron seleccionadas cuatro enzimas fundamentales. La ureasa, una de las enzimas involucradas en el ciclo de nitrógeno, además de participar en la hidrólisis de carbono, se determina por método descrito por Tabatabai y Bremner. Las β -glucosidasas actúan en la hidrólisis de carbohidratos y son consideradas indicadores del metabolismo; el método aplicado es la colorimetría. Las fosfatasas se encargan de la hidrólisis de ésteres para la disponibilidad de microorganismos y se determinan mediante el método espectrofotométrico. Por último, las catalasas sirven como indicador de la actividad microbiana aeróbica, y se determinan mediante el método de Johnson y Temple. Estos métodos son ampliamente utilizados y aportan valiosa información sobre la actividad enzimática en el suelo. Presentan también algunas limitaciones, principalmente por influencia de los factores ambientales. Esto sugiere la necesidad de realizar un mayor desarrollo investigativo para superar las limitaciones actuales y lograr una mayor precisión en la medición de la actividad enzimática en suelos contaminados.

Palabras clave: *enzimas reductoras, suelos, biorremediación, contaminante de suelos*

ABSTRACT

Soil is impacted by a range of anthropogenic activities, such as mining, agriculture and livestock, with the resulting contamination negatively affecting biodiversity and food security. Enzymatic activity constitutes one of the most important indicators of the state of soil, and it also enables the conducting of bioremediation and restoration processes, without generating waste. In this context, the aim of this research was to analyze the bibliographic information available on the main methods for determining enzymatic activity in contaminated soils, on the Scielo, Redalyc, Google Scholar and Dialnet portals. For this work, we selected four fundamental enzymes. Urease, one of the enzymes involved in the nitrogen cycle, in addition to participating in carbon hydrolysis, is determined by the method described by Tabatabai and Bremner. β -glucosidases act in the hydrolysis of carbohydrates and are considered indicators of metabolism; the method applied is colorimetry. Phosphatases are responsible for the hydrolysis of esters for the availability of microorganisms and are determined using the spectrophotometric method. Finally, catalases serve as an indicator of aerobic microbial activity, and they are determined using the Johnson and Temple method. These methods, which are widely used and provide valuable information on enzymatic activity in soil, also have certain limitations, due mainly to the influence of environmental factors. This suggests the need for further research, in order to surmount current limitations and achieve greater precision in the measurement of enzymatic activity in contaminated soils.

Keywords: *Remediation enzymes, soils, bioremediation, soil pollutant*



Introducción

El suelo es una estructura dinámica, constituida por componentes orgánicos, minerales, aire y agua. Está conformado por capas distintas a la roca original, como resultado de cambios en la cantidad y tipo de materiales que se han perdido, añadido, transferido o transformado (Hartemink, 2020). Es fundamental para el funcionamiento global de la biosfera, y pieza clave para el desarrollo de los ciclos biogeoquímicos (Ortiz, 2015), como proveedor de servicios ecosistémicos para el equilibrio terrestre, el soporte y el suministro de alimentos (Torres y Rojas, 2018). Asimismo, sirve como escenario bioquímico donde las enzimas ejercen funciones cruciales en los procesos de descomposición de la materia orgánica (Ynfa, 2017), ya que generan hasta el 95 % de la superficie terrestre (Torres y Rojas, 2018). El conocimiento sobre la actividad enzimática es de vital importancia en la evaluación y conservación de suelos (Aguilar, 2017).

La actividad enzimática corresponde a un conjunto de reacciones catalizadas por enzimas, en un tiempo determinado, y en función del pH, la temperatura, la fuerza iónica y la presencia de inhibidores (Vasquez, 2017). En el suelo, las enzimas aceleran los procesos de descomposición de los sustratos y liberan nutrientes para mantener el funcionamiento del ecosistema (Dominguez, 2018). Asimismo, sirven como indicadores de la calidad del suelo y el grado de contaminación (Millán, 2015), catalizan reacciones esenciales en la vida de los microorganismos (Constanza *et al.*, 2015), y contribuyen al ciclo biogeoquímico de los nutrientes (Ynfa, 2017). Existen diversos métodos para su análisis, entre los que destacan las oxidorreductasas e hidrolasas en el manejo agronómico (Cruz, 2020).

Actualmente, uno de los principales problemas es el efecto de los xenobióticos en el suelo, generado por subproductos químicos de actividades agropecuarias, industriales, municipales, residuales (Hashmi, 2017; Jiménez, 2017) y fertilizantes. Para 2050 estos productos aumentarían su producción y demanda en más del 50 % (Rodríguez *et al.*, 2018), lo que incrementaría la concentración de metales pesados (Naccarato *et al.*, 2020), con impactos significativos sobre la red trófica y la salud humana (Méndez, 2015). Estos metales pueden acumularse (Toledo *et al.*, 2020) y persistir por periodos mayores a los mil años (Muyulema *et al.*, 2019; Rosique, 2016) por actividades como la minería (Menéndez y Muñoz, 2021), e incrementar el riesgo sobre la biodiversidad (Cabrera, 2018).

En 2018, se estimaron 22 248 100 hectáreas degradadas en el territorio peruano, cifra que continúa en ascenso (Minam, 2020) por el incorrecto manejo y planificación de los suelos (Ramsey, 2016). En comparación con otros países de Sudamérica, el Perú presenta 25 525 000 ha de suelo productivo (Diaz, 2016). La relación es más baja

como sustento alimentario, ya que solo el 6 % tiene potencial para el desarrollo agrícola y el 13,94 % para pastos naturales (Berg, 2015), lo cual ocasiona salinización, desertificación y erosión en la costa; y una elevada erosión hídrica, sobrepastoreo, pérdida de fertilidad y la quema de pajonales en la sierra y selva (Vergara, 2015).

El objetivo de esta investigación fue analizar la información disponible sobre los principales métodos para determinar la actividad enzimática en suelos contaminados, por su valor en las áreas de restauración, remediación y educación ambiental. Para ello, se realizó una búsqueda de información en las fuentes bibliográficas confiables como SciELO, Redalyc, Google Académico y Dialnet, empleando las palabras claves «enzimas», «suelos contaminados», «biorremediación», en un intervalo específico de años, 2014-2023. Se obtuvo un total de 1640 resultados, de los cuales se utilizaron 93 artículos. Asimismo, se hizo uso de fuentes bibliográficas externas.

Marco teórico

1. Contaminación de suelos

El suelo es un ente vivo, que ha mejorado la calidad de vida de las personas a lo largo de los años (Lal, 2019). Además, es una estructura vital para las plantas, al proporcionar soporte, y una fuente de nutrientes para su desarrollo y producción (Mori y Candell, 2017). Aunque posee una gran capacidad de resiliencia, es un sumidero sensible y vulnerable a la contaminación (Díaz, 2016). Las principales fuentes antropogénicas de contaminación del suelo son los subproductos de las actividades industriales, ganaderas, los desechos domésticos, municipales, los pesticidas y principalmente los derivados del petróleo (Franco, 2017), liberados accidental o intencionalmente al ambiente (Cortés y Montellano, 2018). Siendo el suelo un recurso natural no renovable, es importante mantener un monitoreo constante, que nos permita alcanzar la sostenibilidad a lo largo del tiempo.

2. Tipos de contaminación

2.1. Contaminación puntual

Este tipo de contaminación ocurre debido a un evento puntual o una serie de eventos en una zona determinada, donde es fácil identificar tanto los contaminantes liberados como las fuentes de contaminación (Cordero, 2020), y proyectar de forma directa el perímetro afectado. Este tipo de contaminación suele encontrarse principalmente en zonas urbanas (Rodríguez *et al.*, 2019) asociadas a espacios industrializados (Berrow y Reaves, 2016), que representan un alto riesgo para los factores ambientales (agua y suelo principalmente). Sin embargo, estos problemas pueden solucionarse a mediano y largo plazo mediante programas de remediación y restauración ambiental de baja complejidad.

2.2. Contaminación difusa

Este tipo de contaminación se extiende con facilidad en el suelo debido a la solubilidad de los contaminantes (Rodríguez *et al.*, 2019), lo que dificulta identificar la fuente y generar un punto crítico sobre el área de influencia. Implica el transporte de contaminantes a otros factores ambientales, como el aire y el agua, por lo que es importante realizar evaluaciones complejas para entender el estado del ecosistema (Passatore *et al.*, 2015). Se producen principalmente por actividades relacionadas con armas nucleares, residuos sólidos, aguas residuales que ingresan a las cuencas, entre otros (Cachada *et al.*, 2018). Este tipo de contaminación se relaciona con la degradación de suelos y la alteración de los cuerpos y cursos de agua, que responden de manera directa al número con afecciones puntuales, y generan mayores problemas dispersivos o difusos.

3. Fuentes de contaminantes del suelo

3.1. Fuentes naturales

Son aquellas que no provienen directamente de actividades antropogénicas (Mora-Barrantes *et al.*, 2020). Muchos parentales del suelo son de origen natural, como los metales pesados y elementos radionúclidos, que comprenden un riesgo para el ambiente (Ballesta, 2017). Estos componentes varían en función de la región estudiada (Rodríguez *et al.*, 2019) y según el tipo de roca madre (Berrow y Reaves, 2016). El arsénico (As), de origen volcánico, es uno de los contaminantes más cuestionados a nivel mundial (Zorrilla, 2017). Muchos de estos minerales presentan una alta variabilidad espacial y pueden encontrarse en concentraciones más altas en capas más profundas (Li *et al.*, 2014). Este tipo de contaminación se considera de baja importancia, ya que las consecuencias en la salud humana no son significativas; sin embargo, podrían convertirse en la principal causa de la contaminación del suelo, cuando se afectan principalmente los ciclos biogeoquímicos.

3.2. Fuentes antropogénicas

El Perú enfrenta diversos desafíos en el área de la conservación de suelos, que repercuten de forma directa en la seguridad alimentaria, la producción de recursos agrícolas (Bedoya *et al.*, 2023) y la biodiversidad, tomando en cuenta que nuestro país es considerado como uno de los puntos críticos para la degradación de suelos a mediano y largo plazo (Hassani *et al.*, 2021).

3.2.1. Minería

Los centros mineros y de fundición liberan elevadas cantidades de metales pesados y otros elementos tóxicos al ambiente. Perduran periodos extensos, mucho después del cierre de estas actividades (Benites, 2016). Los desechos tóxicos almacenados están formados principalmente por partículas finas de concentraciones variables de metales pesados (Jimenez, 2019). Las partículas contaminadas

pueden ser disgregadas por acción de la erosión hídrica y eólica, y pueden alcanzar suelos agrícolas, lo que contribuye a la pérdida de especies vegetales y afecta la salud del suelo (Enciso, 2018). Además, la extracción de petróleo y gas representan una gran fuente de contaminación puntual del suelo, a causa de derrames de petróleo crudo y salmueras (Bayona, 2019). La presencia generalizada de depósitos de desechos de relaves en departamentos como La Libertad y Pasco agrava la situación, causa perturbaciones ecológicas y contamina el entorno terrestre con metales pesados (Menéndez y Muñoz, 2021; Uriarte *et al.*, 2023; Huaranga *et al.*, 2021), lo cual crea nuevos suelos sujetos a severas limitaciones físicas, químicas y biológicas que dificultan la regeneración de la vegetación. En La Oroya, las actividades industriales y mineras han elevado significativamente los niveles de contaminación por arsénico, plomo y cadmio (Díaz, 2016), y representan una amenaza directa para la salud humana y la estabilidad ambiental.

3.2.2. Actividades agrícolas y ganaderas

La agricultura y la ganadería son actividades responsables de obtener productos esenciales para las poblaciones, así como una fuente de contaminación del suelo por malas prácticas agrícolas (Kanter, 2018). La incorporación excesiva de fertilizantes, las malas prácticas de riego (Muñoz, 2019) y el uso de plaguicidas elaborados con metales nocivos (Artiola *et al.*, 2019) ocasionan salinización, acumulación de metales y eutrofización. El crecimiento de la población ganadera implica el sobrepastoreo, la deforestación, la pérdida de bosques, la compactación, la erosión y la alteración química y biología del suelo (Saucedo-Uriarte *et al.*, 2023). En el Perú, los problemas de contaminación por plaguicidas se han convertido en una amenaza que afecta departamentos como Apurímac (Mendoza y Yupanqui, 2023), así como las principales microcuencas, con metales migratorios, provenientes de la agricultura (Correa *et al.*, 2021). En Madre de Dios, estas actividades vienen generando compactación, pérdida de la biodiversidad y alteraciones en la composición del suelo (Escobar, 2022).

4. Efectos de la contaminación de suelos

La contaminación del suelo conlleva una serie de efectos adversos que impactan tanto el ambiente como la salud humana (Rodríguez *et al.*, 2018). Primero, la degradación de la calidad del suelo resulta en la pérdida de su fertilidad y capacidad para sustentar la vida vegetal y microbiana esencial para los ecosistemas saludables (Puente y Astete, 2016). Segundo, la contaminación del suelo puede provocar la lixiviación de contaminantes hacia las aguas subterráneas, y así afectar la calidad del agua potable y amenazar la biodiversidad acuática. La toxicidad de los contaminantes en el suelo tiene consecuencias directas en la flora y fauna, con el riesgo de la pérdida de especies importantes (Longa y Rodríguez, 2017). Estos xenobióticos pueden acumularse en los



tejidos de plantas y animales, y generar problemas de bioacumulación y biomagnificación, que amenazan la cadena alimentaria y la salud humana (Rai *et al.*, 2019). Los suelos contaminados pueden afectar la producción agrícola, lo que conlleva a disminuir la calidad y cantidad de los cultivos (Minaya, 2022). Además, la contaminación del suelo puede contribuir a la contaminación del aire por liberación de partículas contaminadas o gases volátiles.

5. Biorremediación de suelos contaminados

La biorremediación es una rama de la biotecnología que busca soluciones ante problemas de contaminación usando el potencial enzimático de las bacterias, plantas u hongos (Hernández *et al.*, 2016) para degradar o destruir compuestos que generan desequilibrio en el ambiente (Rodríguez *et al.*, 2019). Es un método específico que permite atacar la presencia de xenobióticos en el suelo (Simbaña, 2016). Con el desarrollo de la tecnología, se ha hecho posible el mejoramiento genético de organismos (principalmente en algas y plantas) para optimizar el proceso de biorremediación. Sin embargo, el uso de fertilizantes convencionales y residuos orgánicos aún se considera la alternativa principal de manejo a escala mundial.

5.1. Métodos de biorremediación

Son sistemas o procesos que utilizan métodos biológicos para transformar xenobióticos a desechos menos tóxicos, en los cuales las enzimas degradan o transforman las sustancias peligrosas (Covarrubias *et al.*, 2015). Las técnicas de biorremediación pueden efectuarse *in situ* realizando excavaciones en el terreno o *ex situ* en biorreactores de instalaciones (Pinzón y Fajardo, 2018). Los métodos más usados para la recuperación de suelos contaminados los representan la bioestimulación, la bioaumentación y el compostaje, donde las velocidades enzimáticas pueden desarrollarse bajo condiciones favorables y controladas (Covarrubias *et al.*, 2015). Estos métodos no generan residuos y resultan ser más económicos que otros tratamientos fisicoquímicos; sin embargo, el funcionamiento del tratamiento dependerá de la habilidad de los operadores para crear y mantener las condiciones ambientales necesarias para el crecimiento microbiano.

5.1.1. Bioestimulación

El método se basa en la adición de nutrientes en las principales fuentes de nitrógeno y fósforo (Rivera *et al.*, 2018) para mejorar la biodegradación de contaminantes orgánicos e inmovilizar los contaminantes inorgánicos. Se debe garantizar el crecimiento de los microorganismos para intensificar la velocidad de la degradación (Vallejo *et al.*, 2016), mediante la adición de oxígeno y nutrientes al suelo contaminado, con el fin de estimular la actividad de los microorganismos autóctonos y la degradación de los contaminantes (Olaya y Triviño, 2019). El proceso puede desarrollarse de forma aeróbica y anaeróbica; por

ello, los suelos deben ser lo más homogéneos posible, con una porosidad y permeabilidad al aire adecuados, teniendo en cuenta las condiciones óptimas de aireación, pH, humedad, temperatura y los nutrientes del suelo en relación nitrógeno/fósforo (N:P).

5.1.2. Bioaumentación

El método se basa en la adición de microorganismos vivos que tienen la capacidad de degradar contaminantes, para así fomentar la biodegradación o biotransformación (Zuñiga, 2018). Este proceso trata suelos contaminados por insecticidas, herbicidas y desechos con altas concentraciones de metales (INEI, 2015), donde se identifican las poblaciones de microorganismos y se realiza la caracterización del suelo, para luego evaluar qué microorganismos tienen la capacidad de colonizar y degradar a los contaminantes del suelo (Gutierrez, 2018). Por ello, se deben producir cultivos de enriquecimiento y aislarse microorganismos metabólicos, que usen al contaminante como fuente energética y ser cultivados hasta adquirir proporciones grandes de biomasa, para que el tratamiento sea más eficiente.

5.1.3. Compostaje

Consiste en la descomposición biológica mediante procesos de respiración aeróbica y anaeróbica, modificando xenobióticos en sustancias no tóxicas, relacionadas con el origen de los residuos, el tamaño de partícula, aireación, humedad y la población biológica activa (Medina *et al.*, 2018). Se ha comprobado que este proceso trata suelos contaminados combinando con elementos orgánicos como estiércol y desechos agrícolas para regularizar la cantidad de nutrientes presentes en el suelo (Zhang *et al.*, 2015). Se desarrolla en un ambiente cerrado, donde se obtienen temperaturas superiores a 70 °C, para eliminar patógenos del suelo (Ramos *et al.*, 2018). Por ello, durante la biorremediación se generan dos resultados: la eliminación de contaminantes y la producción de compost (Montenegro *et al.*, 2020); así, este proceso es usado en tratamientos de residuos sólidos antropogénicos y metales, aunque la efectividad del producto requiere de mucha pericia y experiencia del operador.

6. Actividad enzimática en suelos

La actividad enzimática brinda información sobre el estado microbiano y las condiciones fisicoquímicas del suelo (Samuel *et al.*, 2018). Además, es un indicador de la calidad del suelo a causa de su sensibilidad a xenobióticos como los metales pesados, y su relación directa con los ciclos de C, N, P y S (Aponte *et al.*, 2020). Se producen por efecto de los microorganismos que colonizan el suelo, o los restos de plantas que persisten en este sistema por tiempos muchas veces prolongados (Wei *et al.*, 2019; Di Barbaro *et al.*, 2020). Además, brinda información sobre conservación de la biodiversidad y es clave para el funcionamiento de los agroecosistemas (Tortora, 2020; García, 2017).

Las enzimas determinan el tiempo y los procesos de transformación química en el suelo, y son específicas del sustrato o el contaminante (Millán, 2015). Por ello, es importante el reconocimiento de las principales enzimas del suelo como ureasas, β -glucosidasas, fosfatasa y las catalasas (Lázaro, 2015). Sin embargo, estas enzimas importantes (tabla 1) pueden verse afectadas por factores ambientales, principalmente metales, que distorsionan la estructura proteica al alterar su actividad. Asimismo, existe un número limitado de enzimas tolerantes a los cambios ambientales como el pH, la conductividad eléctrica, la temperatura y la materia orgánica (Báez *et al.*, 2016), como las hidrolasas, esterasas, proteasas y lipasas, las cuales son termoestables (Bhandari *et al.*, 2021; Mohammad *et al.*, 2017; Sahay *et al.*, 2017).

Tabla 1. Principales enzimas utilizadas en la determinación de actividad enzimática en el suelo

Enzimas	Características	Función
Ureasa	Es una enzima que presenta dos subunidades alfa y gamma (Aguirre <i>et al.</i> , 2016). Además, su actividad óptima se desarrolla a un pH neutro, y una temperatura de 40 °C (Parada, 2016); muestra especificidad a la urea e hidroxurea; asimismo, es inhibido por metales pesados como mercurio y cadmio (Ruiz, 2020).	Actúan en enlaces carbono-nitrógeno, además de catalizar la hidrólisis de la urea a dióxido de carbono y amoníaco en el suelo (Ruiz, 2020). Está involucrada en el ciclo del nitrógeno, e indica la disponibilidad potencial de este, a partir de origen microbiano en forma libre, vinculada al humus o a los coloides del suelo (Montserrat y Campaña, 2020).
β -Glucosidasa	Es una enzima compuesta por dos subunidades que conforman una glicoproteína, que se desarrolla a un pH óptimo de 7 y una temperatura en el rango entre 30 °C y 40 °C. Estas son susceptibles a inhibidores como nitrógeno y heterociclos (Simas <i>et al.</i> , 2018).	Actúa en la hidrólisis de carbohidratos, fundamental para la obtención de energía para los microorganismos del suelo (García, 2017). Es un indicador general de metabolismo microbiano, asociado a mineralización de materia orgánica celulósica.
Fosfatasa	Es una enzima compuesta por dos subunidades catalíticas y reguladoras (Degayón, 2018), que tienen su actividad máxima en un pH alcalino y una temperatura de 30 °C. Ambas pueden ser inhibidas por metales pesados (Pérez, Nasello y Murno, 2016).	Se encarga de catalizar la hidrólisis de ésteres y de anhídridos de ácido fosfórico, mineralizando el fósforo orgánico (Montserrat y Campaña, 2020) en fósforo inorgánico para la disposición de microorganismos y plantas (Caballero y Mejía, 2015).
Catalasa	Es una enzima antioxidante presente en la mayoría de los organismos aerobios (Farinango <i>et al.</i> , 2021). Está constituida por cuatro subunidades iguales que se sostienen por interacciones no covalentes. Su desarrollo de actividad óptima se encuentra a un pH 8 y una temperatura de 37 °C (Reyes, 2019).	Cataliza la dismutación del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno (Díaz <i>et al.</i> , 2017) producido por la cadena de transporte electrónico mitocondrial. También participa en las reacciones de oxidación e hidroxilación, y tiene como productos el oxígeno y agua. Además, es utilizado como indicador de la actividad microbiana aeróbica y relacionado con la fertilidad del suelo (Lázaro, 2015).

7. Métodos para determinar enzimas en el suelo

7.1. Preparación de reactivos

Preparación de tampón borato PH 10

Mezclar 16 ml de solución de ácido bórico (H_3BO_3) al 0,1 M y 14 ml de solución hidróxido de potasio (KOH) al 0,1 M (ambas con agua libre de CO_2), con el cual se obtiene una solución de buffer borato de pH 10.

Solución Stock Tham (PH 12)

- Agregar 12,2 g de trihidroximetilaminometano (THAM).
- Llevar a pH 12 con hidróxido de sodio 0,5 M.
- Enrasar a un litro con agua destilada.

Solución tampón mub (PH 6,5)

- Agregar 200 ml de solución Tham (pH 12).
- Agregar 11,6 g de ácido maleico.
- Agregar 14 g de ácido cítrico.
- Agregar 6,28 g de ácido bórico.
- Agregar 488 ml de hidróxido de sodio 1 M, enrasado a 1 L de agua destilada.

Solución patrón

- Añadir 0,5 ml de 4-nitrofenol 0,025 M y 2 ml de agua destilada en un tubo de ensayo de vidrio.
- Añadir 0,5 ml de cloruro de calcio 0,5 M, 2 ml de hidróxido de sodio 0,5 M y 5 ml de agua destilada.
- Centrifugar y medir la absorbancia a 400 nm.

7.2. Determinación de la actividad enzimática de la ureasa

Se basa en el método descrito por Tabatabai y Bremner (1972), mediante la técnica de colorimetría a una longitud de onda a 635 nm, en la cual la enzima ureasa cataliza la reacción de hidrólisis de la urea liberando amonio (Paul, 2007). En este proceso de reacción, la urea se rompe formando dióxido y amonio, requiere de la presencia de agua para su transformación en amoníaco. Este último se puede determinar fácilmente, ya que es soluble en agua, menos tóxico, de fácil cuantificación (Borges *et al.*, 2011); y los costos son muy bajos.

Procedimiento

1. Colectar la muestra de suelo y colocar en una bolsa ziploc de 1 kg. Someterla a estufa por 72 horas a 60 °C. Tamizar en malla de 2 mm.
2. Pesar 1g de suelo tamizado (2 mm) en una balanza analítica y humedecer hasta aproximadamente capacidad de campo (cuatro repeticiones).
3. Colocar el suelo pesado en tubos de plástico con tapa (tubos de centrifuga 15 ml), para formar tres muestras y un control.
4. A las muestras añadir 4 ml de tampón borato pH 10, y 0,5 ml de solución de urea al 0,64 %, pero al control en lugar de urea añadir 0,5 ml de agua destilada.
5. Incubar los tubos bajo agitación por dos horas en un baño maría a 37 °C. Cumplido el tiempo, añadir 6 ml de KCl 7,4 %



- a todos los tubos, para medir la presencia de amoníaco. Después, agitar por treinta minutos.
- Centrifugar a 3500 RPM por 10 min. Luego, extraer 9 ml del líquido sobrenadante de todos los tubos a otros tubos de plástico con tapa.
 - Determinar la cantidad de NH_4^+ mediante el espectrofotómetro a 525 nm

7.3. Determinación de la actividad enzimática β -glucosidasa

Toma como referencia al estudio de Eivazi y Tabatabai (1988), al usar el método de colorimétrico para determinar el p-nitrofenol a una longitud de onda a 398 nm. Es uno de los métodos más usados por su selectividad y sencillez en relación con las técnicas cromatográficas y electroforéticas (Quiceno *et al.*, 2020). Por ello, para determinar la actividad enzimática β -glucosidasa se realiza una reacción que cataliza la hidrólisis de residuos, lo cual se da durante la incubación.

Procedimiento

- Recolectar la muestra de suelo y colocar en una bolsa ziploc de 1 kg. Además, someter a estufa 65 °C por 72 horas. Luego, tamizar en malla de 2 mm.
- Pesar en una balanza analítica 0,5 gramos de suelos seco y tamizado, y agregarlo a un tubo de centrifuga de 10 ml. Luego, añadir 2 ml de tampón MUB (pH 6,5).
- Agregar 0,5 ml de solución sustrato 4-Nitrofenil- β -D-Glucopiranosido 0,025 M y 4,5 ml de agua desionizada.
- Luego, preparar el control negativo, utilizando agua destilada en lugar de suelo (enzima), para medir la actividad enzimática no específica.
- Adicionar 2 ml de buffer maleato de pH 6,5 al control y a las muestras.
- Tapar los tubos e incubar a 37 °C por una hora.
- Dejar enfriar por 15 min en una nevera. Después, agregar 0,5 ml cloruro de calcio 0,5 M, 2ml de solución extracto Tham y 5 ml de agua destilada.
- Centrifugar por cuatro minutos por 4000 RPM y medir la absorbancia de los extractos a 400 nm.

7.4. Determinación de la actividad enzimática de la fosfatasa

Se basa en el método espectrofotométrico de Eivazi y Tabatabai (1977). Es una técnica analítica que permite determinar la concentración de un compuesto en solución. El método colorimétrico tiene una longitud de onda de 400 nm, que mide el 4-nitrofenol liberado (Alef y Nannipieri, 1995). Se basa en el hecho de que las soluciones alcalinas de este compuesto presentan coloración amarilla en medio ácido con un pH menor a 5 y son incoloras.

Procedimiento

- Colectar una muestra de suelo de 1 kg en una bolsa ziploc. Someter a la estufa durante 72 horas a 65 °C. Pasar por tamiz de 2 mm.

- Pesar 0,5 g de suelo tamizado (2 mm) en una balanza analítica y colocarlo en un tubo de centrifuga de 10 ml. Preparar un total de seis muestras con sus respectivos controles.
- Añadir 0,5 mL de la solución de 4-nitrofenol-fosfato-p-nitrofenil-fosfato hexahidrato 0,025 M como sustrato enzimático a las muestras.
- Para los controles agregar un volumen similar de agua destilada.
- A todos los tubos agregar 2 mL de tampón MUB (pH 6,5). Luego, agitar el tubo unos segundos para mezclar el contenido y tapar.
- Incubar a una temperatura de 37 °C en baño de agua durante una hora.
- Introducir a la nevera durante 15 minutos. Una vez enfriado, añadir 0,5 mL de cloruro de calcio (0,5 M) y 2 mL de hidróxido de sodio (0,5 M), en ese orden. Agitar para homogeneizar.
- Agregar 5 mL de agua destilada y centrifugar a 3500 RPM por cuatro minutos.
- Medir la absorbancia en un espectrofotómetro a 398 nm.

7.5. Determinación de la actividad de la enzima catalasa

Se basa en el método de Johnson y Temple (1964), cuya reacción enzimática se basa en la adición de una determinada cantidad de H_2O_2 al suelo y en la incubación de la mezcla, durante un periodo de tiempo determinado en el que actúa la enzima. Ello provoca la descomposición del H_2O_2 en H_2O y O_2 (Bécquer *et al.*, 2016), donde se observará la formación de burbujas. Se mide el H_2O_2 residual, es decir, el peróxido de hidrógeno que permanece inalterado después que tuvo lugar la reacción enzimática, mediante una valoración con permanganato potásico (Aguilar, 2017). Si la disolución se torna de color rosado, significa que hay presencia de la enzima catalasa.

Procedimiento

- Colectar 1 kg de muestra de suelo en dos bolsas de papel. Conservar una bolsa y someterla a la estufa a una temperatura de 65 °C al menos dos horas previas a la práctica para obtener el peso seco (SS).
- Pasar por tamiz de 2 mm y pesar en una balanza analítica 0,5 gramos de suelo. Colocarlos en un matraz Erlenmeyer y agregar 40 ml de agua destilada.
- Ingresar magnetos, tapar con Parafilm y llevar al agitador magnético por un lapso de tres minutos (a una velocidad aproximada de 300 RPM). Luego, agregar 5 mL de solución de peróxido de hidrógeno, tapar y agitar por 10 min.
- Añadir 5 mL de ácido sulfúrico 1,5 M para detener la reacción enzimática y estabilizar el H_2O_2 residual.
- Filtrar, tomar 25 ml y titular lentamente con permanganato de potasio 1 % con agitación constante, hasta que cambie de color a un tono rosado permanente.
- Preparar controles: control peróxido, se añade todo menos peróxido de hidrógeno, en el caso del control de la muestra se añade todo menos suelo.

Conclusiones

El suelo se degrada de forma acelerada por actividades antropogénicas como la minería, la agricultura y la ganadería. Esto genera un desequilibrio de nutrientes, destrucción de la biodiversidad y problemas con la seguridad alimentaria a escala mundial. Los procesos de biorremediación, entre los que destacan la bioestimulación y bioaumentación, representan las principales alternativas para atacar estos cambios y evaluar las condiciones del suelo mediante el estudio de la actividad enzimática. Entre las principales enzimas del suelo se encuentran las catalasas, indicadores importantes de actividad biológica aeróbica; las fosfatasas, relevantes para el desarrollo del microbiota y las plantas; las glucosidasas,

relacionadas con el metabolismo y la obtención de energía en los microorganismos del suelo; y las ureasas, involucradas en el ciclo biogeoquímico del nitrógeno. Los métodos experimentales que permiten el análisis de estos indicadores brindan información de vital importancia para conocer el estado del ecosistema, aunque aún presentan ciertas limitaciones relacionadas con la relación con algunos parámetros como la temperatura, la humedad, la materia orgánica, entre otros, lo que precisa continuar con el desarrollo de la investigación en suelos contaminados.

Agradecimientos

A Kaori Ninoshka Baila Laurente, por sus valiosos comentarios a nuestra investigación.



Referencias bibliográficas

- Alef, K. y Nannipieri, P. (1995).** *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*. Bayreuth: Institute of Ecological Chemistry and Geochemistry, University of Bayreuth. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-513840-6.X5014-9>
- Aguilar, C. L. (2017).** *Evaluación de la fertilidad del suelo en función de la actividad enzimática en cultivo ecológico y convencional de pimiento (*Capsicum sp.*)*. [Tesis de máster, Universidad Politécnica de Valencia]. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10251/89555>
- Aguirre, L., Ramos, M., Orozpe, J., Lucero, E., Nobo, N., Plenge, L., Valero, J., Álvarez, E., Martínez, A. y Díaz, Á. (2016).** «Aspectos estructurales y mecanísticos de la enzima ureasa y sus proteínas accesorias». *Ciencia en la Frontera*, volumen especial, pp. 19-36. Disponible en: <https://n9.cl/zewfv>
- Aponte, H., Meli, P., Butler, B., Paolini, J., Matus, F., Merino, C., Cornejo, P. y Kuzyakov, Y. (2020).** «Meta-analysis of heavy metal effects on soil enzyme activities». *Science of the Total Environment*, 737, 139744. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139744>
- Artiola, J. F., Walworth, J. L., Musil, S. A. y Crimmins, M. A. (2019).** «Soil and land pollution». En M. L. Brusseau, I. L. Pepper y C. P. Gerba (eds.), *Environmental and pollution science* (pp. 219-235). Disponible en: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814719-1.00014-8>
- Ballesta, J. (2017).** *Introducción a la contaminación de suelos*. Madrid: Mundi-Prensa. Disponible en: <https://n9.cl/zczmyb>
- Bayona Vega, C. (2019).** *Propuesta para la formulación de un mecanismo de gestión Nexa Agua-Energía en la industria de hidrocarburos en el Valle del Magdalena Medio*. [Trabajo de maestría, Universidad Nacional de Colombia]. Disponible en: <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/77266>
- Báez, A. J., Ospina, N. y Zapata, J. E. (2016).** «Efecto de temperatura, pH, concentración de sustrato y tipo de enzima en la hidrólisis enzimática de vísceras de tilapia roja (*Oreochromis spp.*)». *Información Tecnológica*, 27(6), pp. 63-76. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642016000600007>
- Bhandari, S., Poudel, D. K., Marahatha, R., Dawadi, S., Khadayat, K., Phuyal, S., Shrestha, S., Gaire, S., Basnet, K., Khadka, U. y Parajuli, N. (2021).** «Microbial enzymes used in bioremediation». En C. G. Silva (ed.), *Journal of Chemistry* (vol. 2021, pp. 1-17). Disponible en: <https://doi.org/10.1155/2021/8849512>
- Bécquer, C. J., Galdo, Y., Mirabal, A., Quintana, M. y Puentes, A. (2016).** «Rizobios aislados de leguminosas forrajeras de un ecosistema ganadero árido de Holguín, Cuba. Tolerancia al estrés abiótico y producción de catalasa (Fase II)». *Cuban Journal of Agricultural Science*, 51(1), pp. 117-127. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2079-34802016000400010
- Bedoya-Perales, N. S., Escobedo-Pacheco, E., Maus, D., Neimaier, A. y Pumi, G. (2023).** «Dataset of metals and metalloids in food crops and soils sampled across the mining region of Moquegua in Peru». *Scientific Data*, 10(1), 483. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41597-023-02363-0>
- Pure Earth & Green Cross (2016).** *World's worst pollution problems 2016: the toxins beneath our feet. NY USA, Zurich Switzerland*, 1-56.
- Berg, H. (2015).** *Especiación de metales: teoría, análisis y aplicación*. Chelsea: Lewis
- Berrow, L. y Reaves, R. (2016).** «Remediación de sitios contaminados». *Boletín de Contaminación Ambiental y Toxicología*, 94(3).
- Borges, J., Bastardo, Y., Sandoval, E., Barrios, M. y Ortega R., (2011).** «Efecto de la adición de urea y el tipo de fermentación en la estabilidad de silajes de caña de azúcar (*Saccharum spp.*)». *Zootecnia Tropical*, 29(3), pp. 283-292. Disponible en: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-72692011000300004
- Caballero, J. y Mejía, K. (2015).** *Actividades enzimáticas en suelos de agroecosistemas cafeteros (ecológicos y convencionales) en Anolaima*. [Tesis de grado, Universidad Libre]. Disponible en: <https://hdl.handle.net/10901/7954>
- Cabrera, D. J. (2018).** *Evaluación de la contaminación por metales pesados en sedimentos y suelos de la Reserva Biológica Limoncocha - Ecuador mediante índices de polución*. [Tesis de grado, Universidad de Cantabria]. Disponible en: <https://repositorio.unican.es/xmlui/bitstream/handle/10902/14196/409479.pdf?se>
- Cachada, A., Rocha-Santos, T. y Duarte, A. C. (2018).** «Soil and pollution: an introduction to the main issues». *Soil pollution. From monitoring to remediation* (pp. 1-28). Cambridge: Academic Presse. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-849873-6.00001-7>
- Cordero, N. G. (2020).** *Aplicación del método drástico para determinar potencial de contaminación en aguas subterráneas en el acuífero sur de Puerto Rico*. [Tesis de doctorado, Universidad Ana G Méndez-Gurabo]. Disponible en: <https://n9.cl/ib4yt>
- Covarrubias, S., García Berumen, J. y Peña Cabriales, J. (2015).** «El papel de los microorganismos en la biorremediación de suelos contaminados con metales pesados». *Acta Universitaria*, 25(3), pp. 40-45. Disponible en: <https://doi.org/10.15174/au.2015.907>
- Cortés, J. y Montellano, L. (2018).** *Desarrollo de un programa para vigilancia en la evolución de contaminantes tóxicos persistentes en acuíferos y cuerpos de agua*. [Proyecto TC1802.1, Instituto Mexicano de Tecnología del Agua, IMTA].
- Correa Cuba, O., Fuentes Bernedo, F. E. y Coral Surco, R. G. (2021).** «Contaminación por metales pesados de la microcuenca agropecuaria del río Huancaray - Perú». *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 87(1), pp. 26-38. Disponible en: <https://dx.doi.org/10.37761/rsqp.v87i1.320>
- Cruz Caza, G. D. (2020).** *Evaluación final de la actividad microbiana de un Mollisol bajo el efecto previo de dos sistemas de labranza y cuatro niveles de nitrógeno*. [Tesis de grado, Universidad Central del Ecuador]. Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/21981>
- Degayon, M. A. (2018).** *Caracterización de proteínas-fosfatasa de tipo 1 de *Leishmania infantum* y estudio mediante RNA-Seq de las alteraciones en la expresión génica diferencial inducidas en líneas knock-in*. [Tesis de grado, Universidad Complutense de Madrid]. Disponible en: <https://eprints.ucm.es/id/eprint/50032/>
- Díaz, M., Castro, I., Lugo, Y., Prieto, M., Ultunaga, N. y López, O. (2017).** «Potencial antioxidante y cicatrizante de extractos frescos de *Morus alba*». *Pastos y Forrajes*, 40(2), pp. 135-143. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0864-03942017000200007&script=sci_arttext&tlng=pt
- Díaz, W. (2016).** «Estrategia de gestión integrada de suelos contaminados en el Perú». *Revista del Instituto de Investigación de la Facultad de Minas, Metalurgia y Ciencias Geográficas*, 19(38), pp. 103-110.
- DiBarbaro, G., Andrada, H., Del Valle, E. y Brandán de Weht, C. (2020).** «Actividad biológica de suelos cultivados con topinambur inoculados con *Azospirillum brasilense* y hongos micorrízicos». *Fave. Sección ciencias agrarias*, 19(1), pp. 33-41. Disponible en: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=S1666-77192020000100003&script=sci_abstract&tlng=en
- Dominguez, C. H. (2018).** *Efectos de tres fuentes de fósforo en el desarrollo de micorrizas y el incremento de la fertilidad en cinco ecosistemas terrestres de Tingo María*. [Tesis de grado, Universidad Nacional Agraria de la Selva].

- Eivazi, F. y Tabatabai, M. A. (1977).** «Phosphatases in soils». *Soil Biology and Biochemistry*, 9(3), pp. 167-172. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(77\)90070-0](https://doi.org/10.1016/0038-0717(77)90070-0)
- Eivazi, F. y Tabatabai, M. A. (1988).** «Glucosidasas and galactosidasas in soils». *Soil Biology and Biochemistry*, 20(5), pp. 601-606. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(88\)90141-1](https://doi.org/10.1016/0038-0717(88)90141-1)
- Enciso, C. L. (2018).** «Diagnóstico normativo y ambiental del estado actual de la minería en la jurisdicción de la corporación autónoma regional de Cundinamarca, regional Soacha». Universidad Distrital San Francisco José de Caldas. Disponible en: <http://hdl.handle.net/11349/15361>
- Escobar, A. (2022).** *Aspectos ambientales generados por las prácticas ganaderas en la comunidad de sabaluyoc*. [Tesis de grado, Universidad César Vallejo].
- Farinango, E., Jácome, C., Llanos, F., Lasso, A. y Ramos, J. (2021).** «Usos de la enzima catalasa en la reducción del peróxido de hidrógeno y sus aplicaciones industriales». *Journal of Agro-Industry Sciences*, 3(2), pp. 45-50.
- Fernández Valqui, R. L. y Pariente Mondragón, E. (2020).** «Atenuación natural y biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos, Amazonas, Perú». *Revista de Investigación de Agroproducción Sustentable*, 4(3), pp. 42-52. Disponible en: <https://doi.org/10.25127/aps.20203.665>
- Franco, M. (2017).** *Determinación de plaguicidas y metales pesados en sedimentos superficiales del embalse el guajaro como consecuencia de la actividad agrícola en el distrito de riego repelón, Atlántico*. [Trabajo de pregrado, Universidad de la Costa]. Disponible en: <http://hdl.handle.net/11323/309>
- García, I. S. (2017).** *Actividades enzimáticas determinadas en suelos bajo manejo agrícola sostenible*. Elche: Universidad Miguel Hernandez. Disponible en: <https://n9.cl/mscog>
- Gutierrez, K. (2018).** *Influencia de factores ambientales de crecimiento microbiano en la degradación de polietileno de baja densidad por la bacteria pseudomona aeruginosa en Huancayo*. [Tesis en Ingeniería Ambiental, Universidad Continental]. Disponible en: <https://hdl.handle.net/20.500.12394/4507>
- Hartemink, A. E., Zhang, Y., Bockheim, J. G., Curi, N., Silva, S. H. G., Grauer-Gray, J., Lowe, D. J. y Krasilnikov, P. (2020).** «Soil horizon variation: A review». *Advances in Agronomy*, 160(1), pp. 125-185. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/bs.agron.2019.10.003>
- Hashmi, M. Z., Kumar, V. y Varma, A. (Eds.). (2017).** *Xenobiotics in the soil environment. Monitoring, toxicity and management* (vol. 49). Cham: Springer. Disponible en: <https://n9.cl/gi1w1>
- Hassani, A., Azapagic, A. y Shokri, N. (2021).** «Global predictions of primary soil salinization under changing climate in the 21st century». *Nature Communications*, 12(1), 6663. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41467-021-26907-3>
- Hernández, G., Álvarez, N. y Ríos, L. (2016).** «Biorremediación de organofosforados por hongos y bacterias en suelos agrícolas: revisión sistemática». *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 18(1), pp. 138-159. Disponible en: http://doi.org/10.21930/rcta.vol18_num1_art:564
- Huaranga Moreno, F. R., Rodríguez Rodríguez, E. F., Méndez García, E. F. y Bernuí Paredes, F. (2021).** «Especies bioindicadoras de contaminación por relaves mineros en el Sector Samne, La Libertad-Perú, 2021». *Arnaldoa*, 28(3), pp. 633-650. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2413-32992021000300633
- Instituto Nacional de Estadística e Informática, INEI. (2015).** *Perú: Anuario de Estadísticas Ambientales 2015*. Lima: INEI. Disponible en: https://www.inei.gob.pe/media/MenuRecursivo/publicaciones_digitales/Est/Lib1342/libro.pdf
- Jiménez Ballesta, R. (2017).** *Introducción a la contaminación de suelos*. Madrid: Mundi-Prensa. Disponible en: <https://n9.cl/jvd2e>
- Jimenez, A. (2019).** *Estudio de la recuperación de metales pesados a partir de la síntesis verde de nanopartículas metálicas*. [Tesis de grado, Universidad Politécnica de Catalunya]. Disponible en: <https://upcommons.upc.edu/handle/2117/180803>
- Johnson, J. L. y Temple, K. L. (1964).** «Some variables affecting the measurement of "catalase activity" in soil». *Soil Science Society of America Journal*, 28(2), pp. 207-209. Disponible en: <https://doi.org/10.2136/sssaj1964.03615995002800020024x>
- Kanter, T. (2018).** «Disponibilidad de metales pesados en suelos modificados con desechos sólidos urbanos compostados». *Monitoreo y Evaluación Ambiental*, 112(1-3), pp. 309-326.
- Lal, R. (2019).** Rights-of-soil. *Journal of Soil and Water Conservation*, 74(4), pp. 81A-86A. Disponible en: <https://doi.org/10.2489/jswc.74.4.81A>
- Lázaro, J. C. (2015).** *Actividad enzimática en suelos contaminados por metales pesados*. [Tesis de grado. Universidad Complutense de Madrid].
- Li, Z., Ma, Z., van der Kuijp, T. J., Yuan, Z. y Huang, L. (2014).** «A review of soil heavy metal pollution from mines in China: pollution and health risk assessment». *Science of the Total Environment*, 468, pp. 843-853. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.08.090>
- Longa, E. y Rodríguez, E. (2021).** *Evaluación del efecto de los fertilizantes químicos y abonos orgánicos en suelos agrícolas con cultivo de papa - distrito de Sorochuco 2020*. [Tesis de licenciatura, Universidad Privada del Norte]. Disponible en: <https://hdl.handle.net/11537/28649>
- Medina Lara, M., Quintero Lizaola, R., Espinosa Victoria, D., Alarcon, A., Etchevers Barra, J., Trinidad LSantos, A. y Conde Martinez, F. (2018).** «Generación de un inoculante acelerador de compostaje». *Revista Argentina de Microbiología*, 50(2), pp. 206-221.
- Mendoza, L. y Yupanqui, L. (2023).** *Determinación del grado de contaminación por presencia de plaguicidas en suelos de cultivo de papa en la localidad de Sucaraylla, Andahuaylas*. [Tesis de grado, Universidad San Ignacio de Loyola].
- Menéndez, J. y Muñoz, S. (2021).** «Contaminación del agua y suelo por los relaves mineros». *Paideia*, 11(1), pp. 141-154. Disponible en: <https://doi.org/10.31381/paideia.v11i1.3622>
- Mohammad, B. T., Al Daghistani, H. I., Jaouani, A., Abdel-Latif, S. y Kennes, C. (2017).** «Isolation and characterization of thermophilic bacteria from Jordanian Hot Springs: *Bacillus licheniformis* and *Thermomonas hydrothermalis* isolates as potential producers of thermostable enzymes». *International Journal of Microbiology*, 2017, 6943952. Disponible en: <https://doi.org/10.1155/2017/6943952>
- Mendez, G. (2015).** *Minería aurífera en Madre de Dios y contaminación con mercurio*. Lima: Minam.
- Ministerio del Ambiente, Minam. (2020).** «Perú prioriza medidas para contribuir al manejo sostenible de la tierra». <https://www.gob.pe/institucion/minam/noticias/187438-peru-prioriza-medidas-para-contribuir-al-manejo-sostenible-de-la-tierra#:~:text=Perú%20prioriza%20medidas%20para%20contribuir%20al%20manejo%20sostenible%20de%20la%20tierra,-Nota%20de%20prensa&text=En%20el%20marco%20del%20D%C3%ADa,de%202020%20%2D%20%20%20%20%20p.%20m.>
- Monserrat, V. A. y Campaña, H. (2020).** Desarrollo de indicadores bioquímicos de calidad de suelos del sudoeste bonaerense con enmiendas de residuos y efluentes agroindustriales. *AJEA*, 5. Disponible en: <https://doi.org/10.33414/ajea.5.787.2020>
- Montenegro, S. P., Pulido, S. Y. y Calderón Vallejo, L. F. (2020).** «Prácticas de biorremediación en suelos y aguas». Bogotá: Sello Editorial UNAD. Disponible en: <https://doi.org/10.22490/notas.3451>



- Millán, E. M. (2015).** *Evolución de la actividad enzimática de un suelo contaminado con hidrocarburos aromáticos policíclicos*. [Tesis de grado, Universidad Pablo de Olavide]. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10261/132358>
- Mori, F. y Candell, E. (2017).** *Los microelementos en la agricultura*. La Habana: Agroinfo.
- Muñoz Macas, W. A. (2019).** *Producción de biofertilizante a partir de la descomposición de biomasa a través de biogestores*. [Tesis de grado, Universidad Técnica de Babahoyo]. Disponible en: <http://dspace.utb.edu.ec/handle/49000/6162>
- Muyulema-Allaica, J. C., Canga-Castillo, S. M., Pucha-Medina, P. M. y Espinosa-Ruiz, C. G. (2019).** «Evaluación de la contaminación por metales pesados en suelos de la Reserva Ecológica de Manglares Cayapas Mataje (REMACAM)-Ecuador». *RIIIT. Revista internacional de investigación e innovación tecnológica*, 7(41), pp. 40-61. Disponible en: https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-97532019000600003
- Naccarato, A., Tassone, A., Cavaliere, F., Elliani, R., Pirrone, N., Sprovieri, F., Tagarelli, A. y Giglio, A. (2020).** «Agrochemical treatments as a source of heavy metals and rare earth elements in agricultural soils and bioaccumulation in ground beetles». *Science of the Total Environment*, 749(1), 141438. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141438>
- Olaya Rojas, M. P. y Triviño Cortés, K. A. (2019).** *Estudio de las características físicoquímicas de suelos y sedimentos y su influencia en las actividades productivas de la zona afectada por derrames de hidrocarburos en el río Mira*. [Trabajo de grado, Universidad del Valle]. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10893/17832>
- Parada, V. M. (2016).** *Inhibición dual de ureasa y anhidrasa carbónica como estrategia para limitar la capacidad de colonización de Helicobacter pylori por parte de procianidinas naturales y sus derivados semi-sintéticos*. [Tesis de maestría, Universidad de Concepción]. Disponible en: <http://repositorio.udec.cl/jspui/handle/11594/2193>
- Paul, E. A. (2007).** *Soil microbiology, ecology and biochemistry*. (4.ª ed.). Cambridge: Academic Press. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B978008047514500056>
- Passatore, L., Rossetti, S., Juwarkar, A. A. y Massacci, A. (2014).** «Phytoremediation and bioremediation of polychlorinated biphenyls (PCBs): state of knowledge and research perspectives». *Journal of Hazardous Materials*, 278, pp. 189-202. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.05.051>
- Pérez, G. R., Nasello, W. y Murno, G. (2016).** *Fosfatasa alcalina, su interpretación clínica patológica*. [Tesis de grado, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires]. Disponible en: <https://www.ridaa.unicen.edu.ar/bitstream/handle/123456789/524/PEREZ,%20GEORGINA.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Pinzón, C. P. y Fajardo Gomez, C. A. (2018).** «Impacto del mercurio en los ecosistemas colombianos y las técnicas aplicables para su biorremediación». Working Paper de la Escuela de Ciencias Agrícolas, Pecuarias y del Medio Ambiente, ECAPMA, 2(1). Disponible en: <https://doi.org/10.22490/ECAPMA.2774>
- Puente, G. y Astete, Z. (2016).** *Respuesta de organismos microbianos (acuáticos y terrestres) a los pesticidas*. *Publicaciones de Apoyo de la EFSA*, 9 (11).
- Quiceno-Vallejo, M. F., Escobar, M. C. y Vásquez, Y. (2020).** «Impacto de los drenajes de mina sobre los microorganismos del suelo». *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 44(170), pp. 241-256. Disponible en: <https://doi.org/10.18257/raccefyn.940>
- Ramos Cordero, C., Servicio de Residuos del Cabildo de Gran Canaria, Laich, F., Hristova, H. y Hernández Suárez, E. (2018).** «Viabilidad del compostaje de los restos de poda de palmera infestada por *Diocalandra frumenti* Fabricius, para su aplicación como abono orgánico en jardinería». Disponible en: https://www.icia.es/icia/download/publicaciones/Viabilidad_Compostaje.pdf
- Ramsey, M. (2016).** «Extracción secuencial de suelos de análisis de elementos múltiples».
- Reyes, A. O. (2019).** «Características de la actividad enzimática y el humus en suelos de chinampa». *Terra Latinoamericana*, 37(4), pp. 339-349. Disponible en: <https://doi.org/10.28940/terra.v37i4.487>
- Rivera Ortiz, P., Rivera Lárraga, J., Andrade Limas, E., Heyer Rodríguez, L., Garza Requena, F. y Castro Meza, B. (2018).** «Bioestimulación y biorremediación de recortes de perforación contaminados con hidrocarburos». *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 34(2), pp. 249-262. Disponible en: <https://doi.org/10.20937/rica.2018.34.02.06>
- Rodríguez-Eugenio, N., McLaughlin, M. y Pennock, D. (2018).** *Soil pollution: A hidden reality*. Roma: FAO. Disponible en: <https://www.fao.org/3/I9183EN/i9183en.pdf>
- Ruiz, C. V. (2020).** *Precipitación de carbonatos inducida microbiológicamente como alternativa para remediar entornos naturales contaminados con metales y metaloides tóxicos*. [Tesis de maestría, Universidad Nacional de Colombia]. Disponible en: <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/78261>
- Samuel, A. D., Bungau, S., Tit, D. M., Melinte, C. E., Purza, L. y Badea, G. E. (2018).** «Effects of long term application of organic and mineral fertilizers on soil enzymes». *Revista de Chimie*, 69(10), pp. 2608-2612. Disponible en: <https://doi.org/10.37358/RC.18.10.6590>
- Toledo, E., Santana, A., Sánchez, A., Romero, Y., Ortega, S. y Toribio, J. (2020).** «Aislamiento e identificación de bacterias tolerantes y bioacumuladoras de metales pesados, obtenidas de los jales mineros El Fraile, México». *Terra Latinoamericana*, 38(1), pp. 67-75. Disponible en: <https://doi.org/10.28940/terra.v38i1.430>
- Sahay, H., Yadav, A. N., Singh, A. K., Singh, S., Kaushik, R. y Saxena, A. K. (2017).** «Hot springs of Indian Himalayas: potential sources of microbial diversity and thermostable hydrolytic enzymes». *3 Biotech*, 7(2). Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0762-1>
- Saucedo-Uriarte, J., Díaz-Quevedo, C., Milla, M., Durand, L., Linares, J., Vásquez, H. y Quispe-Ccasa, H. (2023).** «Sustentabilidad productiva de la instalación de sistemas silvopastoriles: una revisión sistemática basada en la realidad de Perú y Colombia». *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 24(2), e3048. Disponible en: https://doi.org/10.21930/rcta.vol24_num2_art:3048
- Simbaña, C. J. (2016).** *Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos de la Parroquia Taracoa en Francisco de Orellana, mediante el hongo Pleurotus ostreatus*. [Tesis de grado, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo]. Disponible en: <http://dspace.epoch.edu.ec/bitstream/123456789/4916/1/236T0192.pdf>
- Simas, D., Acevedo, L., Vasconcelos, U. y Pereira, N. (2018).** «Caracterización de B-glucosidasas producidas por *Aspergillus niger* Atcc 1004 en fermentación sumergida de bagazo de azúcar». *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 17(1), pp. 365-377. Disponible en: <https://acortar.link/9cOodo>
- Tabatabai, M. A. y Bremner, J. M. (1972).** «Assay of urease activity in soils». *Soil Biology and Biochemistry*, 4(4), pp. 479-487. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(72\)90064-8](https://doi.org/10.1016/0038-0717(72)90064-8)
- Torres, F. y Rojas, A. (2018).** «Suelo agrícola en México: retrospectiva y prospectiva para la seguridad alimentaria». *Revista Internacional de Estadística y Geografía*, 9(3), pp. 137-155. Disponible en: <https://n9.cl/gloqkq>

- Tortora, M., Ludueña, L., Fernández de Ullivarri, J., Núñez, M., Romero, E. y Dígonzelli, P. (2020).** «Indicadores biológicos del suelo asociados a diferentes sistemas de manejo del residuo agrícola de la cosecha de la caña de azúcar». *Revista Industrial y Agrícola de Tucumán*, 97(1), pp. 17-25. Disponible en: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1851-30182020000100003
- Vasquez, J. A. (2017).** *Caracterización de los mecanismos moduladores en la transmisión de información de vías de señalización*. [Tesis de doctorado, Universidad Cinvestav]. Disponible en: <https://repositorio.cinvestav.mx/handle/cinvestav/3244>
- Vallejo Quintero, V., Sandoval Cobo, J., Garagoa Barahona, S. y Bastos Arenas, J. (2016).** «Evaluación del efecto de la bioestimulación sobre la biorremediación de hidrocarburos en suelos contaminados con alquitrán en Soacha, Cundinamarca - Colombia». *Acta Agronómica*, 65(4), pp. 354-361. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.15446/acag.v65n4.51013>
- Vergara, P. J. (2015).** *Caracterización de la degradación y los cambios de usos del suelo en fincas ganaderas y su relación con la diversidad de aves en el valle de río Cesar, Colombia*. [Tesis de grado, Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza]. Disponible en: https://repositorio.catie.ac.cr/bitstream/handle/11554/7203/Caracterizacion_de_la_degradacion.pdf?sequence=1
- Wei, X., Ge, T., Zhu, Z., Hu, Y., Liu, S., Li, Y. y Razavi, B. S. (2019).** «Expansion of rice enzymatic rhizosphere: temporal dynamics in response to phosphorus and cellulose application». *Plant and Soil*, 445(1), pp. 169-181. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11104-018-03902-0>
- Ynfa Fora, J. R. (2017).** *Efecto del relave minero en la respiración potencial y la actividad enzimática del suelo y su relación con la germinación de semillas, crecimiento de plántulas de maíz (Zea mays L.) cv Cabanita y bioacumulación de metales pesados*. [Tesis de grado, Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa]. Disponible en: <http://repositorio.unsa.edu.pe/handle/UNSA/5779>
- Zhang, H., Luo, Y., Wu, L., Huang, Y. y Christie, P. (2015).** «Residues and potential ecological risks of veterinary antibiotics in manures and composts associated with protected vegetable farming». *Environmental Science and Pollution Research*, 22, pp. 5908-5918. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11356-014-3731-9>
- Zorrilla, S. (2017).** *Aplicación de la geoquímica al estudio del vertedero de Duquesa en Santo Domingo, República Dominicana : Propuesta de tratamiento pasivo de los lixiviados*. [Tesis de maestría, E.T.S.I. de Minas y Energía]. Disponible en: <https://oa.upm.es/48285/>
- Zuñiga, O. (2018).** *Alternativas para la recuperación de suelos contaminados por actividades industriales en Colombia*. [Tesis de grado, Universidad Nacional Abierta y a Distancia]. Disponible en: <https://repository.unad.edu.co/handle/10596/28181>