



**FACULTAD DE FARMACIA**  
**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**TRABAJO DE FIN DE GRADO**

**ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN SUELOS  
CONTAMINADOS POR METALES PESADOS Y  
SUS IMPLICACIONES COMO INDICADORES  
DE CALIDAD**

**Autor:** Julián Lázaro Cebas.

**D.N.I.:** 71108122-B.

**Tutor:** Antonio Leovigildo López Lafuente.

**Convocatoria:** 2ª convocatoria, 17 de Julio de 2015.

# **ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN SUELOS CONTAMINADOS POR METALES PESADOS Y SUS IMPLICACIONES COMO INDICADORES DE CALIDAD.**

**AUTOR:** Julián Lázaro Cebas.

**TUTOR:** Antonio Leovigildo López Lafuente.

"A nation that destroys its soils destroys itself" Franklyn Roosevelt, presidente de los Estados Unidos de América, 1937 (A. J. Franzlubbers, 2006).

## **RESUMEN:**

El suelo es un recurso no renovable de vital importancia para biosfera que realiza funciones como el reciclaje de nutrientes y la descomposición de la materia orgánica. Estos procesos son llevados a cabo por las enzimas de la microbiota residente en el mismo. Las oxidoreductasas indican actividad metabólica microbiana total mientras que las hidrolasas están implicadas en el ciclo de los nutrientes esenciales. Ante la presencia de un contaminante como los metales pesados, tanto los microorganismos como sus enzimas se ven afectados negativamente, por lo que el análisis de la actividad enzimática del suelo puede utilizarse como indicador del grado de contaminación del mismo. Sin embargo existen múltiples factores (Dependientes del metal, de las enzimas, del suelo y de las plantas) que influyen en el grado de inhibición enzimática. La siguiente revisión tiene como objetivo (1) describir las enzimas más utilizadas en el análisis de suelos, su función biológica y las ventajas e inconvenientes que presenta su uso como indicador de calidad de los suelos; (2) exponer cómo afectan los metales pesados a la actividad enzimática del suelo en función de algunas características del mismo y (3) hacer referencia a algunos de los casos recogidos en la bibliografía sobre suelos contaminados por metales pesados en territorio español.

## **ABSTRACT:**

The soil is a non renewable resource of vital importance for the biosphere developing functions such as recycling of nutrients and degradation of organic matter. This processes are carried out by the enzymes of the microorganisms living in it. Oxidoreductases indicate total metabolic microbial activity while hydrolases are implied in essential nutrients cycle. When facing a contaminant such as heavy metals, both microorganisms and their enzymes are negatively affected, so enzymatic activity may be used as an indicator of contamination of soils. Nevertheless, there are multiple factors (Metal factors, Enzyme factors, soil factors and plant factors) that influence the degree of enzymatic inhibition. The following review aims (1) to describe the most used enzymes in soil analysis, its function and the advantages and disadvantages of its use as a soil quality indicator; (2) to show how heavy metals affect soil enzyme activities based on some soil characteristics and (3) to refer some of the cases reported in the literature on heavy metal contaminated soils in Spanish territory.

# ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN SUELOS CONTAMINADOS POR METALES PESADOS Y SUS IMPLICACIONES COMO INDICADORES DE CALIDAD

## **INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES:**

La vida se asemeja a un fractal, un objeto geométrico cuya estructura básica, fragmentada o irregular, se repite a diferentes escalas (L. Margulis, 1995), (M. Benoît, 1982). Los fractales de la vida son las células, los organismos pluricelulares, las comunidades de organismos y los ecosistemas. Para su desarrollo, todos ellos dependen de una serie de reacciones químicas, muchas de las cuales son demasiado lentas para sostener la vida. Por ello la naturaleza ha diseñado las enzimas, los catalizadores biológicos, que facilitan estas reacciones en todos los seres vivos (Robert A. Copeland, 2004).

El suelo es un recurso natural vivo, dinámico y no renovable fundamental para el funcionamiento global de la biosfera y su salud afecta a todos los seres vivos, incluido el hombre (Alkorta et al., 2003). Muchas de las funciones del suelo relacionadas con el mantenimiento de la vida en la tierra son realizadas por sus enzimas. Estas son producidas en su gran mayoría por la microbiota del suelo aunque también proceden de plantas y animales. En concreto, intervienen en el ciclo de nutrientes esenciales para el desarrollo de los vegetales como el nitrógeno, el fósforo y el potasio, cierran el ciclo trófico generando y descomponiendo materia orgánica y degradan residuos orgánicos contaminantes (S. K. Das, A. Varma, 2011). Tradicionalmente, para determinar la calidad de un determinado suelo, los investigadores se han basado en el

análisis de parámetros físico-químicos con potencial indicador de la salud del suelo (e.g., pH, contenido en materia orgánica, capacidad de intercambio catiónico, capacidad de retención hídrica, etc.). Pero, recientemente, los bioindicadores (un bioindicador se define como “un organismo, o parte de un organismo, o una comunidad de organismos, utilizados para obtener información sobre la calidad del medio ambiente”) de la salud del suelo han surgido con fuerza en este campo debido a su mayor sensibilidad y rapidez de respuesta frente a las perturbaciones o variables introducidas en el ecosistema suelo y, sobre todo, por su carácter integrador (C. Garbisu et al., 2007). Puesto que las enzimas del suelo catalizan todas las reacciones bioquímicas que se dan en el mismo, eso las convierte en uno de los parámetros biológicos con potencial indicador de la salud del suelo más utilizados (Alkorta et al., 2003). Por ello, un mayor conocimiento del papel de la actividad enzimática en el mantenimiento de la salud de los suelos facilitará la evaluación y valoración del estado de los mismos

En la actualidad, la actividad humana expone al suelo a multitud de agentes contaminantes. Uno de los más peligrosos por su persistencia y toxicidad a largo plazo en el suelo, su capacidad para ser bioacumulados por las plantas e incorporarse a la cadena trófica y la posibilidad de su paso a las aguas subterráneas son los metales pesados. La industria, la minería y el uso de fertilizantes en la explotación agrícola intensiva son las

principales fuentes de contaminación por metales pesados en el suelo y suponen una amenaza para la funcionalidad y sostenibilidad de este recurso así como para la salud humana (C. Micó et al., 2006).

### **OBJETIVOS:**

Los objetivos de este trabajo de revisión son (1) describir la función biológica de las enzimas más utilizadas en la realización de análisis de la calidad del suelo y las ventajas e inconvenientes que supone su uso, (2) exponer cómo afectan los metales pesados a la actividad enzimática del suelo en función de algunas características del mismo y (3) hacer referencia a algunos de los casos recogidos en la bibliografía sobre suelos contaminados por metales pesados en territorio español.

### **MATERIAL Y MÉTODOS:**

Se realizó una búsqueda desde los ordenadores de la biblioteca de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid en PubMed. Los términos utilizados fueron: Soil quality indicators, Soil enzyme activity, Heavy metals effect on enzyme activity in soil. Se seleccionaron de entre las primeras 20 opciones que ofrece el buscador de PubMed aquellas que por su abstract pudieran proporcionar información de interés. A partir de la revisión de A. Karaka et al., (2010), desde los mismos ordenadores, se realizó una búsqueda en google académico que permitiera ampliar los contenidos de la misma con los siguientes términos: pH effect enzyme activity

heavy metals, organic matter effect enzyme activity heavy metals, clay effect enzyme activity heavy metals. Se seleccionaron de la primera página de opciones que ofrece el buscador aquellos artículos que por su abstract pudieran aportar información útil para realizar el trabajo.

### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN:**

#### **1 - LAS ENZIMAS DEL SUELO:**

Las enzimas son los catalizadores de las reacciones de catabolismo de los componentes orgánicos e inorgánicos del suelo sin las cuales no puede entenderse el funcionamiento de los ecosistemas (M<sup>a</sup>. R. Albiach et al., 2006). Las actividades enzimáticas del suelo están íntimamente relacionadas con la materia orgánica, las propiedades físicas (Tipo de arcilla, los coloides y la fase acuosa del suelo) y la biomasa del suelo. En concreto, las arcillas aumentan la resistencia de las enzimas a la proteólisis e incrementan la temperatura de inactivación mientras que la materia orgánica proporciona estabilidad a los compuestos nitrogenados. La combinación de ambos factores tiene efectos sinérgicos favorables para la estabilidad de las enzimas aunque dificulta la extracción y purificación de las mismas (S. K. Das, A. Varma, 2011). Aunque en el suelo las enzimas proceden de animales, plantas y microorganismos, son estos últimos los principales productores de las mismas. (Alkorta et al., 2003). En función de la localización y su procedencia se clasifican de la siguiente manera (R.G. Burns, 1982).

## ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN SUELOS CONTAMINADOS POR METALES PESADOS Y SUS IMPLICACIONES COMO INDICADORES DE CALIDAD

- a) Enzimas Bióticas, localizadas en el citoplasma, en el espacio periplásmico o en la superficie de células viables.
- b) Enzimas Abióticas, aquellas excretadas al medio por células vivas o asociadas a restos de células muertas que son liberadas al medio. A su vez estas pueden encontrarse:
- Adsorbidas en la superficie interna o externa de las arcillas.
  - Complejadas con los coloides húmicos a través de su adsorción, atrapamiento o copolimerización en la generación de materia orgánica húmica.

En líneas generales, la actividad enzimática es mayor cuanto mayor es la concentración de materia orgánica en el suelo. A su vez, una actividad enzimática elevada indica la presencia de comunidades microbianas más grandes y una mayor estabilidad de las enzimas adsorbidas en los materiales húmicos. (C. Garbisu et al., 2007). Los ensayos enzimáticos más utilizados son los que analizan la actividad de las oxidoreductasas (Deshidrogenasa y catalasa) y las hidrolasas (Amilasa,  $\beta$ -glucosidasa, invertasa, ureasa, fosfatasa y sulfatasa). Las oxidoreductasas se relacionan con la abundancia y la actividad metabólica de los microorganismos del suelo, lo que nos proporciona una información general del estado del mismo. Por el contrario, las hidrolasas son consideradas como parámetros específicos puesto que corresponden a reacciones concretas

implicadas en los ciclos de los nutrientes básicos: C, P, N y S (M<sup>a</sup>. R. Albiach et al., 2006). (Tabla 1).

### 1.1 - OXIDORREDUCTASAS:

- DESHIDROGENASA: La actividad de la deshidrogenasa se utiliza comúnmente como indicador de la actividad microbiológica viable del suelo (Xiangping Tan et al., 2014) ya que aparece en las células viables pero no se acumula en el suelo. Esto la convierte en un indicador idóneo para detectar cambios a corto plazo o efectos estacionales transitorios (Alkorta et al., 2003). La actividad deshidrogenasa es la suma de varias enzimas del metabolismo redox de la célula representando la capacidad oxidativa total de la microflora. Su actividad varía en función de la disponibilidad de oxígeno, lo que la relaciona íntimamente con el contenido de aire y agua del suelo. Así, en un suelo anegado se reduce drásticamente la cantidad de oxígeno disponible reduciéndose la actividad deshidrogenasa al tiempo que se incrementa el metabolismo anaerobio. Por el contrario, en un suelo poroso y aireado la actividad deshidrogenasa total estará aumentada (S. K. Das, A. Varma, 2011). La deshidrogenasa es sensible ante la presencia de metales pesados en el suelo (Yu Xiang et al., 2014).
- CATALASA: La actividad de la catalasa, al igual que la deshidrogenasa, se considera como un indicador de la actividad de la microflora aerobia del suelo (Xiangping Tan

et al., 2014). Es una enzima intracelular que descompone el  $H_2O_2$  en oxígeno y agua y fue la primera enzima investigada en los suelos (F. P. Jorge, 2006).

### 1.2 - HIDROLASAS:

- AMILASA: La amilasa interviene en el ciclo del C. Existen dos tipos de amilasa, la alfa amilasa y la beta amilasa. La alfa amilasa es sintetizada por plantas, animales y microorganismos mientras que la beta amilasa es sintetizada principalmente por las plantas. Tanto la alfa como la beta amilasa aparecen ampliamente distribuidas en el suelo y se encargan de degradar el almidón procedente de los restos de las plantas en glucosa y en maltosa respectivamente. La actividad enzimática de la amilasa se ve afectada por el tipo de vegetación del suelo de forma directa proporcionando enzimas al suelo procedentes de sus residuos o indirectamente proporcionando nutrientes a la microflora del suelo (S. K. Das, A. Varma, 2011).
- $\beta$ -GLUCOSIDASA: La  $\beta$ -glucosidasa o celobiasa recibe su nombre del tipo de enlace que hidroliza y tiene un rol importante en el ciclo del C. Su sustrato fundamental es la celobiosa, el disacárido producto final de la degradación de la celulosa por las celulasas, obteniéndose como producto final dos moléculas de glucosa. Es una enzima extracelular que se encuentra adsorbida en la superficie de partículas minerales y coloides orgánicos y que persiste tras la desaparición de la microflora, por lo que su análisis puede usarse para determinar la actividad biológica pasada (Alkorta et al., 2003). La  $\beta$ -glucosidasa además es muy sensible a cambios en el pH siendo un buen indicador biológico para detectar cambios producidos por una acidificación del suelo (S. K. Das, A. Varma, 2011).
- INVERTASA: La invertasa, al igual que la amilasa y la  $\beta$ -glucosidasa, interviene en el ciclo del C. También es conocida como sacarasa pues se encarga de hidrolizar el disacárido sacarosa obteniéndose como producto una molécula de glucosa y otra de fructosa. La enzima procede de los microorganismos y de los exudados radiculares de las plantas y actúa tanto intra como extracelularmente. Su actividad se ve afectada por las prácticas de cultivo, la vegetación y la materia orgánica del suelo (F. P. Jorge, 2006).
- UREASA: La ureasa se encarga de hidrolizar la urea procedente de los fertilizantes dando como producto  $CO_2$  y  $NH_4^+$  con el consiguiente incremento del pH del suelo (Xiangping Tan et al., 2014). La enzima procede tanto de plantas como de microorganismos, aunque la mayor parte de la actividad se debe a los microorganismos. Puede encontrarse tanto intracelularmente como estabilizada en los coloides orgánicos. La ureasa es importante en la inmovilización del nitrógeno en suelos agrícolas ya que un déficit de ureasa provoca la pérdida por

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN SUELOS CONTAMINADOS POR METALES PESADOS Y SUS  
IMPLICACIONES COMO INDICADORES DE CALIDAD

Enzima	Sustrato	Producto	Importancia para el suelo	Información obtenida
Deshidrogenasa	Compuestos de carbono	Glucosa + CO <sub>2</sub>	Descomposición de materia orgánica	Abundancia y activ. metabólica de MO
Catalasa	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	O <sub>2</sub> + H <sub>2</sub> O	Detoxificación de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Abundancia y activ. metabólica de MO
Amilasa	Almidón	Glucosa y oligosacáridos	Glucosa disponible para MO y plantas	Ciclo del C
β-glucosidasa	Celobiosa	Glucosa	Glucosa disponible para MO y plantas	Ciclo del C
Invertasa	Sacarosa	Glucosa + Fructosa	Glucosa disponible para MO y plantas	Ciclo del C
Ureasa	Urea	CO <sub>2</sub> + NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Disponibilidad de NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Ciclo del N
Fosfatasa	Po	Pi (PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> )	Disponibilidad de PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	Ciclo del P
Sulfatasa	So	Si (SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> )	Disponibilidad de SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Ciclo del S

**Tabla 1** - Se muestra de forma esquematizada las principales características de las enzimas oxidorreductasas e hidrolasas, su sustrato, el producto de la reacción, la importancia del proceso en el suelo y la información obtenida de su análisis. Abreviaturas: (MO) microorganismo, (Po) Fósforo orgánico, (Pi) Fósforo inorgánico, (So) Azufre orgánico, (Si) Azufre inorgánico.

lavado del fertilizante añadido en forma de urea mientras que un exceso provoca una elevada hidrólisis de la urea y la consiguiente pérdida de amonio por volatilización. La actividad enzimática de la ureasa se ve afectada por múltiples factores, uno de ellos es la contaminación por metales pesados (S. K. Das, A. Varma, 2011).

- **FOSFATASA ÁCIDA Y ALCALINA:** Las fosfatasas juegan un papel crucial en el ciclo del P produciendo su mineralización de P orgánico (Esteres y anhídridos del ácido fosfórico) a P inorgánico (ion PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) asimilable por las plantas. Las fosfatasas se clasificaron de acuerdo al pH óptimo para su actividad en fosfatasas ácidas y fosfatasas alcalinas. La presencia de un tipo de fosfatasa u otra está determinada por el pH

del suelo de tal forma que las ácidas aparecen en suelos ácidos mientras que las alcalinas aparece en suelos con pH básico (Leticia Andrea Fernández et al., 2008). Su actividad se relaciona de forma inversa a la presencia de P libre y reacciona ante perturbaciones exógenas como la deficiencia de P en el suelo. Ante esa perturbación, las plantas y los microorganismos incrementan la secreción de fosfatasa para incrementar la movilidad del P transformándolo en el ión PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> asimilable. (Alkorta et al., 2003).

- **SULFATASA:** Las sulfatasas intervienen en el ciclo del S. El S en el suelo se encuentra en su gran mayoría en forma orgánica (Esteres de azufre) y son principalmente los microorganismos con su actividad sulfatasa los que lo degradan a su forma inorgánica

$\text{SO}_4^{2-}$  disponible por las plantas. Además de satisfacer las necesidades de S, las sulfatasas degradan algunos xenobióticos perjudiciales. Son enzimas principalmente extracelulares y existen distintos tipos (Arilsulfatasas, alquilsulfatasas, mirosulfatasas, etc.). La actividad sulfatasa se relaciona inversamente con la cantidad de S inorgánico del suelo e incrementa su actividad cuando la humedad es elevada (F. P. Jorge, 2006).

A parte de las ya mencionadas, en el suelo existen otras muchas enzimas que si bien están menos estudiadas y son menos utilizadas, podrían constituir un buen indicador biológico (ej. transferasas, liasas y las que hidrolizan el diacetato de fluoresceína) (Alkorta et al., 2003).

### 1.3 - VENTAJAS E INCONVENIENTES DEL ANÁLISIS ENZIMÁTICO EN SUELOS CONTAMINADOS:

La actividad enzimática de las enzimas expuestas anteriormente refleja la situación biológica del suelo pues están fuertemente ligadas a procesos esenciales para el funcionamiento del ecosistema como los ciclos de los nutrientes C, N, P y S (Sonia Sethi et al., 2015). Además, la actividad enzimática cambia con mayor velocidad que otros parámetros proporcionando información más rápida sobre perturbaciones en la salud del suelo. Otro punto a su favor es que son fáciles de medir y existen ensayos bien definidos para un gran número de enzimas. Todo esto las convierte en unos indicadores de gran valor para evaluar la salud del suelo (S. K. Das, A. Varma, 2011). No

obstante, la diversidad microbiológica depende de múltiples reacciones y de la relación entre los distintos microorganismos, por lo que la medida de una sola enzima no es representativa del estado de la microflora del suelo. Por el contrario, la medida de varias actividades enzimáticas puede usarse como índice de la fertilidad bioquímica del suelo (Alkorta et al., 2003). Aun así, las actividades enzimáticas sufren drásticas variaciones estacionales y espaciales además de variar en función del tipo de suelo y otros factores fisicoquímicos. Por ello, es necesario generar modelos multiparamétricos que incluyan no solo la actividad enzimática, sino también indicadores fisicoquímicos y otros bioindicadores que reduzcan los efectos de estas variaciones (Xiangping Tan et al., 2014). Por último, existen una serie de problemas derivados de la metodología seguida para su análisis. Los análisis de medida de la actividad enzimática se realizan in vitro con unas condiciones óptimas de pH, temperatura y concentración de sustrato, por lo que los resultados obtenidos no se corresponden con la actividad en condiciones reales de campo. Sin embargo, sí que permiten conocer la potencialidad de un suelo para una determinada actividad enzimática (M<sup>a</sup>. R. Albiach et al., 2006).

### 2 - LOS CONTAMINANTES DEL SUELO:

Los contaminantes en el suelo se comportan de diferente manera en función de su naturaleza y de las características del suelo. Por ejemplo, los contaminantes orgánicos



pueden degradarse en compuestos más o menos tóxicos mientras que, por el contrario, los metales pesados no se degradan pero puede verse modificada su biodisponibilidad. Una vez en el suelo, los contaminantes pueden volatilizarse, degradarse, pasar al agua del suelo y de ahí al agua subterránea, quedar retenidos en el suelo o ser transmitidos a los organismos. Los factores ambientales del suelo que afectan al comportamiento de los contaminantes son: El pH, la humedad, la estructura el contenido y el tipo de arcilla, la temperatura y la presencia de otros compuestos químicos (H. Shayler et al., 2009).

### **2.1 - LOS METALES PESADOS:**

Los metales pesados son considerados como una de las mayores fuentes de contaminación de los suelos causando efectos tóxicos a largo plazo que influyen negativamente en los procesos biológicos del ecosistema suelo. (C. Micó et al., 2006). Estos efectos los causan de una de las siguientes maneras: (1) Sufriendo reacciones de tipo redox las cuales generan especies reactivas de oxígeno (ROS) que producen estrés oxidativo en los microorganismos del suelo; (2) uniéndose a los grupos tiol (SH) de las proteínas provocando su inactivación y desnaturalización; (3) uniéndose al glutatión (GSH) intracelular o a las enzimas antioxidantes de los microorganismos como la catalasa, la GSH-reductasa y la superóxido dismutasa; y (4) compitiendo con los cofactores metálicos de las metaloenzimas provocando su

inactivación (Maitha M. Alnuaimi et al., 2012). Además de afectar a los microorganismos, la contaminación por metales pesados implica un riesgo adicional para los seres vivos, entre ellos el hombre, debido a la facilidad con la que las plantas son capaces de bioacumularlos en sus tejidos y el consiguiente paso a la cadena trófica. (H. Shayler et al., 2009). Existen infinidad de estudios que corroboran este hecho que ha llegado a producir graves desastres como el conocido caso de la enfermedad de itai-itai, provocada por la ingesta de arroz contaminado con Cd. Los metales pesados también pueden filtrarse a las aguas subterráneas llegando al hombre por el agua de consumo o indirectamente a través del consumo de alimentos de origen marino que los bioacumulen. Un ejemplo de esto es el caso de la enfermedad de la bahía de Minamata en la que la bioacumulación y biomagnificación del Hg vertido por una industria química a lo largo de la cadena trófica marina provocó la intoxicación de la población de la zona la cual basaba su alimentación fundamentalmente en el pescado capturado en las aguas de la bahía. Por ello las concentraciones de metales pesados en los suelos, especialmente en los de uso agrario están reguladas y monitorizadas por la Directiva 86/278/CEE del Consejo de 12 de junio de 1986 transpuesta por el RD 1310/1990, de 29 de octubre, por el que se regula la utilización de los lodos de depuración en el sector agrario, (Tabla 2).

Los metales pesados que normalmente aparecen en los suelos contaminados son Pb, Cd, Ni, Zn, As, Cr, Cu y Hg (A. Karaka et al., 2010). Algunos de ellos aparecen de forma natural en el suelo como consecuencia del proceso de pedogénesis, que implica la meteorización de rocas que los contienen. Este proceso geológico es lento y conforma los valores de fondo para cada uno de los metales en un determinado suelo que rara vez alcanzan concentraciones tóxicas. Sin embargo el ciclo geológico de los metales pesados se ve alterado por la actividad humana. Las fuentes de contaminación antropogénica más comunes son la actividad industrial, la minería y las fundiciones, la combustión de carbón, las pinturas y las gasolinas con plomo, los pesticidas, el uso de abonos animales y lodos de depuradora como fertilizante y el regado con aguas de origen residual. Los metales pesados de origen humano tienden a ser más móviles que los de origen natural (Raymond A. Wuana et al., 2011).

## **2.2 - LOS METALES PESADOS INHIBEN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DEL SUELO:**

Los metales pesados afectan a las enzimas del suelo (J. Wyszowska et al., 2012). Existe una extensa bibliografía que relaciona los metales pesados con la inhibición de la actividad enzimática del suelo. Pero cada suelo es diferente y contiene una microflora distinta, por lo que los resultados obtenidos varían de un estudio a otro y hace imposible extrapolar los

resultados obtenidos en un tipo de suelo al resto. En su revisión bibliográfica, A. Karaka et al., (2010), establece cuatro tipos o clases de factores que influyen en la inhibición enzimática por parte de los metales pesados: (1) dependientes del metal; (2) dependientes del enzima; (3) dependientes del suelo y (4) dependientes de las plantas (Tabla 3).

### **2.2.1 - FACTORES DEPENDIENTES DEL METAL:**

- **TIPO DE ELEMENTO:** La fuerza de la inhibición depende de la afinidad que tenga el metal por la enzima. La inhibición de la  $\beta$ -glucosidasa sigue la siguiente secuencia: Cd > Zn > Cu > Co (Sonia Sethi et al., 2015). Según Shen et al., (2005) la inhibición de la ureasa generalmente sigue la siguiente secuencia: Cr > Cd > Zn > Mn > Pb. El mismo estudio afirmaba que la presencia combinada de varios metales como el Cd y el Zn produce una interacción negativa por competición en la unión a los sitios de sorción (A. Karaka et al., 2010). Lo mismo ocurre con la presencia conjunta de Cu y Cd,

Parámetros	Valores límite	
	Suelos pH < 7	Suelos pH > 7
Cd	1	3
Cu	50	210
Ni	30	112
Pb	50	300
Zn	150	450
Hg	1	1,5
Cr	100	150

**Tabla 2** - Valores límite de concentración de metales pesados en los suelos de uso agrario. Concentración expresada en mg/Kg de materia seca (BOE núm. 262 Jueves 1 noviembre 1990)

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN SUELOS CONTAMINADOS POR METALES PESADOS Y SUS  
IMPLICACIONES COMO INDICADORES DE CALIDAD

Dependientes del metal	Dependientes del enzima	Dependientes del suelo	Dependientes de las plantas
Tipo de elemento	Sensibilidad del enzima	pH	Acumulación del metal
Concentración	Tipo de inhibición	Materia orgánica	Comunidad de plantas
Biodisponibilidad	Variaciones estacionales	Contenido de arcilla	

**Tabla 3** - Factores que determinan la inhibición enzimática por los metales pesados.

aunque algunos estudios han obtenido resultados contrarios (J. Wyszowska et al., 2012).

- **CONCENTRACIÓN DEL METAL:** Todos los metales, incluidos los metales pesados están presentes a bajas concentraciones en los suelos. Algunos de los elementos metálicos son micronutrientes esenciales para los microorganismos. El Zn, por ejemplo, es necesario para el funcionamiento de muchas enzimas como la anhidrasa carbónica, algunas deshidrogenasas, las DNA y RNA polimerasa, t-RNA transferasa etc. pero, a elevadas concentraciones produce inhibición enzimática (J. Wyszowska et al., 2012). A bajas concentraciones se ha observado que el Pb y el Cd estimulan la actividad enzimática del suelo pero la inhiben a altas concentraciones, aunque por regla general, el incremento de la concentración de los metales pesados produce un incremento en el grado de inhibición de la actividad enzimática (A. Karaka et al., 2010). (Tabla 4).

- **BIODISPONIBILIDAD:** Se define como la fracción de contaminante en las partículas del suelo capaz de llegar a los organismos.

La biodisponibilidad de los metales depende de muchos factores, la gran mayoría relacionados con el tipo de suelo, y decae con el tiempo de contacto del metal con el suelo. Khan et al., (2007) propuso que la toxicidad para las enzimas del Cd sería mayor que la del Pb debido a la mayor movilidad del Cd en el suelo, lo que hace que pueda alcanzar con mayor facilidad a las enzimas. (A. Karaka et al., 2010). Un estudio de Pradip Bhattacharyya et al., (2007) estudió la inhibición de la  $\beta$ -glucosidasa por el As. La actividad enzimática se relacionó negativamente con las fracciones de As más lábiles (Fracción soluble e intercambiable) mientras que las fracciones más inmóviles (unidas a óxidos de Fe y Mn, Carbonatos y materia orgánica), a pesar de estar en mayor concentración en el suelo estudiado, no

[Ion metálico] (nmol)	A. enzimática normalizada		
	Hg <sup>2+</sup>	Cu <sup>2+</sup>	Cd <sup>2+</sup>
0	100	100	100
5	52,3	72,3	90,8
10	41,8	27,7	86,9
20	11,8	0,5	71,6
30	2,7	0,2	52,7

**Tabla 4** - Inhibición de la fosfatasa alcalina de E. coli a concentraciones crecientes de Hg, Cu y Cd. Adaptado de Maitha M. Alnuaimi et al., 2012.

afectaron significativamente a la actividad del enzima. La biodisponibilidad depende también de la forma química en la que se encuentre el metal. (A. Karaka et al., 2010).

### 2.2.2 - FACTORES DEPENDIENTES DEL ENZIMA:

- SENSIBILIDAD DEL ENZIMA: Cada enzima tiene una estructura diferente por lo que el grado de inhibición depende de cada una de ellas. Un estudio de Wyszowska et al., (2006) determinó que la sensibilidad de las enzimas del suelo a los metales pesados decrecía siguiendo este orden: Deshidrogenasa > Ureasa > Fosfatasa alcalina > Fosfatasa ácida. La amilasa sin embargo sólo es inhibida por el Cd en una pequeña proporción, mientras que Zn, Cu y Co no tienen efecto sobre la misma (Sonia Sethi et al., 2015). Otros estudios han demostrado que la deshidrogenasa es más sensible a la contaminación combinada de metales pesados e hidrocarburos aromáticos policíclicos como el fenantreno y el benzopireno A. Estos estudios sugieren que la deshidrogenasa podría ser un buen indicador de contaminación combinada particularmente al inicio de la contaminación. Los estudios consultados difieren en los resultados obtenidos lo que posiblemente se deba a la distinta estructura y composición de los suelos sobre los que se realizaron. (A. Karaka et al., 2010).
- TIPO DE INHIBICIÓN: Se han realizado varios estudios que proponen diversos

mecanismos de inhibición. Según Tejada et al., (2008), los metales pesados inhiben a las enzimas de tres formas: (1) complejando al sustrato, (2) combinándose con aminoácidos del centro activo de la enzima y (3) reaccionando con el complejo enzima-sustrato. Otro estudio de D'Ascoli et al., (2006) afirma que los metales pesados desnaturalizan las enzimas y compiten con los metales necesarios para el funcionamiento del centro activo. Maitha M. Alnuaimi et al., (2012) estudió la inhibición de la fosfatasa alcalina de *E. coli* por Hg, Cu y Cd. El Hg podría inhibirla al unirse a los grupos SH del enzima. Esto provocaría la pérdida de la estructura del enzima al impedir la formación de los enlaces de tipo puente disulfuro. El Cu podría alterar su estabilidad debido a las reacciones redox que sufre en el suelo y el Cd podría desplazar al catión  $Zn^{2+}$  nativo de la enzima. Otros muchos trabajos resaltan la interacción de los metales pesados con los grupos SH de las enzimas lo que sugiere que este es uno de los mecanismos de inhibición más extendido. (A. Karaka et al., 2010).

- VARIACIONES ESTACIONALES: Como se ha comentado antes, las enzimas sufren variaciones estacionales significativas (Xiangping Tan et al., 2014), pues derivan de microorganismos y plantas que muestran variación estacional en su actividad. Un estudio de Zhang et al., (2008) encontró que había diferencias estacionales en el grado de inhibición enzimática por parte de los

metales pesados y la estación del año, siendo mayor en primavera y verano y menor en otoño. (A. Karaka et al., 2010).

### 2.2.3 - FACTORES DEPENDIENTES DEL SUELO:

- **pH:** Las enzimas son sensibles a cambios en el pH del suelo. Cuando un metal llega al suelo modifica el pH, generalmente acidificándolo. (A. Karaka et al., 2010). El pH afecta a la solubilidad de los hidróxidos, los carbonatos y los fosfatos metálicos. Un incremento del pH favorece la retención de los cationes metálicos en el suelo al (1) incrementar su adsorción, (2) complejarlos o (3) provocar su precipitación. Chip Appel et al., 2002 estudió el efecto del pH sobre la adsorción del Pb y el Cd en tres suelos tropicales (Mollisol, ultisol y oxisol). En todos los suelos un incremento del pH incrementó la adsorción del metal (Fig. 1). Chip Appel et al., 2002 también determinó que el incremento del pH en los suelos compuestos por minerales de carga variable (Oxisol y ultisol) producía un incremento de las cargas negativas. Por tanto, a menor pH del suelo existe mayor cantidad de metal libre para interactuar con las enzimas e inhibirlas. Sin embargo, muchos de los centros activo de las enzimas están formados por aminoácidos con carga tales como los ácidos glutámico y aspártico, que son afectados por las variaciones de pH. En este sentido Geiger et al. (1998) observó que con una concentración de Cu = 200  $\mu\text{m}$  a pH 5,5

la inhibición de la  $\beta$ -glucosidasa era mayor que a pH 4. (A. Karaka et al., 2010). El pH influye tanto en los metales como en las enzimas, por tanto es un valor a tener muy en cuenta a la hora de sacar conclusiones derivadas de los análisis de la actividad enzimática en los suelos.

- **CONTENIDO EN MATERIA ORGÁNICA:** Algunos estudios han demostrado que la adición de materia orgánica al suelo en forma de biosólidos compostados reduce la toxicidad de los metales pesados sobre las enzimas. Tejeda et al., (2008) establece que esto es debido a dos factores: (1) Las enzimas intra y extracelulares estimulan la actividad microbiana en los materiales añadidos y (2) los alcoholes, los fenoles, los grupos carboxilo y carbonilo de la materia húmica añadida reaccionan quelando los iones metálicos incrementando su estabilidad. (A. Karaka et al., 2010). Sin embargo, el uso de fertilizantes procedentes del tratamiento de las aguas residuales supone también un peligro para el suelo ya que estos pueden contener muchas sustancias contaminantes, entre ellas los

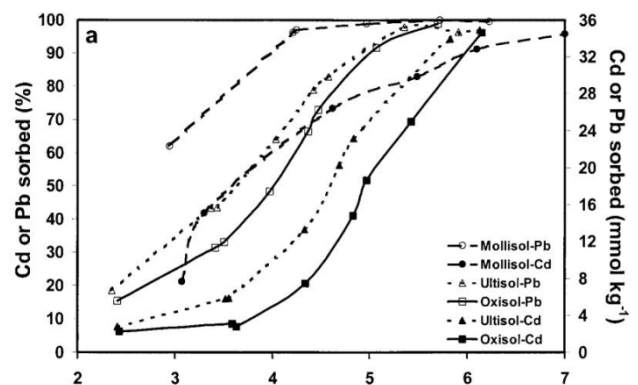


Fig. 1 - Porcentaje de Pb y Cd adsorbido en tres tipos de suelo en función del pH. Adaptado de Chip Appel et al., 2002

metales pesados. En este sentido, algunos de los estudios consultados como el de Adel Usman et al., (2005) estudiaban la contaminación por metales pesados en suelos contaminados por la adición de lodos de depuradora. Los niveles máximos permitidos de metales pesados en estos fertilizantes se regulan también en el RD 1310/1990 (Tabla 4). Un estudio de D'Ascoli et al. (2006) determinó que la materia orgánica era capaz de enmascarar los efectos negativos del Cu sobre la comunidad microbiana (A. Karaka et al., 2010). Yu Xian et al., (2015) estudió la relación entre la actividad enzimática de la arilsulfatasa en 37 suelos contaminados con Pb ( 500 mg kg<sup>-1</sup> de suelo ) y distintas propiedades de los suelos (pH, contenido en arcilla, contenido en materia orgánica y contenido en arena). Los resultados mostraron no solo que a mayor porcentaje de materia orgánica la inhibición de la arilsulfatasa fue menor, sino que a partir de un cierto grado de materia orgánica esta potenciaba la actividad de la enzima con

Parámetros	Valores límite	
	Suelos pH < 7	Suelos pH > 7
Cd	20	40
Co	1000	1750
Ni	300	400
Pb	750	1200
Zn	2500	4000
Hg	16	25
Cr	1000	1500

**Tabla 4** - Valores límite de concentración de metales pesados en los lodos destinados a su utilización agraria. Concentración expresada en mg/Kg de materia seca (BOE núm. 262 Jueves 1 noviembre 1990).

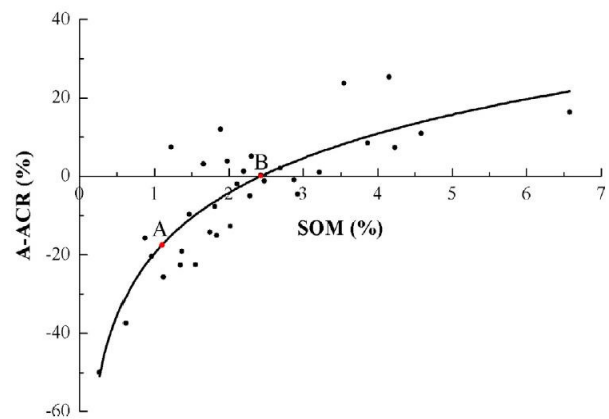
respecto al suelo control. La relación entre el grado de inhibición y el porcentaje de materia orgánica del suelo se ajustó a una representación logarítmica (Fig. 2).

$$y = a + b \ln (x+c)$$

Donde y representa el grado de inhibición enzimática y x el porcentaje de materia orgánica. La actividad enzimática se representa como porcentaje de ACR "Activity Change Ratio" la cual se calcula usando la siguiente ecuación.

$$ACR (\%) = \frac{(A_h - A_c)}{A_c} \times 100$$

Donde A<sub>h</sub> y A<sub>c</sub> representan la actividad enzimática en el suelo contaminado y en el suelo control respectivamente. El punto A=1,05 % representa el porcentaje límite de materia orgánica en el suelo por debajo del cual se produce un rápido descenso de la actividad enzimática. El punto B=2,42 % representa el porcentaje de materia orgánica a partir del cual la materia orgánica tiene efecto protector sobre la contaminación por Pb. Yu Xian et al., (2015) concluye que su modelo fue obtenido bajo unas condiciones



**Fig. 2** - Porcentaje de inhibición de la arilsulfatasa (A-ACR %) frente al porcentaje de materia orgánica en el suelo (SOM %). Ecuación  $ACR_{Pb} = -18,5 + 21,4 \times \ln(SOM - 0,05)$ .  $R^2 = 0,7073$  (Yu Xian et al., 2015).

## ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN SUELOS CONTAMINADOS POR METALES PESADOS Y SUS IMPLICACIONES COMO INDICADORES DE CALIDAD

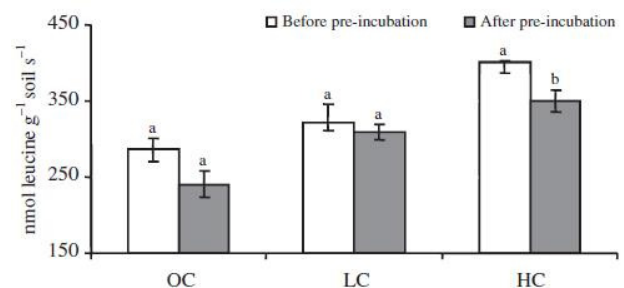
determinadas y que son necesarios más estudios en diferentes tipos de suelos para poder integrarlo en el análisis de riesgo ecológico cuantitativo. No obstante, estos resultados podrían explicar los resultados contradictorios de actividades enzimáticas obtenidos en otros estudios sobre suelos contaminados con varios metales pesados.

- **CONTENIDO DE ARCILLA:** El contenido y el tipo de arcilla, al igual que el de materia orgánica, influye en la interacción metal-enzima (A. Karaka et al., 2010). Waseem Hassan et al., (2013) estudió la actividad fosfatasa, deshidrogenasa y ureasa en tres suelos de la región de Photoar en Pakistán con distinta estructura (Suelo franco con elevado contenido en arena, suelo franco con elevado contenido en arcilla y suelo franco como control). Los suelos fueron incubados con concentraciones crecientes de Cd (0, 50, 100, 15 y 200 mg kg<sup>-1</sup> de suelo) y se tomaron muestras a los 10, 20 y 30 días. La actividad enzimática más elevada se observó en el suelo franco control a 0 mg kg<sup>-1</sup> de Cd. La más baja en el suelo arenoso con 200 mg kg<sup>-1</sup> de Cd tras 30 días de incubación. Los resultados obtenidos corroboran la hipótesis de que los suelos arcillosos contribuyen positivamente en el mantenimiento de la actividad enzimática ya que presentan mayor capacidad para complejar al metal y estabilizar las enzimas. Otro estudio de Fereshteh Shahriari et al., (2010) estudió los efectos de la adición de

cantidades crecientes de arcilla sobre andosol forestal y de cultivo en presencia de cantidades crecientes de Cd. La adición de arcilla fue 0, +5% y +10% con respecto del original, mientras que la adición de Cd fue 0, 10 y 50 mg kg<sup>-1</sup> de suelo. Los suelos se incubaron durante 40 días. La adición de la arcilla (Allofanita) incrementó la actividad enzimática (Fig.3), sin embargo no tuvo efecto a la hora de amortiguar la inhibición de la proteasa al añadir el Cd. Los autores determinaron que la allofanita facilita la inmovilización de la proteasa y la protege frente a la degradación, pero no adsorbe el Cd añadido ya que el Cd intercambiable tras la adición de la arcilla no se modificó. Este estudio demuestra que no solo la cantidad de arcilla, sino también el tipo, es importante en la acción de los metales pesados sobre la actividad enzimática.

### 2.2.4 - FACTORES DEPENDIENTES DE LAS PLANTAS:

- **ACUMULACIÓN DEL METAL:** Existen algunas plantas que son capaces de crecer en



**Fig. 3** - Actividad de la proteasa en andosol forestal sin arcilla añadida (OC), con 5% de arcilla (LC) y con 10% de arcilla (HC). La medida antes de la pre-incubación se realizó 5 horas después de la adición de la arcilla y la medida después de la pre-incubación se realizó a los 7 días. La adición de arcilla en pequeñas cantidades incrementa la actividad proteasa 5 horas después de su adición por favorecer su estabilización y por incorporar nuevos microorganismos productores de proteasa. Fereshteh Shahriari et al., (2010).

suelos contaminados por metales pesados. Esta característica se está utilizando para llevar a cabo procesos de fitorremediación de los suelos. Los métodos de fitorremediación más utilizados son (1) la fitoextracción (utilización de plantas para extraer metales de los suelos y posteriormente acumularlos en los tejidos aéreos) y (2) la fitoestabilización (utilización de plantas para reducir la disponibilidad de los contaminantes en el suelo y evitar así su dispersión) (C. Garbisu et al., 2007). El crecimiento de las plantas tolerantes a los metales pesados en los suelos contaminados reduce la concentración y la movilidad de los mismos. Además, sus raíces proporcionan compuestos orgánicos y superficies adicionales que permiten un mayor crecimiento de microorganismos (Yang et al., 2007). Algunas de estas plantas son *Thlaspi caerulescens*, *Festuca rubra*, *Elsholtzia splendens*, *Trifolium repens* (C. Garbisu et al., 2007), (Wang et al., 2008).

- **COMUNIDAD DE PLANTAS:** Un estudio de Yang Gao et al., (2007) estudió la actividad ureasa, fosfatasa y deshidrogenasa en suelos contaminados por Pb y Cd en presencia de dos especies diferentes de plantas (*Solanum nigrum* L. y *Zea Mays* L.). A los 14 días de incubación en los suelos sin plantas la ED<sub>50</sub> (Dosis Ecológica 50, concentración de metal en el suelo a la cual la actividad enzimática es inhibida en un 50%) fue menor que en el monocultivo y esta a su vez fue menor que en el cultivo

mixto con las dos especies (Tabla 5). El hecho de que la ED<sub>50</sub> fuera mayor en el cultivo mixto indica que la diversidad de especies de plantas protege al suelo frente a la acción del Pb y el Cd. Esto es debido a que la diversidad de las comunidades microbianas cambia en función de las raíces de las plantas. Una mayor diversidad de plantas producirá el desarrollo de diferentes especies de rizobacterias que liberarán distintos azúcares y aminoácidos. Una mayor diversidad de estos exudados aumentará la diversidad y la masa microbiana en el suelo, incrementándose así la actividad enzimática.

### **3 - CASOS EN TERRITORIO ESPAÑOL:**

El suelo mediterráneo posee generalmente un pH y contenido de carbonatos relativamente elevado, así como un bajo contenido en materia orgánica. Estas características unidas a la reducida precipitación y a la rápida evapotranspiración limitan la movilidad de los metales pesados en estos suelos (Ana de Santiago-Martín et al., 2013). Entre los años 2001 y 2003 y con motivo de la actualización de la ya mencionada Directiva 86/278/CEE, se realizó en España un extenso y ambicioso estudio financiado por los ministerios de Medio

Suelo	Dosis Ecológica 50		
	Ureasa	DHA	Fosfatasa
Sin plantas	2248	545	3256
Monocultivo	3575	826	4545
Cultivo mixto	4984	1143	4954

**Tabla 5** - ED<sub>50</sub> para los tres tipos de suelo cultivado a los 14 días de incubación. Los modelos utilizados para calcular la ED<sub>50</sub> pueden consultarse en Yang Gao et al., (2007). (DHA) Deshidrogenasa. Adaptado de Yang Gao et al., (2007).



## ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN SUELOS CONTAMINADOS POR METALES PESADOS Y SUS IMPLICACIONES COMO INDICADORES DE CALIDAD

Ambiente y Agricultura, Pesca y Alimentación y el Ministerio de Ciencia y Tecnología. El estudio consistió en la elaboración de un mapa de contenido de materia orgánica y metales pesados de los suelos agrícolas y de pastos de España. El fin último del trabajo era utilizar los datos obtenidos para facilitar el manejo de las parcelas analizadas a la hora de tratarlas con fertilizantes ya que, "los niveles de riesgo dependen en buena medida del estado del medio receptor". Se puso especial atención en la elaboración del muestreo para que el estudio fuese lo más representativo posible. Fueron analizadas 2700 muestras de 2700 parcelas de 8x8 km de tamaño distribuidas regularmente en toda la superficie agrícola y de pastos (Fig. 4). Además, se tuvieron en cuenta las características edáficas de las parcelas tales como el pH y el contenido de arcilla y se correlacionaron los datos obtenidos con dichas propiedades. El informe, de 181 páginas, constata que la gran mayoría de los suelos analizados están dentro de los niveles



**Fig. 4** - Parcelas de muestreo 8x8 km. En color anaranjado las correspondientes a área agrícola y de pastos. En color verde las correspondientes a área forestal (López Arias, M. et., al 2005).

permitidos por el RD 1310/1990 (Tabla 6). La información detallada puede ser consultada en López Arias, M. et., al (2005).

El departamento de edafología de la Facultad de Farmacia de la UCM también ha colaborado activamente en la investigación sobre el efecto que tiene la contaminación por metales pesados en la actividad enzimática del suelo. Ana de Santiago-Martín et al., (2013) realizó un estudio en suelos de la base de investigación en agricultura de el Encín, (Alcalá de Henares). Los cultivó durante 12 meses con una mezcla de Cd, Co, Pb y Zn a las concentraciones permitidas por la UE. Los resultados mostraron diferente grado de inhibición de la actividad enzimática en función de las propiedades del suelo, lo que sugiere que los niveles máximos permitidos de metales pesados en suelos deberían determinarse en función de las propiedades del suelo. Luisa Martín Calvarro et al., (2014) realizó un estudio en una zona cercana a la del estudio de Ana de Santiago-Martín et al., (2013) en el cual evaluaba el efecto de la estructura del suelo y el contenido en materia orgánica sobre la inhibición enzimática por parte de los metales pesados. A pesar de que la movilidad de los metales pesados en los suelos de tipo calcáreo como el analizado por el estudio es reducida, se produjo inhibición enzimática por parte del Cd

<b>% de parcelas que cumplen el RD 1310/1990</b>						
<b>Cd</b>	<b>Cu</b>	<b>Cr</b>	<b>Hg</b>	<b>Ni</b>	<b>Pb</b>	<b>Zn</b>
99,04	98,32	98,94	99,86	93,31	98,59	99,14

**Tabla 6** - Porcentaje de parcelas estudiadas que cumplen la normativa del RD1310/1990. Adaptado de López Arias, M. et., al (2005).

y del Pb, mientras que el Zn y el Cu mostraron tener un efecto estimulante a bajas concentraciones. También se observó que la variación de la deshidrogenasa fue similar en todos los suelos mientras que, por el contrario, la variación de la fosfatasa alcalina, la ureasa y la  $\beta$ -galactosidasa presentó gran variabilidad de una muestra a otra. La hipótesis más probable es que, debido a la localización extracelular de las hidrolasas, estas están mucho más afectadas por las características estructurales del suelo que las oxidorreductasas. Esto vuelve a demostrar que la actividad enzimática en los suelos está íntimamente relacionada con los factores dependientes del suelo (Contenido en materia orgánica, tipo de arcilla, pH etc.) y que por tanto no puede comprenderse su análisis sin tenerlos en cuenta.

### **CONCLUSIÓN:**

1. El análisis de la actividad enzimática del suelo constituye un método muy prometedor para la realización de estudios sobre la calidad del suelo ya que estas están íntimamente relacionadas con la actividad biológica mismo.
2. Su análisis proporciona información rápida sobre los cambios en el suelo y pueden medirse fácilmente. Sin embargo, no son un método perfecto y presentan una serie de limitaciones a la hora de determinar la salud del suelo que no pueden ser obviadas.
3. La actividad enzimática refleja la contaminación por metales pesados. Sin embargo, la inhibición no depende sólo del

metal. Existen multitud de factores que influyen en la interacción metal-enzima, lo que hace que sea prácticamente imposible hacer afirmaciones sobre cuál de ellos afecta más o menos a cada una de ellas. Continuar estudiando la actividad enzimática bajo distintas condiciones será determinante para conocer a fondo todas las variables que definen la interacción metal-enzima. Ello permitirá, en un futuro, crear una herramienta sencilla y a la vez potente que pueda integrarse en el análisis de riesgo.

### **BIBLIOGRAFÍA:**

- A. de Santiago-Martín, Natalie Cheviron, Jose R. Quintana, Concepción González, Antonio L. Lafuente, Christian Mougin. *Metal Contamination Disturbs Biochemical and Microbial Properties of Calcareous Agricultural Soils of the Mediterranean Area*. Arch Environ Contam Toxicol (2013) 64:388–398.
- A. Karaca, S. C. Cetin, O. C. Turgay, R. Kizilkaya. *Soil heavy metals chapter 11: Effects of Heavy Metals on Soil Enzyme Activities*. Springer Science & Business Media, 2010.
- Adel Usman, Yakov Kuzyakov, Karl Stahr. *Effect of Clay Minerals on Immobilization of Heavy Metals and Microbial Activity in a Sewage Sludge-Contaminated Soil*. JSS - J Soils & Sediments 5 (4) 245-252 (2005).
- Alan J. Franzlubbers and Richard L. Haney. *Assessing soil quality in organic*

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN SUELOS CONTAMINADOS POR METALES PESADOS Y SUS  
IMPLICACIONES COMO INDICADORES DE CALIDAD

- agriculture*. USDA Agricultural Research Service, octubre de 2006.
- C. Garbisu, J.M. Becerril, L. Epelde, I. Alkorta. *Bioindicadores de la calidad del suelo: herramienta metodológica para la evaluación de la eficacia de un proceso fitorremediador*. Ecosistemas 16 (2): 44-49. Mayo 2007.
- C. Micó, L. Recatalá, M. Peris, J. Sánchez. *Assessing heavy metal sources in agricultural soils of an European Mediterranean area by multivariate analysis*. Chemosphere 65 (2006) 863–872.
- Chip Appel, Lena Ma. *Concentration, pH, and Surface Charge Effects on Cadmium and Lead Sorption in Three Tropical Soils*. J. Environ. Qual., Vol. 31, March–April 2002.
- F. P. Jorge. *Propiedades bioquímicas de suelos de prado de Galicia*. Universidad de Santiago de Compostela, 2006.
- Fereshteh S., Teruo H., Kenji T.. *Effects of clay addition on soil protease activities in Andosols in the presence of cadmium*. Soil Science and Plant Nutrition (2010) 56, 560–569.
- H. Shayler, M. McBride, E. Harrison. *Sources and Impacts of Contaminants in Soils*. Cornell Waste Management Institute. Cornell University 15 de abril de 2009.
- I. Alkorta, A. Aizpurua, P. Riga, I. Albizu, I. Amézaga, C. Garbisu. *Soil enzyme activities as biological Indicators of Soil health*. Reviews on environmental health Vol. 18, NO. 1, 2003.
- J. Wyszowska, A. Borowik, M. Kucharski, J. Kucharski. *Effect of cadmium, copper and zinc on plants, soil microorganisms and soil enzymes*. Journal of Elementology 09/2012.
- L. A. Fernández, M. A. Sagardoy, M. A. Gómez. *Estudio de la fosfatasa ácida y alcalina en suelos de la Región Pampeana Norte del área sojera argentina*. Ciencia del suelo vol. 26 no.1.
- L. M. Calvarro, A. de Santiago-Martín, J. Q. Gómez, C. González-Huecas, J. R. Quintana, A. Vázquez, A. L. Lafuente, T. M. Rodríguez Fernández, R. Ramírez Vera. *Biological activity in metal-contaminated calcareous agricultural soils: the role of the organic matter composition and the particle size distribution*. Environ Sci Pollut Res (2014) 21:6176–6187.
- L. Margulis, D. Sagan. *What is life?*. University of California Press, 1995.
- López Arias, M. y Grau Corbí, J.M.. *Metales pesados, materia orgánica y otros parámetros de la capa superficial de los suelos agrícolas y de pastos de la España Peninsular. I: Resultados Globales*. INIA. Ministerio de Educación y Ciencia, 2005.
- M. Benoît. *La Geometría Fractal de la Naturaleza*, Tusquets Editores S.A.
- M. M. Alnuaimi, I. A. Saeed, S. S. Ashraf. *Effect of Various Heavy Metals on the Enzymatic Activity of E. coli Alkaline Phosphatase*. International Journal of

- Biotechnology and Biochemistry. Volume 8, Number 1 (2012) pp. 47-59.
- M<sup>a</sup>. R. Albiach; M. bonmatí; R. canet; C. García; A. García; F. Gíl; S. González; M. T. Hernández; P. Jiménez de Ridder; M<sup>a</sup>. C. Leirós; M<sup>a</sup>. C. Lobo; C. Rad; I. Sastre; C. Trasar. Grupo español de enzimología del suelo. *Sobre las enzimas del suelo y sus técnicas de medida*. Edafología, Vol. 13. (3), PP 117-125, 2006.
- P. Bhattacharyya, S. Tripathy, K. Kima, Seok Hwi Kim. *Arsenic fractions and enzyme activities in arsenic-contaminated soil by groundwater irrigation in West Bengal*. Ecotoxicology and Environmental Safety 71 (2008) 149–156.
- R.G. Burns. *Enzyme activity in soil: Location and a possible role in microbial ecology Chapter 1*. Soil Biology and Biochemistry. Volume 14, Issue 5, 1982, pp. 423 – 427.
- Raymond A. Wuana, Felix E. Okieimen. *Heavy Metals in Contaminated Soils: A Review of Sources, Chemistry, Risks and Best Available Strategies for Remediation*. Vol. 2011 (2011), ID 402647.
- RD 1310/1990, de 29 de octubre, por el que se regula la utilización de los lodos de depuración en el sector agrario BOE núm. 262. Jueves 1 noviembre 1990.
- Robert A. Copeland. *Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis*. John Wiley & Sons, 2004.
- S. K. Das, A. Varma. *Soil Enzymology Chapter 2: Role of Enzymes in Maintaining Soil Health*. Springer 2011.
- S. Sethi, S. Gupta. *Responses of soil enzymes to different heavy metals*. Biolife vol. 3 issue 1, 2015.
- Tejada M., Moreno J.L., Hernández M.T., García C. *Soil amendments with organic wastes reduce the toxicity of nickel to soil enzyme activities*. Eur J Soil Biol 44:129–140 (2008).
- Waseem Hassan, Muhammad Akmal, Ibrahim Muhammad, Muhammad Younas, Kashif Rafiq Zahaid, Farhan Ali. *Response of soil microbial biomass and enzymes activity to cadmium (Cd) toxicity under different soil textures and incubation times*. AJCS 7(5):674-680 (2013).
- X. Tan, B. Xie, J. Wang, W. He, X. Wang, G. Wei. *County-Scale Spatial Distribution of Soil Enzyme Activities and Enzyme Activity Indices in Agricultural Land: Implications for Soil Quality Assessment*. Scientific World Journal Vol. 2014, ID 535768.
- Yang Gao, Pei Zhou, Liang Mao, Yueer Zhi, Chunhua Zhang, Wanjun Shi. *Effects of plant species coexistence on soil enzyme activities and soil microbial community structure under Cd and Pb combined pollution*. Journal of Environmental Sciences 2010, 22(7) 1040 – 1048.
- Yu Xian, Meie Wang, Weiping Chen. *Quantitative assessment on soil enzyme activities of heavy metal contaminated soils with various soil properties*. Chemosphere xxx 2015 xxx-xxx.