



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD EXPERIMENTAL DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA



**Estudio de Actividades Enzimáticas involucradas en el Ciclo del
Nitrógeno en Suelos impactados con Desechos Sólidos ubicados en la
zona del Ereigüe-Estado Carabobo**

Elaborado por: Bejarano Bárbara

Tutor: Arnaldo armado

Valencia, febrero 2011

DEDICATORIA

*A mi madre, **ELIZABETH ESPEJO**, quien con su esfuerzo y dedicación ha logrado sacarme adelante. Esto es de las dos, te amo profundamente.*

A Dios, todopoderoso que siempre me acompaña.

*A Mí, por toda mi lucha y empeño. Realmente soy una mujer **¡REGIA!** y lo seré siempre.*

AGRADECIMIENTOS

A Dios, gracias en todo y por todo.

A mi madre, **ELIZABET ESPEJO**, por su gran trabajo en formarme y su gran amor.

A mi hermano, por estar, por quererme y por colaborar conmigo.

A **WILMARY FEAL**, amiga, hermana gracias por compartir todo este tiempo, por celebrar mi triunfo y llorar mis penas ite adoro!

A **MARIA BORDONES**, mi compinche, mi gran amiga. Te agradezco por estar allí y por toda tu ayuda y confianza te quiero grandote.

A **DAMARIS OROPEZA**, por su calidez, por su dulzura, por su pureza. Te quiero y te admiro.

A **JOSE ANGEL MARTINEZ** por todas tus locuras y por regalarme mucha de tu magia.

A **LENNYS OROZCO**, por ser mi amiga, por tu ayuda te quiero muchísimo.

A **KERLY CORONADO**, por enseñarme que sí se puede, por su ánimo y aliento.

A **MARLENY FERNANDEZ** mi pequeña hermosa, por compartir conmigo tantas cosas eres mi pequeña gran amiga.

A **margarita (MARIA TRWILLO)**, gracias por tu confianza y tus locuras eres lo máximo.

A **TERINA VEGA**, por su apoyo y por brindarme su más sincera amistad.

A **GIOVEIRI SILVERA**, por celebrarme las locuras y contribuir con otras muchas, por organizarnos (control) y por permitirme estar en tu vida te quiero.

A **DAMARITA**, aunque no eres químico te falta poquito. Te adoro.

A **FREDDY LEON**, por ser mi cómplice, por querer tanto a mi María e., y por tus locuras, de verdad te quiero.

A **GABRIELA CAMACHO** y **MIGUEL MONSALVE**, por ser sencillamente incondicionales. Los amo con locura.

A BEATRIZ MOY y LESBIA MARTINEZ, por aguantarme no se van a librar de mí tan fácilmente.

A mi tutor ARNALDO ARMANDO, por su paciencia y dedicación, por su amistad y su apoyo en todo este proceso.

A NELSON SEGOVIA, por todo lo que hiciste y sigues haciendo por mí, no tengo palabras y creo que gracias no basta para expresar lo que siento por ti en este momento.

A toda mi familia por su apoyo y admiración los amo.

A todos aquellos que hablaron mal o bien.... gracias por tomarse el tiempo de pensar en mi les deseo el triple de lo que me deseen.

INDICE GENERAL

Contenido	Pág.
Introducción.....	1
Capítulo I. Planteamiento del problema.	
1.1. Formulación del problema.....	3
1.2. Objetivos de la investigación.....	6
1.2.1. General.....	6
1.2.2. Específicos.....	6
1.3. Justificación.....	7
Capítulo II. Marco Teórico.	
2.1. Antecedentes.....	8
2.2. Fundamentos básicos.....	11
2.2.1. El suelo.....	11
2.2.2. El muestreo de suelos.....	12
2.2.3. Propiedades físicas de los suelos.....	14
2.2.4. Materia orgánica.....	16
2.2.5. Contenido de nitrógeno.....	19
2.2.6. El ciclo del nitrógeno.....	21
2.2.7. Enzimas del suelo.....	24
2.2.8. Contaminación del suelo.....	27
2.2.8.1. Causas y orígenes de la contaminación del suelo.....	29
2.2.9. Residuos sólidos y su clasificación.....	30
Capítulo III. Marco Metodológico.	
3.1. Descripción de la zona de estudio.....	33
3.2. Muestreo y preparación de muestras.....	34
3.3. Equipos.....	36
3.3.1. Agitador orbital.....	36
3.3.2. Espectrofotómetro.....	36
3.3.3. Baño Termostático.....	37
3.3.4. Centrifuga.....	38
3.3.5. Destilador.....	39
3.4. Caracterización Físicoquímica del suelo.....	40
3.4.1. Determinación del porcentaje de Humedad relativa.....	41

3.4.2 Determinación de la capacidad de retención de humedad...	41
3.4.3. Determinación de pH y conductividad eléctrica.....	41
3.4.4. Determinación de carbono orgánico.....	41
3.4.5. Determinación de nitrógeno total.....	41
3.4.6 Determinación del contenido de amonio.....	42
3.4.7 Determinación del contenido de nitrato.....	42
3.5 Determinación de actividades enzimáticas.....	42
3.5.1. Determinación de la Actividad Ureásica.....	42
3.5.2. Determinación de la actividad proteásica.....	44
3.5.3. Determinación de la actividad enzimática de la Desaminasa.....	46
3.5.4. Correlación entre las actividades enzimáticas estudiadas con las propiedades fisicoquímicas.....	48

CAPITULO IV: Análisis de resultados

4.1. Determinación de las propiedades Fisicoquímicas.....	49
4.2. Determinación de las actividades enzimáticas.....	52
4.2.1. Determinación de la actividad ureàsica.....	52
4.2.2. Determinación de la actividad proteásica.....	58
4.2.3. Determinación de la actividad de la Desaminasa.....	63

Capitulo V: Conclusiones y Recomendaciones

5.1 conclusiones.....	67
5.2 Recomendaciones.....	69
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70
APENDICE A.....	79
APENDICE B.....	92

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características de suelo según su granulometría.....	16
Tabla 2. Coordenadas de cada una de las muestras de suelo.....	17
Tabla 3. Métodos de análisis usados en el Laboratorio para el estudio Físicoquímico.....	40
Tabla 4. Preparación de las soluciones patrones de tirosina, para la realización de la curva de calibración.....	45
Tabla 5. Parámetros físicos y químicos determinados en las muestras de suelo impactadas y no impactadas con desechos sólidos.....	50
Tabla 6. Parámetros fisicoquímicos determinados en las muestras de suelo impactadas y no impactadas con desechos sólidos.....	51
Tabla 7. Valores de la actividad Ureásica determinada en suelos provenientes de la zona el Ereigüe-Estado Carabobo.....	55
Tabla 8. Correlación de la actividad Ureásica con los parámetros fisicoquímicos estudiados.....	56
Tabla 9. Porcentaje de actividad de la enzima Ureasa en muestras de suelo impactado por desechos sólidos provenientes de la zona el Ereigüe-Estado Carabobo.....	58
Tabla 10. Valores de la actividad protésica determinada en suelos provenientes de la zona el Ereigüe-Estado Carabobo.....	60
Tabla 11. Porcentaje de actividad de la enzima proteasa en muestras de suelo impactado por desechos sólidos provenientes de la zona el Ereigüe-Estado Carabobo.....	62
Tabla 12. Valores de la actividad de la Desaminasa determinados en suelos provenientes de la zona el Ereigüe-Estado Carabobo.....	64
Tabla 13. Correlación de la actividad de la Desaminasa con los	65

parámetros fisicoquímicos estudiados.....	
Tabla 14. Porcentaje de actividad de la Desaminasa en muestras de suelo impactado por desechos sólidos provenientes de la zona el Ereigüe-Estado Carabobo.....	66
Tabla 15. Datos para la curva de calibración de contenido de Amonio	79
Tabla 16. Datos para la determinación de contenido de amonio por el método Kandeler y Gerber modificado.....	80
Tabla 16. Continuación.....	81
Tabla 17. Datos para la curva de calibración de Contenido de nitrato	82
Tabla 18. Datos para la determinación de contenido de nitrato por el método de Imgran y Anderson (1989).....	83
Tabla 18. Continuación.....	84
Tabla 19. Datos para la determinación de la actividad Ureásica.....	84
Tabla 19. Continuación.....	85
Tabla 20. Datos para la determinación de la actividad Proteásica.....	86
Tabla 20. Continuación.....	87
Tabla 21. Datos para la curva de calibración de tirosina.....	88
Tabla 22. Datos para la determinación de la actividad de la Desaminasa.....	89
Tabla 22. Continuación.....	90

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Triángulo de las clases de textura del suelo.....	15
Figura 2. Esquema de las formas de nitrógeno presentes en el suelo...	20
Figura 3. Ciclo del nitrógeno.....	22
Figura 4. Ubicación geográfica de la zona el Ereigüe.....	33
Figura 5. Agitador Orbital.....	36
Figura 6. Espectrofotómetro.....	37
Figura 7 Baño termostático.....	37
Figura 8. Centrifuga.....	38
Figura 9. Destilador.....	39
Figura 10. Reacción general de la hidrólisis de la urea.....	43
Figura 11. Reacción general de la hidrólisis de un enlace péptidico.....	44
Figura 12. Reacción general de desaminación	47
Figura 13. Visualización de la actividad ureásica en las muestras de suelo provenientes de la zona el Ereigüe-Estado Carabobo.....	54
Figura 14. Reacción completa de hidrólisis de la urea por la enzima ureasa	57
Figura 15. Visualización de la actividad Desaminàsica en las muestras de suelo provenientes de la zona el Ereigüe-Estado Carabobo.....	63
Figura 16. Curva de calibración de Amonio.....	79
Figura 17. Curva de calibración de Nitrato.....	82
Figura 18. Curva de calibración de Tirosina.....	88



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD EXPERIEMENTAL DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA



**Estudio de Actividades Enzimáticas involucradas en el Ciclo del
Nitrógeno en Suelos impactados con Desechos Sólidos ubicados en la
zona del Ereigüe-Estado Carabobo**

Autora: Bejarano B., Barbara B

Tutor: Prof. Armado, Arnaldo

RESUMEN

. Las enzimas son proteínas cuyo papel fundamental es catalizar las reacciones químicas en los seres vivos, actúan sobre sustratos específicos transformándolos en productos necesarios para los ciclos biológicos. En el ciclo del nitrógeno numerosas enzimas, como por ejemplo ureasas, proteasas y desaminasas, actúan para transformar dicho nitrógeno en formas más asimilables para las plantas y microorganismos. Empleando técnicas colorimétricas se determinaron las actividades enzimáticas de la ureasa, proteasa y desaminasa, en suelos de un antiguo vertedero, ubicado en el sector El Ereigüe, San Joaquín, Estado Carabobo. El estudio realizado permitió determinar los efectos que causa la presencia de desechos sólidos urbanos sobre las actividades enzimáticas. Para la ureasa se obtuvo un intervalo de 6 a 96 $\mu\text{g N-NH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y presentó correlaciones negativas ($P < 0.05$) con el pH. La proteasa presentó correlaciones con el contenido de

Nitrato y el pH y tuvo un intervalo de 44 a 138 μg tirosina $\text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$. La desaminasa presentó un intervalo de 0,0062 a 0,114 μg N-NH₄ $\text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$ y no se obtuvieron correlaciones con ningún parámetro fisicoquímico. Las actividades de todas las enzimas estudiadas variaron en las muestras respecto a los controles; para la ureasa se presentó un aumento y para la desaminasa y proteasa una disminución, debido a la heterogeneidad del agente contaminante que en este caso son desechos sólidos de distinta clase y naturaleza.

Palabras Clave: suelos contaminados, actividades enzimáticas, desechos sólidos.



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD EXPERIEMETAL DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA



**Estudio de Actividades Enzimáticas involucradas en el Ciclo del
Nitrógeno en Suelos impactados con Desechos Sólidos ubicados en la
zona del Ereigüe-Estado Carabobo**

Autora: Bejarano B., Barbara B

Tutor: Prof. Armado, Arnaldo

ABSTRACT

Enzymes are proteins whose role is to catalyze chemical reactions in alive organisms, acting on specific substrates by transforming them into products necessary for biological cycles. In the nitrogen cycle numerous enzymes such as urease, protease and deaminase, act to transform the nitrogen into forms that are assimilated by plants and microorganisms. Colorimetric techniques were determined the activity of enzymes of urease, protease and deaminase, in soils of a former landfill, located at the El Ereigüe, San Joaquin, Carabobo State. The study was can determined the effects caused by the presence of solid waste on the enzyme activities. Urease was obtained for a range of 6 to 96 mg N-NH₄ g⁻¹ h⁻¹ and showed negative correlations (P <0.05) with pH. The protease showed correlations with nitrate content and pH and had an interval of 44 to 138 mg tyrosine g⁻¹ h⁻¹. Deaminase introduced a range of

0.0062 to 0.114 mg N-NH₄ g⁻¹ h⁻¹ and no correlations were found with any physicochemical parameter. The activities of all enzymes studied varied in the samples relative to controls, for there was an increase in urease. Desaminase and protease decreased due to the heterogeneity of pollutant in this case are different kinds and nature of solid waste.

Keywords: contaminated soils, enzyme activities, solid waste.

INTRODUCCIÓN

El estudio del suelo es de gran importancia ya que el mismo representa el ecosistema, en el cual se realizan los ciclos necesarios para que exista la vida en el planeta. Sus propiedades varían natural o artificialmente a través del tiempo por diversos factores tales como el clima, los organismos que lo habitan, el material parental, la influencia del hombre, entre otros, en consecuencia no existe una sola medida biológica o química para determinar el estado de salud y calidad de un suelo para un fin determinado. Una manera de evaluar las condiciones y los cambios que ocurren en el suelo es a través del estudio de actividades enzimáticas ya que las mismas están estrechamente relacionadas con las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo y son sensibles a los cambios generados por el manejo y la manipulación de este.

En la actualidad, con el crecimiento, de la población y los avances tecnológicos en pro del mejoramiento de la calidad de vida, se ha incrementado también la contaminación al punto de convertirse en uno de los principales problemas de la sociedad, trayendo como consecuencia el deterioro del agua, el aire y el suelo. La acumulación de desechos sólidos de distinta clase en zonas urbanizadas es hoy en día la principal causa de contaminación del suelo y acarrea problemas de salud vegetal, animal y a la colectividad en general.

En el sector el Ereigüe, municipio San Joaquín, estado Carabobo, en lo que antes fue un vertedero que funcionó durante cuarenta años aproximadamente, se quiere construir un parque para el disfrute de la comunidad. Por esta razón la alcaldía conjuntamente con los consejos comunales de la localidad, realizaron el saneamiento del vertedero cubriéndolo con una capa de relleno, sin embargo, se desconoce si el terreno se encuentra contaminado o si es apto para tal fin.

Por lo antes descrito, se plantea determinar el efecto que ocasiona la presencia de estos desechos sólidos en los principales parámetros fisicoquímicos del suelo y en las actividades de las enzimas ureasa, caseinasa y desaminasa, como indicadores de la contaminación del suelo en estudio.

CAPITULO I: Formulación del problema

1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La contaminación, se ha convertido en uno de los principales problemas mundiales del siglo XXI, encontrándose presente en el aire, en el agua y también en los suelos. Su incremento ha traído como consecuencia, el deterioro de la calidad de vida de las nuevas generaciones. Por esto es necesaria su disminución y control. Los desechos sólidos son sin duda una de las principales causas de contaminación a nivel mundial, de allí la creación de rellenos sanitarios para su disposición. Sin embargo, cuando estos “rellenos sanitarios” no cumplen con las disposiciones ambientales y sanitarias requeridas, se convierten en vertederos; en los cuales se depositan los desechos sólidos sin ningún tipo de regulación y muchos de ellos constituyen material reciclable (Conde et al., 2009).

Un poco más del 80% de la basura que se genera en Venezuela permanece expuesta en las ciudades afectando la salud de la comunidad y deteriorando el paisaje urbano. El país requiere de alrededor de 150 rellenos sanitarios para atender la necesidad actual de disposición final de los desechos sólidos, de los cuales, solo uno (la bonanza), cumple con la normativas ambientales y sanitarias para su funcionamiento. La basura debería ir a lugares apropiados donde los residuos sólidos reciban el tratamiento sanitario y ambiental mínimos, para que la solución no forme parte del problema. En vertederos del país tales como; la Ciénaga en Maracaibo, el Cambalache en Ciudad Guayana o el de Catia la Mar, entre otros, hombres y mujeres deambulan escarbando los residuos, aguas superficiales y subterráneas aledañas se contaminan, el paisaje se deteriora, el suelo se degrada y el aire se contamina por malos olores y quemadas aisladas. A esto se le suma el hecho de que los encargados del manejo de

tales instalaciones, no siempre cuentan con el equipamiento básico necesario lo cual puede atentar directamente contra su salud. Además de esto, algunos expertos afirman que, en Venezuela se recicla menos de a 0,8% de los desechos que se acumulan en estos lugares. En la actualidad es común observar gran cantidad de desperdicios de todo tipo acumulándose por calles y avenidas, particularmente en áreas donde el comercio buhoneril se apodera de las aceras. De allí que el 60% de los desechos sólidos urbanos sean empaques, envoltorios o cajas. Frente a esta situación, tan responsable es el que ensucia como el que deja ensuciar. La basura es una responsabilidad de todos, y no sólo de las alcaldías y las empresas recolectoras (Díaz y Vitaliz, 2007).

Es importante destacar que la contaminación del suelo, además de un problema estético y de salud urbana, animal y vegetal, constituye un problema biológico, ya que la degradación y acumulación de los desechos sólidos puede resultar toxica para los organismos presentes en el mismo degradándolo física, química y biológicamente y causando la pérdida de su productividad (Amador 2010). Por esta razón es necesario evaluar la repuesta del suelo a los factores contaminantes. Una de las numerosas formas de medir la calidad del suelo es a través del estudio de las actividades enzimáticas, debido a que las mismas son sensibles o se ven afectadas por los cambios que pueda sufrir el suelo, principalmente en lo que a contaminación se refiere (Kennedy y Smith, 1995).

Las enzimas presentes en los suelos, son indicadoras de la actividad hidrolítica (proteasas, ureasas, desaminas, entre otras), la cual puede relacionarse con la actividad microbiológica; a través de numerosas reacciones de bacterias y hongos en las cuales sintetizan y liberan enzimas que permiten catalizar las reacciones para la descomposición de la materia orgánica del suelo y los ciclos de nutrientes en los ecosistemas terrestres (Taylor et al., 1989; Zhang et al., 2005). La ureasa participa en el ciclo del

nitrógeno, catalizando la reacción de hidrólisis de la urea en amonio y dióxido de carbono (Steubing et al., 2002), la desaminasa por su parte, actúa como catalizador, para la liberación del amonio de las moléculas inorgánicas y la proteasa cataliza las reacciones que degradan proteínas y péptidos (Nannipieri, 1994). Estas y otras enzimas pueden ser afectadas por la presencia de desechos sólidos lo que ocasionaría modificaciones en las funciones catalíticas que desempeñan.

Este estudio plantea determinar el efecto que pueda causar la contaminación del suelo con desechos sólidos sobre las actividades enzimáticas de ureasa, desaminasa y proteasa en pro de servir como antecedente y también como complemento de otros trabajos de investigación para buscar alternativas para la solución de esta problemática, ya que genera una amenaza real a la salud pública, vegetal y animal. La zona de estudio está ubicada en el sector El Ereigüe, municipio San Joaquín, estado Carabobo.

1.2. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

1.2.1. GENERAL

Estudiar actividades enzimáticas involucradas en el ciclo del nitrógeno en suelos afectados con desechos sólidos en la zona del Ereigüe, situado en el municipio San Joaquín - Estado Carabobo

1.2.2. ESPECÍFICOS

- Determinar los siguientes parámetros fisicoquímicos en las muestras de suelos: textura, pH, conductividad eléctrica, humedad relativa, capacidad de retención de humedad, contenido de carbono orgánico total, nitrógeno total, contenido de amonio y contenido de nitrato.
- Determinar la actividad enzimática de ureasa, caseinasa y desaminasa, en las muestras de suelo en estudio.
- Determinar la correlación de las actividades enzimáticas con la presencia de contaminante y los parámetros fisicoquímicos.

1.3. JUSTIFICACIÓN

A pesar de los avances tecnológicos en lo que a reciclaje se refiere y la gran cantidad de información disponible, son pocos los países que adoptan esta ideología; y este hecho se acentúa en aquellos países en vías de desarrollo; cuya población va en incremento.

Particularmente en Venezuela, el reciclaje tiene un mínimo porcentaje; 0,8% con respecto a los desechos sólidos totales (Conde et al., 2009). Por esta razón, gran cantidad de desperdicios se acumulan en los centros poblados en lugares que no cumplen las normativas ambientales y de salud correspondientes lo que ocasiona grandes riesgos a la salud pública, animal y vegetal, además de constituir un problema estético (Díaz y Vitaliz, 2007). A esto se le suma la contaminación que estos desechos producen en el aire; por la presencia de malos olores, de las aguas subterráneas y superficiales y principalmente de los suelos, donde estos desechos se acumulan lo cual puede afectar los procesos de los mismos tales como la descomposición de la materia orgánica.

La importancia fundamental del estudio de la actividad enzimática del suelo, radica en que el funcionamiento de los ecosistemas no se puede entender correctamente sin la participación de los procesos enzimáticos (Overbeck, 1991), ya que las enzimas determinan la pauta de gran parte de las transformaciones químicas que se producen en el suelo (Stryer, 1995). Dentro de los procesos metabólicos que catalizan se encuentran; la descomposición de materiales orgánicos y la detoxificación de xenobióticos. Se puede decir, que las actividades enzimáticas de los suelos, al verse afectadas por la presencia de desechos sólidos, sirven como parámetro indicativo del nivel de contaminación, por lo que este estudio es de vital importancia, debido además, a que proporcionará una base de datos para futuras investigaciones correspondientes a la eliminación de la contaminación del suelo de este sector El Ereigüe municipio San Joaquín, Estado Carabobo.

CAPITULO II: Marco teórico

2.1. ANTECEDENTES

Entre algunos estudios realizados, relacionados con la presente investigación, se pueden mencionar:

- **Efecto de la aplicación de residuos sólidos de alto impacto en la actividad biológica de suelos de uso forestal (Santander, 2005).**

En este estudio, se trabajó con suelos con experiencias en terreno, es decir suelos expuestos al aire libre y suelos incubados en el laboratorio, a los cuales fueron adicionados biosólidos; llamados así a los residuos sólidos de plantas de tratamiento de aguas servidas. Se le determinaron los siguientes parámetros: porcentaje de carbono, capacidad de retención de agua, pH, actividad deshidrogenasa, actividad arilsulfatasa e hidratos de carbono totales. Los resultados obtenidos fueron comparados con los arrojados por suelos sin tratamiento, de esta manera se determinaron los posibles efectos del biosólido en las muestras. Dichos resultados mostraron que después de seis meses de aplicación de la 1º dosis de lodo en el terreno, la actividad de la deshidrogenasa se mantuvo o aumentó, en ningún caso hubo una disminución significativa en dicha actividad es decir, los efectos no fueron tóxicos. Por su parte, en condiciones controladas (incubaciones), la deshidrogenasa incremento de manera inmediata su actividad. Por su parte, el número de hidratos de carbono totales también aumentó como consecuencia del aporte de carbohidratos al adicionar los biosólidos. Sin embargo, la actividad de la arilsulfatasa en los suelos incubados no varió y el pH disminuyó proporcionalmente al aumentar la dosis. De la misma manera, en la presente investigación se estudió el efecto que produce un agente contaminante, en este caso gran variedad de desechos sólidos, en la

actividad enzimática de diferentes muestras de suelos. Y más aun, se evaluó la actividad de otras enzimas: caseinasa, desaminasa y ureasa.

- **Actividad de la enzima deshidrogenasa en un suelo calciorthids enmendado con residuos orgánicos (Acosta y Paolini, 2005).**

Para la realización de este proyecto, se evaluó la actividad de la enzima deshidrogenasa, en un suelo Calciorthids (llamados así a los suelos calizos), de la Península de Paraguaná (estado Falcón). Se adicionaron tres tipos de residuos orgánicos; estiércol de chivo recolectado en los criaderos de la Península de Paraguaná, residuo del procesamiento de la sábila, Aloe vera Linné, recolectado en una planta procesadora industrial de sábila (PIZCA) en Coro y lodo residual, recolectado en los lechos de secado de la Planta de Tratamiento de Aguas Servidas del Centro de Refinación Paraguaná de PDVSA en Cardón. Así mismo, se trabajó con una muestra control a la cual no se adicionó ningún residuo orgánico a fin de realizar comparaciones respecto a la actividad enzimática de la deshidrogenasa. Las muestras preparadas y el control fueron incubados en el laboratorio por un periodo de aproximadamente dos meses, variando durante los mismos las dosis aplicadas de cada residuo orgánico; obteniéndose que la incorporación de estos materiales orgánicos al suelo incrementó la actividad de la deshidrogenasa con respecto al control. Para los distintos tratamientos del suelo la deshidrogenasa se manifestó en el siguiente orden: estiércol de chivo > residuo de sábila > lodo residual; demostrando que en este último, la materia orgánica (MO) generó una menor actividad microbiana; mientras que los residuos de sábila y el estiércol de chivo mostraron una mayor actividad de la deshidrogenasa como consecuencia de poseer un mayor contenido de MO fácilmente biodegradable. Como se ha mencionado anteriormente, en todos los casos la actividad enzimática de la deshidrogenasa aumentó, por

ende, estos residuos orgánicos aplicados fueron inocuos para el suelo estudiado. Igualmente, este trabajo investigativo se enfocará en comparar suelos contaminados (presencia de desechos sólidos), con suelos control (aparentemente no contaminados) usando la variación de la actividad enzimática como parámetro indicativo del nivel de contaminación. No obstante, en vez de evaluar la actividad de la deshidrogenasa, se siguieron las actividades de las enzimas caseinasa, desaminasa y ureasa.

- **Estudio de actividades enzimáticas involucradas en el ciclo del nitrógeno en suelos impactados con petróleo ubicados en Yaracal - Estado Falcón (Suarez, 2010).**

En este trabajo de investigación, se estudiaron los efectos de la contaminación con crudo en la actividad enzimática de la caseinasa, ureasa y desaminasa. Para ello, se usaron muestras tomadas en cuatro de los pozos inactivos de explotación petrolera, presentes en la zona de Yaracal-Estado Falcón, así mismo, se recolectaron muestras libres de contaminación cercanas a cada pozo. Se determinaron parámetros fisicoquímicos, tales como: textura, pH, humedad relativa, capacidad de retención de humedad, cantidad de carbono orgánico total, contenido de amonio y contenido de nitrato, así como también, la cantidad de hidrocarburos totales de petróleo en las muestras, encontrándose que las actividades de las enzimas estudiadas se vieron afectadas, directa o indirectamente, con la introducción de hidrocarburos en el suelo, ya que éstas disminuyeron al aumentar la concentración de contaminante y de la misma forma la cantidad de carbono orgánico total, la capacidad de retención de humedad, humedad relativa y contenido de nitrato, presentaron variaciones significativas, con relación a la cantidad de crudo. Similarmente, el presente trabajo, está dirigido al estudio de la actividad de las enzimas caseinasa, ureasa y desaminasa, pero en este

caso en otros suelos, geográficamente distintos, y contaminados con desechos sólidos.

2.2. FUNDAMENTOS BÁSICOS

2.2.1. El suelo

El suelo puede definirse de acuerdo al trabajo que se desempeña en el mismo (Jaramillo, 2002), por lo que:

- El suelo es, desde el punto de vista del agricultor, el sitio para ubicar sus semillas y producir sus cosechas (Worthen, 1949).
- Para un geólogo podría ser el recubrimiento terroso que hay sobre un cuerpo rocoso.
- Para un constructor, el suelo es el sitio sobre el cual colocará sus estructuras o el sustrato que le suministrará algunos de los materiales que requiere para hacerlas.
- Para un ecólogo es uno de los componentes del ecosistema que estudia.
- Para un químico, es el laboratorio donde se producen reacciones entre las fases sólida, líquida y gaseosa.
- Un antropólogo o un arqueólogo podrán ver el suelo como un tipo de registro del pasado.

Aunque lo más destacable para este estudio, es que el suelo es el ecosistema, en el cual se realizan todos los ciclos necesarios para que exista la vida en el planeta.

2.2.2. El muestreo de suelos

El muestreo es el primer paso del análisis químico del suelo, y el más crítico, ya que se constituye en la fuente de error más común (Petersen y Calvin, 1986). Cline (1944) expresó que el límite de exactitud está dado por el muestreo y no por el análisis. Esto sucede porque a través de pocas muestras (generalmente no más de 1 kg de suelo) se pretende representar la disponibilidad de nutrientes de miles de toneladas de suelo. Tanto es así que 1 kg de suelo significa el 0,0000005 % del peso medio de 1 hectárea a una profundidad de 0-20 cm. Adicionalmente, si tomamos en cuenta que dentro de la superficie que queremos representar existe una gran variabilidad, la dificultad para realizar un buen muestreo es aún mayor. La variabilidad se ve incrementada cuando un campo ingresa en un sistema de siembra directa continua, por la acción residual de las líneas de fertilización, la acumulación de residuos, aplicación de fertilizantes en la superficie del suelo y el reciclado de nutrientes hacia estratos superiores del suelo.

Existen diferentes maneras de recorrer un lote con el objetivo de obtener una muestra representativa. La más sencilla consiste en recorrer un lote al azar, recolectando sub-muestras que luego son mezcladas para formar una muestra compuesta que es enviada al laboratorio. El inconveniente de este tipo de muestreo es que frecuentemente no se tiene en cuenta la variabilidad existente en cabeceras y sectores no homogéneos del lote. Otro plan de muestreo consiste en dividir el campo en subunidades homogéneas (por ej. loma y bajo), dentro de las cuales se toman muestras compuestas al azar, evitando cabeceras y cualquier desuniformidad que pueda aparecer en el lote como sectores rodeados de suelo de menor calidad; “suelos overos”. Este tipo de muestreo es conocido como muestreo al azar estratificado (Darwich, 2003). Una variante es el muestreo en áreas de referencia, que consiste en muestrear intensamente un sector homogéneo del lote, que se asume representativo del lote completo. El tipo más intensivo

de muestreo es el muestreo en grilla; en éste, las muestras son tomadas a intervalos regulares en todas las direcciones, analizándose por separado. Es muy precisa y refleja la variabilidad del lote, pero no siempre el retorno económico alcanza para justificar el costo de este tipo de muestreo.

La profundidad de muestreo es de gran importancia, pues esta determina el nutriente o propiedad del suelo que se pretende cuantificar. Así, la materia orgánica y el pH se miden habitualmente en capa superficial (0-20 cm) ya que es la profundidad donde ejercen mayor influencia. Con respecto a los nutrientes móviles, los métodos de diagnóstico consideran en general el nitrógeno en capas profundas, pero no siempre recurren a medirlo, sino que lo estiman a partir del contenido en capa superficial de suelo. Así, Álvarez y Álvarez (2000), a partir de un grupo muy grande de muestras, encontraron relaciones muy ajustadas entre la disponibilidad de nitrógeno en horizontes superiores (0-20 o 0-30 cm) y en profundidad.

El muestreo profundo también presenta inconvenientes. En primer lugar, la compactación en el barreno y la mezcla de horizontes pueden llevar a cometer un grave error (Darwich, 2003). Por otra parte, la absorción de Nitrógeno puede tener una correlación más alta con la disponibilidad a 0-30 cm que con 0-60 cm (Gelderman et al, 1988), y el nitrógeno por debajo de los primeros 30 cm no afecta tanto la recomendación como el que se encuentra en los primeros 30 cm (Carefoot et al., 1989).

Finalmente, cabe destacar que las actividades enzimáticas disminuyen con la profundidad en el suelo (Rastin et al., 1990; Kandeler et al., 1994), ya que en general, son proporcionales al contenido en materia orgánica y siguen su distribución en el perfil del suelo. Además varían con la estación del año (Rastin et al., 1990) y con el tipo de cobertura vegetal.

2.2.3. Propiedades físicas de los suelos

Las propiedades físicas del suelo están condicionadas por la masa total del mismo. Son una función de sus componentes tanto en lo que se refiere al tamaño como a su naturaleza, por ello una de las más influyentes es la distribución por tamaños de las partículas edáficas. Entre las propiedades físicas más importante podemos mencionar: la textura, estructura, permeabilidad, propiedades térmicas, densidad, porosidad y dinámica del agua. Algunas de las cuales describimos a continuación:

- Textura

Se conoce como textura a la relación existente entre los contenidos de las diferentes fracciones granulométricas que constituyen el suelo.

La textura depende de la proporción de partículas minerales de diverso tamaño presentes en el suelo que son las siguientes:

- a) *Fragmentos rocosos*: Diámetro superior a 2 mm, y son piedras, grava y cascajo.
- b) *Arena*: Diámetro entre 0,05 a 2 mm. Puede ser gruesa, fina y muy fina. Los granos de arena son ásperos al tacto y no forman agregados estables, porque conservan su individualidad.
- c) *Limo*: Diámetro entre 0,002 y 0,5 mm. Al tacto es como la harina o el talco, y tiene alta capacidad de retención de agua.
- d) *Arcilla*: Diámetro inferior a 0,002 mm. Al ser humedecida es plástica y pegajosa; cuando seca forma terrones duros.

La proporción de estas partículas dan origen a cuatro tipos de suelos fundamentales por su textura: pedregosos (predominan los fragmentos rocosos), arenosos (predominan las arenas); limosos (predominan los limos), y arcillosos (predomina la arcilla) (Soil Survey Division Staff, SSDS, 1993).

Entre estas cuatro categorías existe una infinidad de combinaciones, las cuales se pueden observar claramente en el diagrama ternario de la figura 1.

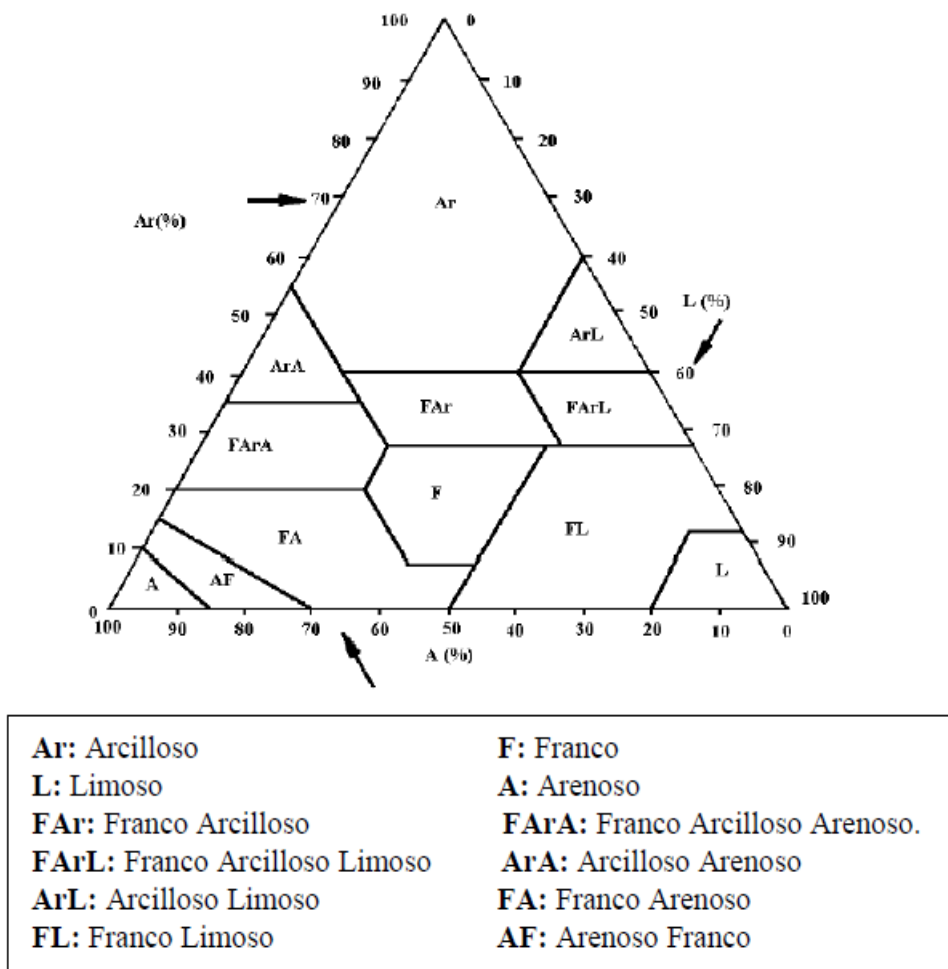


Figura 1. Triángulo de las clases de textura del suelo (Tomado de SSDS, 1993).

Cada una de las clases de textura mostradas en la figura 1 tiene una característica particular. Estas se muestran de forma sintetizada en la tabla 1.

Tabla 1. Características de los suelos según su granulometría

<i>Textura</i>	<i>Arenoso</i>	<i>Franco</i>	<i>Franco limoso</i>	<i>Arcilloso</i>	<i>Agente de agregación</i>
Tacto	Áspero	Áspero	Suave	Terronoso o plástico	Tensión superficial
Drenaje interno	Excesivo	Bueno	Suave	Suave o pobre	Materia orgánica
Agua disponible para las plantas	Baja	Media	Alta	Alta	Alta concentración de electrolitos
Agua transportable	Baja	Media	Alta	Alta	Bajo potencial electrocinético
Labranza	Fácil	Fácil	Media	Difícil	Bajo potencial electrocinético

(Rivas, 2006)

2.2.4. Materia orgánica

Numerosos investigadores han reconocido efectos beneficiosos en la aplicación de la materia orgánica en el suelo, en cuanto a las mejoras observadas con respecto a las características químicas, físicas y biológicas del mismo (Ibañez, 2006; Gonzalo y Obando, 2010). La materia orgánica forma parte del ciclo del nitrógeno, del azufre y del fósforo, contribuye a la asimilación de nutrientes, mejora la estructura y la retención de agua del suelo y da soporte a todo un mundo de microorganismos.

Para conocer el por qué de estas propiedades debemos remontarnos al conocimiento de la estructura interna de la materia orgánica. La materia orgánica procede de los seres vivos (plantas o animales superiores o inferiores) y su complejidad es tan extensa como la composición de los mismos seres vivos. La descomposición en mayor o menor grado de estos seres vivos, provocada por la acción de los microorganismos o por factores abióticos da lugar a un abanico muy amplio de sustancias en diferentes estados que son los constituyentes principales de la materia orgánica.

Todos estos componentes de la materia viva sufren una serie de transformaciones que originan lo que conocemos como materia orgánica propiamente dicha, que consiste en un material dinámico (termodinámicamente inestable), ligado a los ciclos del carbono, nitrógeno, del fósforo y del azufre, a la reducción del hierro y el manganeso en el suelo y a otros muchos procesos y que pueden llegar a estabilizarse en función de los parámetros ambientales (temperatura, pH, humedad, contenido iónico, poblaciones de microorganismos, etc.).

La materia orgánica tiene funciones muy importantes en el suelo y para ello es necesario partir del conocimiento de los procesos que tienen lugar en el suelo (ciclos de nutrientes) y de la actividad biológica del mismo, a modo indicativo, se citan a continuación los efectos de la materia orgánica sobre algunas características físicas, químicas y biológicas del suelo:

- Características físicas

1. La materia orgánica disminuye la densidad aparente del suelo (por tener una menor densidad que la materia mineral), contribuye a la estabilidad de los agregados, mejora la tasa de infiltración y la capacidad de retención de agua.
2. La materia orgánica viva de origen vegetal se caracteriza por una estructura celular abierta. Las partículas de cortezas, corcho o las fibras vegetales tienen células en su interior que contribuyen a aumentar la porosidad del suelo (porcentaje de poros), es decir, aumenta el número de poros que son capaces de retener agua o aire sin aumentar el volumen total de suelo. Los espacios vacíos que se forman en la interfase entre las partículas orgánicas y minerales pueden contribuir al aumento de la conductividad hidráulica del suelo. Debido al efecto físico del tamaño de las partículas, la materia orgánica aumenta la capacidad

de retención de agua de suelos arenosos y aumenta la capacidad de aireación de suelos arcillosos.

- Características químicas

1. La materia orgánica tiene un papel importante en la mejora de la disponibilidad de micronutrientes (principalmente hierro, manganeso, zinc y cobre) para las plantas, así como, en la reducción de los efectos tóxicos de los cationes libres.
2. La mayor parte del nitrógeno almacenado en el suelo se encuentra en forma orgánica, por lo tanto, la disponibilidad de materia orgánica influye directamente en la disponibilidad de nitrógeno.

- Características biológicas

1. La materia orgánica sirve de fuente de energía para los microorganismos del suelo.
2. La materia orgánica puede proporcionar actividad enzimática. Parece que existen enzimas activas adsorbidas al humus o a las partículas de arcilla no ligadas a las fracciones vivas. Una de las más abundantes es la ureasa. En general, las enzimas contribuyen a hidrolizar moléculas de cadena larga, haciendo disponibles para las plantas algunos elementos resultantes de la hidrólisis.

2.2.5. Contenido de nitrógeno

El contenido de nitrógeno en los suelos varía ampliamente, pues están controladas especialmente por las condiciones climáticas y de vegetación, además las mismas inciden en las condiciones locales de la topografía, material parental, las actividades del hombre y el tiempo que estos factores han actuado sobre el suelo.

El clima tiene una influencia determinante sobre el nivel de N en los suelos a través de la influencia de la temperatura y las condiciones de humedad (régimen de lluvia) sobre el desarrollo de las plantas y microorganismos (Jenny, 1930). La vegetación también es determinante sobre el contenido de N, así, los suelos desarrollados bajo plantas con sistemas radicales extensos presentan altos contenidos de N y en suelos de bosques poseen mayores cantidades de N que los de sabana.

El contenido de nitrógeno total en los suelos presenta un amplio intervalo, pero es común el comprendido entre 0,2 y 0,7% para la denominada capa arable. El porcentaje tiende a disminuir al aumentar la profundidad del perfil. Dentro de los factores de formación del suelo, el clima es el que influye más directamente en el contenido total del nitrógeno, cuyo porcentaje tiende a incrementarse al disminuir la temperatura y al aumentar la precipitación, dentro de ciertos límites.

El suelo no solo contiene nitrógeno inorgánico sino también el material parental (proveniente de las rocas y sedimentos que conforman el suelo). Esquemáticamente las formas de nitrógeno presentes en el suelo podrían agruparse según la figura 2.

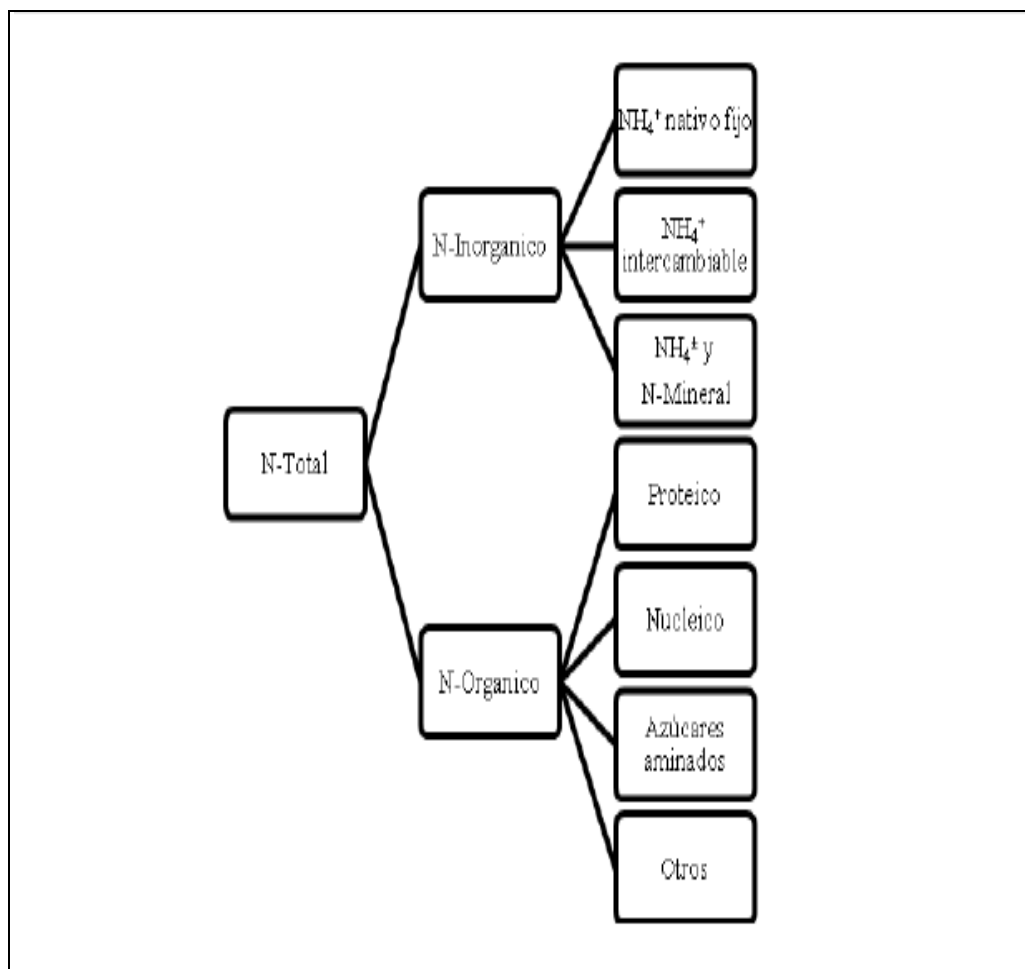


Figura 2. Esquema de las formas de nitrógeno presentes en el suelo.

(Fuente: Fassbender, 1982)

El nitrógeno orgánico representa comúnmente, entre el 85 y el 95% del nitrógeno total. En buena parte su naturaleza química es desconocida. Los compuestos nitrogenados que se acumulan en los suelos en forma de restos animales y vegetales tienen en su mayoría naturaleza proteica. Entre el 20% y 40% del N de los suelos se presentan en forma de aminoácidos. Una segunda evidencia de la naturaleza proteica del N orgánico es la liberación de aminoácidos a partir de la materia orgánica por un ataque enzimático, en

donde la enzima provoca la ruptura de las uniones peptídicas de las proteínas.

En formas inorgánicas se presenta el nitrógeno como óxido nítrico, óxido nítrico, dióxido de nitrógeno (NO_2), amoníaco en cantidades mínimas casi no detectables y además como amonio, nitrito y nitrato. Por lo general, estas formas inorgánicas constituyen sólo hasta el 2% del N total del suelo. El nitrógeno inorgánico de los suelos tiene un intervalo generalmente comprendido entre el 5 y 15%. Diversos estudios realizados (Blasco y Cornfield 1966; Klinge, 1962) demuestran que los porcentajes de nitrógeno inorgánico son más altos en suelos de regiones áridas o semiáridas, correspondiendo los porcentajes menores a suelos volcánicos. Por lo general, el nitrógeno intercambiable no supera el 2% del nitrógeno total, aunque hay aumento significativo en las regiones áridas o semiáridas. El denominado amonio nativo fijo tiene valores comprendidos entre 3 y 13%. El nitrógeno mineralizado no supera en la mayoría de los casos el 2%, aunque el porcentaje puede aumentar cuando las condiciones de incubación son óptimas.

2.2.6. El ciclo del nitrógeno

El ciclo del nitrógeno en el suelo es parte de un ciclo más completo (Schulten y Schnitzer, 1998); en la figura 3 se representa el ciclo del nitrógeno en el suelo.

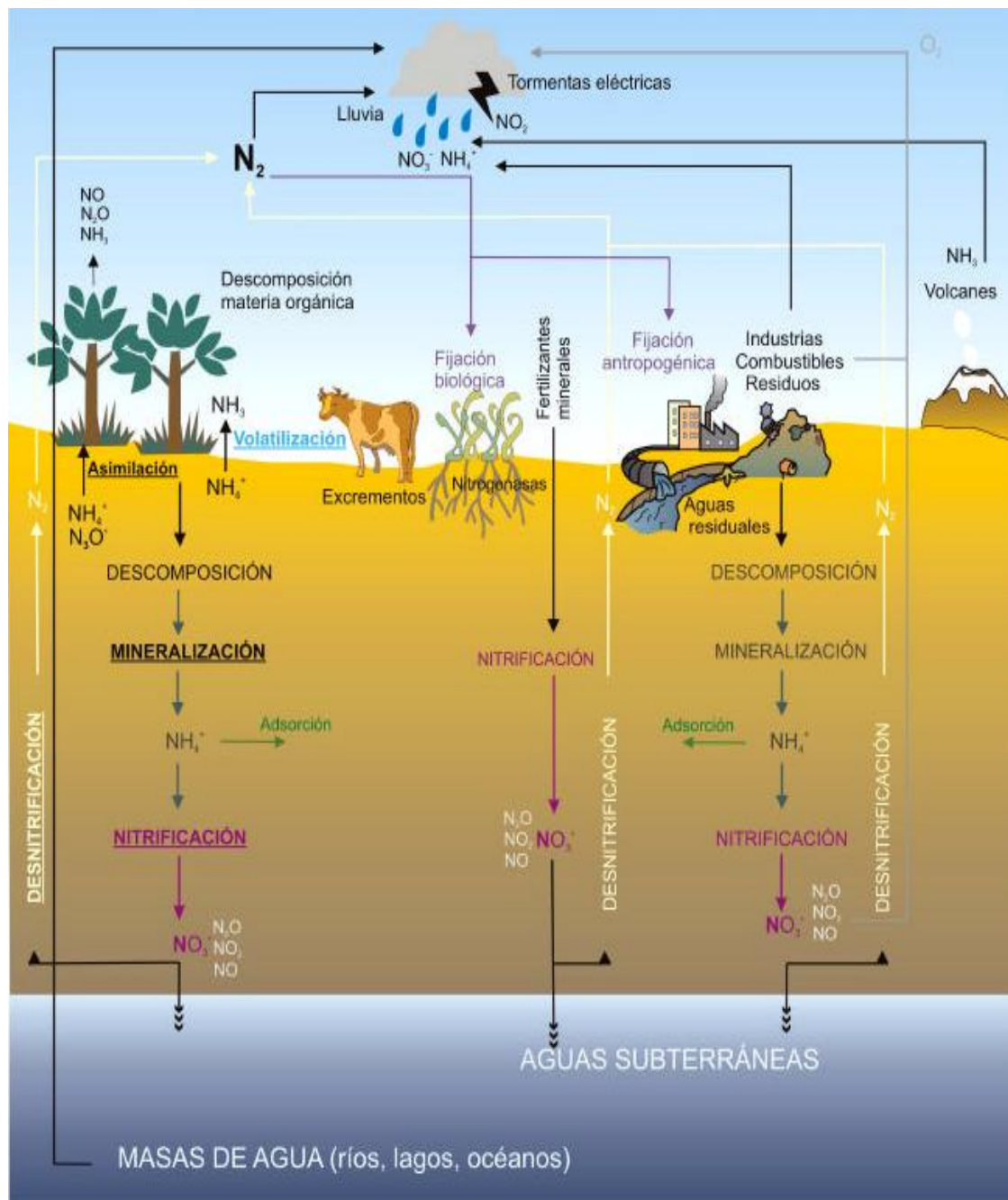


Figura 3. Ciclo del nitrógeno. (Fuente: Masís y González, 2007).

Este es quizá uno de los ciclos más complicados, ya que el nitrógeno se encuentra en varias formas, y se llevan a cabo en él, una serie de procesos químicos en los que el nitrógeno es tomado del aire y es modificado para finalmente ser devuelto a la atmósfera. El nitrógeno (N_2) es el elemento que se encuentra en forma libre (estado gaseoso) y en mayor abundancia en la atmósfera (78 %). Se ubica entre los principales elementos biogeoquímicos; sin embargo, es tan estable, que apenas se combina con otros elementos y, por tanto, es difícil que los organismos lo asimilen, ya que primero necesitan desdoblarlo y emplearlo en la síntesis de aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos (ADN y ARN) y otras moléculas fundamentales para su metabolismo. Por lo tanto, teniendo esto en cuenta, es fácil notar su importancia en la vida de cientos de organismos.

La mayor parte del nitrógeno presente en el suelo está en forma de nitrógeno orgánico. Este nitrógeno orgánico representa una importante reserva de nutrientes y está constituido en aproximadamente un 40% por material proteico (proteínas, péptidos y aminoácidos) (Allano, 1996), aunque también abundan los compuestos heterocíclicos de nitrógeno, aproximadamente un 35% (Schulten y Schnitzer, 1998).

Los microorganismos presentan una gran importancia al describir el ciclo del nitrógeno en el suelo, ya que intervienen en un gran número de procesos. La amonificación se produce debido a la acción de una gran diversidad de microorganismos, tanto aerobios como anaerobios, como bacterias y hongos. Mientras que la nitrificación (conversión de amonio a nitrato por oxidación enzimática) es un proceso que ocurre en dos etapas: conversión de amonio a nitrito y su posterior transformación en nitrato. La primera de estas etapas transcurre principalmente debido a la acción de bacterias pertenecientes al género *Nitrosomonas*, aunque también se encuentran implicadas bacterias pertenecientes a otros géneros como son las *Nitrosolobus* y las *Nitrospira* (De Boer y Kowalchuk, 2001), mientras que

la transformación final en nitrato se produce por medio de la acción de bacterias pertenecientes al género *Nitrobacter*. Este tipo de bacterias son activas en un intervalo de condiciones mucho más estrecho que las bacterias amonificantes (MacDuff y White, 1985). Cada una de estas etapas implicadas en la conversión del nitrógeno orgánico a amonio, se encuentra catalizada por una enzima específica.

2.2.7. Enzimas del suelo

El suelo es un sistema vivo donde toda actividad bioquímica se desarrolla por medio de procesos enzimáticos. Se considera que la actividad enzimática es una de las numerosas formas de medir la calidad del suelo (Kennedy y Smith, 1995). Dicha actividad estaría asociada a condiciones que promueven la síntesis de enzimas microbianas, estabilización y preservación de enzimas extracelulares. Por preceder a la acumulación de materia orgánica, la actividad enzimática sería un sensible y efectivo indicador de los cambios en la calidad del suelo (Kennedy y Papendick, 1995; Park y Seaton, 1996; Monreal et al., 1998).

La actividad de una enzima que actúan sobre un sustrato específico, está relacionada con una reacción específica (Dick et al., 1996), por lo que es necesario medir un amplio grupo de enzimas para caracterizar el estado general de los nutrientes o determinar índices de actividad microbiológica. La medida de una única propiedad biológica o bioquímica no es útil para determinar la calidad del suelo (Dick, 1992) principalmente porque las actividades enzimáticas son variables en el tiempo y espacio. Aunque las medidas simultaneas de varias enzimas se han revelado muy útiles como indicadores de la actividad biológica del suelo y pueden emplearse como índice de la fertilidad bioquímica del suelo (Trasar-Cepeda et al., 1998), este tipo de índices debe incluir un mínimo de datos que reflejan procesos

microbiológicos y bioquímicos importantes en el suelo; además, los métodos empleados para medir estas propiedades deben ser rápidos, simples y precisos (Doran y Parkin, 1994).

Los procedimientos empleados en general se basan en métodos colorimétricos. No obstante, estos métodos son afectados por diferentes factores que limitan la interpretación y comparación de las actividades enzimáticas en diferentes suelos, y se deben tomar en cuenta que tanto influyen en la medición, entre ellos podemos mencionar:

1. Las diferentes fuentes y/o localizaciones de las enzimas en el suelo.
2. Estandarización del método empleado.
3. Evaluación de la adsorción de sustratos o productos por las partículas del suelo.
4. Posible utilización de los productos generados por la acción enzimática por microorganismos durante los ensayos, con incubaciones por largos periodos de tiempo.
5. Los ensayos generales, proporcionan datos sobre la actividad enzimática potencial y total, en vez de la real o actual en el momento de la toma de muestra de suelos.

Las enzimas del suelo más frecuentemente estudiadas son las oxido-reductasas (deshidrogenasas, catalasas y peroxidasas) e hidrolasas (invertasas, fosfatasas, proteasas y ureasas) (Dick, 1994). A continuación se mencionan las funciones, de algunas enzimas comúnmente estudiadas:

- **Proteasas**

Las proteínas son importantes constituyentes de las semillas y de los exudados radiculares o raíces, así como un componente primario funcional y estructural de las paredes celulares de las plantas. Las proteínas entran a formar parte del suelo a través de los organismos muertos, las plantas y los animales. Las proteínas del suelo son descompuestas por multitud de bacterias y hongos. Durante la degradación, las proteasas extracelulares producen oligopéptidos a partir de las proteínas, lo que origina como consecuencia la liberación de compuestos de bajo peso molecular, que son asimilados por los microorganismos. Tras la liberación de las proteasas por parte de las células microbianas las enzimas son absorbidas en coloides del suelo o se unen covalentemente a la materia orgánica. Las enzimas así inmovilizadas muestran un alto grado de resistencia a la proteólisis.

Las proteasas son enzimas que modifican la velocidad en el ciclo del nitrógeno en el suelo (Ladd y Paul, 1973; Hayano, 1996) ya que las reacciones catalizadas por proteasas juegan un papel importante en el contenido de nitrógeno del mismo siendo las responsables de la descomposición progresiva del nitrógeno contenido en las proteínas a nitrógeno peptídico y finalmente a aminoácidos. En cuanto al origen de las proteasas en la matriz del suelo, Hayano (1996) concluye que éstas proceden principalmente de animales y microorganismos, así como, en mucha menor proporción, de los residuos vegetales.

- **Ureasa**

La enzima ureasa cataliza la hidrólisis de la urea a amonio y dióxido de carbono. Esta enzima se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, en microorganismos, células animales y vegetales. Posee gran importancia ya que Cataliza y controla la mayoría de las reacciones bioquímicas del

cuerpo y forma parte del ciclo del nitrógeno donde las plantas y microorganismos utilizan el amonio liberado para sus procesos metabólicos. (Masís y González, 2007)

La ureasa es una proteína hexamérica que contiene dos iones Ni (II) por subunidad. El mecanismo de reacción propuesto para la hidrólisis de urea es aquel en que un ión Ni^{2+} polariza el grupo carbonilo de la urea para facilitar el ataque nucleofílico por un anión OH^- que es activado por el segundo Ni^{2+} (Andrews et al., 1984).

- **Desaminasa**

Es la enzima encargada de catalizar la pérdida de NH_3 en un aminoácido originando un ácido carboxílico. Se encuentra en los tejidos de todos los mamíferos, participa en el metabolismo de las purinas y esta asociada a enfermedades como la tuberculosis (Ginés, 1996).

Las actividades enzimáticas de la ureasa, proteasas y desaminasas, son ampliamente estudiadas en el suelo junto con otro grupo de hidrolasas, como indicadores de calidad, fertilidad y en la evaluación del impacto de contaminantes en el mismo. El interés por estas actividades, se debe a su relación con el ciclo del nitrógeno ya que funcionan como reguladoras dentro del mismo.

2.2.8. Contaminación del suelo

Un suelo se puede degradar al acumularse en él sustancias a unos niveles tales que repercuten negativamente en el mismo. Las sustancias, a esos niveles de concentración, se vuelven tóxicas para los organismos del suelo; se trata pues de una degradación química y física que provoca la pérdida parcial o total de la productividad del suelo. En los estudios de contaminación, no basta con detectar la presencia de contaminantes sino

que se han de definir los máximos niveles admisibles y además se han de analizar posibles factores que puedan influir en la respuesta del suelo a los agentes contaminantes (Amador, 2010). Entre estos factores podemos referirnos a los siguientes:

1. Vulnerabilidad: Representa el grado de sensibilidad (o debilidad) del suelo frente a la agresión de los agentes contaminantes. El grado de vulnerabilidad de un suelo frente a la contaminación depende de la intensidad de afectación, del tiempo que debe transcurrir para que los efectos indeseables se manifiesten en las propiedades físicas y químicas de un suelo y de la velocidad con que se producen los cambios secuenciales en las propiedades de los suelos en respuesta al impacto de los contaminantes.
2. Amortiguación: El conjunto de las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo lo hacen un sistema clave, especialmente importante en los ciclos biogeoquímicos superficiales, en los que actúa como un reactor complejo, capaz de realizar funciones de filtración, descomposición, neutralización, inactivación, almacenamiento, etc. Por todo ello el suelo actúa como barrera protectora de otros medios más sensibles, como los hidrológicos y los biológicos. La mayoría de los suelos presentan una elevada capacidad de depuración.
3. Biodisponibilidad: Se entiende la asimilación del contaminante por los organismos, y en consecuencia la posibilidad de causar algún efecto, negativo o positivo.
4. Movilidad: Se regulará la distribución del contaminante y por tanto su posible transporte a otros sistemas.
5. Persistencia: Se regulará el periodo de actividad de la sustancia y por tanto es otra medida de su peligrosidad.

2.2.8.1. Causas y orígenes de la contaminación del suelo

Es posible clasificar los orígenes de la contaminación del suelo en dos grandes tipos: contaminación de la mano del hombre y contaminación por efectos naturales. En el primer tipo, el hombre está implicado de manera directa; es aquel tipo de contaminación en que el hombre es parte activa de la degradación del suelo como puede ser la transformación de cultivos, urbanización del medio, creación de grandes vías de comunicación terrestre (autopistas, carreteras), vertidos, entre otros (Díaz y Cruz, 1989)

En este trabajo de investigación, se estudiarán muestras de suelos caracterizados por poseer gran cantidad de basura; cuando se amontona la misma al aire libre, y permanece en un mismo lugar durante mucho tiempo, parte de dicha basura orgánica (residuos de alimentos como cáscaras de fruta, pedazos de tortilla, etc.) se fermenta, además de dar origen a mal olor y gases tóxicos, al filtrarse a través del suelo en especial cuando éste es permeable, (deja pasar los líquidos) contamina con hongos, bacteria, y otros microorganismos patógenos (productores de enfermedades), no sólo ese suelo, sino también las aguas superficiales y las subterráneas que están en contacto con él, interrumpiendo los ciclos biogeoquímicos y contaminando las cadenas alimenticias (Amador, 2010).

En el segundo tipo, el hombre está implicado de manera indirecta. Es la contaminación por efectos naturales como puede ser la erosión y desertificación (Díaz y Cruz., 1989).

2.2.9. Residuos sólidos y su clasificación

Un residuo sólido se define como cualquier objeto o material de desecho que se produce tras la fabricación, transformación o utilización de bienes de consumo y que se abandona después de ser utilizado (Galdames, 2000). Es la parte o totalidad de un bien que no es útil a un propósito determinado (Colina et al., 2011).

El residuo se puede clasificar de varias formas, tanto por estado, origen o característica (Galdames, 2000). Además, un residuo también puede ser caracterizado por sus características de composición y generación.

- **Clasificación por estado**

Un residuo es definido por estado según el estado físico en que se encuentre. Existe por lo tanto tres tipos de residuos desde este punto de vista sólidos, líquidos y gaseosos, es importante notar que el alcance real de esta clasificación puede fijarse en términos puramente descriptivos o, como es realizado en la práctica, según la forma de manejo asociado: por ejemplo un tambor con aceite usado y que es considerado residuo, es intrínsecamente un líquido, pero su manejo va a ser como un sólido pues es transportado en camiones y no por un sistema de conducción hidráulica.

- **Clasificación por origen**

Se puede definir el residuo por la actividad que lo origine, esencialmente es una clasificación sectorial. Esta definición no tiene en la práctica límites en cuanto al nivel de detalle en que se puede llegar en ella. Los tipos de residuos más importantes según su origen:

1. *Residuos municipales:* La generación de residuos municipales varía en función de factores culturales asociados a los niveles de ingreso, hábitos de consumo, desarrollo tecnológico y estándares de calidad de vida de la población. Los sectores de más altos ingresos generan mayores volúmenes per cápita de los residuos, y estos residuos tienen un mayor valor incorporado que los provenientes de sectores más pobres de la población.
2. *Residuos industriales:* La cantidad de residuos que genera una industria es función de la tecnología del proceso productivo, calidad de las materias primas o productos intermedios, propiedades físicas y químicas de las materias auxiliares empleadas, combustibles utilizados y los envases y embalajes del proceso.
3. *Residuos mineros:* Los residuos mineros incluyen los materiales que son removidos para ganar acceso a los minerales y todos los residuos provenientes de los procesos mineros.
4. *Residuos hospitalarios:* Actualmente el manejo de los residuos hospitalarios no es el más apropiado, al no existir un reglamento claro al respecto. El manejo de estos residuos es realizado a nivel de generador y no bajo un sistema descentralizado. A nivel de hospital los residuos son generalmente esterilizados. La composición de los residuos hospitalarios varía desde el residuo tipo residencial y comercial a residuos de tipo medico conteniendo sustancias peligrosas. Según el Integrated Waste Management Board de California USA se entiende por residuo medico como aquel que esta compuesto por residuos que es generado como resultado de:
 - a) Tratamiento, diagnóstico o inmunización de humanos o animales.

b) Investigación conducente a la producción o prueba de preparaciones medicas hechas de organismos vivos y sus productos.

- **Clasificación por tipo de manejo**

Se puede clasificar un residuo por presentar algunas características asociadas a manejo que debe ser realizado. Desde este punto de vista se pueden definir tres grandes grupos:

- a) Residuo peligroso: Son residuos que por su naturaleza son inherentemente peligrosos de manejar y/o disponer y pueden causar muerte, enfermedad; o que son peligrosos para la salud o el medio ambiente cuando son manejados en forma inapropiada.
- b) Residuo inerte: Residuo estable en el tiempo, el cual no producirá efectos ambientales apreciables al interactuar en el medio ambiente.
- c) Residuo no peligroso: Ninguno de los anteriores.

CAPITULO III: Marco Metodológico

3.1 Descripción de la zona de estudio

La zona objeto de estudio está situada en la parroquia San Joaquín del Municipio San Joaquín. Se localiza entre las coordenadas geográficas 67° 49' 20" de longitud oeste y 10° 18' 50" de latitud norte, a 800 m.s.n.m. Está ubicada en el sector noroeste de la parroquia (Mesa, 2011).



Figura 4. Ubicación geográfica de la zona el Ereigüe (Fuente: Mesa 2011)

3.2 Muestreo y preparación de las muestras

Se realizó una toma de muestra, empleando el método al azar, a lo largo de toda la zona de estudio, debido a que de esta manera se garantiza la variabilidad existente en la zona muestreada, además de incrementar la precisión de los resultados, sin aumentar sustancialmente los costos (Darwich, 2003).

Utilizando una chícora, en bolsas plásticas de polietileno, se recolectaron diez muestras, las cuales constaron de una capa superficial de suelo (relleno de profundidades comprendidas entre 0-20 cm) y una capa más interna, debajo del relleno con profundidades aproximadas de entre 10 y 40 cm. Adicionalmente se tomaron dos muestras control en las afueras del vertedero. En la tabla N° 2 se presenta la ubicación geográfica de cada muestra.

Tabla 2. Coordenadas de cada una de las muestras de suelo recolectadas.
(Fuente: Propia, 2011)

MUESTRA	NORTE	OESTE
1	10º 09 `7``	67º 52 `10``
2	10º 10 `7``	67º 52 `47``
3	10º 9 `55``	67º 52 `47``
4	10º 9 `44``	67º 52 `47``
5	10º 9 `58``	67º 48 `27``
6	10º 16 `55``	67º 48 `27``
7	10º 16 `59``	67º 48 `34``
8	10º 17 `0``	67º 48 `32``
9	10º 16 `54``	67º 48 `32``
10	10º 17 `3``	67º 48 `37``
control	10º 16 `57``	67º 48 `30``

Para la determinación de los parámetros fisicoquímicos (textura, pH, conductancia eléctrica, contenido y retención de humedad, carbono orgánico total), las muestras de suelo recolectadas se dejaron secar al aire por 72 horas.

Luego, se les realizó la molienda y se pasó por tamiz de 2 mm, y por último se almacenaron en recipientes con tapa a temperatura ambiente.

Por su parte, para la determinación de los parámetros bioquímicos nitrógeno total, contenido de amonio y contenido de nitrato, las muestras frescas (almacenadas a 4° C), se extendieron sobre un plástico limpio y seco, se les retiró el material grueso (piedras, hojas, tallos, raíces, estiércol y basura), y se pasaron por un tamiz de 2 mm. Las muestras tamizadas se almacenaron en recipientes con tapa a -20°C (Frostergård et al., 1993; Matsushita et al., 2007).

3.3. Equipos

3.3.1. Agitador orbital:

Utilizado para la agitación de las muestras de suelos en la determinación de las actividades de las enzimas ureasa, desaminasa y proteasa. Marca BUNSEN modelo AO-400 (figura 5), con tiempo programado de 0 a 60 minutos y regulación de la velocidad de orbitación. Este equipo se encuentra en el Laboratorio de Investigaciones Bioquímicas-FACYT-UC.



Figura 5: Agitador Orbital (Laboratorio de Investigaciones Bioquímicas FACYT-UC 2011)

3.3.2. Espectrofotómetro:

Se utilizó en la medición de la absorbancia de los colores desarrollados en la determinación del contenido de carbono orgánico, contenido de amonio, contenido de nitrato y las diferentes actividades enzimáticas antes citadas. Marca UNICO modelo 1100RS (figura 6), que opera con un ancho espectral (rendija) de 10 nm; monocromador de haz simple, red de difracción de 1200 líneas/mm; intervalo de longitud de onda de 335-1000nm; con intervalo fotométrico de 0-125%T, 0-2^a y 0-1999C (0-1999F) y utiliza como fuente de luz una bombilla halógena de Tungsteno. Este equipo se encuentra en el Laboratorio de Química Orgánica-FACYT-UC.

Bejarano B. (2011). Estudio de Actividades Enzimáticas involucradas en el Ciclo del Nitrógeno en suelos impactados con Desechos Sólidos ubicados en la zona del Ereigüe -Estado Carabobo



Figura 6: Espectrofotómetro (Laboratorio de Química Orgánica-FACYT-UC 2011)

3.3.3. Baño Termostático:

En este equipo se realizó la incubación de las muestras para la determinación de las actividades enzimáticas estudiadas, es de marca COLE-PALMER y se encuentra en el Laboratorio de Fisicoquímica-FACYT-UC.



Figura 7: Baño termostático (Laboratorio de Fisicoquímica -FACYT-UC 2011)

3.3.4. *Centrifuga:*

Este equipo se utilizó en la centrifugación a 3000 y 3500 rpm de las muestras de suelo en la determinación de las actividades de las enzimas desaminasa, ureasa y proteasa. Se encuentra en el Laboratorio de Investigaciones Bioquímicas FACYT-UC.



Figura 8: Centrifuga (Laboratorio de Investigaciones Bioquímicas FACYT-UC 2011)

3.3.5. *Destilador:*

Utilizado en la destilación de las muestras de suelo previamente digestadas para la determinación de nitrógeno total. Se encuentra ubicado en el CIMA-UC.



Figura 9: Destilador (CIMA-UC 2011)

3.4 Caracterización Fisicoquímica del suelo

En el laboratorio se realizaron los análisis fisicoquímicos de las distintas muestras de suelo de la zona, de acuerdo a las metodologías resumidas en la tabla 3.

Tabla 3. Métodos de análisis usados en el Laboratorio para el estudio físico-químico (Fuente: Suarez, 2010).

PARÁMETRO	MÉTODO	TÉCNICA	REFERENCIA
Humedad Relativa (%) y Capacidad de Retención de Humedad	10g de muestra T= 105°C en 24h	Gravimetría	(Jackson, 1970)
pH	1:1 agua o KCL 1M	Potenciometría	(Olarte, 1979)
Conductividad (CE)	1:2 agua	Conductimetría	(Jackson, 1970)
Carbono orgánico	Walkley-Black $K_2Cr_2O_7$	Espectrofotometría 600 nm	(Walinga et al., 1992)
Nitrógeno total	Kjeldahl digestión ácida	Destilación y alcalimetría	(Citado por Faithfull, 2005)
Contenido de Amonio	Determinación Directa	Colorimétrica 690 nm	Kandeler y Gerber, 1988 Modificado
Contenido de Nitrato	Determinación directa con Ácido salicílico	Colorimétrica 410 nm	Anderson e Ingram, 1989
Textura	Al tacto	Tacto	Citado Por Jaramillo, 2002

3.4.1 Determinación del porcentaje de Humedad relativa (Jackson, 1970)

Se pesaron 10g de suelo, se colocaron en la estufa durante 24h a 105°C y se registró nuevamente su peso.

3.4.2 *Determinación de la capacidad de retención de humedad (Jackson, 1970)*

Se pesaron 30g de suelo y se colocaron en embudos de gravedad, se le adicionó agua hasta humedecer todo el suelo, se dejó en reposo durante 6h y luego se registró su peso.

3.4.3 *Determinación de pH y conductividad eléctrica, CE, (Olarte, 1979; Jackson, 1970)*

Se pesaron 5 g de suelo en tubos de ensayo tipo falcón. Se adicionaron 5 mL de agua al primer tubo, 10 mL de agua al segundo, 10 mL de cloruro de potasio al tercero y 10 mL de cloruro de calcio al último tubo con muestra. Luego, se agitaron todos los tubos por 30min, se centrifugaron durante 10min a 3000 rpm y finalmente se determinó el pH a todos los sobrenadantes con un pH-metro. Por su parte la conductividad eléctrica se determinó con un conductímetro sólo al sobrenadante del tubo con 5 g de muestra y 10 mL de agua.

3.4.4 *Determinación de carbono orgánico (Walinga et al., 1992)*

Se pesó 0,1g de suelo, se le adicionó 4 mL de ácido sulfúrico al 97% y 2 mL de solución de dicromato de potasio 0,3 M. se dejó en reposo durante 24h, se llevó a un volumen de 25 mL y se midió la absorbancia a 600nm. Adicionalmente se realizó una curva con patrones de glucosa entre 2 y 12 mgC/mL.

3.4.5 *Determinación de nitrógeno total (Faithfull, 2005)*

Se pesó 1g de muestra y se adicionó la solución digestora de sulfato de cobre, sulfato de potasio y ácido sulfúrico al 97%, se añadió peróxido de hidrogeno al 35% y se sometió a calentamiento (250 °C durante 2 horas). La destilación se hizo empleando hidróxido de sodio al 35% y el destilado se

recogió en ácido bórico al 4%, finalmente se tituló la mezcla colectada con HCl 0,2 M.

3.4.6 *Determinación del contenido de amonio* (Kandeler y Gerber, 1988 modificado)

Se pesó 5g de suelo y se adicionó 8 mL de cloruro de potasio 2M, se agitó por 30 min y se centrifugó por 10 min a 3500 rpm. Se tomó una alícuota de 2 mL de sobrenadante, se adicionó 2 mL de cloruro de potasio 2M, 5mL de la solución de salicilato/hidróxido y 2 mL de solución de dicloroisocianurato de sodio al 0,1%. Se dejó en reposo durante 30min para desarrollo de color y se determinó la absorbancia a 690 nm. Adicionalmente, se realizó una curva de calibración a partir de cloruro de amonio con concentraciones comprendidas entre 0.5 y 2.5 µg/mL.

3.4.7 *Determinación del contenido de nitrato* (Anderson e Ingram, 1989)

Se pesó 5g de suelo y se adicionó una solución al 5% de ácido salicílico en ácido sulfúrico al 97%, luego se adicionó hidróxido de sodio 2 M, se dejó en reposo por 1h para desarrollo de color y se midió su absorbancia a 410nm. Adicionalmente se realizó una curva de calibración con concentraciones desde 2 a 10 mg/L de $[N-NO_3^-]$

3.5 **Determinación de actividades enzimáticas**

Se realizó la determinación de tres actividades enzimáticas en las muestras de suelo: ureasa, desaminasa y proteasa. Para cada actividad enzimática determinada se emplearon 2 réplicas de cada muestra y un blanco.

3.5.1. Determinación de la Actividad Ureásica (Kandeler y Gerber, 1988)

La ureasa actúa como catalizador en la hidrólisis de la urea para la formación de amoníaco y dióxido de carbono, como se muestra en la figura 10.

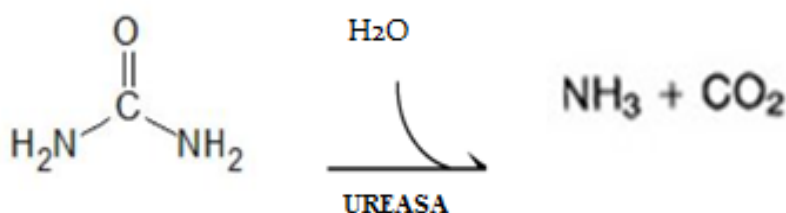


Figura 10: Reacción general de la hidrólisis de la urea

En un tubo de centrifuga tipo falcón se pesó 1g de suelo, se añadió 0.5 mL de solución de urea 79.7 mM (en el caso de las muestras) y 0.5 mL de agua destilada (en el caso de los blancos o control). Se incubaron las muestras y blancos a 37°C por 2 h en un baño termostático. Se añadió 10 mL de solución extractora KCl-HCl 1M, a todos los tubos y posteriormente a las muestras se les añadió 0.5 mL de agua destilada y a los blancos 0.5 mL de solución de urea 79.7 mM. Se agitaron por un periodo de 30 minutos en un agitador horizontal, seguido de una centrifugación por 10 minutos a 3500 rpm en una centrifuga. Se tomó cuidadosamente, una alícuota de 2 mL de cada sobrenadante y se colocó en un vial. Se adicionó 8 mL de agua destilada, 5 mL de la solución salicilato/hidróxido y 2 mL de solución de dicloroisocianurato de sodio al 0,1% p/v. Se dejó en reposo por 30 minutos para el desarrollo de color, y se midió la absorbancia de las soluciones a 690 nm con un espectrofotómetro.

Se realizó una curva de calibración para determinar el amonio liberado, usando una solución madre de cloruro de amonio de 500 µg N-NH₄/mL, a partir de la cual se prepararon soluciones patrones con concentraciones de 0,5 a 2,5 ppm, desarrollando el color de igual manera que las muestras y midiendo su absorbancia a 690 nm.

La actividad de la ureasa se reportó en base a peso de suelo seco, como $\mu\text{g}[\text{N}-\text{NH}_4^+]$ ($\text{g}^{-1} \times \text{h}^{-1}$). El cálculo de dicha actividad se realizó mediante la ecuación EC.1:

$$\text{Act. Ureasa} = \frac{\mu\text{g} [\text{N} - \text{NH}_4]}{\text{g} * \text{h}} = \frac{\left(\frac{\mu\text{g} [\text{N}-\text{NH}_4]}{\text{ml}} \right) * 10 * 11}{\text{PS} * \text{h}} \quad (\text{EC. 1})$$

Donde:

Act. Ureasa= actividad de la enzima Ureasa

10 = Factor de dilución (2 ml de muestra o patrón + 8 ml de agua)

11 = Volumen Final (0,5 ml de sol. urea + 10 ml de KCl-HCl + 0,5 ml de agua)

h = tiempo de incubación (h).

PS = Peso de suelo seco de la muestra (g)

$\mu\text{g}[\text{N}-\text{NH}_4] / \text{ml}$ = Concentración de amonio liberado determinado por la curva de calibración.

3.5.2. Determinación de la actividad proteásica (Ladd y Butler, 1972)

Las proteasas actúan como catalizador en la degradación de proteínas y péptidos, como se muestra en la figura 11.

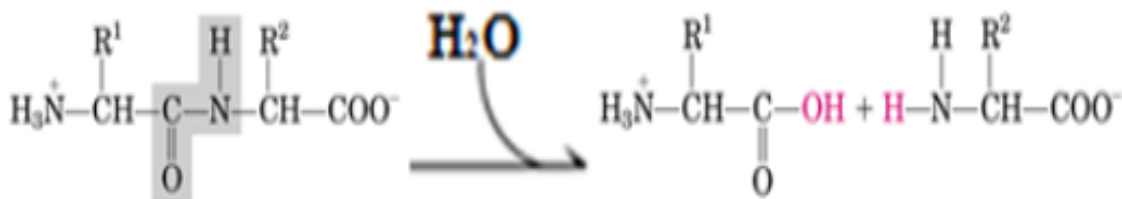


Figura 11. Reacción general de la hidrólisis de un enlace peptídico

Se pesó 2 g de suelo fresco previamente tamizado a 2 mm y se colocó en tubos tipo falcón, se adicionó a cada uno 5 mL de solución amortiguadora, Tris 0,05 M y 5 mL de solución calentada de caseinato de sodio al 2% p/v

(sólo a los envases de muestra), seguidamente se incubaron la muestras y los blancos a 50°C por 2 horas, en un baño termostático. Finalizada la incubación se adicionó 5 mL de TCA al 5% a todos los envases y 5 mL de solución calentada de caseinato de sodio al 2% p/v (sólo a los envases de los blancos o control), se agitó y centrifugó. A continuación se tomó 5mL de sobrenadante y se colocó en un vial con 7.5 mL de reactivo alcalino de trabajo (que contiene carbonato de sodio, sulfato de cobre pentahidratado y tartrato de sodio y potasio), se tomaron con pipetas, 5 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu, se agitó y se dejó en reposo por 1,5 h para la generación de color, midiendo su absorbancia a 700 nm, en un espectrofotómetro. Se realizó una curva de calibración para determinar los aminoácidos solubles en TCA, usando una solución de tirosina de 200 µg/mL, a partir de la cual se prepararon soluciones patrones como se muestra en la tabla 4.

Tabla 4. Preparación de las soluciones patrones de tirosina, para la realización de la curva de calibración (Fuente: Suarez, 2010).

<i>Cantidad de tirosina por tubo (µg)</i>	<i>Volumen de solución de tirosina (mL)</i>	<i>Volumen de solución amortiguadora Tris (mL)</i>
0	0.0	5.0
100	0.5	4.5
200	1.0	4.0
400	2.0	3.0
600	3.0	2.0
800	4.0	1.0
1000	5.0	0.0

Nota: se usaron 5 mL de la solución del sustrato y 5 mL de la solución de TCA.

Luego, las soluciones de la curva patrón, se centrifugaron y se adicionó el reactivo de Folin-Ciocalteu para el desarrollo de color, de la misma manera que las muestras. Los resultados fueron reportados en base a peso de suelo seco, como μg Tirosina ($\text{g}^{-1} \times \text{h}^{-1}$), que es igual a la actividad de la caseinasa, como se muestra en la ecuación EC. 2.

$$\text{Act. Caseinasa} = \mu\text{g Tirosina g}^{-1}\text{h}^{-1} = \frac{(\mu\text{g TirosinaMuestra} - \mu\text{g TirosinaBlanco})}{\text{PS} * \text{h}}$$

(EC.2)

Donde:

Act. Caseinasa= actividad de la enzima caseinasa

Muestra = Promedio de las muestras (μg Tirosina)

Blanco = Promedio de los blancos (μg Tirosina)

PS = peso de suelo seco (g)

h = tiempo de incubación (h)

3.5.3. Determinación de la actividad enzimática de la Desaminasa (Alef y Kleiner, 1986)

Las desaminasas actúan como catalizador para la liberación de amonio, en nuestro estudio se determinó la desaminasa de la arginina, que actúa como se muestra en la figura 12.

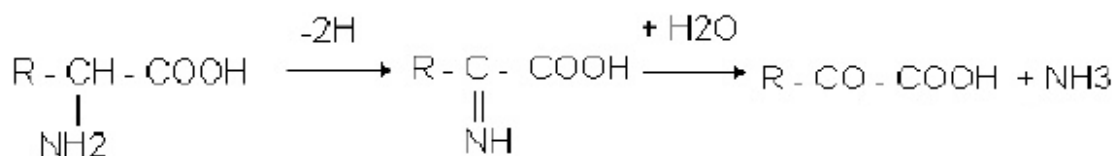


Figura 12. Reacción general de desaminación

Se pesaron 5 g de suelo fresco previamente tamizado, en tubos de centrifuga tipo falcón, se añadieron gota a gota 0.5 mL de solución de arginina al 0.2% p/v (a los tubos con muestra), y a los tubos restantes (control o blanco) se le añadieron 0,5 mL de agua destilada, luego, se taparon e incubaron por 3,5 h a 37°C en un baño termostático. Finalizada la incubación se adicionó 8 mL de KCl 2M tanto a las muestras como a los controles y se agitaron por 30 minutos en un agitador orbital. Luego de la agitación se centrifugaron a 3000 rpm por 10 min, se tomó 2 mL de sobrenadante, y se mezcló con 2 mL de solución de KCl 2M. Luego se adicionaron 5 mL de la solución salicilato/hidróxido y 2 mL de solución de dicloroisocianurato de sodio al 0,1% p/v. Se dejaron en reposo por 30 minutos para el desarrollo de color, midiendo la absorbancia de las soluciones a 690 nm con un espectrofotómetro. Se realizó una curva de calibración para determinar el amoníaco liberado, que en solución se transforma en amonio, usando una solución madre de cloruro de amonio de 500 µg N-NH₄⁺/mL., a partir de la cual se prepararon soluciones patrones con concentraciones de 0,5 a 2,5 ppm, desarrollando el color de igual manera que las muestras y midiendo su absorbancia a 690 nm.

Los resultados fueron reportados basados en el peso de suelo seco, como µg N-NH₄⁺ (g⁻¹ x h⁻¹). La actividad fue calculada a través de la ecuación EC.3.

$$Act.Desaminasa = \frac{\mu g [N - NH_4]}{g * h} = \frac{(M - B) * Vol. Ext.}{PS * h}$$

(EC. 3)

Donde:

Act. Desaminasa= actividad de la enzima desaminasa

M = Valor promedio de la concentración de las muestras (µg N-NH₄⁺/ml)

V = Valor promedio de la concentración de los controles ($\mu\text{g N-NH}_4^+/\text{ml}$)

Vol.Ext = Volumen del extracto (mL) (En este caso 8,5mL)

h = tiempo de incubación (h)

PS = Peso de suelo seco de la muestra (g)

3.5.4 *Correlación entre las actividades enzimáticas estudiadas con las propiedades fisicoquímicas*

Para realizar la correlación de las actividades enzimáticas con los parámetros fisicoquímicos estudiados, se calculó el coeficiente de Pearson a través de la ecuación de Microsoft Excel. Una vez hecho esto, se determinó la desviación estándar a través de la ecuación:

$$s = \sqrt{\frac{1 - r^2}{n}}$$

Donde r es el coeficiente de Pearson y n el número de muestras.

Después se determinó el error de r a un determinado intervalo de confianza, en este caso se hizo para un 95 % de confianza y por tanto la S se multiplicó por 1.746 obteniéndose así el error del coeficiente. Comparando los valores de r con su error se determina si hay o no correlación. Si el error es mayor que el r no hay significancia, pero si r es mayor que el error entonces si hay significancia, es decir, correlación. (Miller y Miller 2002).

CAPITULO IV: Análisis de resultados

En este capítulo se presentan y se analizan los resultados obtenidos, con el propósito de evaluar los efectos causados en las actividades enzimáticas estudiadas en el suelo impactado con desechos sólidos procedente de la zona del Ereigüe en San Joaquín-Estado Carabobo.

4.1. Determinación de las propiedades Fisicoquímicas

En la tabla 5 se presentan los valores obtenidos para los diferentes parámetros fisicoquímicos determinados en las muestras recolectadas. El pH resultó neutro en la mayoría de las muestras y los controles lo que indica que la presencia de contaminante modificó poco este parámetro.

Por su parte, tanto la capacidad de campo y la humedad relativa en las muestras estudiadas presentaron variaciones con respecto a los controles. Recordemos que estos parámetros se ven influenciados por el contenido de materia orgánica ya que la misma le otorga porosidad a la matriz del suelo y permite que se den interacciones electrostáticas con el agua haciéndola capaz de retener humedad (Jaramillo, 2002; Suárez, 2010). Sin embargo, la existencia de contaminante, por su naturaleza heterogénea, es decir, que está compuesto de desechos sólidos de distinta clase y naturaleza, no produjo un incremento o disminución uniforme en todas las muestras.

De la misma forma, la capacidad de intercambio catiónico y el contenido de carbono orgánico del suelo están relacionados con la materia orgánica, por lo que la presencia de gran variedad de desechos sólidos ocasionó también variaciones en el contenido de materia orgánica y por ende alteraciones en estos parámetros (Jaramillo, 2002). (Ver tabla 5).

Tabla 5. Parámetros físicos y químicos determinados en las muestras de suelo impactadas y no impactadas con desechos sólidos (Fuente: Propia, 2011).

MUESTRA	PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS				
	pH 1:1 H ₂ O	pH 1:2 KCl	CE (μs/cm)	HR %	CC %
1 R	6,4 ± 0,1	5,78 ± 0,02	930 ± 38	4,69±0,06	31,00±0,90
p1 F	6,5 ± 0,1	5,79 ± 0,01	848 ± 16	4,42±0,02	32,00±3,00
2 R	7,2 ± 0,2	7,6 ± 0,1	1380 ± 43	7,75± 0,09	18.60± 0,02
2 F	6,9 ± 0,3	7,5 ± 0,3	1720 ± 60	3,9± 0,04	41.61± 0,08
3 R	6,4 ± 0,1	5,65 ± 0,04	350 ± 10	3,48±0,09	41,10±2,00
3 F	6,8 ± 0,2	7,45 ± 0,10	650 ± 35	6,95±0,05	53,40±7,40
4 R	7,1 ± 0,2	7,30 ± 0,20	225 ± 5	5,72± 0,60	39,44 ± 0,08
4 F	7,3 ± 0,1	7,58 ± 0,08	193 ± 5	6,02 ± 0,05	38,30 ± 0,70
5 F	7,0 ± 0,1	6,60 ± 0,20	167,5 ± 0,8	10,70 ± 0,03	27,98±3,27
6 R	6,71 ± 0,01	7,29 ± 0,02	138 ± 2	7,09±0,05	26,17±0,99
6 F	7,18 ± 0,12	7,43 ± 0,01	108 ± 2	8,98±0,04	28,95±3,21
7 R	7,60 ± 0,20	7,60 ± 0,10	1380 ± 43	10,03±0,35	41,26±0,37
7 F	7,43 ± 0,03	7,50 ± 0,30	1720 ± 60	9,64±0,28	32,41±5,76
8 R	7,23 ± 0,03	7,32 ± 0,09	94 ± 2	8,89±0,05	26,86±0,79
8 F	7,53 ± 0,19	7,64 ± 0,01	199 ± 3	7,05±0,08	28,37±1,27
9 R	7,7 ± 0,4	7,50 ± 0,20	189 ± 4	6,45±0,68	69,00±4,00
9 F	7,9 ± 0,1	7,90 ± 0,10	1080 ± 20	8,23±1,16	74,00±3,00
10 F	6,9 ± 0,1	6,96 ± 0,05	69 ± 10	7,89 ± 1,10	25,00 ± 1,00
C 1	7,3 ± 0,1	6,90 ± 0,10	157 ± 23	5,30±0,30	64,50±0,94
C 2	7,0 ± 0,2	5,70 ± 0,60	166 ± 3	6,20 ± 0,40	29,60 ± 0,90

LEYENDA: CE=Conductividad eléctrica; CC=Capacidad de campo; HR= Humedad relativa; R: Relleno; F= Fondo

Tabla 6. Parámetros fisicoquímicos determinados en las muestras de suelo impactadas y no impactadas con desechos sólidos (Fuente: Propia, 2011).

MUESTRA	PARÀMETROS FISICOQUÌMICOS			
	C org %	CIC (cmol/kg)	NO ₃ ⁻ (mg/gss)	NH ₄ ⁺ (mg/gss)
1 R	0,15±0,03	17 ± 2	0,47 ± 0,03	0,71 ± 0,03
1 F	0,54±0,08	18 ± 3	0,3 ± 0,1	0,33 ± 0,02
2 R	0,02 ± 0,01	25,6 ± 0,5	1,0 ± 0,6	0,127 ± 0,006
2 F	0,05 ± 0,01	18,4 ± 0,8	0,56 ± 0,01	0,135 ± 0,004
3 R	0,182±0,009	22 ± 5	0,28 ± 0,05	0,14 ± 0,01
3 F	0,99±0,07	22 ± 6	0,45 ± 0,09	0,13 ± 0,03
4 R	0,22 ± 0,02	30 ± 1	0,6 ± 0,4	0,29 ± 0,05
4 F	0,90 ± 0,01	17,01 ± 0,10	0,8 ± 0,2	0,26 ± 0,02
5 F	0,49±0,31	20 ± 7	0,08 ± 0,03	0,14 ± 0,02
6 R	0,0100±0,0001	20 ± 1	0,18 ± 0,04	0,14 ± 0,02
6 F	0,074±0,002	24 ± 4	0,86 ± 0,02	0,14 ± 0,02
7 R	0,014±0,001	41 ± 1	0,3 ± 0,1	0,464 ± 0,002
7 F	0,023±0,002	49 ± 2	0,167 ± 0,009	0,324 ± 0,002
8 R	0,40±0,01	19 ± 5	0,28 ± 0,01	0,14 ± 0,02
8 F	1,53±0,15	20,02 ± 0,10	0,40 ± 0,02	0,13 ± 0,03
9 R	0,44±0,05	39,2 ± 0,7	0,05 ± 0,03	0,46 ± 0,06
9 F	0,90±0,16	38,2 ± 0,3	2,3 ± 0,1	1,33 ± 0,03
10 F	0,39 ± 0,01	20,02 ± 0,70	0,35 ± 0,01	0,27 ± 0,03
C 1	2,93±0,94	27 ± 5	0,259 ± 0,004	0,29 ± 0,06
C 2	0,52 ± 0,05	29,08 ± 0,60	0,8 ± 0,4	4,0 ± 0,6

LEYENDA: Corg= Carbono orgánico; CIC= Capacidad de intercambio catiónico; R: Relleno; F= Fondo

La determinación de nitrato y amonio en el suelo es de gran importancia ya que representan dos de las formas de nitrógeno inorgánico presentes en éste. El nitrato y el amonio forman parte del ciclo del nitrógeno, el primero es producto de la fase de mineralización del suelo (transformación del amonio a nitrato por acción bacteriana), y el segundo es utilizado por las plantas y otros organismos para su metabolismo, (proceso de Amonificación) (De Boer y Kowalchuk, 2001).

En las muestras estudiadas las cantidades de amonio y nitrato fueron mayores en algunos casos y en otros menores con respecto a los controles (ver tabla 6), esto debido a la presencia de diferentes clases de desechos sólidos en dichas muestras estudiadas.

Si bien, los parámetros fisicoquímicos se vieron influenciados por la heterogeneidad del suelo y por las variaciones en el contenido de materia orgánica, el factor de mayor influencia en los mismos fue su ubicación, ya que muestras tales como la N° 5 y la N° 2 al estar situadas más cerca de la laguna El Ereigüe, presentaron mayor humedad y por ende variaciones marcadas en sus parámetros fisicoquímicos, al contrario de las muestras tales como la N° 6 y la N° 10, que aunque presentaron alteraciones en sus propiedades fisicoquímicas, la ubicación lejos del lago el Ereigüe les aportó menor humedad y por ende alteraciones menos pronunciadas.

El conocimiento del contenido de nitrógeno total en suelos es de gran importancia ya que el mismo representa la reserva disponible de nutrientes para las plantas y microorganismos. En el estudio realizado no fue posible determinar este parámetro por el método empleado (Kjeldahl, digestión ácida) a pesar de que se trabajó con dos procedimientos; el primero aplicado para muestras de suelo (Manual Velp científica-ukd 127), y el segundo, un procedimiento generalmente utilizado para muestras de agua que en este

caso fue aplicado a las muestras de suelo recolectadas (Norma mexicana N° Nmx-AA-020-SCF1-2009) Esto puede ser consecuencia de la digestión incompleta de la materia orgánica la cual al estar constituida por moléculas complejas fue difícil de oxidar lo que ocasionó que no se desprendiera el nitrógeno para su determinación y cuantificación. O simplemente por el bajo contenido de materia orgánica, lo que trae como consecuencia una poca cantidad de nitrógeno orgánico por lo que es necesario aplicar un método más sensible.

Por lo antes descrito, se puede decir que el contenido de nitrógeno total en las muestras es muy bajo, (valores que van desde 0,022 a 0,48 % N), en consecuencia la cantidad de nitrógeno presente podemos asumir que debe ser muy cercano al resultado del aporte de nitrato y amonio dentro de la matriz de suelo. Otra posibilidad que pudiera explicar la no detección de nitrógeno en las muestras, es que el nitrógeno orgánico presente es tan bajo, por ser la materia orgánica tan baja, que la poca cantidad presente se pudo convertir en nitrógeno inorgánico por acción microbiana, y volatilizarse.

4.2. Determinación de las actividades enzimáticas

4.2.1. Determinación de la actividad ureásica

La actividad ureásica fue determinada por el método propuesto por Kandeler y Gerber (1988), cuantificando el amonio liberado durante la incubación de las muestras y los controles con una solución de urea a 37°C durante dos horas. La actividad enzimática obtenida en las muestras de suelo presenta valores dentro del intervalo reportado por Bonmati, et al, (1985) (14 a 210 $\mu\text{g N-NH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$), en la implementación de este método (ver tabla 6).

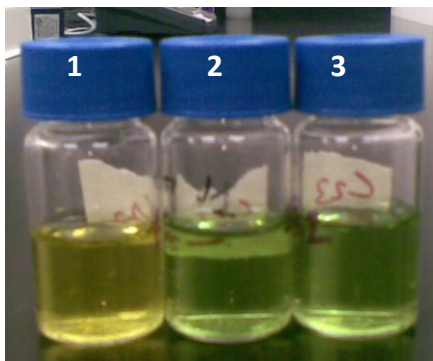


Figura 13. Visualización de la actividad ureásica en las muestras de suelo provenientes de la zona el Ereigüe-Estado Carabobo. (Muestra control 2). El vial 1 (con la coloración menos intensa), corresponde al blanco y los viales 2 y 3 corresponden a la muestra. (Fuente: propia.2011).

La determinación de la actividad ureásica por éste método, está basado en la reacción de Berthelot que consiste en la reacción de formación de indofenol a pH básico, dando una coloración verde esmeralda (Figura 13), la cual es proporcional a la cantidad de amonio liberado, lo que permite apreciar una disminución o aumento de la actividad ureásica.

Tabla 7. Valores de la actividad Ureásica determinada en suelos provenientes de la zona el Ereigüe-Estado Carabobo. (Fuente: propia.2011)

MUESTRA	ACTIVIDAD UREÁSICA ($\mu\text{g N-NH}_4^* \text{ g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)
1 Relleno	41 ± 8
1 Fondo	$20,0 \pm 0,8$
2 Relleno	76 ± 5
2 Fondo	26 ± 3
3 Relleno	96 ± 22
3 Fondo	59 ± 9
4 Relleno	18 ± 1
4 Fondo	75 ± 5
5 Fondo	37 ± 7
6 Relleno	$39,0 \pm 0,1$
6 Fondo	44 ± 11
7 Relleno	62 ± 10
7 Fondo	21 ± 1
8 Relleno	86 ± 2
8 Fondo	$8,2 \pm 0,8$
9 Relleno	$57,0 \pm 0,4$
9 Fondo	$16,18 \pm 0,06$
10 Fondo	53 ± 1
Control 1	$20,5 \pm 0,4$
Control 2	6 ± 2

En cuanto a las correlaciones significativas, sólo se obtuvieron de magnitud negativa ($P < 0.05$), con el pH en solución acuosa ($r = -0.39$), lo que indica que a medida que la actividad de la enzima aumenta disminuye este parámetro fisicoquímico. Sabiendo que las enzimas son proteínas, cualquier cambio brusco de pH puede alterar el carácter iónico de los grupos amino y carboxilo en la superficie proteica, afectando así las propiedades catalíticas de la enzima. A pH alto o bajo se puede producir la desnaturalización de la enzima y en consecuencia su inactivación (Hernández 2001).

Muchas enzimas tienen máxima actividad cerca de la neutralidad en un intervalo de pH de 6 a 8 como es el caso de la Ureasa (Hernández 2001). La presencia de contaminante, que en este caso son desechos sólidos de diferente tipo y origen puede modificar el pH del suelo lo que ocasiona variaciones en la actividad de dicha enzima.

Tabla 8. Correlación de la actividad Ureásica con los parámetros fisicoquímicos estudiados. (Fuente: propia.2011).

	pH 1:1 H ₂ O	pH 1:1 KCL	CE	CC	HR	C org	CIC	NO ₃	NH ₄	Act. Ure
Act. Ure										1
NH ₄									1	-0,2
NO ₃								1	0,75	0,04
CIC							1	0,2	0,25	-0,09
C org						1	-0	-0,09	0,15	-0,08
HR					1	0,21	0,3	0,38	0,47	-0,22
CC				1	-0,2	0,04	-0,1	0,11	0,04	0,24
CE			1	-0,2	0,35	0,05	0,4	0,35	0,59	-0,2
pH 1:1 KCL		1	0,15	-0,1	-0,2	-0,2	0,22	0,28	0,42	-0,18
pH 1:1 H ₂ O	1	0,34	0,22	-0,1	-0,3	-0,08	-0,1	-0,39	0,06	-0,4

LEYENDA: los números en **rojo** indican que existe correlación significativa (P<0.05), valores sin color indican que no hay correlación; CE=Conductividad eléctrica; CC=Capacidad de campo; HR= Humedad relativa; Corg= Carbono orgánico; CIC= Capacidad de intercambio catiónico; Act. Ure= Actividad ureásica.

Por otra parte, no se encontraron correlaciones de la actividad Ureásica con los parámetros de humedad, capacidad de campo, contenido de amonio y contenido de nitrato, aunque en general estos parámetros influyen en la actividad enzimática de la ureasa.

La ureasa es la enzima que cataliza la hidrólisis de la urea a dióxido de carbono y amoníaco, que en solución se convierte en amonio como se muestra en la figura 13.

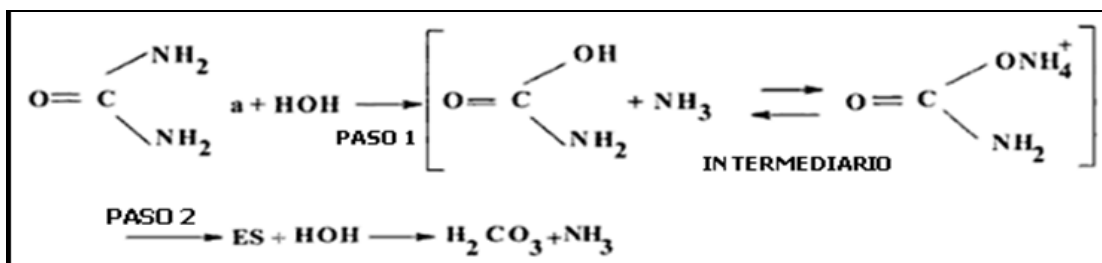


Figura 14. Reacción completa de hidrólisis de la urea por la enzima ureasa
(Fuente: García et al., 2003)

De esta forma, las variaciones en la actividad de la enzima afectan directamente el contenido de amonio en la matriz del suelo para la fase de nitrificación del ciclo del nitrógeno donde el amonio es oxidado por acción bacteriana para formar nitrato (De Boer y Kowalchuk, 2001).

La reacción de hidrólisis ocurre por supuesto en medio acuoso, por esto la disponibilidad de agua en los suelos es de gran importancia ya que afecta la velocidad de la reacción y por ende la actividad de la enzima.

En la tabla 9 se presentan los porcentajes de actividad que existen en cada una de las muestras estudiadas. Es importante destacar que este porcentaje no se refiere a una actividad enzimática propiamente dicha, sino que compara el porcentaje de actividad en las muestras impactadas, con el porcentaje de actividad de las muestras controles aledañas al vertedero.

Tabla 9 Porcentaje de actividad de la enzima Ureasa en muestras de suelo impactado por desechos sólidos provenientes de la zona el Ereigüe-Estado Carabobo. (Fuente: propia.2011).

Muestra	Porcentaje de actividad (%)
1 Relleno	204 ± 42
1 Fondo	97,53 ± 4,04
2 Relleno	363 ± 24
2 Fondo	129 ± 15
3 Relleno	470 ± 107
3 Fondo	290 ± 45
4 Relleno	89 ± 5
4 Fondo	364 ± 26
5 Fondo	179 ± 35
6 Relleno	191 ± 5
6 Fondo	219 ± 52
7 Relleno	303 ± 52
7 Fondo	100 ± 9
8 Relleno	422 ± 11
8 Fondo	40 ± 4
9 Relleno	279 ± 2
9 Fondo	79,0 ± 0,3
10 Fondo	256 ± 9

Nótese que en algunos casos la actividad aumenta y en otros disminuye. Puesto que el estudio de la actividad enzimática está basado en que bacterias y hongos liberan extracelularmente enzimas que ayudan a descomponer la materia orgánica del suelo a formas asimilables (Sinsabaugh *et al.*, 1999), se puede decir que en algunas muestras tales como relleno 2 y relleno 7, la clase de desechos sólidos que contienen favorece el crecimiento de bacterias u hongos que producen esta enzima y de esta manera aumenta su actividad, caso contrario ocurre en muestras tales como 4 fondo y 2 fondo donde la presencia de contaminante

desfavorece el crecimiento de estos microorganismos que producen esta enzima para sus procesos metabólicos.

4.2.2. Determinación de la actividad proteásica

La determinación de la actividad proteásica se basa en la reacción de Folin, con los aminoácidos liberados solubles en tricloroacético (TCA) después de incubar el suelo con caseína a 50°C por dos horas. La reacción de Folin implica oxidación de residuos de aminoácidos susceptibles, dando como resultado es una sal reducida tipo molibdeno, de color azul.

Estudios realizados en suelos cacaoteros del occidente venezolano reportaron valores de actividad proteásica en un intervalo entre (45 ± 29) y (296 ± 75) mg tirosina g suelo⁻¹ 2h⁻¹ (Armado *et al.*, 2009). Los valores obtenidos para esta actividad enzimática se encuentran dentro de este intervalo como se observa en la tabla N° 9.

Por otra parte, la actividad proteásica presentó correlación significativa ($P > 0.05$) con el pH en solución acuosa ($r = 0.60$) (ver tabla 10). Esto quiere decir que al igual que la ureasa cuando el pH se incrementa disminuye la actividad de la proteasa debido a que cualquier cambio brusco en el pH, ocasiona alteraciones en los terminales ácidos (grupos carboxilos) y básicos (grupos aminos) de la superficie proteica, afectando así las propiedades catalíticas de la enzima (Frankenberger y Dick, 1983).

Tabla 10. Valores de la actividad protésica determinada en suelos provenientes de la zona el Ereigüe-Estado Carabobo. (Fuente: propia.2011)

MUESTRA	ACTIVIDAD PROTEÁSICA (μg tirosina* $\text{g}^{-1}\text{h}^{-1}$)
1 Relleno	84 ± 15
1 Fondo	96 ± 1
2 Relleno	44 ± 15
2 Fondo	-
3 Relleno	50 ± 16
3 Fondo	95 ± 17
4 Relleno	53 ± 19
4 Fondo	38 ± 11
5 Fondo	45 ± 25
6 Relleno	45 ± 17
6 Fondo	58 ± 28
7 Relleno	75 ± 20
7 Fondo	112 ± 37
8 Relleno	77 ± 48
8 Fondo	45 ± 17
9 Relleno	56 ± 4
9 Fondo	47 ± 17
10 Fondo	69 ± 17
Control 1	47 ± 5
Control 2	138 ± 15

Adicionalmente, la actividad de la proteasa presentó correlación significativa ($P < 0.05$) con el contenido de nitrato ($r = -0.42$), puesto que está involucrada en el ciclo del nitrógeno catalizando la degradación de proteínas y péptidos a aminoácidos, que a su vez mediante la degradación oxidativa producen nitrato (Masís y González 2007). La presencia de contaminante afectó este parámetro fisicoquímico originando como consecuencia alteraciones en la actividad de la enzima incrementándola en algunas muestras y disminuyéndola en otras.

Tabla 10. Correlación de la actividad proteásica con los parámetros fisicoquímicos estudiados. (Fuente: propia.2011).

	pH 1:1 H ₂ O	pH 1:1 KCL	CE	CC	HR	C org	CIC	NO ₃	NH ₄	Act. Pro
Act. Ure										1
NH ₄									1	-0,18
NO ₃								1	0,75	-0,42
CIC							1	0,2	0,25	0,28
C org						1	-0	-0,09	0,15	0,01
HR					1	0,21	0,3	0,38	0,47	-0,16
CC				1	-0,2	0,04	-0,3	0,11	0,04	0
CE			1	-0,2	0,35	0,05	0,4	0,35	0,59	0,23
pH 1:1 KCL		1	0,15	-0,1	-0,2	-0,2	0,22	0,28	0,42	-0,14
pH 1:1 H ₂ O	1	0,34	0,22	-0,1	-0,3	-0,08	-0,1	-0,39	0,06	0,6

LEYENDA: los números en **rojo** indican que existe correlación significativa ($P < 0.05$), valores sin color indican que no hay correlación; CE=Conductividad eléctrica; CC=Capacidad de campo; HR= Humedad relativa; Corg= Carbono orgánico; CIC= Capacidad de intercambio catiónico; Act. Pro= Actividad Proteásica.

En la tabla 11 se presentan los porcentajes de actividad de la proteasa con respecto a los controles. En este caso la actividad disminuyó en todas las muestras lo que indica que la presencia de desechos sólidos ejerció un efecto tóxico para la actividad de esta enzima.

Tabla 11. Porcentaje de actividad de la enzima proteasa en muestras de suelo impactado por desechos sólidos provenientes de la zona el Ereigüe- Estado Carabobo. (Fuente: propia.2011).

Muestra	Porcentaje de actividad
1 Relleno	60 ± 10
1 Fondo	69 ± 1
2 Relleno	32 ± 11
2 Fondo	-
3 Relleno	36 ± 11
3 Fondo	68 ± 12
4 Relleno	38 ± 14
4 Fondo	28 ± 8
5 Fondo	33 ± 18
6 Relleno	32 ± 12
6 Fondo	42 ± 20
7 Relleno	54 ± 14
7 Fondo	81 ± 27
8 Relleno	55 ± 34
8 Fondo	32 ± 12
9 Relleno	41 ± 3
9 Fondo	34 ± 13
10 Fondo	50 ± 12

4.2.3. Determinación de la actividad de la Desaminasa

El principio del método implementado para la determinación de la actividad desaminásica, es añadir una solución acuosa de arginina y determinar el amonio liberado después de 3 horas de incubación a 37°C, el cual es extraído con una solución de cloruro de potasio y se determina colorimétricamente por la reacción del indofenol (verde esmeralda), relacionando directamente la intensidad del color con la cantidad de amonio liberado, análogo a la determinación de ureasa (Figura 15).

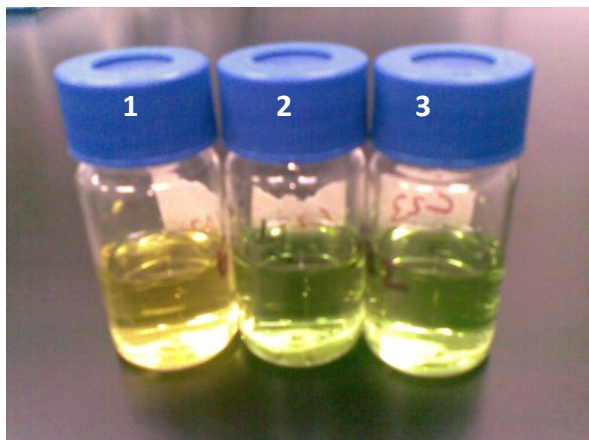


Figura 15. Visualización de la actividad Desaminàsica en las muestras de suelo provenientes de la zona el Ereigüe-Estado Carabobo. (Muestra 2) El vial con la coloración menos intensa (Nº 1), corresponde al blanco y los demás, Nº 2 y Nº3 a la muestra. (Fuente: propia.2011).

Estudios relacionados con la actividad de esta enzima en los suelos venezolanos libres de contaminación, presentan valores entre $(0,04 \pm 0,02)$ y $(0,19 \pm 0,06) \mu\text{gN-NH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Armado *et al.*, 2009) y desde $(0,757 \pm 0,210)$ hasta $(13,05 \pm 3,20) \mu\text{gN-NH}_4 \text{ g}^{-1}$ de suelo seco por 24h (Flores, S. *et al.*, 2003). En este estudio los valores obtenidos para la actividad de la desaminasa se encuentran dentro de estos intervalos. (Ver tabla Nº 12).

Tabla 12. Valores de la actividad de la Desaminasa determinados en suelos provenientes de la zona el Ereigüe-Estado Carabobo. (Fuente: propia.2011)

MUESTRA	ACTIVIDAD DE LA DESAMINASA ($\mu\text{gN-NH}_4^* \text{ g}^{-1}*\text{h}^{-1}$)
1 Relleno	$0,05 \pm 0,02$
1 Fondo	$0,02 \pm 0,01$
2 Relleno	$0,02 \pm 0,01$
2 Fondo	$0,05 \pm 0,04$
3 Relleno	$0,013 \pm 0,005$
3 Fondo	$0,027 \pm 0,006$
4 Relleno	$0,024 \pm 0,004$
4 Fondo	$0,05 \pm 0,01$
5 Fondo	$0,06 \pm 0,05$
6 Relleno	$1,0 \pm 0,2$
6 Fondo	3 ± 1
7 Relleno	$0,05 \pm 0,03$
7 Fondo	$0,023 \pm 0,003$
8 Relleno	$0,017 \pm 0,005$
8 Fondo	$0,0238 \pm 0,0007$
9 Relleno	$0,05 \pm 0,04$
9 Fondo	$0,0062 \pm 0,0007$
10 Fondo	$0,039 \pm 0,002$
Control 1	$0,08 \pm 0,05$
Control 2	$0,114 \pm 0,008$

La actividad de la desaminasa no reveló correlaciones significativas con ninguno de los parámetros fisicoquímicos (ver tabla N° 13), lo que indica que dichos parámetros no afectan notablemente esta actividad enzimática, sin embargo, la presencia de contaminante si la afectó en general inhibiéndola.

Tabla 13. Correlación de la actividad de la Desaminasa con los parámetros fisicoquímicos estudiados. (Fuente: propia.2011).

	pH 1:1 H2O	pH 1:1 KCL	CE	CC	HR	C org	CIC	NO3	NH4	Act. Des.
Act. Ure										1
NH4									1	-0,15
NO3								1	0,75	0,13
CIC							1	0,2	0,25	-0,25
C org						1	0	-0,09	0,15	-0,16
HR					1	0,21	0,3	0,38	0,47	-0,07
CC				1	-0,2	0,04	-0,3	0,11	0,04	-0,16
CE			1	-0,2	0,35	0,05	0,4	0,35	0,59	-0,09
pH 1:1 KCL		1	0,15	-0,1	-0,2	-0,2	0,22	0,28	0,42	0,1
pH 1:1 H2O	1	0,34	0,22	-0,1	-0,3	0,08	-0,1	-0,39	0,06	-0,1

LEYENDA: los números en **rojo** indican que existe correlación significativa ($P < 0.05$), valores sin color indican que no hay correlación; CE=Conductividad eléctrica; CC=Capacidad de campo; HR= Humedad relativa; Corg= Carbono orgánico; CIC= Capacidad de intercambio catiónico; Act. Des= Actividad de la Desaminasa.

Al comparar los porcentajes de actividad de la enzima con respecto a las muestras control o no impactadas, se observó una disminución en casi todas las muestras a excepción de la muestra 6 relleno y fondo cuya actividad aumentó (Ver tabla N° 14). Esto puede ser causado por la naturaleza de los distintos desechos sólidos presentes en las muestras recolectadas algunos de ellos pueden poseer mayor cantidad de materia orgánica aprovechable para los microorganismos, sin embargo, otros pueden estar constituidos de elementos tóxicos que inhiban la actividad de la enzima. Además la ubicación con respecto a la laguna el Ereigüe, influyó en la actividad enzimática por las diferencias de humedad en las muestras debido a su cercanía o lejanía de la laguna.

Tabla 14. Porcentaje de actividad de la Desaminasa en muestras de suelo impactado por desechos sólidos provenientes de la zona el Ereigüe-Estado Carabobo. (Fuente: propia.2011).

Muestra	Porcentaje de actividad
1 Relleno	45 ± 16
1 Fondo	17 ± 2
2 Relleno	11 ± 5
2 Fondo	47 ± 12
3 Relleno	11 ± 4
3 Fondo	22 ± 5
4 Relleno	20 ± 3
4 Fondo	41 ± 12
5 Fondo	49 ± 9
6 Relleno	228 ± 20
6 Fondo	382 ± 32
7 Relleno	38 ± 16
7 Fondo	19 ± 2
8 Relleno	14 ± 4,
8 Fondo	19,81 ± 0,57
9 Relleno	42 ± 18
9 Fondo	5,21 ± 0,57
10 Fondo	32 ± 1

En general, podemos decir que las actividades enzimáticas estudiadas en este trabajo pueden servir como indicadores biológicos de la salud del suelo, ya que presentan variaciones respecto a los suelos control, observándose que la más sensible a la presencia de desechos sólidos fue la desaminasa encontrándose en la mayoría de las muestras porcentajes de actividad menores a 50 % respecto al control.

Adicionalmente, la poca presencia de nitrógeno en los suelos puede estar influyendo para obtener valores bajos de las actividades enzimáticas estudiadas en estos suelos contaminados con desechos urbanos.

Capítulo V: Conclusiones y Recomendaciones

5.1. Conclusiones

- Los contenidos de amonio y de nitrato presentaron correlaciones significativas positivas ($P > 0.05$), puesto que ambos forman parte del ciclo del nitrógeno, donde en el proceso de nitrificación, el amonio presente en el suelo es transformado en nitrato por acción bacteriana.
- Se presentaron correlaciones significativas ($P > 0.05$) entre la humedad del suelo, la capacidad de intercambio catiónico y la conductividad eléctrica, ya que en una matriz acuosa existe mayor movilidad de iones y por ende se incrementan estos parámetros fisicoquímicos.
- El pH correlacionó significativamente con el contenido de amonio y nitrato ($P > 0.05$), puesto que cambios bruscos en este parámetro afectan las actividades enzimáticas que se dan dentro del ciclo del nitrógeno, donde se produce amonio y nitrato por la acción metabólica de los microorganismos.
- La actividad ureásica presentó un intervalo de 6 a 96 $\mu\text{g N-NH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$, para la actividad proteásica el intervalo fue de 44 a 138 $\mu\text{g tirosina g}^{-1} \text{ h}^{-1}$, y para la actividad de la desaminasa se encontró un intervalo de 0,0062 a 0,114 $\mu\text{g N-NH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$.
- La presencia de los desechos sólidos urbanos en los suelos estudiados como agente contaminante, en algunos casos estimula la actividad de las enzimas evaluadas y en otros las inhibe. En el caso de la ureasa se presentó un aumento en la mayoría de las muestras, por su parte, para la proteasa y la desaminasa se presentó, en general, una inhibición.

- La actividad enzimática de la ureasa presentó correlaciones significativas con el pH en solución acuosa debido a que cualquier cambio brusco de este parámetro, puede alterar el carácter iónico de los grupos amino y carboxilo de la superficie proteica, afectando así las propiedades catalíticas de la enzima.
- Se obtuvo correlaciones significativas entre la actividad proteásica y el contenido de nitrato en la matriz del suelo debido a que esta enzima está involucrada en el ciclo del nitrógeno catalizando el desdoblamiento de proteínas y péptidos a aminoácidos, que a su vez mediante la degradación oxidativa producen nitrato. Por tanto, un déficit o incremento del contenido de nitrato en el suelo afecta también la actividad de la enzima.
- La actividad proteásica presentó correlaciones significativas con el pH en solución acuosa, puesto que las variaciones en el pH, modifican también el carácter iónico de los grupos amino y carboxilo de la proteína y esto afecta las funciones de la enzima.
- La actividad de la desaminasa no presentó correlaciones significativas con los parámetros fisicoquímicos lo que indicó que dichos parámetros no modificaron de forma abrupta dicha actividad, sin embargo, la actividad de la enzima disminuyó con respecto a los controles (muestras no impactadas) con la presencia de contaminante.

5.2 Recomendaciones

- Es recomendable realizar estudios de otras actividades enzimáticas como bioindicadores de la calidad del suelo, además de utilizar otros bioindicadores para poder concluir si el suelo es apto para la construcción del parque recreativo para la comunidad.
- Se recomienda realizar un estudio previo de las actividades enzimáticas en la zona donde se implementará un estudio de biorremediación, con la finalidad de asegurar que pueden ser utilizados como bioindicadores, pues estas pueden presentar tendencias distintas a las encontradas en este trabajo de investigación.
- Es recomendable determinar las propiedades fisicoquímicas en la zona a estudiar, puesto que el conocimiento de estos parámetros es de gran importancia ya que pueden limitar la actividad de la enzima, como bioindicador de un estudio de biorremediación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acosta, Y. y Paolini, J. (2005) Actividad de la enzima deshidrogenasa en un suelo calciorthids enmendado con residuos orgánicos. *Agronomía Trop.*, vol.55, no.2, Pp.217-232.

Alef, K. y Kleiner D. (1986) Arginine ammonification, a simple method to estimate microbial activity potentials in soils. *Soil Biol. Biochem.* **18**: 233-235

Álvarez C. y R. Álvarez. (2000) Correlación entre las concentraciones de nitrato en suelo a distintas profundidades: análisis de datos publicados. En: Actas XVII Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo (CD Rom), Mar del Plata, Buenos Aires.

Amador, F. (2010) La contaminación del suelo. Documento en línea disponible en: www.monografias.com › [Ecología](#)

Anderson, J.M. e Imgram J.S.I. (1989) Tropical soil biology and fertility: Handbook of methods. CAB International, Wallingford.

Andrews, R.K.; Blakeley y R.L.; Zerner, B. (1984). Urea and Urease. En: Eichhorn., Marzilli, L.G. (Eds.), *Advances in Inorganic Biochemistry*. Vol. VI. Elsevier Science Publishing, New York, pp. 245-283.

Armado, A.; Froilán, C.; García, P. Y Paolini J. (2009) Correlación de actividades enzimáticas con la respiración basal en suelos cacaoteros del occidente venezolano. Artículo publicado en *Avances en química* Pp 73-77

Bandick, A.K. y Dick, R.P. (1999). Field management effect on soil enzymes activities. *Soil Biology and Biochemistry* 31: 1471-1479

Bonmati, M.; Pujola, M.; Sana, J.; Soliva, M., Felipe, M.T., Garau, M., Ceccanti, B.; Nannipieri, P. (1985) Chemical properties, populations of nitrite oxidizers, urease and phosphatase activities in sewage sludgeamended soil. *Plant and Soil*. 84:79-91.

Blasco, L.M. y Cornfield, A.H. (1966) Fixation of added ammonium and nitrification of fixed ammonium in soil clays. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 17: 481-484.

Carefoot, J., J. Bole y T. Entz. (1989) Relative efficiency of fertilizer N and soil nitrate at various depths for the production of soft wheat. *Can J. Soil Sci.* 69-867-874.

Colina, W. Ruiz, B. Torres, N. y Warton, D. (2011) *Residuos Sólidos Boletín introductorio a la problemática de residuos sólidos urbanos* Documento en línea disponible en: www.estrucplan.com.ar/producciones/entrega.asp?identrega.

Conde, X. Ojeda, E. y Blandín, N (2009) servicios ambientales para la comunidad. Los desechos sólidos en Venezuela. Documento en línea disponible en: guiaambiental.blogspot.com

Cline, M. (1944) Principles of soil sampling. *Soil Sci.* 58:275-288.

Darwich, N. (2003) Muestreo de suelos para una fertilización precisa. En: II Simposio de Fertilidad y Fertilización en Siembra Directa. XI Congreso Nacional de AAPRESID. Tomo 2. pp 281-289

Determinación de Nitrógeno en agua. Norma Mexicana N° Nmx-AA-020-SCF1-2009.

De Boer W. y Kowalchuk GA., (2001). Nitrification in acid soils: micro-organisms and mechanisms, *Soil Biology and Biochemistry*, 33:853-866.

Díaz A. y M. Cruz (1989), *Contaminación agraria difusa*, ED. Ministerio de Obras Públicas y Urbanismo, Madrid, 98 p.

Díaz, D. y Vitaliz, M. (2007) Basura: ¿Destino incierto en Venezuela? Documento en línea disponible en: www.vitalis.net/actualidad85.htm.

Dick, R.P. (1992) A review: long-term effects of agricultural systems on soil biochemical and microbial parameters. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 40: 25-36

Dick, R. P. (1994) Soil enzyme activities as indicators of soil quality. En: *Defining soil quality for a sustainable environment* (Eds. Doran, J. W., Coleman, D. C.; Bezdicek, D. F. y Stewart, B. A.), Soil Science Society of America. Special publication N° 35, Madison, Wisconsin. P.p. 107-124.

Dick, R.P., Breakwell, D.P. y Turco, R.F. (1996) Soil enzyme activities and biodiversity measurements as integrative microbiological indicators. En: Doran, J.W. y Jones, A.J. (Eds.). *Methods for Assessing Soil Quality*, SSSA Special publication, 49. SSSA y ASA, Madison, W.I, pp 247-271

Doran, J.W. y Parkin, T.B. (1994) Defining and assesing soil quality. En: Doran, J.W. (Ed.). *Defining Soil Quality for Sustainable Environment*, SSSA Special publication, 35. SSSA y ASA, Madison, W.I, pp 3-23.

Faithfull. Nigel T. (2005) Métodos de análisis químico agrícola. Manual práctico. Ed. Acribia. Madrid. 114 p.

Fassbender, H. W. (1982) Química de suelos con énfasis en suelos de América Latina. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). San José. Costa Rica. 398 p.

Flores, S.; Alfonso, J.; Molina, L y Paolini, J. (2003) Actividad enzimática en sedimentos superficiales del frente atlántico, Venezuela. Programa de Estudios Ambientales en el Atlántico Venezolano. Pp. 12-21.

Frankenberger, W. T. y W. A. Dick. (1983) Relationship between enzyme activities and microbial growth and activity indices in soil. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 47:945-951.

Frostergård, Å.; Bååth, E. y Tunlid, A. (1993) Shifts in the structure of soil microbial communities in limed forests as revealed by phospholipids fatty acid analysis. *Soil Biol. Biochem.*, 25: 723-730.

García, C.; Gil, F.; Hernández, T.; Trasar-Cepeda, C. (2003). Técnica de análisis de parámetros bioquímicos en suelo: Medida de actividades enzimáticas y biomasa Microbiana. Ediciones Mundi-Prensa. Rio Panuco, México. Pp.: 14-16, 27-29, 127-130, 141-143.

Galdames. D. (2000) Ingeniería Ambiental y Medio Ambiente. Documento en línea disponible en: www.fortunecity.es/expertos/.../171/residuos.html

Ginés.S. (1996) Multifuncionalidad de la adenosina desaminasa de la superficie celular y de sus proteínas de unión. Universidad de Barcelona facultad de química, departamento de química y biología molecular. Tesis de grado pP 34-36.

Gelderman, R. Dahnke, W. y Swenson, L. (1988) Correlation of several soil N indices for wheat. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 19(6): 755-772.

Gonzalo, H. y Obando, R. (2010) La importancia de la materia orgánica en el suelo. Fresh Plaza. Documento disponible: http://www.freshplaza.es/news_detail.asp?id=41158 Consultado: 10 septiembre 2010.

Hayano, K (1996). Characterization and origin of protease activity in cultivated soils. *Japan Agricultural Research Quarterly* 30: 79-84.

Hernández, R. (2001) Libro de Botánica online Documento disponible en internet: www.forest.ula.ve/~rubenhg/enzimas/index.html. Consultado: 14 de mayo del 2011

Ibañez, J.J. (2006) Influencia de la Materia Orgánica sobre las propiedades físicas del suelo. Un Universo invisible bajo nuestros pies, los suelos y la vida. Documento disponible en internet: <http://www.madrimasd.org/blogs/universo/2006/04/04/17409>. Consultado: 10 de Septiembre del 2010.

Jackson, M. L. (1970) Análisis químico de suelos. 2ª Ed. Ediciones Omega, S. A. Barcelona, España. P.p. 662.

Jaramillo, J.D. F. (2002) Introducción a la Ciencia del Suelo. Universidad Nacional de Colombia. Medellín. Pp. 190,417.

Jenny, H. (1930) A study of the influence of climate upon the nitrogen and organic matter content of the soil. Missouri Agricultural Experiment Station. Research Bulletin N° 152, pp. 66

Kandeler, E. y Gerber, H. (1988) Short-term assay of urease activity using colorimetric determination of ammonium. *Biol. Fertil. Soils.*, 6: 68-72.

Kandeler, E., Gerfield, E. y Soborik, M. (1994) Microbial Biomass, N mineralization and the activities of various enzymes in relation to nitrate leaching and root distribution in a slurry-amended grassland. *Biology and Fertility of soil.* 18: 7-12.

Kennedy, A.C., y R.C. Papendick. (1995) Microbial characteristics of soil quality. *J. Soil Water Conserv.* 50:243-248.

Kennedy, A.C., y K.L Smith. (1995) Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils. *Plant Soil* 170:75-86.

Klinge, H. (1962) Beiträge zur Kenntnis tropischer Böden. IV. Über Gesamthumus und Stickstoff in Böden des brasilianischen Amazonasgebietes. Zeitschrift für Pflanzenernährung, Düngung und Bodenkunde 97: 106-118.

Ladd, J.N. y Butler, J.H.A. (1972) Short-term assays of soil proteolytic enzyme activities using proteins and dipeptide derivatives, as substrates. *Soil Biol. Biochem.*, 4: 19-30.

Ladd, J.N. y Paul, E.A. (1973) Changes in the enzymes activity and distribution of acid soluble, ammonio acid nitrogen in soil during nitrogen immobilization and mineralization. *Soil Biol. Biochem* 3: 825-848.

Matsushita, M.; Ito, S.; Meguro, S. y Kawachi, S. (2007) Structure of soil microbial communities in sugi plantations and seminatural broad-leaved forests with different land-use history. *Can. J. For. Res.* 37: 236-246.

Masís, W. y González, J (2007) Estimación de la mineralización neta de nitrógeno del suelo en sistemas agroforestales y a pleno sol en el cultivo del café (*Coffea arabica* L.), en el pacífico de Nicaragua, departamento de Carazo. Universidad nacional agraria, Facultad de agronomía, departamento de producción vegetal. Trabajo de diploma. Pp 12.

Mesa, E. (2011) Diccionario topográfico del estado Carabobo. Documento disponible en internet: www.juanjosemora.com.ve/.../index.php?title=Ereigue. Consultado: 21 de enero 2011.

Miller.N.J y Miller.J.C. (2002) Estadística y quimiometría para química analítica. 4^{ta} edición. Prentice Hall. Madrid. 296p.

Monreal, C.M., H. Dinel, M. Schnitzer, D.S. Gamble y V.O. Biederbeck. (1998) Impact of carbon sequestration on functional indicators of soil quality

as influenced by management in sustainable agriculture. p. 435-458. In R. Lal et al.

Nannipieri, P. (1994) The potential use of soil enzymes as indicators for productivity, sustainability and pollution. En: Pankhurst CE, BM Doube, VVSR Gupta & PR Grace (eds) Soil biota management in sustainable farming systems: 238-244. CSIRO, Adelaide, Australia

Olarte. L. I. (1979) Métodos analíticos del laboratorio de suelos 4ta Ed. Instituto Geográfico Agustín Codazzi. Bogotá, Colombia. 664pp.

Operation Manual for Heating digester Velp scientific Pp.43.

Overbeck, J. (1991) Early studies on ecto and extracellular enzymes in aquatic environments. En: Choróst, R.J. (Ed.), Microbial enzymes in aquatic environments. Springer. New York, pp.: 1-5

Park, J., y R.A.F. Seaton. (1996) Integrative research and sustainable agriculture. Agric. Syst. 50:81-100. Monreal, C.M., H. Diné, M. Schnitzer, D.S. Gamble and V.O. Biederbeck. 1998. Impact of carbon sequestration on functional indicators of soil quality as influenced by management in sustainable agriculture. p. 435-458. In R. Lal et al. (ed.) Soil processes and the carbon cycle. Adv. Soil Sci. Ser. CRC PRESS, Boca Raton, FL.

Petersen R. y L. Calvin. (1986) Sampling. In: A. Klute (ed). Methods of Soil Analysis, Part I 2nd Ed. Agronomy. 9 (I): 33-51.

Rastin, N., Schlechte, G., Hüttermann, A., and Rosenplänter, K. (1990) Seasonal fluctuations of some biological and biochemical factors and their dependence on certain soil factors on the upper and lower slope of a spruce forest. *Soil Biology and Biochemistry*. 22: 1049-1061.

Rivas, B. (2006) Los Suelos. Documento en línea disponible en: <http://www.monografias.com/trabajos33/suelos/suelos.shtm>

Santander, G (2005) Efecto de la aplicación de residuos sólidos de alto impacto en la actividad biológica de suelos de uso forestal. Universidad de Chile Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Departamento de Química Inorgánica y Analítica Tesis de grado Pp. 27-49.

Sinsabaugh, R.L., Klug, M.J., Collins, H.P., Yeager, P.E., Petersen, S.O. (1999) Characterizing soil microbial communities. En GP. Robertson, D.C. Coleman, CS. Bledsoe, and P. Sollins: Standard soil methods for long-term ecological research. Oxford University Press. New York. Pp. 318-348.

Schulten, H.R. y Schnitzer, M. (1998) The chemistry of soil organic nitrogen: a review. *Biol. Fert. Soils* **26**: 1-15

SOIL SURVEY DIVISION STAFF (SSDS). (1993) Soil survey manual. Handbook No. 18. United States Department of Agriculture (USDA). Washington D. C. 437 p.

Steubing, L.; Godoy, R y Alberdi, M. (2002) Métodos de ecología vegetal. Editorial Universitaria, Santiago, Chile. 345 pp.

Stryer, L., (1995) Biochemistry. 4th Edition. Freeman and Company. New York. Pp.: 1870-1875.

Suarez, Z. (2010) Estudio de Actividades Enzimáticas involucradas en el Ciclo del Nitrógeno en suelos impactados con petróleo ubicados en Yaracal - Estado Falcón. Universidad de Carabobo, Facultad experimental de ciencias y tecnología, Escuela de Química. Tesis de grado. Pp. 11-26.

Taylor B, Parkinson, R.; Pearsons, D. (1989) Nitrogen and lignin content as predictors of litter decay rates: a microcosm test. *Ecology* 70: 97-104.

Trasar-Cepeda, C., Leiros, M.C, Gil-Sotres, F. y Seoane, S. (1998) Towards a biochemical quality index for soils: An expression relating several biological and biochemical properties. *Biology and Fertility of Soils* 26: 100-106.

Walinga, I., Kithome, M., Novozamsky, I., Houba, V.J.G. y J.J Van der Lee. (1992) Spectrophotometric determination of organic carbon in soil. *Commun. Soil.Sci. Plant Anal.* 23 (15&16): 1935-1944.

Walkley, A. y Black, I. (1934) An examination of the Degtjaeff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Sci.* 37: 29-38

Worthen, E. L. (1949) Suelos agrícolas: Su conservación y fertilización. U.T.E.H.A. México. 463 p.

Zhang, Y.; Wu, N.; Zhou, G. y Bao, W. (2005) Changes in enzyme activities of spruce (*Picea balfouriana*) forest soil as related to burning in the eastern Qinghai-Tibetan plateau. *Applied Soil Ecology* 30: 215-225

APÉNDICE

APENDICE A. TABLAS DE DATOS

Tabla 15. Datos para la curva de calibración de contenido de amonio

$\mu\text{g N-NH}_4/\text{mL}$	Absorbancia
0.5	0,278
1	0,566
1.5	0,839
2	1,108
2.5	1,359

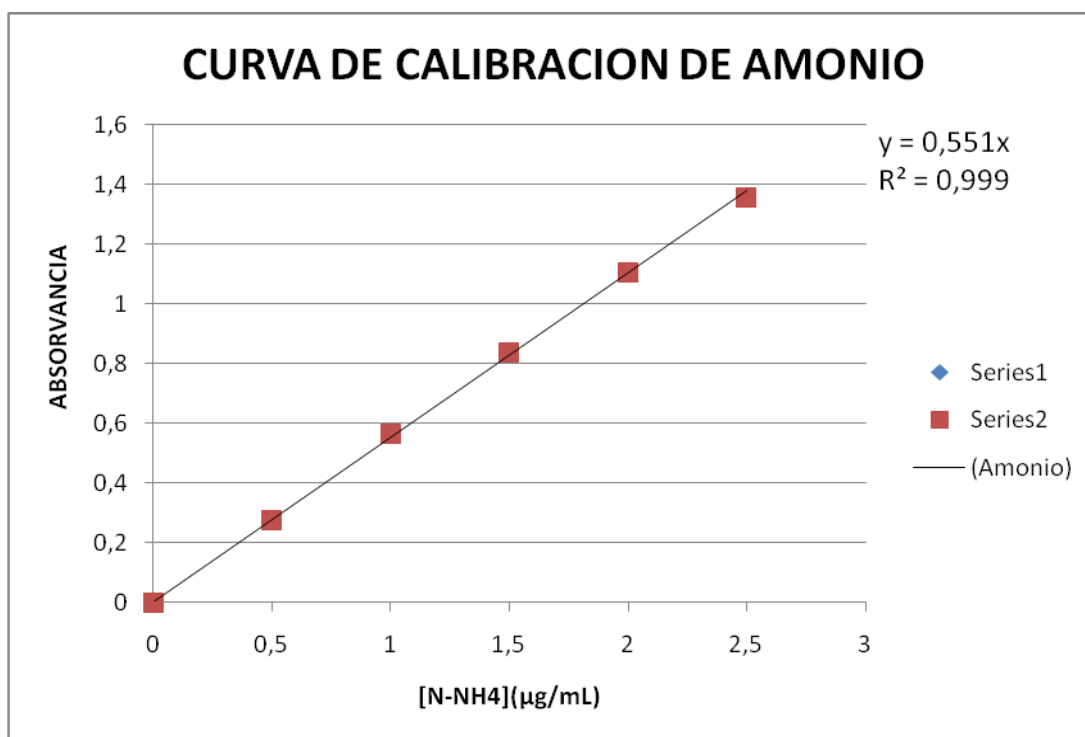


Figura 16. Curva de calibración de Amonio

Tabla 16. Datos para la determinación de contenido de amonio por el método de Kandeler y Gerber modificado.

Muestra	Masa de muestra (g)	Abs	[N-NH₄] mg/gss
1R1	1,0006	0,202	0,73
1R2	1,1814	0,223	0,69
1S1	1,117	0,098	0,32
1S2	1,0657	0,103	0,35
2R1	1,0962	0,037	0,12
2R2	1,0277	0,037	0,13
2S1	1,0446	0,038	0,13
2S2	1,0108	0,037	0,13
2S3	1,0154	0,039	0,14
3R1	1,0146	0,043	0,15
3R2	1,2077	0,045	0,14
3R3	1,0071	0,036	0,13
3S1	1,0132	0,044	0,16
3S2	1,021	0,029	0,1
3S3	1,0855	0,039	0,13
4R1	1,0265	0,093	0,33
4R2	1,1816	0,084	0,26
4S1	1,0323	0,077	0,27
4S2	1,043	0,07	0,24
5S1	1,0207	0,045	0,16
5S2	1,0754	0,042	0,14
5S3	1,1005	0,039	0,13
6R1	1,0182	0,038	0,14
6R2	1,0325	0,045	0,16
6R3	1,0133	0,032	0,11
6S1	1,0052	0,042	0,15
6S2	1,006	0,032	0,12
6S3	1,0116	0,04	0,14
7R1	1,0767	0,137	0,46
7R2	1,0144	0,13	0,47
7S1	1,0368	0,093	0,33
7S2	1,09	0,097	0,32

Tabla 16. Continuación.

Muestra	Masa de muestra (g)	Abs	[N-NH₄] mg/gss
8R1	1,0115	0,042	0,15
8R2	1,0679	0,035	0,12
8R3	1,0127	0,039	0,14
8S1	1,0428	0,033	0,11
8S2	1,0312	0,031	0,11
8S3	1,0146	0,045	0,16
9R1	1,062	0,146	0,5
9R2	1,0875	0,125	0,42
9S1	1,063	0,396	1,35
9S2	1,0366	0,373	1,31
10S1	1,2178	0,083	0,25
10S2	1,0304	0,081	0,29
C11	1,0148	0,095	0,34
C12	1,0355	0,072	0,25
C21	1,0952	1,356	4,49
C22	1,1801	1,148	3,53

Tabla 17. Datos para la curva de calibración de Contenido de nitrato

[N-NO₃] µg /mL	Absorbancia
2,06	0,13
4,12	0,192
6,18	0,222
8,24	0,24
10,3	0,325

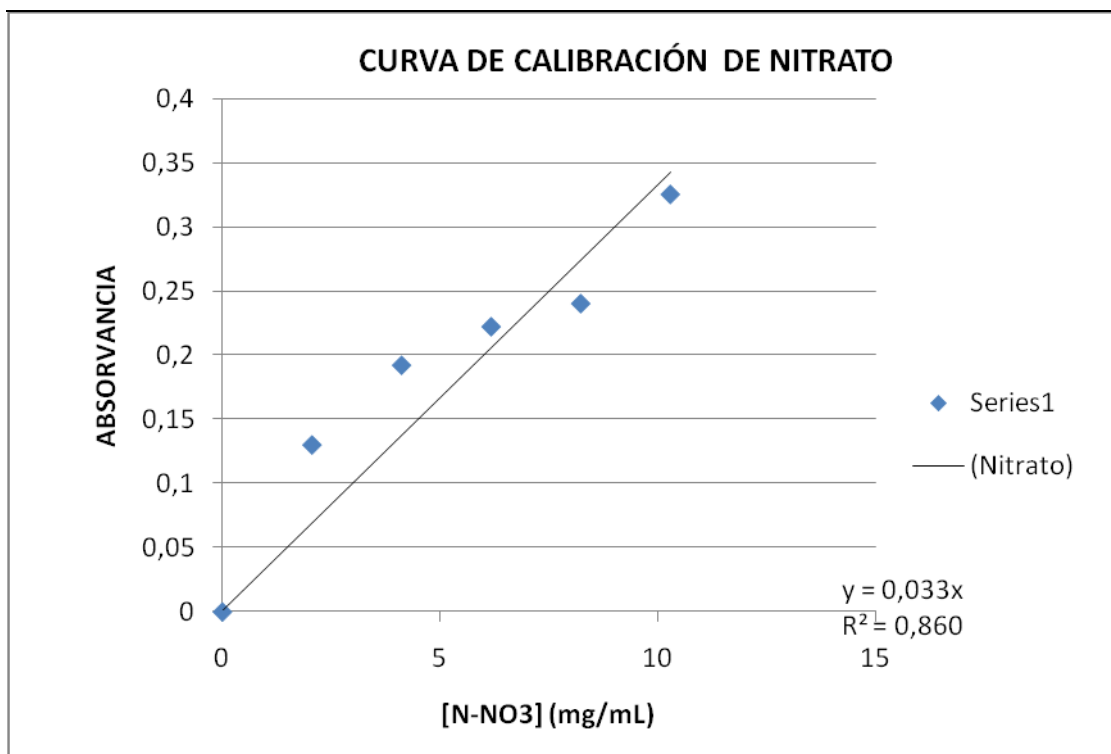


Figura 17. Curva de calibración de Nitrato

Tabla 18. Datos para la determinación de contenido de nitrato por el método de Imgran y Anderson (1989).

Muestra	Masa de muestra (g)	Abs	[N-NO₃] mg/gss
1R1	1,0726	0,02	0,45
1R2	1,0829	0,022	0,49
1S1	1,0205	0,01	0,24
1S2	1,0393	0,016	0,37
2R1	1,094	0,066	1,46
2R2	1,0979	0,027	0,6
2S1	1,1078	0,026	0,57
2S2	1,0091	0,023	0,55
3R1	1,0039	0,013	0,31
3R2	1,1723	0,012	0,25
3S1	1,0066	0,016	0,39
3S2	1,0268	0,022	0,52
4R1	1,1203	0,014	0,3
4R2	1,0523	0,039	0,9
4S1	1,0181	0,039	0,93
4S2	1,0285	0,029	0,68
5S1	1,134	0,003	0,06
5S2	1,1752	0,005	0,1
6R1	1,1124	0,007	0,15
6R2	1,0753	0,009	0,2
6S1	1,0524	0,038	0,88
6S2	1,0877	0,038	0,85
7R1	1,0175	0,015	0,36
7R2	1,1269	0,01	0,22
7S1	1,0544	0,007	0,16
7S2	1,1188	0,008	0,17
8R1	1,0179	0,012	0,29
8R2	1,0995	0,012	0,26
8S1	1,0673	0,017	0,39
8S2	1,0105	0,017	0,41
9R1	1,0716	0,001	0,02
9R2	1,054	0,003	0,07

Tabla 18. Continuación.

Muestra	Masa de muestra (g)	Abs	[N-NO₃] mg/gss
9S1	1,0734	0,103	2,33
9S2	1,1475	0,103	2,18
10S1	1,1363	0,016	0,34
10S2	1,0734	0,016	0,36
C11	1,0394	0,011	0,26
C12	1,1089	0,012	0,26
C21	1,0221	0,022	0,52
C22	1,0055	0,047	1,13

Tabla 19. Datos para la determinación de la actividad Ureásica.

Muestra	M. muestra	Abs	µg N-NH₄/mL	Act. URE
1R1	1,1467	1,017	1,85	89,84
1R2	1,0006	0,768	1,39	77,75
1R3	1,0046	0,417	0,76	42,05
1S1	1,0386	0,527	0,96	51,54
1S2	1,0184	0,505	0,92	50,36
1S3	1,0134	0,309	0,56	30,97
2R1	1,0372	1,015	1,84	99,77
2R2	1,0362	1,084	1,97	106,65
2R3	1,0382	0,281	0,51	27,59
2S1	1,0197	1,046	1,9	111
2S2	1,0302	1,097	1,99	115,22
2S3	1,0068	0,806	1,46	86,62
3R1	1,0978	1,568	2,85	146,18
3R2	1,1823	1,332	2,42	115,31
3R3	1,0467	0,353	0,64	34,52
3S1	1,0715	1,241	2,25	123,32
3S2	1,0362	1,072	1,95	110,15
3S3	1,0281	0,553	1	57,27
4R1	1,0412	0,276	0,5	27,11
4R2	1,0749	0,27	0,49	25,69
4R3	1,186	0,095	0,17	8,19
4S1	1,1053	1,151	2,09	106,13
4S2	1,1314	1,262	2,29	113,68
4S3	1,054	0,366	0,66	35,39

Tabla 19. Continuación.

Muestra	M. muestra	Abs	µg N-NH₄/mL	Act. URE
5S1	1,0619	0,652	1,18	68,63
5S2	1,011	0,528	0,96	58,38
5S3	1,0306	0,247	0,45	26,79
6R1	1,0728	0,714	1,3	66,45
6R2	1,0756	0,701	1,27	65,07
6R3	1,081	0,289	0,52	26,69
6S1	1,0187	0,784	1,42	76,85
6S2	1,0259	0,636	1,15	61,91
6S3	1,1066	0,279	0,51	25,18
7R1	1,0974	0,948	1,72	94,24
7R2	1,004	0,73	1,32	79,32
7R3	1,0486	0,238	0,43	24,76
7S1	1,0389	0,491	0,89	50,62
7S2	1,0222	0,458	0,83	47,99
7S3	1,0045	0,27	0,49	28,79
8R1	1,063	1,159	2,1	109,81
8R2	1,0893	1,221	2,22	112,89
8R3	1,1325	0,28	0,51	24,9
8S1	1,2436	0,572	1,04	49,4
8S2	1,1014	0,519	0,94	50,61
8S3	1,0614	0,413	0,75	41,79
9R1	1,0763	0,811	1,47	80,35
9R2	1,0881	0,826	1,5	80,95
9R3	1,0796	0,239	0,43	23,61
9S1	1,0658	0,827	1,5	81,45
9S2	1,1057	0,857	1,56	81,36
9S3	1,0332	0,642	1,17	65,23
10S1	1,1281	0,889	1,61	80,27
10S2	1,1579	0,942	1,71	82,86
10S3	1,0273	0,293	0,53	29,05
C11	1,0269	0,794	1,44	81,41
C12	1,0256	0,788	1,43	80,9
C13	1,0153	0,585	1,06	60,67
C21	1,0948	0,322	0,58	29,71
C23	1,1466	0,272	0,49	23,97

Se utilizó la curva de calibración mostrada en la figura 18 (Página 79), para la determinación de amonio liberado, y la ecuación EC.1 (Página 42) para la determinación de la actividad ureásica.

Tabla 20. Datos para la determinación de la actividad Proteásica.

Muestra	M. muestra	Abs	µg tirosina	Act. pro
1R1	2,1571	0,6	600	93,86
1R2	2,0635	0,499	499	73,28
1R3	2,3198	0,201	201	
1S1	2,0073	0,479	479	95,3
1S2	2,1883	0,522	522	97,41
1S3	2,0755	0,103	103	
2R1	2,0344	0,324	324	33,64
2R2	2,1053	0,417	417	55,06
2R3	2,1222	0,19	190	
3R1	2,2308	0,421	421	38,61
3R2	2,0501	0,5	500	61,77
3R3	2,018	0,253	253	
3S1	2,0238	0,703	703	82,49
3S2	2,1374	0,818	818	106,8
3S3	2,0044	0,39	390	
4R1	2,1035	0,595	595	66,49
4R2	2,0583	0,48	480	39,32
4R3	2,0512	0,322	322	
4S1	2,2019	0,42	420	45,91
4S2	2,1184	0,35	350	30,85
4S3	2,1128	0,222	222	
5S1	2,2519	0,4	400	27,35
5S2	2,479	0,57	570	63,24
5S3	2,1068	0,29	290	
6R1	2,2117	0,298	298	33,01
6R2	2,2865	0,41	410	56,43
6R3	2,061	0,152	152	
6S1	2,4296	0,59	590	77,62
6S2	2,2978	0,388	388	38,1
6S3	2,2217	0,213	213	

Tabla 20. Continuación.

Muestra	M. muestra	Abs	µg tirosina	Act. pro
7R1	2,003	0,518	518	60,56
7R2	2,0079	0,621	621	88,45
7R3	1,6432	0,296	296	
7S1	2,1809	0,78	780	138,49
7S2	2,0206	0,539	539	85,49
7S3	2,2325	0,217	217	
8R1	2,0107	0,51	510	110,4
8R2	2,0279	0,321	321	42,79
8R3	2,0529	0,07	70	
8S1	2,3	0,312	312	33,21
8S2	2,1861	0,4	400	56,6
8S3	2,1015	0,17	170	
9R1	2,0658	0,475	475	53,52
9R2	2,186	0,511	511	59,38
9R3	2,0536	0,268	268	
9S1	1,0222	0,3	300	59,16
9S2	1,1334	0,26	260	34,79
9S3	0,5848	0,185	185	
10S1	2,043	0,543	543	81,16
10S2	2,4255	0,49	490	57,22
10S3	2,2175	0,218	218	
C11	2,1286	0,691	691	43,36
C12	2,0473	0,714	714	51,01
C13	2,1533	0,516	516	
C21	2,1426	0,915	915	149,98
C22	2,2633	0,851	851	127,68
C23	2,1531	0,28	280	

Tabla 21. Datos para la realización de la curva de calibración de tirosina.

μg tirosina	Absorbancia
0	0
129	0,065
258	0,248
516	0,624
774	0,782
1032	1,051
1290	1,324

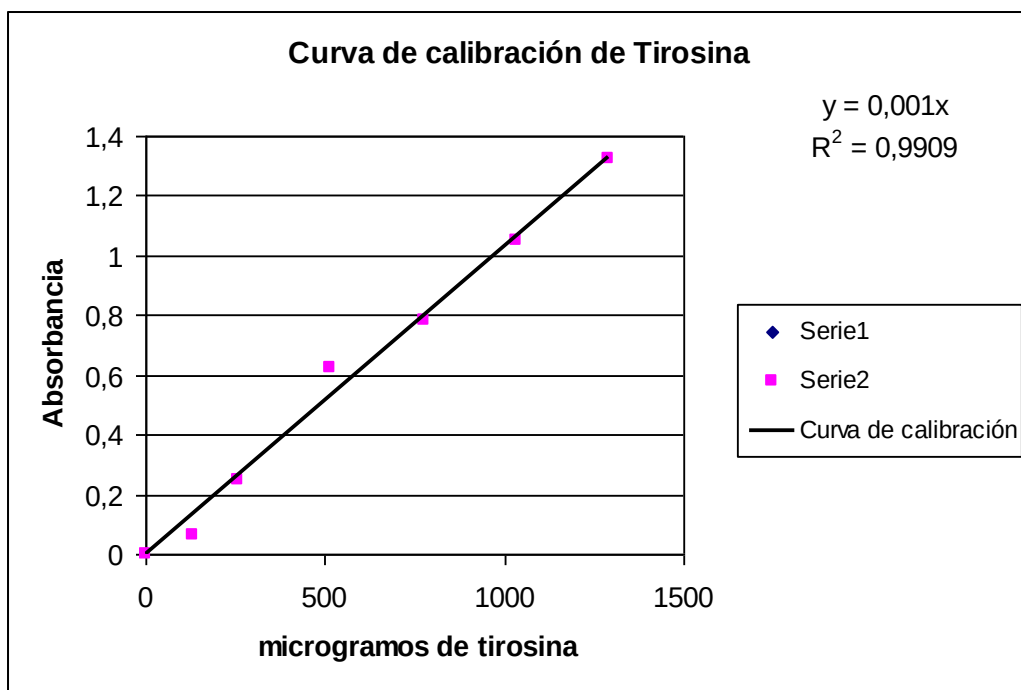


Figura 18. Curva de calibración de Tirosina

Tabla 22. Datos para la determinación de la actividad de la Desaminasa.

Muestra	M. muestra	Abs	µg N-NH ₄ /mL	Act. Des
1R1	4,0941	0,172	0,31	0,04
1R2	4,2079	0,198	0,36	0,067
1R3	4,0283	0,135	0,25	
1S1	4,008	0,105	0,19	0,031
1S2	4,0588	0,085	0,15	0,009
1S3	4,208	0,077	0,14	
2R1	4,4837	0,115	0,21	0,022
2R2	4,0072	0,097	0,18	0,004
2R3	4,0866	0,093	0,17	
2S1	4,0263	0,216	0,39	0,027
2S2	4,0142	0,264	0,48	0,085
2S3	4,0693	0,193	0,35	
3R1	5,0873	0,149	0,27	0,017
3R2	5,0807	0,141	0,26	0,01
3R3	5,0954	0,13	0,24	
3S1	5,1808	0,127	0,23	0,031
3S2	5,046	0,117	0,21	0,022
3S3	5,0101	0,093	0,17	
4R1	2,0209	0,057	0,1	0,027
4R2	2,0685	0,055	0,1	0,022
4R3	2,0717	0,045	0,08	
4S1	4,1327	0,103	0,19	0,039
4S2	4,015	0,119	0,22	0,058
4S3	4,1791	0,067	0,12	
5S1	4,0872	0,103	0,19	0,023
5S2	4,078	0,163	0,3	0,096
5S3	4,2438	0,084	0,15	
6R1	4,1411	0,104	0,19	1,118
6R2	4,0519	0,103	0,19	0,875
6R3	4,0387	0,099	0,18	
6S1	4,1543	0,123	0,22	4,039
6S2	4,0364	0,115	0,21	2,18
6S3	4,1442	0,105	0,19	

Tabla 22. Continuación.

Muestra	M. muestra	Abs	µg N-NH₄ /mL	Act. Des
7R1	4,1444	0,117	0,21	0,026
7R2	4,0042	0,149	0,27	0,065
7R3	4,1633	0,095	0,17	
7S1	2,0502	0,047	0,09	0,021
7S2	2,0283	0,049	0,09	0,026
7S3	2,0849	0,038	0,07	
8R1	4,107	0,105	0,19	0,021
8R2	4,2201	0,099	0,18	0,014
8R3	4,2253	0,086	0,16	
8S1	4,0738	0,127	0,23	0,023
8S2	4,1074	0,128	0,23	0,024
8S3	4,2704	0,107	0,19	
9R1	4,0664	0,115	0,21	0,023
9R2	4,0641	0,162	0,29	0,078
9R3	4,0056	0,095	0,17	
9S1	4,1324	0,178	0,32	0,007
9S2	4,0196	0,177	0,32	0,006
9S3	4,0172	0,172	0,31	
10S1	5,0624	0,126	0,23	0,04
10S2	5,0125	0,123	0,22	0,038
10S3	5,1251	0,081	0,15	
C11	2,0047	0,282	0,51	0,153
C12	2,2774	0,224	0,41	0,016
C13	2,0096	0,216	0,39	
C21	2,0117	0,28	0,51	0,12
C22	2,0196	0,275	0,5	0,108
C23	2,0245	0,226	0,41	

Se utilizó la curva de calibración mostrada en la figura 18 (Página 79), para la determinación de amonio liberado, y la ecuación EC.3 (Página 45) para la determinación de la actividad de la Desaminasa.

Bejarano B. (2011). Estudio de Actividades Enzimáticas involucradas en el Ciclo del Nitrógeno en suelos impactados con Desechos Sólidos ubicados en la zona del Ereigüe -Estado Carabobo