

SOBRE LAS ENZIMAS DEL SUELO Y SUS TÉCNICAS DE MEDIDA

GRUPO ESPAÑOL DE ENZIMOLOGÍA DEL SUELO.

M^a. R. ALBIACH; M. BONMATÍ; R. CANET; C. GARCÍA*; A. GARCÍA; F. GÍL; S. GONZALEZ; M. T. HERNÁNDEZ; P. JIMÉNEZ DE RIDDER; M^a. C. LEIRÓS; M^a. C. LOBO; C. RAD; I. SASTRE; C. TRASAR.

* Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS), Murcia, CSIC, Apdo. 164, E-30100 Espinardo, Murcia. Autor para correspondencia.

Abstract. The aim of this paper is to highlight the relevance that nowadays has the measurements in soils of enzymatic activities and other measures of microbial activity based on microbial biomass. However, despite these measurements can help to understand most of the processes taking part in soils such as processes of organic matter mineralization or humification, soil degradation, or soil contamination, there is a gap in the standardisation of the analytic methods for determining these parameters. These parameters are influenced by very diverse factors such as pH, temperature, seasonal variation etc... All these aspects have been exhaustively examined and revised in the book edited by the Spanish Group of Soil Enzymology, edited by Mundiprensa, titled "Técnicas de Análisis de Parámetros Bioquímicos en suelos: Medidas de Actividades Enzimáticas y Biomasa Microbiana".

Keywords: microbial activity, microbial biomass, soil enzymatic activity, analytic method standardisation

Resumen. Este Trabajo trata de poner de manifiesto la importancia que hoy en día tiene la determinación en los suelos de medidas de actividades enzimáticas, y otras medidas de actividad microbiana basadas en su biomasa. Sin embargo, y a pesar de que dichas medidas pueden ayudar a comprender muchos de los mecanismos que se producen en el suelo, tales como procesos de mineralización de la materia orgánica, de degradación, así como otros de contaminación, la determinación analítica de todos estos parámetros no está estandarizada. Dichos parámetros están influenciados por una gran cantidad de aspectos, tales como pH, temperatura, variación estacional, etc... Toda esta temática ha sido revisada y analizada de forma exhaustiva en el libro editado por el Grupo Español de Enzimología de Suelos, publicado por Editorial Mundiprensa y titulado "Técnicas de Análisis de Parámetros Bioquímicos en suelos: Medidas de Actividades Enzimáticas y Biomasa Microbiana".

Palabras clave: actividad microbiana, biomasa microbiana, actividades enzimáticas, estandarización de métodos analíticos

INTRODUCCION

Este trabajo pretende poner de manifiesto todos aquellos aspectos contemplados en el libro "Técnicas de Análisis de Parámetros Bioquímicos en Suelos: Medida de Actividades Enzimáticas y Biomasa Microbiana". Considere-

ramos de interés resaltar la importancia que en la actualidad está adquiriendo la medida de los parámetros bioquímicos del suelo, de cuya determinación analítica tratan los diferentes capítulos del libro. Entre los parámetros bioquímicos, algunos, como el contenido en C

y N de la biomasa microbiana, la mineralización del nitrógeno, el ATP y la respiración del suelo, o incluso la actividad de oxidorreductasas como deshidrogenasa y catalasa, pueden ser considerados como “generales”, ya que su medida permite tener una idea de los procesos microbianos que se producen en un suelo de manera global. Por el contrario, otros parámetros bioquímicos, como la mayoría de las actividades enzimáticas del tipo hidrolasas (actividades implicadas en los ciclos de los elementos biófilos como, por ejemplo, carbohidrasas, quitinasa, β -glucosidasa y β -galactosidasa del ciclo del C, fosfatasa del ciclo del P, ureasa y proteasas del ciclo del N y arilsulfatasa del ciclo del S) deben ser considerados como “parámetros específicos”, puesto que corresponden a reacciones concretas y dependen precisamente de sustratos específicos (Nannipieri *et al.*, 1990).

La importancia que hoy en día está adquiriendo la determinación de los parámetros bioquímicos, tanto de las actividades enzimáticas de suelo, como de aquellos relacionados con la biomasa microbiana, es cada vez mayor en los estudios avanzados de la Ciencia del Suelo. Esto se debe a que, dado que son esenciales para que el suelo realice sus funciones de manera correcta (Burns, 1982; Dick y Tabatabai, 1993), su medida dará idea de la actividad metabólica del suelo y servirá de ayuda para entender la funcionalidad del mismo. En el suelo, la actividad metabólica es la responsable de procesos tan importantes como los de mineralización y humificación de la materia orgánica, los cuales incidirán a su vez sobre otra serie de procesos en los que intervienen algunos elementos fundamentales (C, N, P y S), así como de todas las transformaciones en las que interviene la propia biomasa microbiana del suelo. La determinación de los parámetros bioquímicos puede ser útil en estudios que se lleven a cabo sobre suelos naturales, donde los procesos microbianos, claves para su conservación, pueden monitorizarse a través de pará-

metros de la actividad metabólica de dichos suelos (García y Hernández, 2000; Trasar-Cepeda *et al.*, 2000). Dichos parámetros pueden resultar apropiados para estudios relativos a sistemas agrícolas, tanto los de tipo tradicional como aquellos en los que impera un manejo ecológico y sostenible del suelo (Canet *et al.*, 2000). Además, la actividad metabólica que muestre un suelo se verá afectada por problemas de contaminación, así como cuando se siga un proceso de descontaminación, en cuyo caso dicha actividad es un reflejo de la posibilidad de degradación de compuestos tóxicos para el suelo, que pueden haber sido adicionados al mismo antropogénicamente (Lobo *et al.*, 2000). Por último, la incidencia que en este tipo de parámetros tiene la adición a los suelos de gran cantidad de materiales orgánicos de diverso origen (desde estiércoles hasta otros materiales orgánicos considerados de nueva generación como los lodos de depuradora), con las connotaciones tan particulares de este tipo de enmiendas (aporte y generación de biomasa microbiana al suelo, contenidos a veces no deseables de contaminantes como metales pesados, etc.), ha hecho que, en los últimos años, se incremente el número de estudios en los que se determinan los parámetros bioquímicos en suelos con enmiendas orgánicas, ya que se considera que ayudarán a conocer el efecto que dichos materiales orgánicos provocarán en el suelo sobre los procesos metabólicos y su actividad microbiana en particular (Pascual *et al.*, 2000; Bonmatí *et al.*, 2000; Canet *et al.*, 2000).

A pesar de la importancia que tiene el estudio de los parámetros bioquímicos del suelo, debemos poner de manifiesto aquí uno de los mayores problemas que existen en la actualidad en este campo, que es, precisamente, su determinación analítica. La falta de estandarización de técnicas de medida para parámetros indicativos de actividad metabólica de suelos aparece como uno de los grandes inconvenientes para popularizar más los estudios basados en su empleo, y es precisamente este

hecho el que nos ha llevado a la realización de este Libro. La mencionada falta de estandarización de metodologías se ve influenciada por una gran cantidad de factores, tanto ambientales (temperatura, humedad,...) como del propio trabajo analítico (uso de tampones, concentración de sustrato, condiciones de trabajo,...), factores . todos ellos que inciden sobre las determinaciones de los parámetros bioquímicos del suelo. En este sentido, nuestro ánimo ha sido elaborar un “Manual de Técnicas Analíticas” que pueda ser útil para investigadores y estudiosos de la Ciencia del Suelo de habla hispana, no sólo en lo referente a disponer de los métodos más usuales de determinaciones analíticas para este tipo de parámetros, sino también en aspectos innovadores, entre los que destacamos los siguientes: i) el establecimiento para cada uno de los parámetros cuya técnica analítica se propone, de comentarios generales útiles sobre el mismo; ii) incluir valores de referencia para cada parámetro, reseñados en la bibliografía; iii) comentarios específicos sobre la problemática que se puede encontrar en su determinación analítica; iv) una consideración sobre las unidades en que cada parámetro en particular debería ser expresado, con ánimo de intentar hacer coincidir en este sentido los diferentes trabajos que se puedan realizar, a fin de facilitar la comparación entre ellos.

IMPORTANCIA DEL SUELO Y DE SU ACTIVIDAD METABÓLICA

El suelo es un recurso natural no renovable, al menos en una escala de tiempo humano. Tenemos, por tanto, la obligación de mantenerlo y conservarlo para presentes y futuras generaciones. Esto implica la necesidad de adaptarlo a diversos usos (agricultura, bosque, suelo urbano, industria...), pero siempre realizando un manejo de manera ordenada y controlada, tendiendo hacia la “sostenibilidad” de dicho recurso natural. Es precisamente en el hecho de conseguir conocer la incidencia del

manejo del suelo sobre dicha “sostenibilidad” donde tiene mucho que ver la actividad metabólica del suelo.

De todos los parámetros que pueden contribuir a aportar información sobre los distintos aspectos relacionados con la calidad de los suelos, aquellos relativos a su actividad metabólica son los que mantienen una mayor sensibilidad frente a procesos no deseables tales como contaminación, degradación por diversas causas, e incluso desertificación (García *et al.*, 1994). La componente física y química del suelo puede considerarse relativamente estable, por lo que cualquier cambio tardará tiempo en modificar las propiedades relacionadas con ambas componentes de forma apreciable para poder ser medida. Por ello, considerando la flexibilidad del ecosistema suelo, se debe pensar que cualquier cambio puede ser detectado en primer lugar por la componente biológica del mismo; dicha componente biológica es sin duda altamente sensible a degradaciones incipientes. Debido a ello un cambio en la componente biológica del suelo puede ser considerado como una “alerta” ante un posible colapso ambiental, lo que nos permite entonces reaccionar a tiempo antes de que pueda ocurrir un daño irreversible en este ecosistema. Sin embargo, hay que señalar en primer lugar, que medidas como las propuestas no resultan sencillas debido a lo complicado que es el estudio de los microorganismos y de sus reacciones a nivel de su microhabitat y, en segundo lugar, que la medida de un solo parámetro es difícil que pueda resultar útil y satisfactoria como reflejo de la calidad biológica del suelo (Nannipieri *et al.*, 1990; Gil-Sotres *et al.*, 1992).

GENERALIDADES SOBRE LAS ENZIMAS DEL SUELO

La importancia fundamental de la actividad de las enzimas 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). Skujins, en 1978, resaltaba el hecho de que las actividades enzimáticas del suelo habían sido ampliamente estudiadas en los 50 años anteriores. Desde entonces, muchos investigadores han revisado el interés de las enzimas del suelo (Burns, 1982; Nannipieri, 1994). Un libro clave para el estudio de la Enzimología del Suelo, fue publicado por Burns en 1978, en el que se recoge el origen, rango, cinética e historia de las enzimas del suelo, e incluye temas aún hoy en día tan actuales como la interacción de las enzimas y diversos agroquímicos, su significado, y aspectos metodológicos de diversas enzimas del suelo. Con las enzimas del suelo se puede establecer categorías según su función: hidrolasas, oxidoreductasas, liasas y transferasas (Skujins, 1978; Gianfreda y Bollag, 1996). Las enzimas del suelo más estudiadas son las oxidoreductasas (en particular, deshidrogenasas, catalasas y peroxidasas) y las hidrolasas (sobre todo fosfatasa, proteasas y ureasa); menos estudios se han llevado a cabo sobre otras enzimas del tipo transferasas o liasas. Una parte de las enzimas del suelo son sin duda extracelulares, liberadas durante el metabolismo y muerte celular aunque, por lo regular, su vida media como enzimas libres es muy corta; otras son intracelulares, formando parte de la biomasa microbiana. Por último, existen las enzimas inmovilizadas que son las que pueden mantener un nivel constante y estable de actividad enzimática en el suelo, independiente de la proliferación microbiana y de las formas usuales de regulación de la síntesis y secreción de enzimas. Este tipo de enzimas inmovilizadas pueden permanecer unidas a coloides minerales (como la arcilla) u orgánicos (como las sustancias húmicas), y son muy resistentes a procesos de desnaturalización (Ladd, 1978). Todo ello indica que es difícil extraer la totalidad de la actividad enzimática existente en el suelo y

es por ello que se estudian indirectamente midiendo su actividad.

Las enzimas del suelo pueden considerarse útiles para monitorizar cambios en las actividades microbianas (Sinsabaugh, 1994) y ofrecen información sobre la capacidad potencial del suelo para llevar a cabo reacciones específicas, las cuales son importantes en el ciclo de nutrientes (García y Hernández, 2000; Ros 2000; Leirós *et al.*, 2000.; Trasar-Cepeda *et al.*, 1999.). La importancia concreta que en todo este ámbito tienen las oxidoreductasas o las hidrolasas implicadas en los ciclos del C, N, P y S van a ser consideradas en profundidad a lo largo de los Capítulos de este Libro.

Necesitamos hacer gran hincapié en que uno de los principales problemas con que nos encontramos a la hora de establecer interpretaciones sólidas con las enzimas del suelo es la gran variabilidad que demuestran sus actividades, las cuales, se ven alteradas en función del modo de conservación de la muestra, de la variabilidad estacional, etc. Parece claro que al depender parte de dicha actividad de la biomasa microbiana, los cambios que afectan a ésta alterarán también a las actividades enzimáticas. Otro de los problemas de la determinación de las actividades enzimáticas del suelo es que durante el tiempo de duración del ensayo, el cual será variable en función de la actividad enzimática a medir, se puede producir un crecimiento microbiano no deseado, así como la detección de actividad intracelular motivada por la rotura de paredes celulares. Por último, es necesario señalar que con las técnicas estándares existentes, se mide una actividad potencial que se determina en condiciones óptimas, ya que la metodología seguida *in vitro* establece una concentración de sustrato adecuada, junto a una temperatura y un pH idóneos para que tenga lugar la actividad enzimática. Lo que se mide con técnicas estándares no se corresponde, por tanto, con la actividad de los suelos en condiciones reales de campo. Sin embargo, este tipo de determinaciones ofrece la posibili-

dad de conocer la potencialidad de un suelo para una determinada actividad enzimática.

GENERALIDADES SOBRE LA BIOMASA MICROBIANA DE UN SUELO Y SU MEDIDA

Se sabe que la microflora del suelo es una parte fundamental para su desarrollo y funcionalidad; es por ello que Martens, en 1995, definió a la biomasa microbiana como el almacén a través del cual deben de pasar nutrientes inorgánicos y compuestos orgánicos diversos. En los últimos años se ha desarrollado un amplio espectro de métodos microbiológicos para conocer la actividad microbiana de un suelo. Nosotros hemos incluido en este libro los métodos de determinación de algunos de los parámetros que más se emplean en estudios de biomasa microbiana.

La primera característica que llamó la atención sobre la biomasa microbiana fue su relativo gran tamaño, ya que representa entre el 1 y el 3% de la materia orgánica total del suelo (Jenkinson y Ladd, 1981). A pesar de que dicho porcentaje corresponde sólo a una pequeña parte dentro del pool total de la materia orgánica del suelo, la biomasa microbiana es uno de los componentes más activos de la misma. Por definición, dicha biomasa es parte del carbono orgánico total y aporta una cantidad relativamente importante del conjunto de nutrientes del suelo (Insam, 1990) e incluye microorganismos muy diferentes (bacterias, hongos, levaduras, algas, protozoos, etc.). Las modificaciones en el contenido en carbono y nitrógeno de la biomasa microbiana pueden utilizarse de forma más efectiva que la materia orgánica en general, o el carbono orgánico total en particular, como indicadores de las variaciones sufridas en la calidad de un suelo, ya que responden de forma más rápida y sensible a los cambios que se puedan producir en el mismo (degradación, contaminación, usos del suelo etc.). Así, las medidas de la biomasa micro-

biana pueden marcar a corto plazo la tendencia de variación que mostrará la materia orgánica a más largo plazo (Powlson *et al.*, 1987). Los cambios en este parámetro también se han empleado como índice de comparación entre sistemas naturales y degradados (Ross *et al.*, 1982).

Entre las medidas de parámetros relacionados con la biomasa microbiana del suelo, la determinación del contenido en adenosin-5'-trifosfato (ATP) también constituye un método útil para estimar la cantidad de biomasa microbiana. El ATP es un compuesto presente en todos los seres vivos, cuya misión principal es la de actuar como molécula energética, y que es utilizado en todos los procesos celulares bien como coenzima o bien como sustrato (Alef, 1991). Este parámetro se muestra significativamente correlacionado con otras estimaciones de la biomasa microbiana, tanto en suelos sin enmendar (Jenkinson, 1988) como en suelos enmendados con sustratos no estabilizados (Ocio y Brookes, 1990).

En relación asimismo con la biomasa microbiana de un suelo, un parámetro ampliamente utilizado para medir la actividad microbiológica del mismo es la respiración microbiana, la cual puede ser determinada tanto mediante el desprendimiento de CO₂ como mediante el consumo de O₂. La degradación de materia orgánica es una propiedad de todos los microorganismos heterótrofos y el comportamiento de dicha descomposición se ha utilizado comúnmente para indicar el estado biológico de los suelos (Nannipieri *et al.*, 1990). La medida del desprendimiento de CO₂ se ha empleado, también, para estimar la biomasa microbiana del suelo que realmente es activa (West *et al.*, 1987). Además, la medida de la respiración del suelo en presencia de productos potencialmente tóxicos, como los empleados en la agricultura, puede permitir evaluar los daños causados por estos productos sobre las funciones fisiológicas de los suelos (Nannipieri *et al.*, 1990). Finalmente, la determinación del

desprendimiento de CO₂ también es útil para conocer el efecto de determinadas variables sobre la oxidación de la materia orgánica in situ, aunque en ningún caso puede indicar qué tipo de sustrato orgánico en particular está siendo catabolizado.

CONSIDERACIONES SOBRE LOS CAPÍTULOS INCLUIDOS EN EL LIBRO

La primera parte del libro incluye los capítulos dedicados a las determinaciones de aquellas actividades enzimáticas cuya determinación en los suelos se ha considerado fundamental, dada la importancia de las reacciones que catalizan y de los procesos en los que participan, así como el gran número de entre los trabajos consultados en los que se estudian dichas actividades. Dentro de esta parte, se ha introducido un primer capítulo en el que se incluyen diversas Consideraciones Generales sobre las determinaciones de las actividades enzimáticas del suelo y que se pueden considerar comunes a la totalidad de las mismas; en este capítulo se hace mención a aspectos tan variados como la forma de conservación de las muestras a analizar, o el uso de tampones, pH óptimo, etc... En los siguientes capítulos de esta primera parte se incluyen las técnicas para la determinación de las actividades oxidorreductoras más importantes (deshidrogenasa y catalasa) y de algunas actividades de enzimas hidrolíticas implicadas en los ciclos de los elementos biófilos. Del ciclo del C se han incluido carbohidrasas como la celulasa y la invertasa, así como la quitinasa, la β-glucosidasa y la β-galactosidasa. Del ciclo del N se han incluido la ureasa y dos proteasas. Del ciclo del P se incluyen diversas fosfatasas y del ciclo del S, la arilsulfatasa.

La segunda parte del Libro está dedicada a la determinación de algunos de los parámetros que se han considerado de interés debido a su relación con la biomasa microbiana del suelo. En concreto, se incluye la determinación

del contenido en carbono y nitrógeno asociados a la biomasa, así como la del contenido en ATP, junto con la determinación de la mineralización del nitrógeno del suelo y de la respiración microbiana del mismo. Se ha considerado que la inclusión en el texto de las técnicas de medida de este tipo de parámetros es de interés, ya que en estudios amplios en los que se trate de estimar la actividad metabólica del suelo, el compaginar la determinación de parámetros de índole general, como aquellos relacionados con la biomasa microbiana, con otros específicos como las actividades de tipo hidrolasas, puede ser de mucha utilidad.

REFERENCIAS

- Alef, K., 1991. *Methodenhandbuch Bodenmikrobiologie*. Ecomed Laudsberg/Lench. Germany, xx pp.
- Balloni, W., Favilli, F., (1987). Effects of agricultural practices on the physical, chemical and biochemical properties of soils: Part I: Effect of some agricultural practices on the biological Soil Fertility. En: Barth, H., Hermite, P.L. (Eds.), *Scientific Basis for Soil Protection in the European Community*. Elsevier Applied Science, New York, pp.
- Bonmatí, M., Jiménez, P., Alvarez, H., Calero, E., Juliá, M., Morillo, M., Nuñez, E., (2000). Evolución de actividades enzimáticas en el proceso restaurador de dos suelos procedentes de la explotación de canteras de Cataluña utilizando altas dosis de lodos de depuradora. En: García, C., Hernández, M.T. (Eds), *Investigación y Perspectivas de la Enzimología de Suelos en España*. CEBAS-CSIC, pp. 209-293.
- Burns, R.G., (1978). *Soil Enzymes*. Academic Press, London, 380 pp.
- Burns, R.G., (1982). *Enzyme activity in soil:*

- Location and possible role in microbial ecology. *Soil Biology & Biochemistry* 14, 423-427.
- Canet, R., Albiach, R., Pomares, F., (2000). Los índices de actividad biológica como herramienta de diagnóstico de la fertilidad del suelo en agricultura ecológica. En: García, C., Hernández, M.T. (Eds), *Investigación y Perspectivas de la Enzimología de Suelos en España*. CEBAS-CSIC, pp. 11-39.
- Dick, W.A., Tabatabai, M.A., (1993). Significance and potential uses of soil enzymes. En: Metting, Jr., F.B. (Ed), *Soil Microbial Ecology*. Marcel Dekker, New York, pp. 95-127.
- Doran, J.W., Parkin, T.B., (1994). Defining and assessing soil quality. En: J. W. Doran, J.W., Coleman, D.C., Bezdicek, D.F., Stewart, B.A. (Eds.), *Defining soil quality for a sustainable environment*. Soil Science Society of America, Special Publication nº 35, Madison, pp. 3-23.
- García, C., Hernández, T., (1997). Biological and biochemical parameters in derelict soils subject to erosion process. *Soil Biology & Biochemistry* 29, 171-177.
- García, C., Hernández, T., (2000). Investigación y perspectivas de la enzimología de suelos en España. CEBAS-CSIC, Murcia, 352 pp.
- García, C., Hernández, T., Costa, F., (1994). Microbial activity in soils under Mediterranean conditions. *Soil Biology & Biochemistry* 26, 1185-1191.
- García, C., Hernández, T., Roldán, A., Albaladejo, J., (1997). Biological and biochemical quality of a semiarid soil after induced revegetation. *Journal of Environmental Quality* 26, 1116-1122.
- Gianfreda, L., Bollag, J.-M., (1996). Influence of natural and anthropogenic factors on enzyme activity in soil. En: Stotzky, G., Bollag, J.-M. (Eds.), *Soil Biochemistry*, Vol. 9. Marcel Dekker, New York, pp. 123-193.
- Gil-Sotres, F., Trasar-Cepeda, M.C., Ciardi, C., Ceccanti, B., (1992). Biochemical characterisation of biological activity in very young mine soils. *Biology and Fertility of Soils* 13, 25-30.
- Insam, H., (1990). Are the soil microbial biomass and basal respiration governed by the climatic regime? *Soil Biology & Biochemistry* 22, 525-532.
- Jenkinson, D.S. (1988).
- Jenkinson, D.S., Ladd, J.N., (1981). Microbial biomass in soil: measurement and turnover. En: Paul, E.A., Ladd, J.N. (Eds.), *Soil Biochemistry*, vol. 5. Marcel Dekker, New York, pp. 415-471.
- Ladd, J.N., (1978). Origin and Range of Enzyme in Soil. En: Burns, R.G. (Ed.), *Soil Enzymes*. Academic Press, London, pp. 51-96.
- Landi, L., Badalucco, L., Pomaré, F., Nannipieri, P., (1993). Effectiveness of antibiotics to distinguish the contribution of fungi and bacteria to net nitrogen mineralization, nitrification and respiration. *Soil Biology & Biochemistry* 12, 1771-1778.
- Leirós, M.C., Trasar-Cepeda, C., Seoane, S., Gil-Sotres, F., (2000). Biochemical properties of acid soils under climax vegetation (Atlantic oakwood) in an area of the European temperature-humid zone (Galicia, N.W. Spain): general parameters. *Soil Biology & Biochemistry* 32, 747-755.
- Lobo, M.C., Sastre, I., Vicente, M.A., (2000). Las enzimas como medida del impacto ambiental en los suelos. En: García, C., Hernández, M.T. (Eds), *Investigación y Perspectivas de la Enzimología de Suelos en España*. CEBAS-CSIC, pp. 297-352.
- Martens, R., (1995). Current methods for mea-

- asuring microbial biomass C in soil: Potentials and limitations. *Biology and Fertility of Soils* 19, 87-99.
- Nannipieri, P., (1994). The potential use of soil enzyme as indicators of productivity, sustainability and pollution. En: Pankhurst, C.E., Doube, B.M., Gupta, V.V.S.R., P.R. Grace, P.R. (Eds.), *Soil Biota: Management in Sustainable Farming Systems*. CSIRO, Adelaide, pp. 238-244.
- Nannipieri, P., Ceccanti, B., Grego, S., (1990). Ecological significance of the biological activity in soil. En: Bollag, J.-M., G. Stotzky, G. (Eds.), *Soil Biochemistry*, Vol 6. Marcel Dekker., New York, pp. 293-355.
- Ocio, J.A., Brookes, P.C., (1990). An evaluation of methods for measuring the microbial biomass in soils following the recent addition of wheat straw and characterisation of biomass the develops. *Soil Biology & Biochemistry* 22, 685-694.
- Overbeck, J., (1991). Early studies on ecto- and extracellular enzymes in aquatic environments. En: Chróst, R.J. (Ed.), *Microbial enzymes in aquatic environments*. Springer, New York, pp. 1-5.
- Papendick, I.R., Parr, J.F., (1992). Soil quality: the key to a sustainable agriculture. *American Journal of Alternative Agriculture* 7, 2-3.
- Pascual, J.A., García, C., Hernández, M.T., Moreno, J.L., Ros, M., (2000). Soil microbial activity as a biomarkers of degradation and remediation processes. *Soil Biology & Biochemistry* 28, 1877-1883.
- Powlson, D.S., Brookes, P.C., Chistensen, B.T., (1987). Measurement of soil microbial biomass provides and early indication of changes in total soil organic matter due to straw incorporation. *Soil Biology & Biochemistry* 19, 159-164.
- Ros, M., (2000). Recuperación de suelos agrícolas abandonados mediante el reciclaje en los mismos de residuos orgánicos de origen urbano. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia.
- Ross, D.J.K., Tate, R., Cairns, A., Meyrick, K.F., Parsic, E.A., (1982). Restoration of pasture after topsoil removal: effect of soil carbon and nitrogen mineralization, microbial biomass and enzyme activities. *Soil Biology & Biochemistry* 14, 575-581.
- Sinsabaugh, R.L., (1994). Enzymic analysis of microbial pattern and process. *Biology and Fertility of Soils* 17, 69-74.
- Skujins, J., (1978). History of Abiotic Soils Enzyme Research. En: Burns, R.G. (Ed.), *Soil Enzymes*. Academic Press, London, pp. 1-49.
- Speir, T.W., Ross, D.J., (1990) Temporal stability of enzymes in a peatland soil profile. *Soil Biology & Biochemistry* 22, 1003-1005.
- Stryer, L., (1995). *Biochemistry*. 4th Edition. Freeman and Company, New York, pp. .
- Trasar-Cepeda, C., Leirós, M.C., Gil-Sotres, F., Seoane, S., (1999). Defining the validity of a biochemical index of soil quality. *Biology and Fertility of Soils*. 30, 140-146.
- Trasar-Cepeda, C., Leirós, M.C., Seoane, S., Gil-Sotres, F., (2000). Limitations of soil enzymes as indicators of soil pollution. *Soil Biology & Biochemistry* 28, 1867-1875.
- West, A.W., Sparling, G.P., Grant, W.P., (1987). Relationships between mycelium and bacterial populations in stored, air dried and glucose-amended arable and grassland soils. *Soil Biology & Biochemistry* 19, 599-605.