

Artículo

Bacterias con potencial de biorremediación en suelos contaminados con sulfato de cobre procedente del cantón Mocache

Bacteria with bioremediation potential in soils contaminated with copper sulfate from the Mocache canton

Naomi Kaymara Wong Carriel ¹, Ketty Vanessa Arellano Ibarra ^{2,*}, Ander Leonardo Solórzano Loor ³, Hevert Aarón Coello Burgos ⁴, Daniela Yamilet Galán Mendoza ⁵ y Keily Damaris Cruzatty Caldas ⁶

Cita: Wong Carriel, N. K., Arellano Ibarra, K. V., Solórzano Loor, A. L., Coello Burgos, H. A., Galán Mendoza, D. Y., & Cruzatty Caldas, K. D. (2025). Bacterias con potencial de biorremediación en suelos contaminados con sulfato de cobre procedente del cantón Mocache. *Multidisciplinary Collaborative Journal*, 3(4), 41-53. <https://doi.org/10.70881/mcj/v3/n4/90>

Recibido: 23/10/2025
Revisado: 20/11/2025
Aceptado: 22/11/2025
Publicado: 25/11/2025



Copyright: © 2025 por los autores. Este artículo es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos y condiciones de la **Licencia Creative Commons, Atribución-NoComercial 4.0 Internacional. (CC BY-NC)**.

[\(https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/\)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)

- ¹ Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Ecuador, Los Ríos; <https://orcid.org/0009-0006-5393-7640>; naomi.wong2017@uteq.edu.ec
- ² Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Ecuador, Los Ríos; <https://orcid.org/0000-0001-7168-7485>
- ³ Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Ecuador, Los Ríos; <https://orcid.org/0009-0004-4254-8514>; andersolorzano217@uteq.edu.ec
- ⁴ Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Ecuador, Los Ríos; <https://orcid.org/0000-0002-2949-7140>; hcoellob@uteq.edu.ec
- ⁵ Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Ecuador, Los Ríos; <https://orcid.org/0009-0000-2802-8177>; daniela.galan2017@uteq.edu.ec
- ⁶ Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Ecuador, Los Ríos; <https://orcid.org/0009-0008-8820-701X>; keily.cruzatty2017@uteq.edu.ec

* Correspondencia: ketty.arellano2017@uteq.edu.ec

 <https://doi.org/10.70881/mcj/v3/n4/90>

Resumen: La contaminación por metales pesados, como el sulfato de cobre, representa un riesgo ambiental y sanitario creciente. La biorremediación mediante bacterias resistentes surge como una alternativa sostenible para disminuir su impacto. En este estudio se aislaron cepas bacterianas a partir de suelos recolectados en tres localidades del cantón Mocache, empleando diluciones seriadas (10^{-6}) y cultivo en agar nutritivo. Las cepas fueron caracterizadas mediante rasgos morfológicos y pruebas bioquímicas (catalasa, ureasa, fluorescencia y tinción de Gram). Su capacidad biorremediadora se evaluó en plántulas de arroz cultivadas en suelo contaminado con sulfato de cobre (25,28 mg/kg), inoculadas con 3 mL de suspensión bacteriana (1:10 v/v), bajo un Diseño Completamente al Azar con tres tratamientos (B1, B2, B3) y un control. Las cepas B2, B1 y B3 redujeron la concentración del contaminante en 20,6 %, 14 % y 3,8 %, respectivamente. Asimismo, se registró un efecto positivo en el crecimiento vegetal, destacándose B1 como la cepa con mayor promoción. La DL_{50} fue de 68 mg/L para *Pseudomonas* y 43 mg/L para *Bacillus*. Los resultados confirman el potencial de estas bacterias para disminuir la presencia de sulfato de cobre en suelos agrícolas y mejorar el desarrollo de las plantas.

Palabras clave: contaminación; biorremediadora; morfológicos.

Abstract: Heavy metal contamination, such as copper sulfate, poses increasing environmental and human health risks. Bioremediation using

resistant bacteria offers a sustainable strategy to mitigate these impacts. In this study, bacterial strains were isolated from soils collected in three localities of the Mocache canton using serial dilutions (10^{-6}) and nutrient agar cultivation. Strains were characterized based on morphological traits and biochemical tests (catalase, urease, fluorescence, and Gram staining). Their bioremediation capacity was evaluated in rice seedlings grown in soil contaminated with copper sulfate (25.28 mg/kg), inoculated with 3 mL of bacterial suspension (1:10 v/v) under a Completely Randomized Design with three treatments (B1, B2, B3) and a control. Strains B2, B1, and B3 reduced contaminant concentrations by 20.6%, 14%, and 3.8%, respectively. A positive effect on plant growth was also observed, with B1 showing the greatest growth promotion. The LD₅₀ values were 68 mg/L for *Pseudomonas* and 43 mg/L for *Bacillus*. Overall, the results demonstrate the potential of these bacterial strains to reduce copper sulfate levels in agricultural soils and enhance plant development.

Keywords: contamination; bioremediation; morphological

1. Introducción

El suelo es un recurso esencial para la seguridad alimentaria, sustentando más del 95% de la producción mundial (FAO, 2015; Naciones Unidas, 2024). Sin embargo, su degradación constituye una amenaza creciente debido a que se trata de un recurso no renovable que requiere estrategias efectivas de conservación y recuperación. Entre los principales factores de deterioro destacan los metales pesados, presentes de forma natural por la composición de la roca madre (Wuana & Okieimen, 2011), pero cuya concentración se incrementa por actividades antropogénicas como la minería, el uso de combustibles fósiles y la aplicación intensiva de fertilizantes (Haghighizadeh et al., 2024; Wan et al., 2024). Estas acumulaciones pueden alcanzar niveles críticos en suelos agrícolas.

Las plantas absorben únicamente la fracción biodisponible de los metales presentes en la fase acuosa del suelo, acumulándolos en raíces, tallos, hojas y frutos (Xu et al., 2022; Yan et al., 2020). La ingestión de alimentos con altos contenidos de metales pesados representa un riesgo para la salud humana (Tchounwou et al., 2012; OMS, 2024), motivo por el cual entidades regulatorias como la Unión Europea y el Codex Alimentarius han establecido límites máximos permisibles en productos agrícolas.

En Ecuador, se han reportado concentraciones elevadas de Cd, Ni, Cu y Pb en diversos suelos agrícolas (Carrillo, 2003), superando los límites establecidos por la normativa nacional (MAE, 2015). Si bien la investigación local se ha centrado principalmente en la mitigación de cadmio mediante enmiendas orgánicas y minerales, existe escasa información sobre focos de contaminación por cobre (Cu) y alternativas de remediación adaptadas a distintos tipos de suelos.

El cobre es un micronutriente esencial, pero en exceso provoca fitotoxicidad. Niveles elevados de Cu generan estrés oxidativo, peroxidación lipídica, daño en membranas y desorganización del aparato fotosintético, reduciendo el crecimiento y rendimiento vegetal (Rao et al., 2025; Abbasirad & Ghotbi-Ravandi, 2025). En suelos contaminados con sulfato de cobre (CuSO₄), la remediación se ha orientado a disminuir la biodisponibilidad de Cu²⁺ mediante encalado, aportes de materia orgánica, biochar y microorganismos beneficiosos, como hongos micorrízicos (Tan et al., 2023; Zhao et al., 2024). Aunque estas estrategias reducen parcialmente la movilidad del metal, su

eficacia depende en gran medida de la heterogeneidad física y química de cada suelo, lo que limita su aplicación generalizada.

La biorremediación basada en microorganismos autóctonos surge como una alternativa promisoriosa, especialmente en regiones donde la diversidad microbiana local no ha sido caracterizada. Para su implementación es indispensable identificar bacterias capaces de tolerar y reducir el sulfato de cobre, así como evaluar su potencial para disminuir la biodisponibilidad del metal y favorecer el crecimiento vegetal (Cedeño & Canchignia, 2022).

Los objetivos fueron aislar y caracterizar bacterias nativas tolerantes al sulfato de cobre, evaluar su capacidad para reducir la biodisponibilidad de Cu^{2+} en suelos contaminados y determinar su efecto sobre el crecimiento vegetal bajo estrés por cobre, con el fin de identificar microorganismos con potencial biorremediador para su aplicación en la provincia de Los Ríos.

2. Materiales y Métodos

2.1. Área de estudio

La investigación se realizó en el laboratorio de Biología y Microbiología, ubicado en el Campus Experimental “La María” propiedad de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo (UTEQ), Localizada en el km 7,5 de la vía Quevedo- Mocache, provincia de Los Ríos –Ecuador. Ubicada a $01^{\circ} 04' 48.6''$ de latitud sur y $79^{\circ} 30'04.2''$ de longitud oeste y, a una altitud de 85 msnm.

2.2. Aislamiento de cepas bacterianas

Para este estudio se recolectaron muestras de suelo de tres puntos distintos de la finca Holguín, en el cantón Mocache, para el aislamiento de bacterias. Cada muestra (1 g) fue suspendida en 100 mL de agua destilada en matraces Erlenmeyer, obteniendo mezclas homogéneas utilizadas como muestras madre. A partir de estas, se realizaron diluciones seriadas hasta 1×10^{-6} en tubos Eppendorf con agitación en vortex. Se sembraron 200 μL de cada dilución en placas con agar nutritivo (7 g en 250 mL de agua destilada, esterilizado en autoclave), y se incubaron durante 48 h. Tras la incubación, se identificaron colonias bacterianas con morfologías distintas, seleccionándose tres cepas para su caracterización y evaluación en la investigación.

2.3. Caracterización las poblaciones bacterianas.

Se aplicó el estudio de la morfología colonial de la cepa (homogeneidad, tamaño, forma, color, opacidad y textura de las colonias) y su observación al microscopio (forma y tamaño celular, movilidad, etc.). En la CECT se incluye además la determinación del Gram, la catalasa y la oxidasa para células procariontas (Elzeini *et al.*, 2017).

2.4. Pruebas bioquímicas.

Las pruebas bioquímicas aplicadas incluyeron ureasa, catalasa y tinción de Gram. La actividad ureásica se evaluó en un medio con NaCl, agar y fenol rojo, donde la hidrólisis de urea elevó el pH, produciendo un cambio de color de amarillo a rojo (Zuluaga y Martínez, 2018). La prueba de catalasa se realizó con H_2O_2 , evidenciando liberación de burbujas como indicativo positivo. La tinción de Gram, tras cultivo en agar King B,

permitió diferenciar bacterias Gram positivas y negativas mediante la retención diferencial de colorantes (Rodríguez y Arenas, 2018).

2.5. Establecimiento de la Dosis Letal media (DL₅₀) de sulfato de cobre en cepas bacterianas

Los datos de mortalidad se utilizaron para construir una curva de concentración respuesta para el cobre, representando la mortalidad en función de la concentración del metal pesado. La DL₅₀ se calculó utilizando el método aritmético, que implica la interpolación lineal entre las concentraciones que producen respuestas de mortalidad del 50% de la población (Arroyo, 2022).

2.6. Interacción de planta / bacteria / metal.

Se utilizó un enfoque indirecto para medir la disminución de los niveles de metales pesados, a través de la interacción entre plantas, bacterias y metales, analizando las propiedades agronómicas del cultivo de arroz. Llevando a cabo pruebas que hacen uso de cultivos bacterianos crecidos en King B líquido (1% v/v), con peptona (20.0 g/L), glicerol (15 mL), K₂HPO₄ (1.5 g), MgSO₄ x 7H₂O (1,5 g) y agua destilada (pH 7,2), durante 24 horas a 28 °C en un agitador orbital para favorecer el crecimiento de células vivas. Además, se utilizó suelo franco arcilloso esterilizado y se colocaron en vasos de plástico en cantidades de 50 gramos por unidad, luego se llevó el suelo a su capacidad de retención de agua rápidamente (King *et al.*, 1954). Se sembraron semillas de arroz comercial y se dejaron crecer durante tres semanas. Posteriormente, se añadieron 3 mL de cultivos bacterianos (1 mL de la solución bacteriana en 10 mL de agua destilada) con una concentración de 1×10^{-6} UFC, con el objetivo de evaluar la reducción del sulfato de cobre en el suelo.

2.7. Evaluación del efecto de las cepas bacterianas

Para determinar la eficacia de las cepas bacterianas en la biorremediación del sulfato de cobre, se realizó un análisis químico del suelo antes y después de la aplicación de los tratamientos, con el objetivo de cuantificar el porcentaje de reducción del contaminante. Paralelamente, se utilizaron plántulas de arroz (*Oryza sativa* L.) como bioindicadores, evaluando su respuesta fisiológica y morfológica frente a la presencia del contaminante y a la inoculación bacteriana. Las variables morfológicas medidas fueron: altura de la planta (cm), peso foliar fresco (g), longitud radicular (cm) y peso radicular fresco y seco (g). Estas mediciones permitieron correlacionar el nivel de remediación con el desarrollo vegetal, evidenciando el impacto de las cepas bacterianas tanto en la descontaminación del suelo como en la promoción del crecimiento de las plántulas.

2.8. Diseño experimental y análisis de datos

Los tratamientos en estudio fueron B1 (*Pseudomonas* sp 1), B2 (*Pseudomonas* sp 2), B3 (*Bacillus*) y un testigo absoluto, distribuidos en diseño completamente al Azar con cinco repeticiones. Los datos obtenidos fueron analizados mediante ANOVA y se aplicó la prueba de rangos múltiples de Tukey para la comparación de medias con un nivel de significancia de $p \leq 0,05$, empleando el programa estadístico InfoStat.

3. Resultados

3.1. Caracterización morfoquímica.

La caracterización morfoquímica permitió distinguir claramente a las tres cepas bacterianas aisladas, evidenciando variabilidad en forma, elevación y reacción a la tinción de Gram. Destaca la diversidad estructural entre las cepas, así como la diferencia en la composición de la pared celular, al identificarse tanto bacterias Gram positivas como negativas. Adicionalmente, todas las cepas presentaron actividad ureásica y catalásica, lo que sugiere un potencial metabólico relevante para la degradación de compuestos minerales en suelos contaminados (Tabla1).

Tabla 1

Caracterización morfoquímica

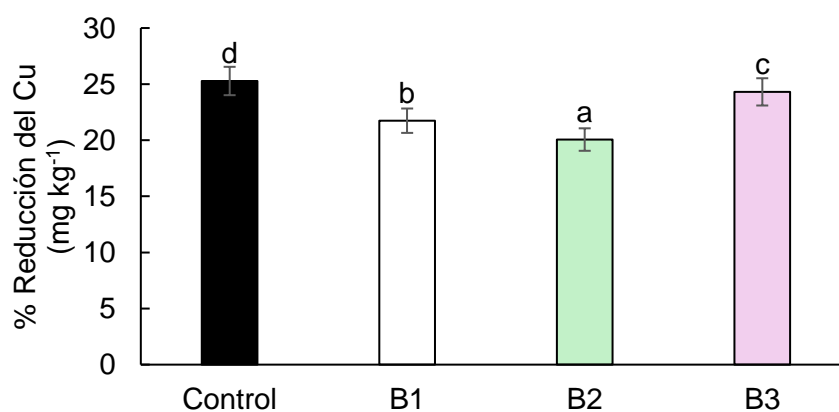
Características		Cepas		
		B1	B2	B3
Forma	Circular	+	-	-
	Fusiforme	-	+	-
	Filamentosa	-	-	+
Elevación	Plana	+	-	+
	Elevada	-	+	-
	Convexa	-	-	-
Forma del borde	Entera	-	-	-
	Ondulada	+	+	-
	Filamentosa	-	-	+
Pruebas bioquímicas	Tinción de Gram	-	-	+
	Catalasa	+	+	+
	Ureasa	+	+	+
	Fluorescencia	-	+	-

3.2. Análisis de suelo

En la Figura 1 se presentan los resultados del análisis de suelo, que muestran diferencias significativas en la concentración de sulfato de cobre entre los tratamientos. El tratamiento B2 generó una reducción del 20,6 %, el tratamiento B1 una disminución del 14 %, y el tratamiento B3 una reducción del 3,8 %, en comparación con la concentración inicial de 25,28 mg/kg.

Figura 1

Reducción de la concentración de cobre en el suelo tras la aplicación de cepas bacterianas.

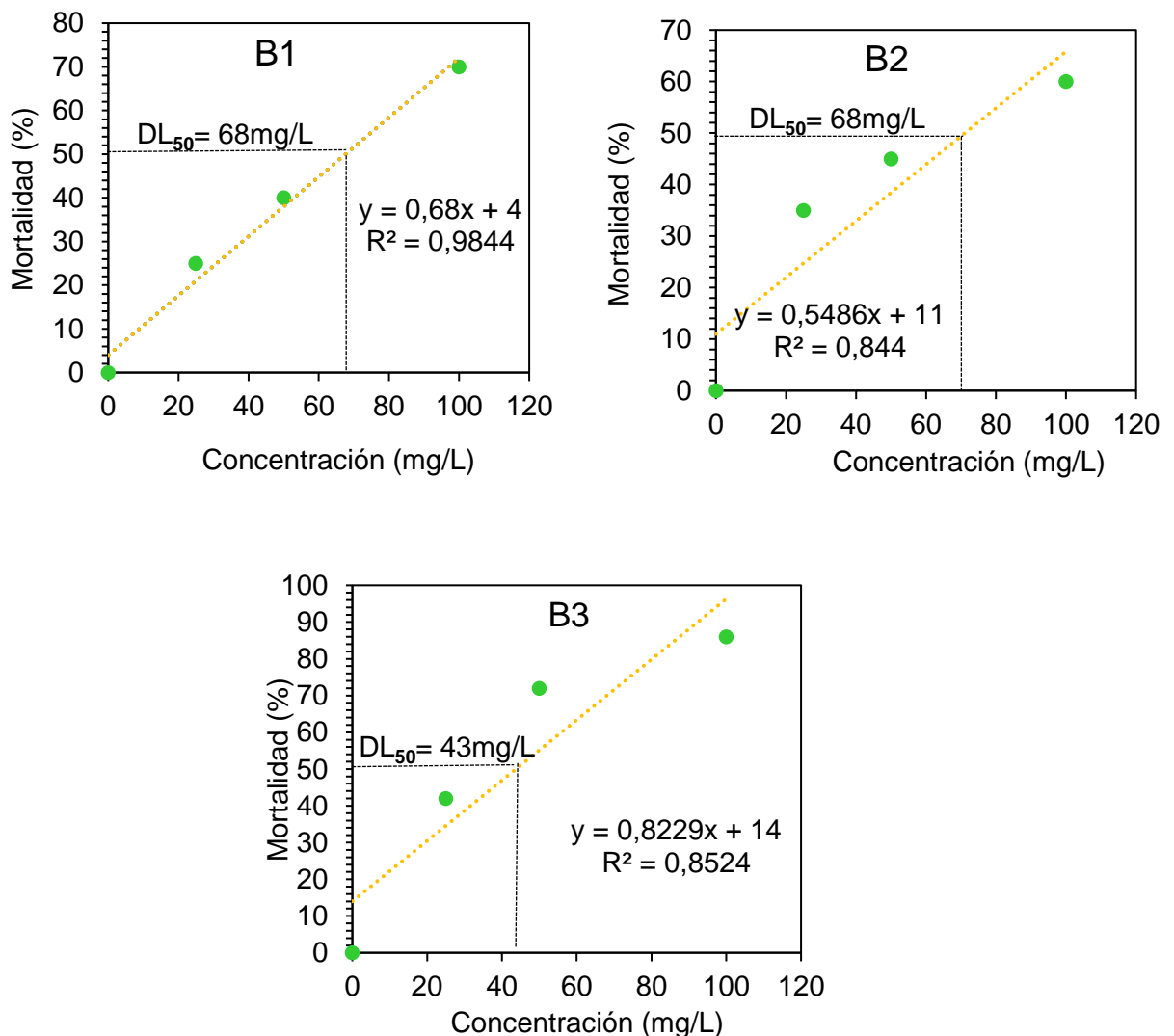


3.3. Dosis Letal media (DL₅₀) de bacterias tolerantes al sulfato de cobre.

En esta investigación, el CuSO₄ a una concentración de 68 mg/L provocó una mayor mortalidad en las cepas bacterianas de *Pseudomonas*, específicamente 40 y 50 % para cepa B1 y B2, respectivamente. mientras que, en el caso de *Bacillus* (B3), la concentración que causó la mortalidad fue de 43 mg/L. Estos resultados indican que, en un lapso de 20 horas, esa cantidad de cobre es capaz de eliminar el 50 % de las cepas bacterianas evaluadas (Figura 2).

Figura 2

Determinación de la dosis letal media (DL₅₀) del sulfato de cobre en las cepas bacterianas B1, B2 y B3.



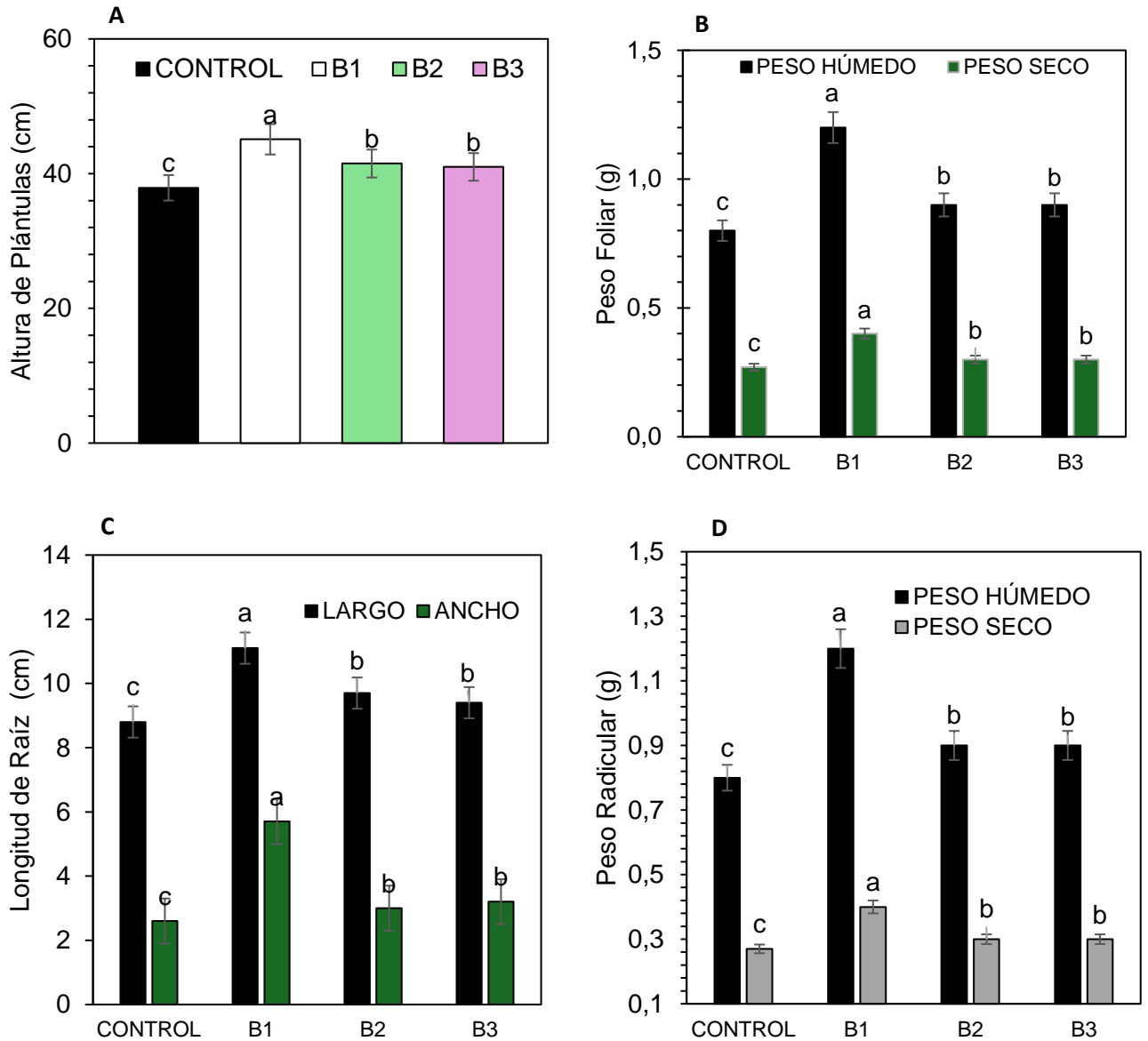
3.4. Efecto de cepas bacterianas en el crecimiento de *Oryza sativa*

La inoculación con cepas bacterianas tuvo un efecto significativo sobre el desarrollo morfológico de *Oryza sativa* (Figura 3). En todas las variables analizadas altura de planta (A), peso foliar (B), longitud de raíz (C) y peso radicular (D) se observaron diferencias estadísticas frente al control, con incrementos notables en los tratamientos

bacterianos. La cepa B1 destacó consistentemente como la más efectiva, registrando los promedios más altos de altura de planta (45,1 cm), peso foliar seco (1,2 g), longitud (11,1 cm) y biomasa seca de raíz (0,4 g).

Figura 2

Altura de plántulas (A), peso foliar (B), longitud de raíz (C) y peso radicular (D) de plantas de arroz con la presencia de cobre.



3.5. Efectos del sulfato de cobre y cepas bacterianas sobre el desarrollo y comportamiento de *Oryza sativa* en condiciones experimentales

En la Figura 4 se muestran plántulas de arroz inoculadas con las cepas bacterianas B1, B2 y B3, junto con el control sin tratamiento bacteriano, todas expuestas al cobre. A pesar de que todas las plantas presentaron síntomas de clorosis debido a la presencia de cobre, las plantas tratadas con las cepas bacterianas (B1, B2 y B3) mostraron mayor crecimiento en comparación con el control, que tuvo un menor desarrollo.

Figura 4

Efectos en la morfología de *Oryza sativa* ante la inoculación de bacterias con potencial de biorremediación de sulfato de cobre.

**4. Discusión****Caracterizar las poblaciones bacterianas tolerantes al sulfato de cobre del cantón Mocache perteneciente a la zona baja de la provincia de Los Ríos.**

Las cepas aisladas mostraron características morfológicas y bioquímicas consistentes con microorganismos adaptados a ambientes contaminados con metales pesados. Su capacidad para crecer en presencia de concentraciones elevadas de cobre concuerda con lo reportado por Karnwal et al. (2025), quienes indican que la exposición prolongada favorece la adquisición de mecanismos de detoxificación, tales como modificación de la pared celular, formación de biopelículas y producción de compuestos quelantes. Adicionalmente, las habilidades metabólicas observadas en las cepas, incluyendo la posible solubilización de nutrientes, coinciden con funciones ampliamente descritas para rizobacterias que habitan suelos degradados (Lai et al., 2022). Estos resultados confirman el potencial de las bacterias autóctonas como agentes microbianos aptos para aplicaciones de biorremediación.

Establecer la Dosis Letal media (DL₅₀) de bacterias tolerantes al sulfato de cobre.

Las cepas B2, B1 y B3 lograron reducir la concentración de cobre en 20,6 %, 14,0 % y 3,8 %, respectivamente, evidenciando su capacidad de mitigar este contaminante. Estos valores respaldan la hipótesis inicial y son coherentes con los mecanismos descritos por Aslam et al. (2025), quienes destacan el rol de grupos funcionales microbianos (carboxilo, fosfato y amina) en la biosorción e inmovilización de iones metálicos. Aunque las eficiencias obtenidas son inferiores a remociones superiores al 90 % reportadas en *Pseudomonas* y *Bacillus* (Hu et al., 2025; Rocco et al., 2024), estas diferencias podrían atribuirse a las condiciones experimentales, al uso de cepas individuales y al tiempo limitado de exposición. Estudios previos señalan que los consorcios microbianos

presentan un desempeño superior por su sinergia metabólica (Santana et al., 2020), lo cual sugiere un espacio significativo para la optimización de la remediación.

Determinar la reducción de sulfato de cobre mediante la interacción de bacterias biorremediadoras /planta

Además de reducir el contaminante, las cepas evaluadas demostraron efectos positivos en el crecimiento vegetal. Este comportamiento ha sido ampliamente reportado para bacterias tolerantes a metales pesados, que contribuyen a mitigar el estrés oxidativo, favorecer la absorción de nutrientes y estimular la fisiología vegetal (Thin et al., 2022). Los resultados refuerzan la importancia de las rizobacterias con doble funcionalidad: biorremediación y promoción del crecimiento, elementos esenciales para la restauración sostenible de suelos contaminados.

El empleo de bacterias provenientes de suelos agrícolas del cantón Mocache ofrece ventajas relevantes, ya que estas cepas se encuentran adaptadas a las condiciones edafoclimáticas locales y a los históricos de uso intensivo de agroquímicos. Esta adaptación puede traducirse en una mayor resiliencia y eficacia en condiciones reales de campo, como ha sido demostrado en otros contextos de remediación microbiana (Abasolo & Morante, 2020).

5. Conclusiones

La caracterización morfoquímica fue exitosa al confirmar la diversidad fenotípica y genérica de las tres cepas aisladas, al distinguirse claramente por su forma, elevación, y reacción Gram. Además, la presencia universal de las actividades ureásica y catalásica en todas las cepas respalda su potencial metabólico para intervenir en ciclos de nutrientes y la degradación de compuestos minerales en suelos, lo que es crucial para la fitorremediación de contaminantes.

La evaluación de la dosis letal media (DL_{50}) para las cepas bacterianas confirmó su diferencial de tolerancia al sulfato de cobre. Las cepas de *Pseudomonas* (B1 y B2) mostraron una mayor sensibilidad al contaminante, alcanzando una concentración de $CuSO_4$ de 68 mg/L. En contraste, la cepa de *Bacillus* (B3) exhibió una mayor resistencia, con 43 mg/L.

La aplicación de las cepas bacterianas (B1, B2 y B3) mostró un efecto significativo en la reducción de la concentración de sulfato de cobre en el suelo, lo que evidencia su capacidad de biorremediación. Específicamente, el tratamiento B2 demostró la mayor eficiencia, logrando una disminución del 20,6 % en la concentración inicial de 25,28 mg/kg de $CuSO_4$.

Contribución de los autores: Todos los autores contribuyeron por igual a la preparación del documento. Además, todos han leído y aceptado la versión publicada del manuscrito.

Financiamiento: Esta investigación no ha recibido financiación externa

Declaración de disponibilidad de datos: Los datos están disponibles previa solicitud a los autores de correspondencia: ketty.arellano2017@uteq.edu.ec

Conflicto de interés: Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses

Referencias Bibliográficas

- Abasolo Pacheco, F., & Morante Carriel, L. A. (2020). Bacterias degradadoras de hidrocarburos a partir de suelos contaminados con hidrocarburos. *Biblioteca Colloquium*. <https://colloquiumbiblioteca.com/index.php/web/article/view/33>
- Abbasirad, S., & Ghotbi-Ravandi, A. A. (2025). Toxicity of copper oxide nanoparticles in barley: Induction of oxidative stress, hormonal imbalance, and systemic resistances. *BMC Plant Biology*, 25, 187. <https://doi.org/10.1186/s12870-025-06213-6>
- Aguilar Merino, C. S. (2021). Evaluación de la calidad del suelo agrícola mediante las características químicas en la finca Aguilar, provincia El Oro [Tesis de grado, Universidad Agraria del Ecuador]. <https://cia.uagraria.edu.ec/Archivos/AGUILAR%20MERINO%20CARLOS%20STEEVEN.pdf>
- Arroyo Rivera. (2022). Evaluación de la acumulación del insecticida clorpirifos en abejas domésticas (*Apis mellifera*) suministrado vía oral crónica, mediante métodos analíticos basados en cromatografía líquida de alta resolución [Tesis de grado, Universidad de Chile].
- Aslam, A., Kanwal, F., Javied, S., Nisar, N., y Torriero, A. A. J. (2025). Microbial biosorption: A sustainable approach for metal removal and environmental remediation. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 22(13), 13245–13276. <https://doi.org/10.1007/s13762-025-06611-1>
- Cedeño Moreira, A. V., y Canchignia Martínez, H. F. (2022). Empleo de bacterias como alternativa de biorremediación en suelos contaminados con mercurio (Hg), zinc (Zn), aluminio (Al) y cobre (Cu) [Tesis de grado, Universidad Técnica Estatal de Quevedo]. <https://repositorio.uteq.edu.ec/handle/43000/675>
- Cheng, Z., Wang, C., Tang, F., Zhou, Y., Zhu, C., y Ding, Y. (2025). The cell wall functions in plant heavy metal response. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 299, 118326. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2025.118326>
- Comisión Europea. (2023). Reglamento (UE) 2023/915 de la Comisión, de 25 de abril de 2023, sobre los niveles máximos de determinados contaminantes en los alimentos (y sus modificaciones). Diario Oficial de la Unión Europea, L119, 103–157.
- El-Komy, M. S., Abuzaid, A. S., Fadl, M. E., Drosos, M., Scopa, A., y Abdel-Hai, M. S. (2025). Spatiotemporal variations affect DTPA-extractable heavy metals in coastal salt-affected soils of arid regions. *Soil Systems*, 9(1), 26. <https://doi.org/10.3390/soilsystems9010026>
- Elzeini, H. M., Ali, A. A., Nasr, N. F., Awad, A. A., y Hassan, A. A. (2017). Morphological and rheological identification of cocci lactic acid bacteria. *Microbial Biochemistry and Technology*, 9(1), 519–526.

- FAO. (2015). Healthy soils are the basis for healthy food production.
- Haghighizadeh, A., Shahsavari, S., y Khanjani, N. (2024). Comprehensive analysis of heavy metal soil contamination in mining areas. *Journal of Environmental Management*, 350, 119758. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2024.105777>
- Hu, Y., Wang, C., y Wang, Y. (2025). Biochar-Immobilized *Pseudomonas aeruginosa* enhances copper remediation and growth of Chinese milk vetch (*Astragalus sinicus*). *Microorganisms*, 13(8), 1793.
- Iza Bósquez, L. G., y Vera Sánchez, G. K. (2023). Biorremediación de muestras de suelo contaminado con hidrocarburos totales de petróleo (TPH) [Tesis de grado].
- Karnwal, A., Kumar, G., Din Mahmoud, A. El, Dutta, J., Singh, R., Al-Tawaha, A. R. M. S., y Malik, T. (2025). Eco-engineered remediation: Microbial and rhizosphere-based strategies for heavy metal detoxification. *Current Research in Biotechnology*, 9, 100297. <https://doi.org/10.1016/j.crbiot.2025.100297>
- King, E. O., Ward, M. K., y Raney, D. E. (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 44(2), 301–307.
- Lai, W., Wu, Y., Zhang, C., Dilinuer, Y., Pasang, L., Lu, Y., Wang, Y., Chen, H., y Li, Z. (2022). Combination of biochar and phosphorus solubilizing bacteria to improve the stable form of toxic metal minerals and microbial abundance in lead/cadmium-contaminated soil. *Agronomy*, 12(5), 1003. <https://doi.org/10.3390/agronomy12051003>
- Loyde de la Cruz, L. A., González Méndez, B., Cruz Avalos, A. M., y Loredó Portales, R. (2022). Suelos agrícolas y metales pesados, una relación tóxica que se puede remediar. *Epistemos*, 16(33), 93–98. <https://doi.org/10.36790/epistemos.v16i33.228>
- Liu, Q., Ding, Y., Lai, Y., Long, Y., Shi, H., y Liu, M. (2024). The immobilization mechanism of inorganic amendments on Cu and Cd in polluted paddy soil in short/long term. *Toxics*, 12(2), 157. <https://doi.org/10.3390/toxics12020157>
- Mazzurco-Miritana, V., Passatore, L., Zacchini, M., Pietrini, F., Peruzzi, E., Carloni, S., ... Nogués, I. (2025). Promoting the remediation of contaminated soils using biochar in combination with bioaugmentation and phytoremediation techniques. *Scientific Reports*, 15, 11231. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-93879-5>
- Ministerio del Ambiente. (2015). Acuerdo Ministerial N° 028 Sustitúyese el Libro VI del Texto Unificado de Legislación Secundaria.
- Naciones Unidas. (2024). World Soil Day: Healthy soils for a healthy life.
- OMS. (2024). Lead poisoning and health [Nota descriptiva].
- Rao, M. J., Duan, M., Zhou, C., Jiao, J., Cheng, P., Yang, L., Wei, W., Shen, Q., Ji, P., Yang, Y., Conteh, O., Yan, D., Yuan, H., Rauf, A., Ai, J., & Zheng, B. (2025). Antioxidant defense system in plants: Reactive oxygen species production, signaling, and scavenging during abiotic stress-induced oxidative damage. *Horticulturae*, 11(5), 477. <https://doi.org/10.3390/horticulturae11050477>

- Rather, B. A., Masood, A., Qiao, F., Jiang, X., Zafar, M. M., Cong, H., y Khan, N. A. (2025). The role of nitric oxide and nitrogen in mediating copper stress in *Brassica juncea* L. *Plant Science*, 353, 112414. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2025.112414>
- Rizvi, A., Ahmed, B., Zaidi, A., y Khan, M. S. (2020). Biosorption of heavy metals by dry biomass of metal tolerant bacterial biosorbents: An efficient metal clean-up strategy. *Environmental Monitoring and Assessment*, 192(12), 1–21. <https://doi.org/10.1007/s10661-020-08758-5>
- Rocco, D. H. E., Freire, B. M., Oliveira, T. J., Alves, P. L. M., de Oliveira Júnior, J. M., Batista, B. L., Grotto, D., y Jozala, A. F. (2024). *Bacillus subtilis* as an effective tool for bioremediation of lead, copper and cadmium in water. *Discover Applied Sciences*, 6(8), 430. <https://doi.org/10.1007/s42452-024-06101-y>
- Rodríguez, P. A., y Arenas, R. (2018). Hans Christian Gram y su tinción. *Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica*, 16(2), 166–167. <http://www.medigraphic.com/pdfs/cosmetica/dcm-2018/dcm182n.pdf>
- Santana, A., Sánchez, A., Romero, Y., Toledo, E., Ortega, S., y Toribio, J. (2020). Aislamiento e identificación de bacterias tolerantes y bioacumuladoras de metales pesados, obtenidas de los jales mineros. *Terra Latinoamericana*, 38(1), 67–75. <https://doi.org/10.28940/terra.v38i1.430>
- Sheng, Z., Luo, T., Wang, L., Chen, M., Ma, B., Liu, L., Wang, B., Kuai, J., Wang, J., Zhao, J., Xu, Z., y Zhou, G. (2024). Biochar addition enhances remediation efficiency and rapeseed yield in copper-contaminated soil. *Frontiers in Plant Science*, 15, 1481732. <https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1481732>
- Tang, Y., Wang, C., Holm, P. E., Hansen, H. C. B., y Brandt, K. K. (2023). Impacts of biochar materials on copper speciation, bioavailability, and toxicity in chromated copper arsenate polluted soil. *Journal of Hazardous Materials*, 459, 132067. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.132067>
- Tchounwou, P. B., Yedjou, C. G., Patlolla, A. K., y Sutton, D. J. (2012). Heavy metals toxicity and the environment. *EXS*, 101, 133–164. https://doi.org/10.1007/978-3-7643-8340-4_6
- Thin, V., Kim, J., Chang, S., y Chung, W. (2022). Bacterial biosorbents, an efficient heavy metals green clean-up strategy: Prospects, challenges, and opportunities. *Microorganisms*, 10(3), 610. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10030610>
- Wan, Y., Jiang, Y., Wang, R., y Chen, J. (2024). Heavy metals in agricultural soils: Sources, influencing factors, and remediation. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 21(1), 123. <https://doi.org/10.3390/toxics12010063>
- Wairich, A., Lima-Melo, Y., Menguer, P. K., Ortolan, F., y Ricachenevsky, F. K. (2025). Iron, cold iron, is the master of them all: Iron crosstalk with zinc, copper, phosphorus and nitrogen homeostasis. *Journal of Experimental Botany*. Advance online publication. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraf106>

- Wuana, R. A., y Okieimen, F. E. (2011). Heavy metals in contaminated soils: A review of sources, chemistry, risks and best available strategies for remediation. *ISRN Ecology*, 2011, 402647. <https://doi.org/10.5402/2011/402647>
- Xu, D., Zhou, P., Zhan, J., Gao, Y., y Dou, C. (2022). Effects of soil properties on heavy metal bioavailability and accumulation in crops. *Frontiers in Environmental Science*, 10, 918637. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-13140-1>
- Yan, A., Wang, Y., Tan, S. N., Yusof, M. L. M., Ghosh, S., y Chen, Z. (2020). Phytoremediation: A promising approach for revegetation of heavy metal contaminated land. *Frontiers in Plant Science*, 11, 359. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00359>
- Zhang, H., Xu, Y., Kanyerere, T., Wang, Y.-S., y Sun, M. (2022). Washing reagents for remediating heavy-metal-contaminated soil: A review. *Frontiers in Earth Science*, 10, 901570. <https://doi.org/10.3389/feart.2022.901570>
- Zhao, S., Gao, H., Huang, L., Shi, H., y Tang, X. (2024). Arbuscular mycorrhizal fungi-assisted phytoremediation: A promising strategy for heavy-metal-contaminated soils. *Plants*, 13(23), 3289. <https://doi.org/10.3390/plants13233289>
- Zhou, X., Wang, S., Liu, Y., Huang, G., Yao, S., y Hu, H. (2020). Coupling phytoremediation efficiency and detoxification to assess the role of P in the Cu tolerant *Ricinus communis* L. *Chemosphere*, 247(125965), 125965. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.125965>
- Zhou, X., Xiong, X., Lu, F., Shi, W., Zhou, Y., Lai, N., Chen, L.-S., & Huang, Z.-R. (2025). Excessive copper induces lignin biosynthesis in the leaves and roots of two citrus species: Physiological, metabolomic and anatomical aspects. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 289, 117692. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2025.117692>
- Zuluaga, A. M., & Martínez, J. R. (2018). Diagnóstico de *Helicobacter* spp. en mucosa gástrica de equinos, mediante pruebas de actividad ureasa. *Revista Científica*, 28(1). <https://doi.org/10.15446/rfmvz.v69n2.103260>