

EXOENZIMAS Y CARBONO DE RESPIRACIÓN COMO ÍNDICES BIOLÓGICOS PARA DETERMINAR LA DEGRADACIÓN DE UN SUELO

D. EFFRON¹, V. FONTANIVE¹, R. DEFRIERI¹ y R. M. PALMA²

RESUMEN

La capacidad productiva de los suelos puede decaer por el intenso uso agrícola manifestado de diversas formas, entre ellas, la disminución de la materia orgánica, la pérdida de nutrientes, la compactación, la disminución de la población microbiana y las variaciones en la actividad de las enzimas y en el pH. En lo referente a la actividad enzimática, las enzimas más estudiadas son aquellas relacionadas con la mineralización de nutrientes necesarios para el crecimiento de las plantas y de los microorganismos. El objetivo de este trabajo fue estudiar la actividad de las enzimas ureasa, proteasa y arilsulfatasa y su relación con un índice de actividad microbiana evaluado mediante el carbono de respiración. Las muestras de suelo fueron tomadas de un suelo vertisólico de la provincia de Entre Ríos, Argentina. Se seleccionaron muestras de cuatro situaciones con diferentes niveles de degradación. De los resultados obtenidos se comprueba que la actividad de la ureasa es más sensible que las otras variables estudiadas, en detectar cambios provocados por las diferentes historias culturales de cada situación. Aquellas situaciones con una mayor calidad del suelo, tienen un mayor índice de respiración y una mayor actividad de enzimas extracelulares.

Palabras clave. ureasa, proteasa, arilsulfatasa, carbono de respiración, Vertisol.

EXOENZYMES AND RESPIRED CARBON AS BIOLOGICAL INDEX TO DETERMINE SOIL DEGRADATION

SUMMARY

The intense agricultural use of soil may lead to decrease their production. This is shown in many ways, such as the decrease of organic matter, the loss of nutrient, soil compactation, the decrease of microbial population and variation in enzyme activities. According to enzyme activities, the most studied enzymes are those related with nutrient mineralization needed for plant and microorganisms growth. The objective of this work was to study the activities of the enzymes urease, protease and arylsulphatase and their relationship with and index of microbial activity evaluated through soil respiration. The soil samples were collected from a vertisolic soil of Entre Ríos province (Argentina). Four situations with different degradation levels were selected. From the result obtained it is verified that urease activity is more sensitive than the rest of the properties studied, detecting significant differences for the different cultural histories of each studied situation. Those situations which promote organic matter maintenance, shown a higher index of respiration and a higher activity of extracellular enzymes.

Key words. urease, protease, arylsulphatase, respired carbon, Vertisols

INTRODUCCIÓN

Estudios realizados en las últimas décadas sobre la capacidad productiva de los suelos indican una severa degradación, mayor al 10%, de las tierras cultivadas de la corteza terrestre como resultado de la erosión, la polución ambiental, el

excesivo laboreo, el sobrepastoreo, la tala, la salinización y la desertificación (Lal, 1993; Sanders, 1992). Las prácticas de manejo, tales como: las labranzas, las rotaciones, el uso de pesticidas y fertilizantes, el agregado de abonos verdes, etc., tienen influencia directa sobre la calidad del agua

¹Cátedra de Química General e Inorgánica. Facultad de Agronomía UBA, Av. San Martín 4453 (1417) E-mail: effron@mail.agro.uba.ar. Buenos Aires.

² Cátedra de Edafología. Facultad de Agronomía UBA, Av. San Martín 4453 (1417). Buenos Aires.

y del aire y sobre la capacidad de producción del suelo (Gregorich *et al.*, 1994; Chander, 1997; Campbell *et al.*, 1991; 1992; Engels *et al.*, 1995).

Para cuantificar el estado de deterioro o calidad de los suelos agrícolas se puede seleccionar un grupo de propiedades biológicas y bioquímicas (Gregorich *et al.*, 1994). Entre ellas, se mencionan: el contenido de las diferentes fracciones de C y N (orgánicas, livianas y mineralizables), la biomasa microbiana, el carbono de respiración, la cantidad de carbohidratos y la actividad de algunas enzimas (dehidrogenasa, β -glucosidasa, ureasa, proteasa, histidasa, glutaminasa, nucleosidasa, arilsulfatasa, fosfomonoestearasa). Esta selección se basa en que esas propiedades están relacionadas con diversos procesos del suelo, permitiendo detectar cambios en su degradación, así como también indicar su recuperación (Pankhurst *et al.*, 1995).

La actividad de las enzimas son indicadores de la calidad de la materia orgánica, debido a que ellas controlan: la liberación de nutrientes necesarios para el crecimiento de las plantas y de los microorganismos (Skujins, 1978), el intercambio gaseoso entre el suelo y la atmósfera (Conrad *et al.*, 1983) y las propiedades físicas del suelo (Martens *et al.*, 1992). Las más estudiadas son aquellas relacionadas con la mineralización de nutrientes, cuyos productos finales son importantes para la nutrición de los vegetales.

La actividad proteásica detectada en microorganismos, plantas y animales, cataliza la hidrólisis de las proteínas a polipéptidos, oligopéptidos o aminoácidos (Ladd y Butler, 1972).

La ureasa, si bien no participa directamente en la liberación de nutrientes interviene en la hidrólisis de la urea dando CO_2 y NH_3 , afectando de esta manera la eficiencia de este fertilizante. Es una de las enzimas cuya actividad ha sido ampliamente estudiada en distintos suelos y con distintos manejos (Palma y Conti, 1991; Tabatabai y Bremner, 1972). Se halla ampliamente distribuida en la naturaleza encontrándose en microorganismos, animales y plantas.

Las sulfatasas catalizan la hidrólisis de distintos ésteres orgánicos liberando SO_4^{2-} disponible

para las plantas (Tabatabai y Bremner, 1970; Deng y Tabatabai, 1997). Un elevado porcentaje (40-70%) del contenido total de S en el suelo está presente bajo la forma de éster sulfato. La arilsulfatasa cumple un rol importante en la mineralización de S.

La actividad de las enzimas está relacionada con la actividad microbiológica, siendo uno de sus índices el C de respiración. La respiración es un proceso que refleja la actividad biológica del suelo (Reicosky y Lindstrom, 1993); puede ser evaluada por la liberación de CO_2 o por la demanda de O_2 y es el resultado de los procesos metabólicos de los organismos del suelo.

El objetivo de este trabajo fue evaluar si la actividad de las enzimas proteasa, ureasa, arilsulfatasa y carbono de respiración son más sensibles en detectar cambios entre distintos manejos culturales y relacionar la actividad de las enzimas con un índice de actividad microbiana evaluado mediante el C de respiración.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este experimento se llevó a cabo en el Sur del Departamento de La Paz, Prov. de Entre Ríos, caracterizada por tener suelos vertisólicos. Se seleccionaron cuatro situaciones: bosque natural (BN) con un horizonte A de 27 a 30cm de espesor, pastizal en recuperación (PR) con un horizonte A de 20 a 30cm, un lote cultivado durante 26 años posteriores al desmonte (DA), con un horizonte A de 10 a 12 cm y otro con 40 años de cultivo después del desmonte (DB) con un horizonte A de 9 a 12 cm.

La vegetación natural del área en estudio corresponde al denominado bosque o selva de Montiel que es una formación boscosa xerofítica constituida por diversas especies arbóreas entre las que se destacan el ñandubay (*Prosopis affinis*), el algarrobo (*Prosopis nigra*) y el quebracho blanco (*Aspidosperma quebracho-blanco*). A medida que aumentó la explotación agrícola se produjo una disminución de la superficie cubierta por estos bosques y se incrementaron los pastizales y chicales (matorrales de *Baccharis* sp.).

Determinaciones analíticas

- a) Actividad de enzimas extracelulares:

- Ureasa (EC 3.5.1.5.): según la técnica de Zantua y Bremner (1975).
 - Proteasa: empleando como sustrato caseína (Ladd y Butler, 1972), modificado por Dilly y Munch (1996).
 - Arilsulfatasa (EC 3.1.6.1): según la metodología de Dick *et al.* (1996).
- b) Respiración del suelo: según el método de Alef (1995).

Las muestras de suelo (8 por cada tratamiento) fueron obtenidas a una profundidad de 0 a 10 cm y se mantuvieron refrigeradas a 4°C, con el contenido de humedad natural, hasta el momento de ser analizadas. En todos los casos la valoración de actividad enzimática se midió incubando la muestra con su respectivo sustrato. Después de un periodo adecuado se midió la concentración por espectrofotometría de un producto de la reacción o de sustrato remanente o de su disminución como consecuencia de la reacción.

c) Carbono oxidable: por oxidación con dicromato de potasio y ácido sulfúrico (Nelson y Sommers, 1982)

Los datos fueron analizados estadísticamente asumiendo un diseño experimental completamente aleatorizado. El ANVA fue realizado entre tratamientos; para las medias entre tratamientos se empleó el test de Tukey y se correlacionaron las variables para determinar su asociación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las Figuras 1, 2, 3 se muestran los valores medios de la actividad de las enzimas proteasa, ureasa y arilsulfatasa, respectivamente. En cada una de las figuras se incluyen los valores medios de un índice de actividad microbológica evaluado mediante el carbono de respiración.

La actividad de la proteasa (Figura 1) presenta dos grupos, entre las situaciones BN y PR (grupo que presenta los mayores valores) que difieren significativamente ($p < 0,05$) de DA y DB. En las situaciones más degradadas la actividad de esta enzima se reduce 66% con respecto a los valores medios del primer grupo que oscilan entre 143 μg tirosina $\text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$ y 28 μg tirosina $\text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$. Estos valores están dentro del orden de los mencionados en la bibliografía (Ladd y Butler, 1972).

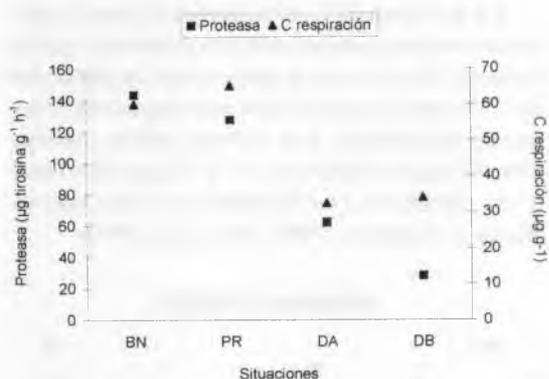


Figura 1. Actividad proteasa y C respirado en cuatro situaciones de manejo (BN: bosque nativo, PR: pastizal en recuperación, DA: cultivado 26 años posteriores al desmonte, DB: cultivado 40 años posteriores al desmonte).

La Figura 2 muestra los valores medios correspondientes a la actividad de la ureasa de las diferentes situaciones que oscilan entre 53 μg N-urea $\text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$ para BN y 4 μg N-urea $\text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$ para el lote DB. Estos valores están en el rango de los hallados por otros autores (Palma y Conti, 1989; Pancholy y Rice, 1973). Los valores medios entre las cuatro situaciones marcan diferencias significativas ($p < 0,05$), correspondiendo el mayor a la situación BN, el siguiente a la situación PR, el tercero a la DA y el menor a la DB, siendo ésta la situación más degradada.

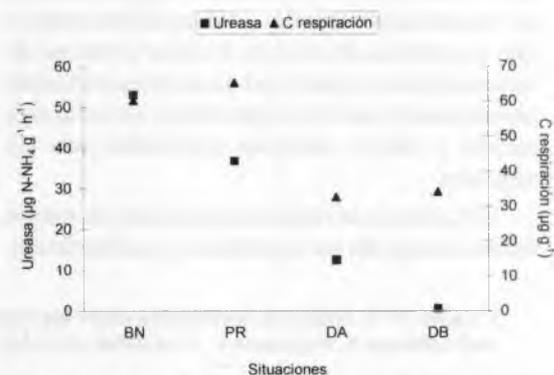


Figura 2. Actividad ureasa y C respirado en cuatro situaciones de manejo (BN: bosque nativo, PR: pastizal en recuperación, DA: cultivado 26 años posteriores al desmonte, DB: cultivado 40 años posteriores al desmonte).

La actividad de la arilsulfatasa (Figura 3) presenta el mismo comportamiento estadístico que la proteasa. En este caso se observa una disminución del 75% entre las situaciones más degradadas y las menos degradadas. Los valores medios oscilan entre 195 $\mu\text{g p-nitrofenol g}^{-1} \text{h}^{-1}$ y 15 $\mu\text{g p-nitrofenol g}^{-1} \text{h}^{-1}$, similares a los hallados por otros autores (Kang y Freeman, 1999; Dick *et al.*, 1996)

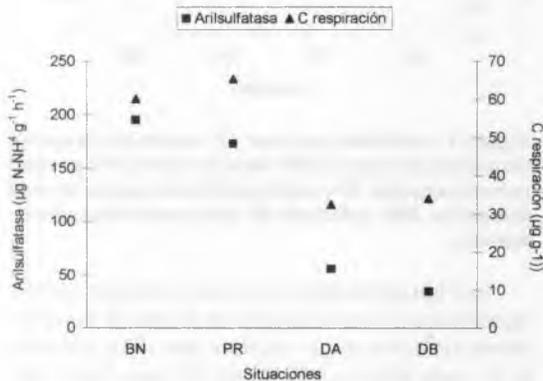


Figura 3. Actividad arilsulfatasa y C respirado en cuatro situaciones de manejo (BN: bosque nativo, PR: pastizal en recuperación, DA: cultivado 26 años posteriores al desmonte, DB: cultivado 40 años posteriores al desmonte).

La diferente actividad enzimática entre situaciones revela la perturbación causada al agroecosistema por las prácticas culturales. Estos resultados indican que las prácticas de manejo, al alterar el retorno de materia orgánica al suelo, disminuyen la actividad de las enzimas afectando la capacidad de ese suelo para reciclar y liberar nutrientes disponibles para los vegetales.

El Carbono de respiración presenta un patrón similar al seguido por la proteasa y la arilsulfatasa,

es decir, marca diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las medias de las situaciones BN y PR, respecto de las situaciones DA y DB. Esta variable presenta un porcentaje de disminución de 47% entre ambos grupos. Los valores medios oscilan entre 65 $\mu\text{g C g}^{-1}$ suelo y 35 $\mu\text{g C g}^{-1}$ suelo y se encuentran dentro del rango de valores informados por otros autores (Chang y Broadbent, 1981).

Las situaciones que tienen menores pérdidas de C, debido a que no hay extracción por parte de cultivos, son las que muestran una mayor liberación de CO_2 por respiración indicando poseer una actividad microbiana más elevada (Friedel *et al.*, 1996).

Las correlaciones entre la actividad de cada enzima y el CO_2 respirado se muestran en el Cuadro N° 1. También se incluyen las correlaciones con el C oxidable. Las actividades de todas las enzimas correlacionan positivamente con el C de respiración, siendo la mayor la correspondiente a la arilsulfatasa ($r = 0,84$, $p < 0,05$) y la menor la de la proteasa ($r = 0,75$, $p < 0,05$).

El C oxidable correlaciona positivamente con las actividades de todas las enzimas. Esto refuerza el concepto que indica que las enzimas extracelulares en los suelos están unidas a las arcillas y los coloides húmicos, siendo la asociación con las sustancias húmicas una forma efectiva de protección de las enzimas en el ambiente del suelo (Mc Laren, 1975).

También se ha encontrado una correlación significativa entre el C de respiración y el C oxidable coincidiendo este resultado con lo citado por diversos autores, entre ellos, Frankenberger y Dick (1983). El hecho de que en algunos estudios de suelos no se encuentre una correlación significativa entre estas variables puede ser atribuido a la diferente calidad de la materia orgánica y a su dife-

Cuadro N° 1. Índice de correlación entre las variables: actividad de las enzimas proteasa, ureasa, arilsulfatasa, C respirado y C oxidable, ($n = 32$).

	Actividad proteasa	Actividad ureasa	Actividad arilsulfatasa
C de respiración	0,75 ($p < 0,05$)	0,80 ($p < 0,05$)	0,84 ($p < 0,05$)
C oxidable	0,78 ($p < 0,05$)	0,87 ($p < 0,05$)	0,90 ($p < 0,05$)

rente resistencia al ataque microbiano (Díaz-Raviña *et al.*, 1988).

El uso intensivo del suelo, como ocurre en DA y DB, es un ejemplo claro de un ciclo abierto, donde, bajo las condiciones dadas, los nutrientes son rápidamente metabolizados y usados por las plantas o bien se pierden con las cosechas. Como consecuencia de ello, estas situaciones tienen un menor grado de estabilidad y se requiere una mayor entrada de materia orgánica para mantener la productividad del suelo.

CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos se deduce que la actividad de la enzima ureasa resulta ser más sensible que la proteasa, la arilsulfatasa y el C de respiración en detectar los cambios provocados por las diferentes historias culturales de cada situación.

Las situaciones menos degradadas, BN y PR, tienen una mayor actividad microbiana que se refleja en una mayor actividad de enzimas extracelulares. Esto probablemente posibilite un mayor potencial para estabilizar y proteger los complejos enzimáticos en la matriz del suelo.

BIBLIOGRAFIA

- ALEF, K. 1995. Soil Respiration. Pp 214- 219 In *Methods in applied Soil Microbiology and Biochemistry*. Editores: Alef, K and Nannipieri, P. Academic Press Inc. San Diego. USA.
- CAMPBELL, C.A., V.O. BIEDERBECK, R.P. ZENTNER and G.P. LAFOND. 1991. Effect of crop rotation and cultural practices on soil organic matter, microbial biomass and respiration in thin black chernozem. *Can. J. Soil Sci.* 71:363-376.
- CAMPBELL, C.A., A.P. MOULIN, K.E. BOWREN, H.H. JANZEN, L. TOWNLEYSMITH and V.O. BIEDERBECK. 1992. Effect of crop rotations on microbial biomass, specific respiratory activity and mineralizable nitrogen in a black chernozemic soil. *Can. J. Soil Sci.* 72:417-427.
- CONRAD, R., M. WEBER and W. SEILER. 1983. Kinetics and electron transport of soil hydrogenases catalyzing the oxidation of atmospheric hydrogen. *Soil. Biol. Biochem* 15: 167-176.
- CHANDER, K., S. GOYAL, M.C. MUNDRA and K.K. KAPOOR. 1997. Organic Matter, microbial biomass and enzyme activity of soils under different crop rotations in the tropics. *Biol. Fertil. Soils.* 24:306-310.
- CHANG, F.H. and F.E. BROADBENT. 1981. Influence of Trace metals on Carbon dioxide evolution from a Yolo Soil. *Soil Science.* 132: 416.
- DENG, S.P. and M.A. TABATABAI. 1997. Effect of tillage and residue management on enzyme activities in soils. III Phosphatases and arylsulfatases. *Biol. Fertil. Soils.* 24:141-146.
- DIAZ-RAVINA, M., T. CARBALLAS and M.J. ACEA. 1988. Microbial biomass and metabolic activity in four acid soils. *Soil Biochem.* 20:817.
- DICK, R.P., D.P. BRAKWELL and R.F. TURCO. 1996. Soil enzyme activities and biodiversity measurements as integrative microbiological indicators. Pp. 247-271. In J. Doran y A. Jones (eds) *Methods for Assessing Soil Quality*. SSSA Spec. Publ. Número 49.
- DILLY, O. and J.C. MUNCH. 1996. Microbial biomass content, basal respiration and enzyme activities during the course of decomposition of leaf litter in a Black Alder (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn) Forest. *Soil Biol. Biochem.* 28: 1073-1081.
- ENGELS, E.A., M. BECKER, J.C.G. OTTOW and J.K. LADHA. 1995. Influence of phosphorus or phosphorus-potassium fertilization on biomass and dinitrogen fixation of the stem-nodulating green-manure legume *Sesbania rostrata* in different marginally productive wetland soils. *Biol. Fertil. Soil.* 20:107-112.
- FRANKENBERGER, W.T. Jr. and W.A. DICK. 1983. Relationships between enzyme activities and microbial growth and activity indices in soil. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 47:945-951.
- FRIEDEL, J. K., J. C. MUNH and W. R. FISHER. 1996. Soil microbial properties and the assesment of available soil organic matter in a haplicluvisol after several years of different cultivation and crop rotation. *Soil Biol. Biochem.* 28: 479-488.

- GREGORICH, E.G., M.R. CARTER, D.A. ANGERS, C. MONREAL and B.H. ELLERT. 1994. Towards a minimum data set to assess soil organic matter quality in agricultural soils. *Canadian Journal of Soil Science*, 74: 367-385.
- KANG, H. and CH. FREEMAN. 1999. Phosphatase and arylsulphatase activities in wetland soils: annual variation and controlling factors. *Soil Biology and Biochemistry* 31: 449-454
- LADD, J.N. and J.H.A. BUTLER. 1972. Short term assays of soil proteolytic enzyme activities using proteins and dipeptide derivatives as substrates. *Soil Biol. Biochem.* 4: 19-30.
- LAL, R. 1993. Tillage effects on soil degradation, soil resilience, soil quality and sustainability. *Soil Tillage Res.* 27: 108.
- MAC LAREN, A. D. 1975. Soil as a system of humus and clay immobilized enzymes. *Chem. Scr.* 28: 97-99.
- MARTENS, D.A., J.B. JOHANSON and W.T. FRANKENBERGER. 1992. Production and persistence of soil enzymes with repeated addition of organic residues. *Soil Sci.* 153:53-61.
- NELSON, D.W. and L.E. SOMMERS. 1982. Total C, organic C and organic matter. Chapter 29. In *Methods of Soil Analysis*. Part 2. 2nd Edition. Page editor. Am. Soc. of Agron. Inc., Madison, Wisconsin, USA.
- PANKHURST, C.E., B.G. HAWKE, H.J. McDONALD, C.A. KIRBY, J.C. BUCKERFIELD, P. MICHELSEN, K.A. O'BRIEN, V.V.S.R. GUPTA and B.M. DOUBE. 1995. Evaluation of soil biological properties as potential bioindicators of soil health. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 35:1015-1028.
- PANCHOLY, S. and E. RICE. 1973. Soil Enzymes in relation to Old Field Succession: Amylase, Cellulase, Invertase, Dehydrogenase and Urease. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* 37: 47-50.
- PALMA, R.M. y M. CONTI. 1989. Influencia de sistemas de labranza y secuencias de cultivos sobre la actividad ureásica de un Argiudol típico de Marcos Juárez. (Córdoba). *Ciencia del Suelo*, 7(1-2):51-54.
- PALMA, R.M. and M. CONTI. 1991. Ureasa activity in argentine soils: Field studies and influence of sample treatment. *Soil Biol. Biochem.* 22:105-108.
- REICOSKY, D.C. and M. J. LINDSTROM. 1993. Fall tillage method: Effect on short-term carbon dioxide flux from soil. *Agron. J.* 85:1237-1243.
- SANDERS, D.W. 1992. International activities in assessing and monitoring soil degradation. *Am. J. Altern. Agric.* 7: 17-24.
- SKUJINS, J. 1978. History of abiotic soil enzyme research. pp. 1-49. In *Soil Enzymes*. Burns, G.R. (ed.), Academic Press Inc. (London) Ltd.
- TABATABAI, M.A. and J.M. BREMNER. 1970. Arylsulfatase activity of soils. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* 34:225-229.
- TABATABAI, M.A. and J.M. BREMNER. 1972. Assay of urease activity in soils. *Soil Biol. Biochem.* 4:479-487.
- ZANTUA, M.I. and J.M. BREMNER. 1975. Comparison of methods of assaying urease activity in soils. *Soil Biol. Biochem.* 7: 291-295.