



Correlación de actividades enzimáticas con la respiración basal en suelos cacaoteros del occidente venezolano

Arnaldo Armado^{1*}, Froilán Contreras², Pablo García², Jorge Paolini³

- (1) Departamento de Química, Facultad de Ciencias y Tecnología, Universidad de Carabobo, Valencia, Venezuela.
(2) Postgrado en Biotecnología de Microorganismos, Facultad de Ciencias, Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela.
(3) Laboratorio de Ecología de Suelos, Centro de Ecología, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), Caracas, Venezuela.

(*) armadoa@uc.edu.ve

Recibido: 16/04/2009

Revisado: 23/08/2009

Aceptado: 31/08/2009

Resumen:

En muestras de tres suelos cacaoteros del occidente venezolano, discriminadas en seis muestras de la Finca Pedregal-Tucaní (Estado Mérida), cuatro de la Estación Experimental San Juan de Lagunillas (Estado Mérida) y seis de la Estación Experimental Chama (Estado Zulia) se determinaron actividades de deshidrogenasa, desaminasa, fosfatasa ácida y alcalina, ureasa, caseinasa, β -glucosidasa y la respiración basal, con el fin de estudiar la correlación de dichas actividades enzimáticas con la producción de CO_2 (respiración basal). Los valores de actividades enzimáticas y respiración basal para los suelos del Estado Mérida fueron mayores que para el suelo del estado Zulia. Las actividades de deshidrogenasa, ureasa y caseinasa presentaron la mayor correlación con la respiración basal de los suelos en estudio.

Palabras clave: Deshidrogenasa; Fosfatasa; Desaminasa; Ureasa; Caseinasa; β -Glucosidasa; Respiración Basal.

Abstract

Samples of three cocoa soils from the Venezuelan west, discriminated in six samples of Pedregal farm (Tucaní, Mérida State), four samples of San Juan Lagunillas Experimental Station (Mérida State) and six samples of Chama Experimental Station (Zulia State) were used for determination of enzymatic activities dehydrogenase, arginine amination (desaminase), acid and alkaline phosphatase, urease, caseinase and β -glucosydase, with the aim of to correlate and compare with the microbiological activity (basal respiration). Enzymatic activities and basal respiration values were higher for soils of Mérida State. Dehydrogenase, urease and caseinase activities there were the most significant correlation ($p < 0,01$) with basal respiration of soils studied.

Keywords: Dehydrogenase; Phosphatase; Deaminase; Urease; Caseinase; β -Glucosydase; Basal Respiration.

Introducción

La actividad microbiológica es un término general que incluye todas las reacciones metabólicas y las interacciones de la microflora y microfauna del suelo y debe estar correlacionada con el contenido de carbono de la biomasa microbiana¹. Distintos métodos se han utilizado para expresar la actividad microbiológica del suelo².

La medida de las actividades enzimáticas del suelo ha sido extensamente investigada como una posible herramienta para determinar la actividad microbiológica en suelos, sin embargo, esto ha sido ampliamente discutido y criticado

en la actualidad³. En general, las actividades enzimáticas no se correlacionan con la respiración o el número total de microorganismos del suelo, ya que son específicas a un sustrato y relativas a reacciones específicas; además en el ensayo se determina la actividad enzimática potencial del suelo y no la real en el momento de la toma de muestra. Las mediciones simultáneas de varias actividades enzimáticas en el suelo, pueden ser más validas para estimar la actividad microbiológica total y su respuesta a prácticas de manejo del suelo, estrés medioambiental y cambios en condiciones climáticas. Las enzimas en suelo más frecuentemente estudiadas son las oxido-reductasas e

hidrolasas³. Los ensayos de actividad enzimática, junto con otros parámetros bioquímicos (como la actividad microbiológica y biomasa microbiana), medidos en suelos ofrecen potencialmente, un índice integrador del estatus biológico del suelo o de la capacidad de un suelo de llevar a cabo discretos procesos de catálisis enzimática que ayuden al suelo a volver a un punto de equilibrio después de cualquier perturbación⁴.

En el presente trabajo, se realizó el estudio de diferentes actividades enzimáticas y la respiración basal en suelos cacaoteros de los estados Mérida y Zulia, con el propósito de establecer correlaciones entre la producción de CO₂ y las actividades enzimáticas determinadas.

Parte experimental

Muestreo. El muestreo se realizó en la Estación Experimental San Juan de Lagunillas (SJ), INIA-Mérida, (8°30' latitud norte, 71°20' longitud oeste, altitud de 1100 msnm); Finca El Pedregal (FP), Tucaní, Estado Mérida (8°50' latitud norte, 71°23' longitud oeste, altitud de 700 msnm) y Estación Experimental Chama (CH), INIA-Zulia (8°43' latitud norte, 71°44' longitud oeste, altitud de 10 msnm). Utilizando un barreno, se recolectaron en bolsas plásticas (polietileno) muestras compuestas de 4 submuestras, tomadas al azar, entre 5-10 cm de profundidad. Se tomaron 4 muestras compuestas para SJ, 6 para FP y 6 para CH.

Preparación de las muestras. Para la determinación de los parámetros fisicoquímicos, cada muestra de suelo se secó al aire por 72 horas, luego se realizó la molienda y se pasó por tamiz de 2 mm. Se mezcló y se almacenó en recipientes con tapa a temperatura ambiente. Para la determinación de la respiración basal y las actividades enzimáticas, cada muestra fresca se extendió sobre un plástico limpio y seco, se retiró el material grueso (piedras, hojas, tallos, raíces) con la mano, y se pasó por un tamiz de 2 mm. La muestra tamizada se mezcló y se guardó en recipientes con tapa, en nevera (4 °C) hasta su utilización. Los estudios de respiración fueron comenzados dentro de los primeros tres días de realizados los muestreos; y los enzimáticos se realizaron dentro de los treinta días después de cada muestreo.

Parámetros fisicoquímicos. El pH y la conductividad eléctrica (CE) se determinaron en relación suelo: agua 1:2. El pH se midió con un pH-meter Orion modelo 230A con electrodo combinado de vidrio Cole Parmer. La CE se determinó con un conductímetro Metrohm 660. El C_{org total} se determinó mediante el método basado en la oxidación de la materia orgánica con dicromato de potasio en medio ácido⁵. La capacidad de intercambio catiónico (CIC) se determinó mediante el método del acetato de amonio normal y neutro (1N, pH 7)⁶.

Actividad microbiológica (Respiración basal). Se determinó el carbono mineralizado durante 39 días mediante el método de las incubaciones estáticas⁷ siguiendo el procedimiento descrito por Anderson⁸. Las muestras de suelo fueron humedecidas al 40-50% de su capacidad de campo. Se utilizaron tres réplicas de cada muestra y dos blancos.

Actividades enzimáticas. La determinación de deshidrogenasa se basa en la extracción con una mezcla etanol/N,N-dimetilformamida proporción 1:1 y posterior determinación colorimétrica a 490 nm del INTF liberado después de la incubación de una muestra de suelo con el sustrato INT (2-p-iodofenil-3-p-nitrofenil-5-fenil-tetrazolio) a 40°C por 2 horas⁹. Las actividades de fosfatasa ácida y alcalina están basadas en la determinación colorimétrica a 420 nm de p-nitrofenol (p-NF) liberado cuando un suelo es incubado con solución de p-nitrofenilfosfato, tamponada a pH 6,5 y 11 respectivamente, a 37 °C por una hora¹⁰. La ureasa y la amonificación de arginina se basan en la determinación de amonio liberado (N-NH₄⁺) durante la incubación de las muestras de suelo con una solución de urea o arginina a 37°C por 2 y 3 horas respectivamente^{11,12}. La caseinasa se determinó colorimétricamente con el reactivo de Folin-Ciocalteu, midiendo los aminoácidos liberados durante la incubación de una solución de caseína con muestras de suelo a 50°C por 2 horas¹³. La β-glucosidasa se determinó colorimétricamente en forma análoga a las actividades de fosfatasa ácida y alcalina, incubando el suelo con solución de p-nitrofenil-p-D-glucopiranosido, tamponada a pH 6,0 a 37 °C por una hora¹⁴. Todas las mediciones colorimétricas se realizaron en un equipo Bausch & Lomb, modelo Spectronic 21 y los resultados se expresan sobre peso seco. Para todas las determinaciones enzimáticas se realizaron tres réplicas de cada muestra y dos blancos.

Análisis estadístico. Se determinó el promedio de cada variable y su desviación estándar, se determinó la correlación lineal entre las variables utilizando el coeficiente lineal de Pearson (*r*) y se calculó el error estándar de *r* para determinar su significancia. Todos los análisis se realizaron utilizando Microsoft Office Excel 2007.

Resultados

Parámetros fisicoquímicos. Los valores determinados de pH, CE, CIC, C_{org total} se presentan en la Tabla 1. El pH de las muestras de San Juan (SJ) fue de 7,8±0,5 ligeramente alcalino, para las de Chama (CH) y la Finca Pedregal (FP) resultó un pH ácido de 4,9±0,4 y 4,1±0,2 respectivamente. La CE para SJ fue de 573±243 μS cm⁻¹ algo mayor que en las muestras de CH y FP que fue de 241±87 y 245±46 μS cm⁻¹. La CIC resultó similar en SJ y CH, siendo de 35±4 y

35±5 cmol(+) kg⁻¹ de suelo seco, respectivamente y para FP dio 25±5 cmol(+) kg⁻¹ de suelo seco, el menor valor. El C_{org total} resultó de 33±3 gC kg⁻¹ de suelo seco para SJ, siendo el mayor valor comparado con los otros dos sitios, en FP fue de 18±6 gC kg⁻¹ y para CH de 10±2 gC kg⁻¹.

Actividad microbiológica (Respiración Basal). El carbono mineralizado resultó de 8±1; 6,5±0,7 y 2,0±0,9 mgC-CO₂ kg⁻¹ día⁻¹ para FP, SJ y CH, respectivamente, siendo mayor para las muestras de FP y SJ. En CH dio el más bajo (Tabla 1).

Tabla 1. Parámetros fisicoquímicos y respiración basal de las muestras de suelo*.

MUESTRA	pH	CE μS cm ⁻¹	CIC cmol(+) kg ⁻¹	C _{org total} gC kg ⁻¹	Respiración Basal mg C-CO ₂ kg ⁻¹ día ⁻¹
Promedio SJ	7,8 ± 0,5 ^a	573 ± 243 ^a	35 ± 4 ^a	33 ± 3 ^a	6,5 ± 0,7 ^a
Promedio FP	4,1 ± 0,2 ^b	245 ± 46 ^b	25 ± 5 ^b	18 ± 6 ^b	8,0 ± 1,0 ^b
Promedio CH	4,9 ± 0,4 ^c	241 ± 87 ^b	35 ± 5 ^a	10 ± 2 ^c	2,0 ± 0,9 ^c

* En una misma columna, valores con la misma letra no poseen diferencia significativa (p< 0,05)

Tabla 2. Actividades enzimáticas para los tres suelos en estudio*. A. Deshidrogenasa (μg INTF g⁻¹ h⁻¹) B. Amonificación de Arginina (μg N-NH₄⁺ g⁻¹ h⁻¹) C. Fosfatasa ácida (μg p-NF g⁻¹ h⁻¹) D. Fosfatasa alcalina (μg p-NF g⁻¹ h⁻¹) E. Ureasa (μg N-NH₄⁺ g⁻¹ h⁻¹) F. Caseinasa (μg Tirosina g⁻¹ h⁻¹) G. β-Glucosidasa (μg p-NF g⁻¹ h⁻¹).

MUESTRA	A	B	C	D	E	F	G
Promedio SJ	21±3 ^a	0,19±0,06 ^a	276±89 ^a	428±85 ^a	1,8±0,5 ^a	261±80 ^a	75±14 ^a
Promedio FP	58±7 ^b	0,13±0,06 ^a	426±92 ^b	87±48 ^b	4±1 ^b	296±75 ^a	58±17 ^a
Promedio CH	11±2 ^c	0,04±0,02 ^b	244±47 ^a	88±52 ^b	0,37±0,08 ^c	45±29 ^b	21±7 ^b

*En una misma columna, valores con la misma letra no poseen diferencia significativa (p< 0,05)

Tabla 3. Coeficiente de Correlación lineal de Pearson entre los diferentes parámetros en las muestras de suelo. A pH; B CE; C CIC; D C_{org total}; E Respiración Basal; F Deshidrogenasa; G Ureasa; H Fosfatasa alcalina; I Fosfatasa ácida; J Caseinasa; K β-Glucosidasa; L Desaminasa

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
A	1	0,65 ^b	0,47 ^c	0,78 ^a	-0,02	-0,45 ^c	-0,32	0,92 ^a	-0,37	0,15	0,51 ^c	0,50 ^c
B		1	0,33	0,65 ^b	0,15	-0,22	-0,12	0,66 ^b	-0,21	0,17	0,41 ^c	0,38
C			1	0,25	-0,37	-0,65 ^b	-0,48 ^c	0,39	-0,24	-0,30	-0,06	0,03
D				1	0,57 ^c	0,13	0,30	0,84 ^a	0,21	0,67 ^a	0,88 ^a	0,86 ^a
E					1	0,85 ^a	0,87 ^a	0,17	0,77 ^a	0,89 ^a	0,80 ^a	0,69 ^a
F						1	0,95 ^a	-0,24	0,82 ^a	0,75 ^a	0,44 ^c	0,36
G							1	-0,07	0,84 ^a	0,82 ^a	0,56 ^b	0,50 ^c
H								1	-0,23	0,37	0,63 ^b	0,61 ^b
I									1	0,69 ^a	0,46 ^c	0,48 ^c
J										1	0,86 ^a	0,84 ^a
K											1	0,94 ^a
L												1

^a (p<0,001); ^b (p<0,01); ^c (p<0,05)

Actividades enzimáticas. La deshidrogenasa y ureasa fueron mayores para FP, seguidas por SJ y sus valores menores en CH. La fosfatasa ácida no tuvo diferencias significativas en los tres lugares, pero la fosfatasa alcalina resultó mayor en los suelos de SJ, que son ligeramente alcalinos. La amonificación de arginina (desaminasa), caseinasa y β -glucosidasa no mostraron diferencias significativas entre SJ y FP, pero sí para CH donde fueron menores (Tabla 2).

Correlaciones de actividades enzimáticas con los parámetros fisicoquímicos. El pH correlacionó significativamente ($p < 0,05$) con las actividades de deshidrogenasa, fosfatasa alcalina, β -glucosidasa y desaminasa. La CE correlacionó con fosfatasa alcalina y β -glucosidasa. La CIC solo correlacionó con deshidrogenasa y ureasa. Se encontró correlaciones significativas ($p < 0,01$) de las actividades enzimáticas con carbono orgánico excepto para la fosfatasa ácida, ureasa y deshidrogenasa. La respiración basal correlacionó significativamente ($p < 0,01$) con las actividades enzimáticas excepto con la fosfatasa alcalina (Tabla 3).

Discusión de resultados

Para los parámetros fisicoquímicos determinados (pH, CE, CIC y $C_{org\ total}$) hubo diferencias significativas para los tres suelos en estudio. Según Vera y col.¹⁵ estas diferencias fundamentalmente se deben al tipo de suelo de cada lugar, ya que en los suelos de los Andes venezolanos, los materiales parentales poseen gran influencia sobre sus características físicas y químicas.

Los suelos de CH y FP son suelos ácidos mientras que el suelo de SJ es ligeramente alcalino. El pH correlacionó significativamente con algunas actividades enzimáticas, sin embargo, no tuvo ninguna correlación con la mineralización de carbono (respiración basal). Esto se explica porque existen microorganismos que se adaptan al pH del suelo, y por lo tanto, no podemos decir que en suelos con un determinado pH existe una mayor o menor actividad microbiana.

El carbono orgánico presenta relación con la actividad microbiana¹⁷ y observamos una correlación significativa entre $C_{org\ total}$ y la respiración basal ($p < 0,01$). Se observaron correlaciones significativas ($p < 0,001$) de las actividades enzimáticas con la respiración basal, excepto para la fosfatasa alcalina. Las actividades de deshidrogenasa, ureasa y caseinasa presentaron las correlaciones más elevadas con la respiración, lo que sugiere que estas actividades se podrían tomar como un indicador de la actividad microbiana^{4,16} o ser usadas en conjunto para establecer un índice de actividad. Las correlaciones significativas obtenidas entre las actividades enzimáticas

estudiadas y la respiración basal, nos permite afirmar que la actividad microbiana en los suelos estudiados está íntimamente relacionada con algunas de las actividades enzimáticas^{16,18}. La variación en las actividades enzimáticas es una evidencia indirecta de que existen diferencias en las comunidades microbianas de cada suelo en estudio¹⁹. En SJ y FP se observó una mayor actividad microbiana y en general, una mayor actividad enzimática. Los mayores valores obtenidos, de la respiración basal y las actividades enzimáticas en suelos del estado Mérida, indican que estos poseen una actividad microbiana mayor a la del suelo del estado Zulia, y sugieren que existe mejor manejo en esas dos zonas²⁰. Sin embargo, estos valores son algo menores a los reportados en suelos Venezolanos por otros autores²¹.

Se deben realizar nuevas mediciones para corroborar las correlaciones obtenidas y plantear un índice de actividad microbiana en los suelos cacaoteros estudiados, que constituya una herramienta para recomendaciones en las técnicas de manejo empleadas en diferentes suelos agrícolas. Además, se debe tomar en cuenta la época (lluvia o sequía) en la que se realiza la toma de muestras, porque es bien conocido que la humedad influye en la actividad microbiana de los suelos.

Conclusiones

En general, las actividades enzimáticas determinadas en los suelos cacaoteros estudiados presentan correlaciones significativas ($p < 0,001$) con la respiración basal, especialmente las actividades de deshidrogenasa, ureasa y caseinasa. Además, la variabilidad en los valores obtenidos para cada una de las actividades enzimáticas determinadas, dan indicio de la diferencia en la actividad biológica de los suelos estudiados, producto tal vez del manejo que se realiza y de la ubicación geográfica de los mismos.

Agradecimiento

CNU-OPSU, Programa para la formación de Doctores, Proyecto Alma Mater; Estación Experimental San Juan de Lagunillas, INIA-Mérida; Estación Experimental Chama, INIA-Zulia y Finca Pedregal, Tucaní, Estado Mérida.

Referencias

1. Baldock J, Nelson P. Soil Organic Matter. In: Handbook of Soil Science (Sumner, M. E. y col., editors.), CRC Press, Boca Ratón, USA. Pp. B25-B84 (2000).
2. Nannipieri P, Grego S, Ceccanti, B. Ecological significance of the biological activity in soil. In: Soil Biochemistry, Vol. 6. (Bollag, J. y Stotzky, G., editors) Marcel Dekker, Inc. New York. Pp. 293-355 (1990).
3. Dick R. Soil enzyme activities as indicators of soil quality. In: Defining soil quality for a sustainable environment

- (Doran, J., Coleman, D.; Bezdicek, D. y Stewart, B., editors), SSSA. Special publication N° 35, Madison, WI, USA. Pp. 107-124 (1994).
4. Dick R. (1997) Soil enzyme activities as integrative indicators of soil health. In: Biological Indicators of Soil Health (Pankhursts, C.; Doube, B. y Gupta, V., editors), CAB International, Oxon, United Kingdom. Pp. 121-156 (1997).
 5. Walkley A, Black I. 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 (1934).
 6. Schollenberger C, Simon R. Determination of exchange capacity and exchangeable bases in soil- Ammonium acetate method. **Soil Sci.**, **59**, 13-24 (1945).
 7. Stotzky G. Microbial respiration. In: Methods of Soil Analysis. Part 2 (Black; Evans; Ensminger; White y Clark, editors.) ASA, Madison, USA. Pp. 1550-1572 (1965).
 8. Anderson JP. Soil respiration. p. 831-871. En: Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties. 2nd ed. (A.L. Page, R H. Miller and D.R. Keeney eds.) Soil Science Society of America Number 9. SSSA, Madison, Wisconsin, USA (1982).
 9. Camiña F, Trasar-Céspedes C, Gil-Sotres F, Leiros C. Measurement of dehydrogenase activity in acid soils rich in organic matter. **Soil Biol. Biochem.**, **30**, 1005-1010 (1998).
 10. Tabatabai M, Bremner J. Use of p-nitrophenylphosphate for assay of soil phosphatase activity. **Soil Biol. Biochem.**, **1**, 301-307 (1969).
 11. Alef K, Kleiner D. Arginine ammonification, a simple method to estimate microbial activity potentials in soils. **Soil Biol. Biochem.**, **18**, 233-235 (1986).
 12. Kandeler E, Gerber H. Short-term assay of urease activity using colorimetric determination of ammonium. **Biol. Fertil. Soils**, **6**, 68-72 (1988).
 13. Ladd J, Butler J. Short-term assays of soil proteolytic enzyme activities using proteins and dipeptide derivatives, as substrates. **Soil Biol. Biochem.**, **4**, 19-30 (1972).
 14. Eivazi F, Tabatabai M. Glucosidases and galactosidases in soils. **Soil Biol. Biochem.**, **20**, 601-606 (1988).
 15. Vera M, Rosales H, Ureña N. Caracterización fisicoquímica de suelos cacaoteros de la zona sur del lago de Maracaibo, Venezuela. **Rev. Geog., Ven.** **41**, 257-270 (2000).
 16. Bolton Jr. H, Elliot L, Papendick R. Soil microbial biomass and selected soil enzyme activities: effect of fertilization and cropping practices. **Soil Biol. Biochem.**, **17**, 297-302 (1985).
 17. Graham M, Haynes R. Organic matter status and the size, activity and metabolic diversity of the soil microbial community in the row and inter-row of sugarcane under burning and trash retention. **Soil Biol. Biochem.**, **38**, 21-31 (2006).
 18. Perucci P. Enzyme activity and microbial biomass in a field soil amended with municipal refuse. **Biol. Fert. Soils**, **14**, 54-60 (1992).
 19. Srivastava R, Roseti D, Sharma A. The evaluation of microbial diversity in a vegetable based cropping system under organic farming practices. **Appl. Soil Ecol.**, **36**, 116-123 (2007).
 20. Brussaard L, de Ruiter P, Brown G. Soil biodiversity for agricultural sustainability. **Agric. Ecosyst. Environ.**, **121**, 233-244 (2007).
 21. Gómez Y, Paolini J. Actividad microbiana en suelos de sabanas de los Llanos Orientales de Venezuela convertidas en pasturas. **Biol. Trop.**, **54**, 273-285 (2006).