

Efecto inhibitor de algunos biocidas sobre la actividad enzimática del suelo

I. GIMÉNEZ VERDÚ

Ha sido efectuada una revisión sobre la interacción entre microorganismos, biocidas y enzimas presentes en el sistema suelo, por su trascendencia sobre la fertilidad del mismo y en definitiva en el rendimiento de las cosechas.

Con esta finalidad, se ha iniciado este estudio, considerando el suelo y sus componentes esenciales: fracción mineral y orgánica, aire, agua y organismos vivos, citando dentro de las comunidades microbianas existentes, bacterias, hongos, algas y protozoos.

Es señalado el creciente uso de biocidas y fertilizantes en la agricultura moderna, como origen de una serie de problemas debidos a las interacciones entre estos productos y los microorganismos del suelo, los cuales intervienen en su degradación enzimática.

A causa de que muchas transformaciones biológicas que se verifican en el suelo, son catalizadas por enzimas producidos por los microorganismos, se indican los enzimas de mayor interés como óxido reductasas e hidrolasas, así como sus reacciones características.

Asimismo se indica el origen, estado y persistencia de los enzimas en el suelo, la variación de la actividad enzimática en relación con el número de microorganismos del terreno y la alta estabilidad de los enzimas en el sistema suelo.

Se sabe que la actividad enzimática del terreno interviene en los procesos fundamentales de éste y se encuentra relacionada con su fertilidad, reconociéndose la existencia de dificultades en el estudio de su cinética, dada la heterogeneidad del medio. No obstante tal complejidad, el mecanismo de acción se cree similar al que se desarrolla en microorganismos y plantas.

El hecho de que los enzimas del suelo entren en interacción con los productos residuales de los biocidas, de interés en la práctica agronómica, hace que sea importante su estudio, junto con el de los factores implicados en tales procesos.

En cuanto a la influencia que tienen los biocidas sobre la actividad enzimática del suelo, se distinguen efectos directos, donde algunos productos constituyen un medio muy adecuado para estudiar el mecanismo de acción de los enzimas. De igual modo, al considerar como efectos indirectos aquellos que inciden sobre los microorganismos, por contribuir a la actividad enzimática del suelo mediante sus enzimas, se indican los distintos procesos con que alteran su fisiología.

Como ejemplo de interacción entre actividad enzimática del suelo y biocidas se indica el efecto de la azida de sodio y del bromuro de metilo.

Se incluyen diversas observaciones en relación al metabolismo de los biocidas, intervención de los microorganismos, reacciones, características y relación con las poblaciones microbianas.

Por último, son considerados los efectos de los microorganismos sobre algunos herbicidas e insecticidas.

I. GIMÉNEZ VERDÚ. *Instituto de Edafología y Biología Vegetal C.S.I.C. Madrid.*

INTRODUCCION

En la actualidad, han sido ampliados los estudios sobre aquellos factores del suelo, cuyo conocimiento y metodología contribu-

yen a mejorar la fertilidad. Entre estos factores se encuentran las propiedades físico-químicas del suelo, los procesos biológicos operantes sobre él, sus interacciones con aire y agua, así como la utilización de abonos,

biocidas y otras sustancias que aumentan la producción y calidad de las cosechas.

Así pues, el creciente suministro de biocidas en la moderna agricultura, contribuye a intensificar las investigaciones relativas al metabolismo de tales productos en el suelo, para poder llegar a la identificación de sus diversos metabolitos y sobre todo a conseguir conocer las diferentes etapas de su degradación, debida a la actividad de los microorganismos del suelo.

EL SUELO

El suelo está formado por 5 componentes principales: la sustancia mineral, la sustancia orgánica, el agua, el aire y los organismos vivos. La cantidad de cada uno de estos constituyentes varía de suelo a suelo. Para un suelo determinado, la cantidad de sustancia mineral y orgánica puede permanecer fija, mientras pueden variar la cantidad de aire y agua disponibles. El aire y agua constituyen aproximadamente la mitad del volumen del suelo.

La fracción mineral constituye, en general, cerca de la mitad del volumen del suelo y tiene su origen en la desintegración y descomposición de las rocas. La sustancia orgánica, en cambio, representa casi un 3-6% del volumen total.

La porción correspondiente a los organismos vivos del suelo, comprende alrededor del 1% del volumen total. Las sustancias minerales del suelo, influyen en el crecimiento de los microorganismos. En la fracción mineral se encuentran partículas de varias dimensiones, comprendidas entre visibles y poco visibles a simple vista.

Los microorganismos, como se ha dicho anteriormente, encuentran en el suelo muchas sustancias minerales útiles para su crecimiento. El compuesto dominante es el sílice (SiO_2), que puede constituir del 60-90% de la masa total. También son abundantes

Al y Fe. Igualmente presentes, si bien en menor cantidad están Ca, Mg, K, Ti, Mn, Na, N, P y S.

La materia orgánica está presente en el suelo en cantidades comprendidas entre 0,5 - 10% del total. El contenido en N es casi 1/20 del contenido de la materia orgánica, es decir, entre 0,025 - 0,50%. A excepción del C y del K, los elementos principales necesarios para la síntesis del protoplasma, están presentes en el suelo en cantidades inferiores al 1%.

Una importante característica del suelo es la capacidad de cambio catiónico, que consiste en la capacidad de desplazar los cationes de las soluciones presentes en el suelo.

La fracción orgánica del suelo es denominada comúnmente «humus» y representa el producto de la actividad de síntesis y degradación de la microflora. Esta fracción constituye una importante reserva de materia orgánica nutritiva, ya que contiene el C y N orgánico necesarios para el crecimiento de los microorganismos.

El «humus» existe en un estado dinámico, en cuanto depende, tanto de la actividad microbiana como de la actividad biodegradante que continuamente tienen lugar en la naturaleza.

El suelo tiene 5 importantes grupos de microorganismos: bacterias, bacterias Actinomicetos, hongos, algas y protozoos. El ecosistema suelo incluye todos estos grupos de microorganismos mezclados con la sustancia orgánica e inorgánica. En consecuencia, en el suelo se forman comunidades microbianas y en el interior de las mismas se constituyen poblaciones.

Bacterias

Las bacterias presentes en el suelo pueden ser subdivididas en 2 grupos: bacterias indígenas o autóctonas, que están siempre presentes en un suelo dado y bacterias invasoras o alóctonas, que no participan en la consti-

tución de la denominada comunidad microbiana.

Entre los géneros más fácilmente aislados del suelo, se encuentran especialmente *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Caulobacter*, *Cellulomonas*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Sarcina*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Xanthomonas* y *Pseudomonas*.

Entre las bacterias, tiene notable importancia el grupo de los Actinomicetos, que se encuentran en gran número en el suelo. Las especies más frecuentes pertenecen a los géneros *Streptomyces*, *Nocardia*, *Actinoplanus*, *Streptosporangium* y *Thermoactinomyces*.

Hongos

Los hongos se encuentran en suelos cultivados y bien aireados y constituyen una parte considerable de la microflora del suelo. Las especies aisladas más frecuentes, pertenecen a los géneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Mucor*, *Alternaria*, *Geotrichum*, *Helminthosporium*, *Rhizopus*, *Chaetomium*, *Phytium*, *Candida*, *Lypomyces*, *Torulopsis*, *Saccharomyces* y *Tórula*.

Algas

Las algas abundan en todos los suelos ricos en agua y bien iluminados. Las especies más frecuentes pertenecen a los géneros *Chlamydomonas*, *Chlorella*, *Chlorococcum*, *Protococcus*, *Scenedesmus*, *Achnanthes*, *Anabaena*, *Nodularia*, *Nostoc*, *Oscillatoria* y *Heterotrix*.

Protozoos

Los protozoos más frecuentes en el suelo pertenecen a los géneros *Amoeba*, *Acantho-*

moeba, *Monas*, *Spiromonas*, *Balanthiophorus*, *Pleomotriche* y *Vorticella*. La mayoría de los protozoos está supeditada a la disponibilidad en materia orgánica preformada en el suelo. Pueden estar presentes en número de 100-300.000 individuos/gr suelo, pero normalmente su número está comprendido entre 10.000-100.000 células/gr de suelo fresco.

BIOCIDAS

Los biocidas son compuestos químicos utilizados en el control de los microorganismos que perjudican los cultivos agrícolas.

Uno de los campos más activos e importantes en la investigación de la microbiología del suelo, está representada por el estudio de las interacciones existentes entre biocidas y los microorganismos. Las interacciones que pueden establecerse son varias, pero fundamentalmente se pueden considerar 2 tipos:

- Se puede verificar una acción directa del biocida sobre el microorganismo, con efecto letal para este último.
- Se puede asistir a una adaptación del microorganismo al biocida, lo cual conduce a la inactivación de éste.

Los biocidas se emplean, generalmente, sobre diversos cultivos a distintas concentraciones y en diferentes períodos del año. Los fungicidas, por ej., se suministran a altas concentraciones, a diferencia de los herbicidas, que se aplican con menor frecuencia y en pequeñas concentraciones. Según los casos, se producen o no, fenómenos de toxicidad sobre los microorganismos del suelo. El tiempo que permanece un biocida en el suelo se denomina comúnmente «persistencia» y depende de la estructura química del compuesto y de las condiciones ambientales dentro de las que el biocida actúa. Su influencia sobre la comunidad microbiana preexistente, depende por tanto mayormente

de las características del producto de su concentración y en particular de su persistencia.

La persistencia de un biocida reviste una notable importancia, porque ayuda a comprender las posibles interacciones existentes entre el ambiente y el destino del producto. En efecto, en función de la persistencia de un producto, se puede pensar que una parte del mismo pueda ser asimilada por la planta y acumularse en sus órganos, adherirse a las raíces de plantas herbáceas hortícolas, ser transportada por las aguas durante el drenaje, o acumularse en el terreno y alcanzar altos niveles de concentración. Estos problemas no se dan en el caso de biocidas de baja persistencia.

Muchos compuestos orgánicos de síntesis, al entrar en contacto con el suelo, pueden desaparecer después de un cierto tiempo como consecuencia de una serie de reacciones de diverso tipo. Tal es el caso de algunos productos volátiles, que en breve tiempo abandonan el suelo. En otros casos, se puede verificar una degradación del biocida debida a una actividad hidrolítica. En la mayor parte de los casos, la actividad hidrolítica de los biocidas se debe a la presencia de los microorganismos. Efectivamente, muchos géneros de microorganismos consiguen metabolizarlos y utilizarlos como sustancia nutritiva.

Uno o más biocidas alteran:

— Especies de bacterias pertenecientes a los géneros *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Flebsiella*, *Pseudomonas* y *Xanthomonas*.

— Especies de hongos pertenecientes a los géneros *Alternaria*, *Aspergillus*, *Clamidosporium*, *Fusarium*, *Glomerella*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizoctonia* y *Trichoderma*.

— Especies de Actinomicetos pertenecientes a los géneros *Micromonospora*, *Nocardia* y *Streptomyces*.

INTERACCIONES DE LOS BIOCIDAS CON LOS MICROORGANISMOS DEL SUELO

En los últimos 30 años ha tenido lugar una importante revolución en la agricultura moderna, con la utilización de numerosos compuestos orgánicos y sintéticos, idóneos para combatir los agentes biológicos responsables de las enfermedades de las plantas. El uso de estas sustancias se ha añadido al de otros productos orgánicos e inorgánicos aplicados en agricultura como fertilizantes.

Como es sabido, las plantas pueden ser atacadas por muchos microorganismos, tales como hongos, bacterias y virus, pero pueden también serlo por organismos como insectos, otros invertebrados y nematodos. Así pues, el esfuerzo del hombre ha estado y continúa estando enfocado hacia la obtención de sustancias capaces de controlar y anular los procesos infectivos causados por los citados organismos. Entre los productos orgánicos sintéticos utilizados en agricultura, los 2 grupos principales están compuestos por herbicidas e insecticidas, si bien existen otros importantes compuestos como son los fungicidas, nematicidas y acaricidas.

Las sustancias utilizadas para proteger los cultivos agrícolas son muy diferentes entre sí y comprenden compuestos con ciclos aromáticos y 1, o, más átomos de S y P. Generalmente estas sustancias son relativamente poco solubles en agua y se denominan «biocidas». Pueden ser clasificados de una manera muy sencilla como hidrocarburos clorados, ésteres órgano-fosfóricos, triazinas substituidas, derivados del ácido fenoxiacético, fenil ureas substituidas y fenil carbamatos substituidos. No obstante, dentro de cada grupo, existen marcadas diferencias entre los distintos compuestos en cuanto a su estructura, propiedades químicas y sobre todo en relación a su biodegradación por parte de los microorganismos. Por este motivo, también la persistencia de los bioci-

das en el suelo representa un importante argumento de investigación.

Algunos estudios han permitido llegar a comprender el comportamiento de los microorganismos del suelo frente a los biocidas. Se ha observado que existe una alta especificidad, entre el compuesto orgánico y el enzima producido por el microorganismo. El comportamiento de un microorganismo degradador frente a un compuesto, no implica necesariamente que deba tener lugar una reacción entre ambos. La descomposición de un compuesto sintético por parte de los microorganismos presentes en el suelo, implica diversos estados y tiene en cuenta, tanto las características propias de los microorganismos, como las propiedades del suelo o la presencia de otros organismos vivos. Ante todo, un compuesto orgánico reacciona, según sus particulares propiedades físico-químicas con la componente orgánica del suelo, siendo, por ejemplo, absorbida sobre ésta.

Si el compuesto en examen es suministrado al suelo en solución, tiene lugar inmediatamente la formación, en los diversos estratos del suelo, de un gradiente de concentración. Asumiendo que el compuesto sea suficientemente estable, transcurrirá un tiempo bastante largo, dentro del cual no se podrán apreciar grandes variaciones en la concentración del producto, hasta que algunos microorganismos adquieren capacidad para producir el enzima específico capaz de reaccionar con dicha sustancia. Hasta ahora no ha sido perfectamente comprendido el mecanismo mediante el cual los microorganismos disponen del enzima, es decir, si éste se produce como consecuencia de un proceso de inducción o debido a modificaciones genéticas originadas en el microorganismo.

Parece claro, que organismos adaptados nutricionalmente a un substrato particular, pueden fácilmente metabolizarlo y de tal forma adquirir nutrientes y energía. En este caso, si las demás condiciones necesarias

para el crecimiento de los microorganismos son favorables, el microorganismo crece infinitamente y se asiste a una rápida disminución del compuesto orgánico considerado.

En general, la actividad microbiana manifestada por el suelo puede ser influenciada de diversas formas y parece posible que algunos biocidas pueden ser más fácilmente degradados, aumentando, por consiguiente, la actividad metabólica de los microorganismos.

Un papel importante en la degradación de un biocida puede residir en la presencia de otras fuentes de nutrición, o en la actividad metabólica debida a los organismos presentes en el mismo ambiente. A veces, la descomposición de algunas sustancias, puede ser efectuada por cultivos mixtos de microorganismos, los cuales constituyen un consorcio de actividades metabólicas. No se sabe si todos los constituyentes del consorcio tienen igual función en la degradación de las sustancias, pero BULLI (1980), afirma que es muy difícil para un solo organismo, poder realizar todas las fases necesarias para conseguir la completa descomposición de una sustancia.

LOS ENZIMAS DEL TERRENO

Muchas de las transformaciones biológicas que tienen lugar en el suelo, son catalizadas por enzimas producidos por los microorganismos presentes en él. En efecto, una parte de la actividad fisiológica desarrollada por éstos, viene representada por su capacidad de producir enzimas y liberarlos en el ambiente; por ejemplo, algunas proteinasas y algunas celulasas son capaces de hidrolizar complejos y macromoléculas y los productos de degradación que se obtienen, constituyen sustancias nutritivas para los microorganismos.

En cierto modo, se puede asumir que algunos de estos enzimas permanecen en el

suelo en estado activo fuera de las células vivas. No obstante, no todas las reacciones enzimáticas que se realizan en el suelo y, por tanto, no todos los enzimas, pueden considerarse extracelulares; muchos enzimas, en efecto, son endocelulares y solamente pueden actuar en el interior de la célula microbiana. Sólo en el caso en que las células sean destruidas, los enzimas presentes en el jugo endocelular, podrán ser activos en el exterior. Por otra parte, una gran porción del material liberado, puede ser rápidamente metabolizado por otros microorganismos, o bien, puede ocurrir que algunos enzimas persistan en el suelo durante un cierto período de tiempo, de mayor o menor duración, o puedan ser resistentes a la desnaturalización.

La presencia de los enzimas en el suelo da lugar a la formulación de algunas cuestiones: ¿Cuál es su origen exacto? ¿Cuál es su distribución? ¿Cuál es su localización? ¿Qué funciones pueden desarrollar desde el punto de vista nutricional? ¿Cuáles son sus modalidades de acción? Todas estas cuestiones representan importantes temas de investigación y estudio.

En los últimos decenios se ha dedicado mucha atención a la enzimología del suelo y ha sido posible recoger una cantidad considerable de datos empíricos. La investigación sobre los enzimas ha debido utilizar diversas metodologías suficientemente comprobadas en otros campos de estudio. Algunas actividades enzimáticas puestas en evidencia en el suelo, han sido reagrupadas en la Tabla 1.

ENZIMAS DE MAYOR INTERES PRESENTES EN EL SUELO

Oxido-reductasas

Deshidrogenasas

La actividad deshidrogenásica del suelo ha sido determinada, observando la velocidad

de reducción del cloruro de 2-3-5 trifenil tetrazolio a trifenil formazán, mediante medida espectrofotométrica (SKOJINS, 1973). En la bibliografía existen diversos métodos para la determinación de la actividad deshidrogenásica. Uno de ellos consiste en tamponar a pH 7,8, o, alcalinizar con Ca CO_3 las suspensiones de terreno.

En algunas pruebas ha sido añadido al terreno succinato, glucosa u otros azúcares, mientras que en otros casos, la coloración que aparece depende de la oxidación del substrato endógeno, ya que el tratamiento del terreno con tolueno o cloroformo destruye la actividad deshidrogenásica. Los compuestos de acción bactericida o bacteriostática son siempre suprimidos de la mezcla de reacción.

El aporte de los microorganismos a la actividad enzimática observada no ha sido completamente aclarado, pero se puede pensar que resulte de vital importancia, especialmente en aquellos casos en que el suelo sea privado de substratos carbónicos e incubado durante 24 h. También en pequeñas experiencias en las que el crecimiento microbiano es reducido al mínimo, la actividad de los microorganismos puede ser influenciada, no sólo por la concentración del enzima, sino incluso por la naturaleza y concentración del substrato carbónico endógeno y por los del añadido, así como por la concentración del aceptor de electrones. BREMNER y TABATABAI (1973) han demostrado que la adicción de Fe_2O_3 , MnO_2 , SiO_4^{2-} , PO_4^{3-} , Cl^- , estimulan la actividad deshidrogenásica del suelo, mientras que los iones NO_3^- , NO_2^- , y Fe^{3+} parece que inhiben la actividad deshidrogenásica. La inhibición encontrada en este último caso, puede ser debida al hecho de que estos compuestos actúen como aceptores alternantes de electrones.

Las deshidrogenasas existen en el suelo como componentes de células íntegras y la actividad deshidrogenásica parece ser reflejo inmediato de la actividad oxidativa de la microflora del suelo. No obstante, la activi-

Tabla 1.—Enzimas de mayor interés presentes en el suelo

Enzimas	Reacción catalizada	Referencia
1. Oxido-reductasas		
— deshidrogenasas	$HX_2 + A \rightarrow X + AX_2$	(LENHARD, 1962) (STEVENSON y KATZNELSON, 1958) (STEVENSON, 1962) (SHAEFER, 1963)
— catalasas	$2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$	(KONIG <i>et al.</i> , 1906) (MAY y GILE, 1909) (BARANOVSKAYA, 1954)
— peroxidasas	$A + H_2O \rightarrow$ oxidada A + H_2O	(KOZLOV, 1964) (GALSTYAN, 1958)
— catecoloxidasas	o -difenol + $1/2 O_2 \rightarrow$ o -quinona + H_2O	(KUPREVICH, 1951)
— p -difenol-oxidasas	p -difenol + $1/2 O_2 \rightarrow$ p -quinona + H_2O	(TROJANOWSKI y MARTWIJOW, 1964)
— uricasas	ácido úrico + $O_2 \rightarrow$ alantoina, CO_2 , otros productos.	(DURAND, 1961) (MARTIN-SMITH, 1963)
2. Transferasas		
— transaminasas	$R_1R_2 \rightarrow CH-NH_2 + R_3R_4Cl \rightarrow$ $R_3R_4 \rightarrow CH-NH_2 + R_1R_2CO$	(HOFFMANN, 1959 b)
— Transglicolasas	$n C_{12}H_{22}O_{11} + HOR \rightarrow H(C_6H_{10}O_5)$ $nOR + n C_6H_{12}O_6 + n C_6H_{12}O_6$	(DROBNIK, 1955) (HOFFMANN, 1959 b) (KISS y PETERFI, 1959)
3. Hidrolasas		
— fosfatasas	éster fosfato + $H_2O \rightarrow R-OH + PO_4^{3-}$	(ROGERS, 1942) (SKUJINS <i>et al.</i> , 1962) (VLASYUK <i>et al.</i> , 1957)
— pirofosfatasas	pirofosfato + $H_2O \rightarrow$ 2 ortofosfato	(ROTINI, 1933)
— metafosfatasas	hidrólisis de polimetafosfato a ortofosfato	(ROTINI y CARLONI, 1953)
— acetil estererasas	éster acético + $H_2O \rightarrow$ alcohol + ácido acético	(HAIG, 1955)
— amilasas	hidrólisis de enlaces 1,4-glucosídicos de poligalacturonasas	(DROBNIK, 1955) (GALSTYAN, 1965) (ROSS, 1965)
— α -glucosidasas	- R - glucosido + $H_2O \rightarrow R-OH +$ glucosa	(HOFFMANN y HOFFMAN, 1954) (KISS, 1958) (KISS y PETERFI, 1960)
— α -galactosidasas	- R - galactosido + $H_2O \rightarrow ROH +$ galactosa	(HOFFMANN y HOFFMANN, 1954)
— celulasas	hidrólisis de enlaces 1,4 - glucano en celulosa	(MARKUS, 1955) (SORENSEN, 1957)

Enzimas	Reacción catalizada	Referencia
— Inulasas	hidrólisis de enlaces - 1,2-fructano	(KISS y PETERFI, 1961)
— amidasas	ácido monocarboxílico y amida + H ₂ O - ácido monocarboxílico + NH ₃	(SUBRAHMANYAN, 1927)
— ureasas	CO(NH ₂) ₂ + H ₂ O - 2 NH ₃ + CO ₂	(ROTINI, 1935) (GALSTYAN, 1958, 1965) (CONRAD, 1942)
4. Liasas		
— ácido aspártico descarboxilasas	ácido aspártico - alanina	(DROBNIK, 1956)

dad deshidrogenásica del suelo no está siempre correlacionada con el número de microorganismos presentes en el suelo, con la velocidad de consumo de O₂, o con la formación de CO₂. Sin embargo, la actividad deshidrogenásica frecuentemente aumenta con el incremento del número de bacterias, producido como consecuencia de correcciones del suelo con substratos nutritivos y disminuye con la sequedad, o cuando el suelo es tratado con derivados de la triazina (SPIRINODOV y SPIRINODOVA, 1973), o con metilparathión o con cloramfenicol. Por otro lado, la actividad deshidrogenásica está relacionada con la porción de materia orgánica, pero varía con las estaciones y disminuye con la profundidad del suelo. La actividad deshidrogenásica se mantiene mejor conservando al frío las muestras de terreno húmedo.

Glucoso-oxidasas

Las suspensiones de terreno tratadas con tolueno y tamponadas, pueden oxidarse lentamente a glucosa cuando son inoculadas a 37°C durante uno o dos días. Entre los productos que se obtienen, han sido identificados el gluconato y 2-cetogluconato, compuestos que indican la actividad de la

glucosa-oxidasas y de la gluconato-deshidrogenasa. La producción de ácido y el consumo de O₂ son aproximadamente equivalentes después de un período de incubación de 24 horas, pero tal equivalencia desaparece para períodos de tiempo superiores.

Se ha observado que la velocidad de oxidación de la glucosa en terrenos tratados con tolueno, es baja, lo que hace pensar que la actividad de diversos carbohidratos sobre el terreno es despreciable.

LADD y PAUL (1973) han puesto a punto un ensayo más sensible para la oxidación de la glucosa, similar al sugerido por HOBBIÉ y CRAWFORD (1969), en el cual la glucosa marcada con C¹⁴ es parcialmente convertida en CO₂, después de incubar durante una o dos horas una suspensión de terreno en ausencia de tolueno. La actividad de la glucoso-oxidasas refleja posibles variaciones en el número de bacterias vitales presentes en el terreno, como resultado de la adición a éste de sustancias nutritivas.

Catecol-oxidasas (1.10.3.1.)

Terrenos o extractos de terreno pueden oxidar diversos o-difenoles (catecol, catequina), bencenotrioles (floroglucina y pirogalol) y monofenoles (tiroxina). La actividad

catecolásica del suelo, generalmente ha sido determinada usando el catecol como sustrato (ROSS y Mc NEILLY, 1973). En algunas pruebas, la actividad ha sido calculada en base a la velocidad de consumo de O_2 sin apreciarse formación de quinona. No obstante, GALSTYAN (1958) ha demostrado que extractos de terreno consiguen catalizar rápidamente la oxidación del pirogalol a purpurogalina, mientras que MAYAUDON *et al.* (1973) han señalado, que extractos de terreno parcialmente purificados desplazan compuestos húmicos solubles, oxidando la o-catequina, el catecol y la D-3,4-dihidroxifenilalanina a derivados quinónicos.

ROSS y Mc NEILLY (1973) han demostrado que la actividad oxidante del catecol del terreno está inversamente relacionada con el contenido de catecol fenólico del terreno de bosque de hayas e inversamente relacionado a su vez con el pH, humedad, contenido de C orgánico y contenido de polifenol. Los enzimas catecol-oxidásicos parecen ser de origen microbiano y no derivados del extracto de residuos de las hojas de haya.

Catalasas (1.11.1.6)

La actividad catalásica del suelo está basada en el cálculo de la velocidad de liberación de O_2 , tras añadir al sustrato H_2O_2 (BECK, 1971). El tiempo de ensayo está comprendido entre 2-60 min. El control, constituido por terreno esterilizado en autoclave, muestra actividad catalásica positiva, debido a la presencia de compuestos inorgánicos de Fe y Mn (KUPREVICH y SHCHERBAKOVA, 1971).

En los terrenos cultivados, la actividad catalásica, varía en función de la estación (RAGUOTIS, 1967), o de la vegetación presente en ella (KHAN, 1970). Por otra parte, la actividad catalásica depende también del contenido en materia orgánica del suelo y disminuye con la profundidad a la que ha sido tomada la muestra, pero no parece relacionada con el número de microorganismos

presentes en el suelo (ROIZIN y EGOROV, 1972).

La actividad catalásica puede aumentar o disminuir en función del tratamiento del suelo con herbicidas (ZINCHENKO y OSINSKAYA, 1969), insecticidas (TSIRKOV, 1970) o nematocidas (ABDEL'YUSSIF *et al.*, 1976). El ácido tánico y otros ácidos aromáticos pueden inhibir las catalasas del terreno, aumentando la inhibición con la disminución del contenido fenólico de los ácidos añadidos (GNITKE y KUNCE, 1975).

Peroxidasas (1.11.1.7.)

Las actividades peroxidásicas en el suelo o en los extractos de suelo, son ensayadas mediante oxidación del pirogalol (SHCHATSMAR y KALIKINA, 1972), catecol, p-dianisidina y o-dianisidina, en presencia de H_2O_2 (BORDELEAU y BARTHA, 1972).

Las actividades peroxidásicas, mediante el uso de o-dianisidina y de extractos celulares tamponados obtenidos del suelo, han sido relacionados con la capacidad del suelo para transformar las cloroanilinas derivadas, utilizadas como herbicidas (BARTHA y BORDELEAU, 1969; BARTHA y BORDELEAU, 1969). Diversos autores (BORDELEAU y BARTHA, 1972) han descrito técnicas para el aislamiento de microorganismos sintetizadores de las peroxidásas del suelo. BURGE (1973) usando el mismo método de ensayo, no ha encontrado ninguna correlación entre la actividad peroxidásica del suelo, el número de microorganismos sintetizadores de peroxidásas y la capacidad del suelo para transformar la 3,4-dicloroanilina en 3,3',4,4'-tetraclorobenceno.

La peroxidasa extraída del suelo y la extraída del rábano puede ser inhibida con cianuro potásico y por azida de sodio. Dichos enzimas difieren sólo en el hecho de que las peroxidásas extraídas del suelo son incapaces de transformar la 3,4-dicloroanilina en 3,3',4,4'-tetracloroazobenceno. Estos resultados sugieren que terrenos diferentes pue-

den contener peroxidasas con diversas propiedades catalíticas y, por otra parte, tienen en cuenta la necesidad de purificar los enzimas del suelo, de las sustancias que pueden de alguna forma influenciarlos.

Hidrolasas (3.1.1.1.)

PANCHOLY y LYND (1972, 1973) han descrito un ensayo muy sensible, basado en la hidrólisis del 7-hidroxi 4-metilcumarinabutirato, que se transforma en un producto fluorescente denominado 7-hidroxi 4-metilumbeliferona. La actividad esterásica de extractos de terreno arenoso, muestra aumentos en presencia de iones Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ y Na^+ , mientras disminuye en presencia de los iones Cu^{2+} , S^{2-} , Fe^{2+} y EDTA.

Una esterasa aislada de algunos terrenos arcillosos y parcialmente purificada, consigue transformar el malathion en sus derivados monoácidos (GETZIN y ROSEFFELD, 1971; SATYNARAYANA y GETZIN, 1973); el enzima se ha mostrado bastante estable. La desnaturalización del mismo se da en soluciones mantenidas durante 24 h a $\text{pH} > 2$ y < 10 , o durante 15 min. a temperaturas superiores a 70°C . La actividad del enzima se mantiene estable en solución de esterasas purificadas, conservadas a temperaturas comprendidas entre 4 y -10°C , pero se pierde mucha si se somete el enzima a liofilización. Dicho enzima está constituido probablemente por una glicoproteína y persiste en suelo incubado durante 8 semanas aproximadamente.

Lipasas (3.1.1.3.)

POKORNA (1964) ha demostrado que en suelos tratados con tolueno, la tributirina es hidrolizada a glicerina y butirato. Después de 72 h de incubación la concentración de butirato en el suelo, con o sin tolueno, difiere en casi un 15%.

Fosfatasa

Algunos mono o di ésteres orgánico O-fosfóricos, se hidrolizan si se incuban terrenos, bien sean irradiados, tratados con tolueno o no tratados, lo que indica la presencia de una actividad fosfatásica. Los ensayos comprobantes de tales actividades, han sido realizados por diversos autores (STEFANIC, 1971; HOFFMANN, 1968; KHAZIEV, 1972; TABATABAI y BREMNER, 1969 b). El tiempo de ensayo normalmente es de 2 ó 3 horas.

Las actividades fosfatásicas en terrenos cultivados ha mostrado débiles variaciones con el tiempo de estación, mientras se ha notado una notable influencia en aquéllas por parte de las plantas cultivadas (BLAGOVESHCHENSKAYA y DANCHENKO, 1974).

Por otra parte se ha observado que las fosfatasa usualmente aumentan después de añadir al terreno fertilizantes orgánicos o inorgánicos (RANKOV y DIMITROV, 1971). Se ha podido apreciar asimismo, una inhibición de las fosfatasa debida a fertilizantes fosfatados; efectivamente, la actividad fosfatásica se ha mostrado directamente relacionada con el fósforo orgánico del suelo (GVRILOVA *et al.*, 1974). La actividad fosfatásica en general, no está relacionada con el número de microorganismos del suelo ni con la actividad respiratoria de los mismos (ROIZIN y EGOROV, 1972), pero aumenta notablemente en correspondencia con el crecimiento de los microorganismos (LADD y PAUL, 1973).

La irradiación del suelo, así como el tratamiento con tolueno (SUCIU, 1970), influyen poco las fosfatasa. Por el contrario, la sequedad del suelo, el calentamiento de éste, o la adicción de nematicidas (ABDEL-YUSSIF *et al.*, 1976) reducen su actividad, así como el incremento de la concentración de metales pesados (TYLER, 1974).

Amilasas (3.2.1.)

Suspensiones de terreno tamponado o de extractos de terreno, son normalmente capaces de hidrolizar el almidón, indicando la presencia en ellos de enzimas tales como α y β amilasas (PANCHOLY y RICE, 1973). Las β -amilasas resultan ser más activas que las α amilasas. Se ha demostrado que el pH óptimo está comprendido entre 5-6.

En algunos casos, la actividad amilásica puede ser inducida o puede disminuir con la profundidad y el contenido en materia orgánica del terreno (ROSS, 1968). Las actividades amilásicas pueden ser influenciadas fundamentalmente por las estaciones (CORTEZ *et al.*, 1972) y por la naturaleza de las plantas cultivadas (CORTEZ *et al.*, 1975) disminuyendo en terrenos deshidratados o conservados a -20°C , ó a $+21^{\circ}\text{C}$ (PANCHOLY y RICE, 1972).

Celulasas (3.2.1.4.)

La actividad celulásica del suelo ha sido estudiada por diversos autores sobre varios terrenos. Usualmente ha sido calculada basándose en medidas gravimétricas, viscosimétricas o modificando el cálculo de las concentraciones de los azúcares reductores. Parece no ser influenciada por el contenido en materia orgánica, pero puede ser correlacionada con el tipo de substancia orgánica que se añada al suelo durante las prácticas culturales.

Poligalacturonasas (3.2.1.15.)

KAISER y MONZON DE ASCONEGUI (1971) han demostrado que terrenos tamponados hidrolizan la pectina en presencia de tolueno, mientras que la actividad poligalacturonásica es inhibida por compuestos como el tanino. BENOIT y STARKEY (1968) han sugere-

rido que el efecto del tanino sobre la actividad enzimática extracelular puede retardar la descomposición de compuestos de alto peso molecular de origen vegetal, presentes en el suelo.

 β -glucosidasas (2.2.1.21.)

Ha sido ensayado el enzima β -glucosidasa mediante la hidrólisis del p-hidroxifenil - β -D-glucósido (GALSTYAN, 1965 a, b) de la celobiosa, de la salicina y del p-nitrofenil - β -D-glucósido (HAYANO, 1973; HAYANO y SHIOJIMA, 1974). Este último ensayo está basado en la formación de p-nitrofenol y ha demostrado ser un método rápido y preciso.

La actividad β -glucosidásica del suelo alcanza la máxima velocidad a pH 5,9-6,2 y disminuye con la profundidad del terreno, con la aridez y con la estación y parece correlacionada con la naturaleza de las partículas más superficiales del terreno (CERNA, 1970).

Invertasas (3.2.1.26)

En muchos casos se ha observado que terrenos irradiados o tratados con tolueno, habían hidrolizado la sacarosa a glucosa y fructosa, hecho indicador de la presencia de actividad invertásica (HOFFMANN y PALLAUF, 1965; KISS *et al.*, 1972). El valor del pH óptimo es de 4,2-5,0.

La actividad invertásica del suelo varía con las estaciones, tipo de vegetación, contenido en materia orgánica y con la calidad de los constituyentes de las partículas superficiales del terreno (ROIZIN y EGOROV, 1972). Por otra parte, se ha podido apreciar que la actividad invertásica no está influenciada por el número de microorganismos presentes en el terreno, ni por la velocidad de consumo del O_2 , ni por el acúmulo de CO_2 (ROSS, 1976). No obstante, se ha demostrado la notable influencia expresada por las plan-

tas y por las asociaciones de las raíces de las plantas con los microorganismos. La actividad invertásica puede venir estimulada por la adición de nematicidas y disminuye con la sequedad del terreno.

Proteinasas

Se ha comprobado que en terrenos que contienen proteinasas se forman aminocompuestos de bajo peso molecular. Este resultado indica la presencia en el suelo de ovoalbúmina, caseína, gelatina y de otras proteínas que han sido utilizadas en ensayos de laboratorio.

La actividad proteica o proteolítica está basada en la determinación de compuestos amídicos, mediante la ninhidrina (LADD y BUTLER, 1972), o un reactivo a base de Cu.

Algunos terrenos difieren en su actividad proteolítica por causa de la caseína y la gelatina. En efecto, mientras la caseína puede ser hidrolizada a pH 8,5, la gelatina puede venir hidrolizada a pH 6.

La actividad proteolítica de los suelos disminuye con la profundidad del terreno, con el contenido en materia orgánica y con la presencia de partículas agregadas. En terrenos cultivados, tal actividad varía en función de la estación, pero no en función de los microorganismos presentes.

LADD y PAUL (1973) han demostrado que el notable aumento de la actividad proteásica en relación a la caseína, se produce en correspondencia con una rápida oxidación de los metabolitos de origen microbiano y con una marcada disminución en el número de bacterias vitales. La actividad de las proteinasas neoformadas disminuye al disminuir la actividad microbiana. LADD y BUTLER (1975) han sugerido que los enzimas extracelulares, como las proteinasas, activos frente a sustratos de alto peso molecular, pueden tener una breve vida en el terreno.

Cada enzima proteico podría ser autolizado, degradado por otras proteinasas, o estabilizarse mediante complejación o adsor-

ción con los coloides del suelo. El enlace del enzima con estos coloides, puede proteger al enzima proteico, pero puede también volverlo inaccesible y de esta forma inactivo, frente a sustratos de alto peso molecular (ROWELL *et al.*, 1973). Estas actividades de las proteinasas pueden disminuir rápidamente, a menos que los enzimas libres activos sean continuamente resintetizados, según las fuentes de energía.

Las actividades proteinásicas de los suelos cultivados disminuyen temporalmente después de la adición de paraquat, dalapón y simazine y por fumigación con bromuro de metilo y cloropicrín. De igual modo, la actividad proteinásica de los extractos del suelo está relacionada positivamente con el contenido en materia orgánica del suelo y negativamente con el contenido en arcilla (MAYAUDON *et al.*, 1975).

De la hidrólisis de los suelos se obtienen dipéptidos. La existencia de un enlace peptídico confiere especificidad a la reacción, estableciéndose una relación lineal entre la velocidad de hidrólisis y la concentración del suelo. Los suelos hidrolizan también las amidas N-bencil-L-arginina amida (LADD y BUTLER, 1972) y el propil (BURGE, 1973). Si bien diversas proteinasas han sido convenientemente ensayadas usando como sustrato BAA, o dipéptidos específicos derivados. La hidrólisis en el suelo de éstos puede venir también catalizada por dipeptidasas. LADD y BUTLER (1972) han demostrado que ciertos suelos hidrolizan preferentemente derivados aniónicos dipeptídicos de aminoácidos con cadenas laterales hidrofóbicas, por ej., benciloxycarbonil fenil alanil leucina (ZPL).

La velocidad de hidrólisis por suelos de ZPL y BAA correlativa con la velocidad de hidrólisis debida a la actividad de la caseína, está poco influenciada por cambios estacionales, calor, o sequedad de los suelos, o por otros factores que originan marcadas fluctuaciones en la población microbiana (LADD y PAUL, 1973).

Ureasas (3.5.1.5.)

Los ensayos para el estudio de las ureasas del suelo están basados en la velocidad de utilización de urea añadida (SIMPSON, 1968), de formación de CO₂ (NORSTAD *et al.*, 1973), o de NH₄⁺ a partir de urea (KOZLOVSKAYA *et al.*, 1972). La mayor parte de los ensayos han sido efectuados usando suspensiones de suelo tamponado e incubado durante 1 ó 2 horas, pudiendo ser los suelos no tratados con tolueno o esterilizados por radiaciones.

La actividad de las ureasas del suelo puede aumentar o disminuir con la adicción de tolueno (NORSTAD *et al.*, 1973) o por irradiación (THENTE, 1970). Los efectos dependen del tipo de suelo, del período de conservación, del contenido en humedad, de la dosis de radiación, etc. En células vivas con adicción de urea, la rotura de las membranas celulares o los cambios de permeabilidad pueden incrementar las actividades ureásicas. Tales incrementos se deben más que a la pérdida de actividad ureásica a la desnaturalización debida a los tratamientos.

Se han verificado estudios sobre el efecto de las concentraciones de urea sobre la actividad ureásica del suelo (ARDAKANI *et al.*, 1975), observándose que las variaciones pueden deberse parcialmente a diferencias en las proporciones de enzimas presentes en las células vivas o la adsorción en los coloides del suelo (PAULSON y KURTZ, 1970 a).

La actividad ureásica de los suelos cultivados varía con la estación y con la vegetación (BLAGOVESHCHENSKAYA y DANCHENKO, 1974), disminuyendo con la profundidad del suelo y estando correlacionada con el contenido en materia orgánica (FRANZ, 1973), aumentando con la adicción de fertilizantes inorgánicos y orgánicos (LAUGENSEN, 1972).

Las actividades ureásicas del suelo se consideran debidas principalmente a enzimas extracelulares, si bien varían con el efecto de las condiciones del suelo sobre el previo crecimiento microbiana (ZANTUA y BREMNER,

1976). La actividad ureásica aumenta con las partículas superficiales del suelo (CERNA, 1966).

La estabilidad de las ureasas del suelo puede ser debida a su existencia, principalmente como complejo con los constituyentes orgánicos del suelo. El enlace del enzima en una matriz coloidal orgánica puede volverlo inaccesible a la degradación por las proteínas del suelo y puede conferirle estabilidad frente a la desnaturalización debida al calor o a la sequedad, sin excluir la influencia de substratos y productos de pequeño peso molecular (NANNIPIERI *et al.*, 1975).

Han sido determinados los efectos de los insecticidas (TSIRKOV, 1970), de los herbicidas (NAMDEO y DUBE, 1973 a, b), de los nematocidas (ABDEL'YUSSIF *et al.*, 1976 y de los metales pesados (TYLER, 1974), sobre la actividad de las ureasas del suelo. Asimismo han sido observadas las inhibiciones y estimulaciones por parte de diversos correctores del suelo. Los derivados quinónicos inhiben dicha actividad (BUNDY y BREMNER, 1973).

ORIGEN DE LOS ENZIMAS DEL SUELO

Los estudios de enzimología del suelo han permitido reagrupar bajo 3 tipos diversos, el origen de los enzimas: el primero es atribuido a los microorganismos vivos y muertos presentes en el suelo; el segundo se debe a los animales del suelo y el tercero a las plantas o a parte de los tejidos vegetales. Muchos microorganismos producen enzimas extracelulares. Algunos de éstos catalizan la degradación de compuestos de alto peso molecular, pero con frecuencia ocurre que es difícil establecer si un enzima está presente extracelularmente o si se vuelve disponible sólo a continuación de la autólisis celular. Los estudios llevados a cabo sobre hongos tal como *Aspergillus oryzae*, han mostrado que los enzimas se vuelven disponibles en tiempos sucesivos: primero aparecen las car-

bohidrasas y las fosfatasa, siguiéndoles las proteinasas y las esterasa, apareciendo finalmente las catalasas.

Algunos enzimas pueden ser liberados durante el período inicial del crecimiento, otros, en cambio, más tarde, cuando, por ej., el crecimiento del micelio está en fase estacionaria o de declive. Es interesante notar cómo las catalasas que pueden ser consideradas típicos enzimas endocelulares, han sido encontradas con mucha frecuencia extracelularmente.

Enzimas tales como amilasas, celulasas, pectinasas y enzimas proteolíticos son liberados por numerosas bacterias y hongos: en el género *Penicillium*, por ej., ha sido aislada una dextranasa, así como en especies de *Streptomyces* ha sido encontrada una xilanasas, o en especies del género *Bacillus*, pentosanasa. Así también, una quitinasa ha sido identificada en especies del género *Streptomyces*. Una levanosacarasa ha sido aislada de cultivos de *Bacillus asterosporus* y *Azotobacter chroococcum*, mientras algunas transglicolasas se han aislado de cultivos de *Aspergillus*, *Penicillium*, *Myrothecium* y *Bacillus subtilis*.

Ha sido demostrada la existencia de una actividad invertásica en el suelo, debida a la presencia de especies pertenecientes al género *Saccharomyces* y de *Hansenula anomala*, o en cultivos de *Myrothecium verrucaria*. De igual modo, algunas ribonucleasas y algunas fosfatasa, son producidas en condiciones particulares por *Bacillus subtilis*.

MEYER *et al.* (1964) han demostrado que especies del género *Fusarium* liberan extracelularmente algunas fosfatasa y esteroidasas. KUPREVICH (1949), en cambio, han demostrado que las raíces de algunas plantas liberan en el suelo una serie de enzimas, que comprenden catalasas, fenolasas, tiroxinasas, ureasas, proteasas, lipasas, invertasas, amilasas y celulasas.

La contribución de los animales presentes en el suelo al acúmulo de los enzimas en

éste es de escasa importancia. Sin embargo, es poco oportuno recordar que algunos trabajos de Kiss (1957), han permitido poner en evidencia la actividad invertásica debida a la lombriz *Lumbricus terrestris*.

ESTADO DE LOS ENZIMAS EN EL SUELO

Los enzimas se acumulan en el suelo y generalmente son más resistentes a la inactivación por parte de agentes inhibidores que análogos enzimas «in vitro». Es muy difícil extraer del suelo enzimas muy activos; aparentemente existen en asociación físico-química con partículas del suelo, las cuales son capaces de volver las moléculas proteicas más estables y menos accesibles a los agentes inhibidores.

Sobre la superficie de las partículas componentes del suelo, así como sobre las raíces de las plantas, o sobre las superficies celulares de los microorganismos, existe una fuerte variación en el estado molecular, caracterizada por un gradiente de concentración iónico, de pH y de potencial redox. Las reacciones enzimáticas normalmente suceden en este ambiente particular, dentro del cual, el estado sólido está caracterizado por partículas discretas sólidas, tanto orgánicas como inorgánicas, que usualmente tienen una medida coloidal y en cierto modo están dispersas con partículas minerales más grandes.

La mayor parte de las reacciones químicas importantes, en términos biológicos, tienen lugar en la interfase sólido-líquido. Los coloides presentes en el suelo, muestran fuertes propiedades adsorbentes, en función de las cargas que presentan en su superficie. Una gran parte de las proteínas que se liberan en el suelo, pueden ser rápidamente metabolizadas por los microorganismos, mientras que la mayoría de ellas puede ser rápidamente adsorbida por partículas de arcilla. Generalmente, la adsorción de las

proteínas por parte de la arcilla puede ocurrir en un amplio intervalo de pH. Con frecuencia se originan complejos proteína-arcilla, muy estables, sobre los cuales puede suceder que algunos enzimas proteolíticos sean adsorbidos, dando origen a la hidrólisis de las proteínas adsorbidas.

Ha sido observado que la arcilla se expande por encima de las proteínas adsorbidas, conforme ésta penetra en los espacios de los cristales. De esto se deriva que cada proteína localizada en estos espacios, pueda venir utilizada por los microorganismos que han podido a su vez ser adsorbidos por la arcilla misma. Esta observación sugiere que los enzimas proteolíticos extracelulares pueden llegar también a penetrar en los espacios inter-estratos. Algunos estudios han demostrado que un substrato adsorbido puede ser metabolizado; en efecto, se ha observado que un mono-estrato de lisozima desnaturalizado, adsorbido sobre caolinita, ha sido hidrolizado más rápidamente por una proteinasa exocelular de *Pseudomonas* o de *Flavobacterium*, que en solución.

Es muy importante la presencia de la arcilla y la calidad de ésta para explicar el diverso comportamiento de los enzimas adsorbidos. KROI.L. y KRAMER (1955) han demostrado que añadiendo montmorillonita al suelo no se influencia la actividad de las fosfatasas, ni la adición de caolinita influencia la actividad de las invertasas. Por el contrario, si a la caolinita se le añade sacarosa, se observa una considerable actividad enzimática invertásica; aparentemente, la adsorción de las invertasas sobre la arcilla reduce su desnaturalización. Algunos autores (GALSTYAN, 1963) han observado considerables inactivaciones de las invertasas, amilasas, ureasas y peroxidasas añadidas al suelo. HAIG (1955) en un estudio sobre la actividad esterásica del suelo, pudo apreciar que fraccionando tierra arenosa la fracción arcillosa desarrolla el papel más importante, ya que

efectivamente, la actividad enzimática reside más en ella que en la componente arenosa.

Un estudio análogo realizado por HOFFMAN (1959 a) ha demostrado que la actividad de una carbohidrasa era más alta en la fracción silíceas, mientras que en lo referente a las ureasas, era mayor en la componente arcillosa. Dado que en el terreno examinado no se detectó la presencia de algunos microorganismos, era evidente que la ureasa liberada por células lisadas había sido adsorbida y por lo tanto había permanecido activa en la componente arcillosa.

Los coloides orgánicos e inorgánicos del suelo y las partículas cristalinas de arcilla, usualmente poseen una carga electromagnética. En la arcilla, la carga es debida al desequilibrio de las cargas iónicas presentes en el retículo cristalino y ello comporta una potencialidad electrocinética. En fase acuosa este potencial electro-negativo causa un aumento en la conducción de cationes —capaz de neutralizar la carga negativa— incluidos los protones H^+ , los cuales hacen variar el pH sobre la superficie de las partículas coloidales del suelo. La consecuencia de esto es la formación de un gradiente de pH en los sistemas biológicos a nivel de superficie. Este fenómeno desempeña una importante función en las reacciones enzimáticas que tienen lugar especialmente a nivel de interfase.

El estado físico exacto de los enzimas en el suelo no es todavía perfectamente conocido, pero se cree que los enzimas existen en el suelo adsorbidos sobre las superficies de las partículas coloidales y están en cierto modo unidos covalentemente a compuestos monomoleculares inorgánicos y orgánicos. Estudios llevados a cabo sobre la adsorción de la quimotripsina (McLAREN y ESTERMANN, 1957), fosfatasa (RAMÍREZ-MARTÍNEZ y McLAREN, 1966) y ureasa (DURAND, 1965) sobre partículas de arcilla, han demostrado que la actividad de estos enzimas ha sido considerablemente más alta, de la notada en expe-

riencias conducidas con soluciones líquidas de los citados enzimas.

Este resultado es preciso atribuirlo, no sólo al equilibrio existente entre cationes H^+ y aniones OH^- sobre las partículas cargadas, sino en especial a la posibilidad de que estos iones sean substituidos por otros diversos aniones y cationes, pudiendo resultar coincidentes las variaciones de pH producidas.

PERSISTENCIA DE LOS ENZIMAS EN EL SUELO

Enzimas libres, producidos extracelularmente a partir de células vivas o liberados por células muertas o rotas, pueden persistir de diverso modo en el suelo. La ausencia de un sistema biológico de renovación o de acúmulo de aquéllos, puede conducir a un rápido decrecimiento de su concentración, debido, tanto a fenómenos de hidrólisis por parte de proteinasas microbianas, como a su interacción con los coloides del suelo.

La aceptación general del principio según el cual los enzimas del suelo pueden derivar de animales, plantas o microorganismos, está basada fundamentalmente en la afirmación de que en el suelo existe la posibilidad de que los enzimas se estabilicen y persistan durante largos períodos de tiempo, incluso cuando han sido alejados de su fuente de producción.

Según estudios realizados por BARTHOLOMEW (1965) ha sido posible demostrar cuanto ha sido dicho. En efecto, se ha observado que durante la descomposición de materiales vegetales, en presencia de un exceso de N inorgánico marcado ^{15}N , el enriquecimiento porcentual de las 2 componentes nitrogenadas, inorgánica y orgánica es casi igual. De esto se deduce que esta equivalencia es posible si:

— el N presente en las plantas ha sido completamente mineralizado.

- el N inorgánico derivado de las plantas ha sido completamente equilibrado con la porción de N inorgánico añadido.
- el N orgánico se debe exclusivamente a la fijación de parte del N inorgánico debido al crecimiento de los microorganismos.

Los terrenos arcillosos y complejos orgánicos heterocondensados, se han mostrado idóneos para ligar proteínas, confiriéndoles menor posibilidad de ser degradadas, tanto a causa de microorganismos, como por acción directa de proteinasas (VERMA *et al.*, 1975). Las reacciones que pueden ocurrir con las arcillas o con polímeros orgánicos, usualmente conducen a una inhibición de la actividad enzimática, pero en compensación, estas reacciones pueden estabilizar los enzimas (ROWELL *et al.*, 1973). La estabilidad de los citados enzimas en el suelo, ha sido ampliamente demostrada por varios autores, pero no ha sido comprendido por completo si esta estabilidad es debida a la formación de complejos entre enzimas y arcilla, o entre enzimas y polímeros orgánicos, tal y como normalmente ha sido observado en los modelos experimentales.

No obstante, ha sido bastante fácil extraer enzimas del suelo en condiciones de poder ser todavía activos. En algunos casos han sido parcialmente purificados y han mostrado la capacidad de complejarse con sustancias húmicas del suelo (CACCO y MAGGIONI, 1976).

Otras indagaciones han sugerido que los enzimas del suelo se encuentran parcialmente en forma de complejos extracelulares adsorbidos. No hay duda de que existen en el suelo mecanismos capaces de estabilizar los enzimas. Por ej., la estabilidad les puede ser conferida por células autolisadas, antes de la rotura de la membrana o de las paredes celulares. Debido a que por definición, los enzimas acumulados en el suelo comprenden productos de organismos vivos, el número de ellos deberá sin duda ser superior

a 50°C, pero, hasta hoy, sólo ha sido demostrada la actividad de algunos enzimas extraídos del suelo.

Una parcial purificación de dichos enzimas ha sido obtenida por algunos investigadores, pero no ha resultado suficiente como para comparar las propiedades de enzimas de diverso origen o para definir la naturaleza del enlace existente entre los enzimas y coloides húmicos del suelo.

Los enzimas del suelo más frecuentemente estudiados, han sido las amido-reductasas y las hidrolasas. Se han llevado a cabo algunos estudios sobre la actividad de transferasas y liasas, pero se sabe poco sobre isomerasas y liasas. Por el contrario, existe una notable literatura relativa a deshidrogenasas, catalasas, invertasas, proteinasas, fosfatasas y ureasas del suelo.

ACTIVIDAD ENZIMATICA Y NUMERO DE MICROORGANISMOS DEL TERRENO

La falta de una completa correlación entre actividad enzimática del terreno y número de hongos y bacterias, ha sido señalada por RAMÍREZ y McLAREN (1966) y atribuida a la presencia de enzimas extracelulares.

Un método elegante e ingenioso para distinguir la actividad de los enzimas libres del terreno, de los presentes en los microorganismos, se debe a PAULSON y KURTZ (1969). Estos autores estudiaron las variaciones de la actividad ureásica y de los microorganismos ureolíticos, que se encontraban en el terreno después de la adición de una fuente de C (glucosa) y una de N (urea o sulfato amónico). La adición provocaba una proliferación de microorganismos ureolíticos, con el correspondiente aumento de la actividad ureásica total del terreno. Al sucesivo decrecimiento de la población microbiana, se unía una disminución de dicha actividad, aunque menos pronunciada que la presentada por los microorganismos.

PAULSON y KURTZ, mediante un análisis de regresión múltiple, elaboraban datos a partir de las diversas componentes de la actividad enzimática, en particular de la ureasa microbiana, de la ureasa liberada por los microorganismos durante el experimento y sobre todo de la ureasa libre del terreno. En la figura 1, en una reelaboración gráfica debida a Mc LAREN (1972), la actividad ureásica viene expresada en función del número de microorganismos ureolíticos; la extrapolación a cero del trazo ascendente de la curva (crecimiento microbiano) determina sobre la ordenada la actividad enzimática para una población nula de microorganismos ureolíticos, es decir, la actividad ureásica libre en el terreno antes del experimento. PAULSON y KURTZ han posido demostrar así que en el terreno usado por ellos, la actividad enzimática libre representa cerca del 80-90% de la actividad total. Este dato parecía de extremo interés, porque demostraba por primera vez de forma clara y difícilmente rebatible, que la actividad enzimática de un terreno en condiciones estacionarias era de naturaleza prevalentemente extracelular.

Al disminuir los microorganismos, como se ha visto, la actividad ureásica total decrecía menos de lo que era previsible, según un nuevo comportamiento (fig. 1) y el fenómeno era atribuido a un «extracellular background noise level» de la actividad enzimática. Al término de la experiencia tendía a restablecerse un nuevo equilibrio entre ureasa microbiana y ureasa libre (fig. 2).

No existen todavía muchos datos sobre el contenido porcentual de las actividades enzimáticas extracelulares, respecto a las totales en otros terrenos. NANNIPIERI *et al.* (en prensa) han demostrado que en el horizonte A₁ de un podzol, la actividad ureásica era extremadamente elevada y que prácticamente era toda de naturaleza extracelular; este resultado parece importante, ya que muestra el significado que pueden revestir los enzimas libres en la fisonomía de un terreno, que

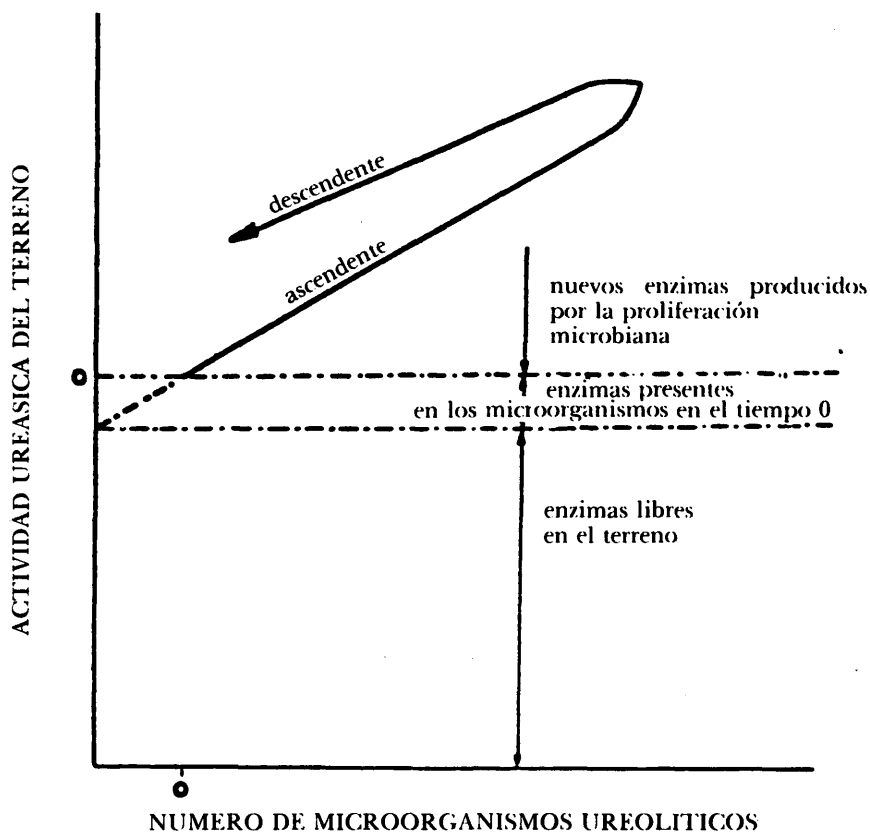


Fig. 1.—Variaciones de la actividad ureásica del suelo, en función del cambio en el número de microorganismos ureolíticos. Sobre la abscisa y sobre la ordenada el 0 indica el inicio del experimento. Esquema modificado debido a McLAREN (1972).

presenta condiciones desfavorables para la vida de los microorganismos (ARISTOVSKAYA, 1965).

ESTABILIDAD DE LOS ENZIMAS DEL TERRENO

Como ha sido puesto en evidencia, los enzimas del terreno son extremadamente estables, tanto, que se han revelado activos en terrenos geológicamente preservados, de edad hasta de 9.000 años (SKUJINS y McLAREN, 1969). Las actividades fosfatásicas ácidas y ureásicas eran bien medibles en formacio-

nes de arcillas pliocénicas sujetas a intensa erosión, completamente estériles por lo que se refiere a vegetación (NANNIPIERI *et al.*, 1974). La persistencia de los enzimas durante larguísimos períodos en forma activa, permite presuponer una gran estabilidad frente a todas las adversidades ambientales, de naturaleza física, química y biológica. Esta estabilidad ha sido desde hace tiempo aceptada por numerosos autores.

Acerca de la estabilidad de algunas actividades enzimáticas a valores extremos de pH, se ha hecho ya mención; mientras que la actividad de la mayor parte de los enzimas

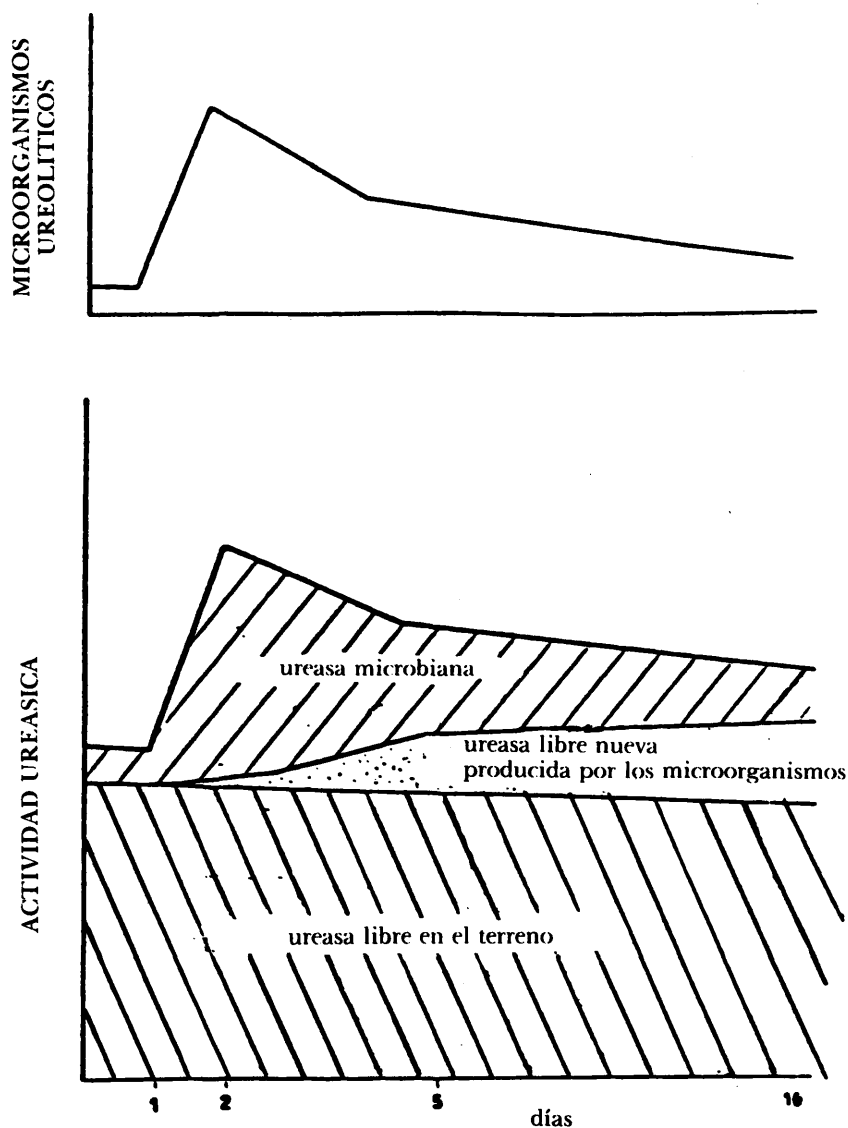


Fig. 2.—Variaciones en los componentes de la actividad ureásica del suelo, como consecuencia de una proliferación microbiana, inducida por la adición de una fuente de C y de N al suelo. Las escalas de valoración son arbitrarias. Esquemas modificados debidos a PAULSON y KURTZ (1969).

extraídos de los seres vivos, es fácilmente desnaturalizada a valores de pH superiores a 10. Una esterasa del terreno ha sido extraída con NaOH 0,2 N en forma activa (GETZIN y ROSEFELD, 1971; SATYNARAYANA y GETZIN,

1973); a tal concentración de hidrato sódico, normalmente el pH final de la extracción es alrededor de 13.

Todavía más sorprendente quizás, es la estabilidad de los enzimas del terreno frente

a la temperatura. Si se examina la actividad de un enzima en función de la temperatura no se encuentra, como es sabido, una curva gaussiana. El efecto de la temperatura es distinto en 2 componentes:

— una primera curva, con pendiente ascendente, que expresa la acción general de la temperatura sobre las reacciones químicas;

— una segunda curva, con una fuerte pendiente descendente, debida al efecto de la temperatura sobre la desnaturalización del enzima.

La temperatura óptima de una reacción enzimática viene dada por la resultante de las curvas. Para una esterasa del terreno, la temperatura óptima ha sido encontrada por CACCO (comunicación personal a SEQUI (1974) próxima a 80°C, mientras que para una esterasa de origen vegetal la temperatura óptima aparecía cercana a 40°C.

La estabilidad de los enzimas del terreno a la temperatura, como se ha dicho, es tal que la destrucción de las actividades enzimáticas se adoptan temperaturas elevadísimas durante largos períodos de tiempo. Pero el hecho de que los enzimas conserven la estabilidad a la temperatura, incluso después de la extracción y parcial purificación, hace descartar a priori la hipótesis de que sobre esta propiedad ejerzan una influencia dominante los coloides inorgánicos, sobre los que son adsorbidos los enzimas del suelo.

SATYNARAYANA y GETZIN (1973) han investigado la estabilidad térmica de las esterazas que hidrolizan el insecticida fosfórico malathion, después de haberla purificado más de 500 veces respecto a la actividad presente en el extracto bruto. El enzima viene inactivado a 90°C, pero a 80°C es todavía extremadamente estable. Entre 60 y 70°C, se tiene una pérdida parcial de actividad de cerca de un 20%.

Así pues, la acción de la temperatura sobre los enzimas del terreno puede ser compleja y en cada caso muy diferente de la ejercida sobre los enzimas de los organismos

vivos. En la figura 3 ha sido idealizado un posible modelo como resultante de 3 efectos:

(A) El efecto general de la temperatura sobre las reacciones químicas.

(B) El efecto de la temperatura sobre la desnaturalización del enzima.

(C) Tercer efecto, consistente en una parcial pérdida de actividad, como en el caso de la malathion esterasa, debida, por ejemplo, a una reorganización interna de la molécula enzimática.

Los enzimas del terreno son muy estables en ciertos casos a los inhibidores y sobre todo a los metales pesados. La ureasa de origen vegetal, por ejemplo, es muy sensible a los metales que se pueden enlazar a los grupos sulfhidrilo y debe ser protegida en cada fase de su purificación con agentes quelantes y reductores, mientras para la ureasa del terreno estas precauciones no son necesarias. La esterasa del malathion es insensible a inhibidores específicos de las esterazas de los organismos vivos, como el diisopil fluorofosfato y los metales pesados como Ag, Mg y Pb, que no inhibe la actividad si no a altas concentraciones (SATYNARAYANA y GETZIN, 1973).

ASPECTOS Y PROBLEMAS DE LOS ENZIMAS DEL TERRENO

Se sabe que la actividad de los enzimas del terreno está relacionada con algunas de las transformaciones más importantes que se producen en el ciclo del C, N, P y S. Es muy probable que en el terreno pueda ser demostrada la existencia de todas las actividades enzimáticas presentes en los organismos vivos, del acetilcolinesterasa a los enzimas del ciclo de Calvin. Es evidente, sin embargo, que estos enzimas estarán presentes sólo en la microfauna o en las algas y que ningún sentido tendría su presencia en el terreno en estado extracelular.

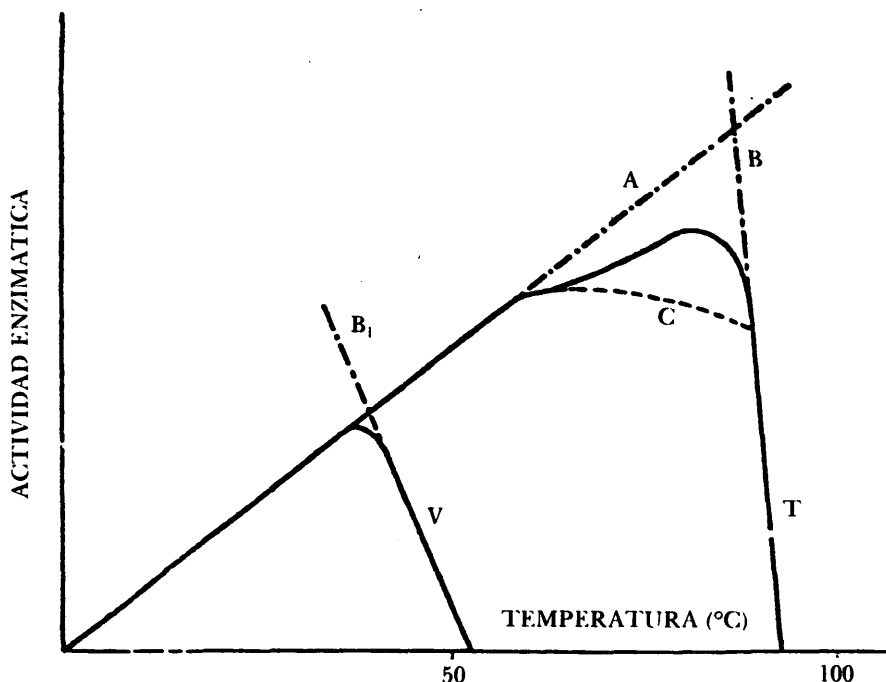


Fig. 3.—Acción de la temperatura sobre una actividad enzimática de origen vegetal (V), o extraída del terreno (T). La escala de actividad es arbitraria (SATYNARAYANA y GETZIN, 1973).

Es importante subrayar, que el terreno se ha especializado en una catálisis enzimática muy particular. Desde hace milenios, los animales aportan urea y ácido úrico al terreno. Así éste contiene ureasas y uricasas extracelulares en cantidad sorprendentemente abundante. Las ureasas están presentes en el terreno en medida al menos comparable a la de algunas plantas y su presencia condiciona, incluso, las prácticas agronómicas de fertilización ureica. Se trata así pues, no tanto de catalogar un número de actividades enzimáticas presentes en el terreno, sino de examinar aquéllas importantes desde el punto de vista práctico y de estudiar si es posible influenciar su génesis o el mecanismo de acción.

De estas mismas consideraciones, nace una posible aclaración del concepto de las «acti-

vidades enzimáticas como índice de fertilidad del terreno». FLORENZANO (1976) observa justamente, que querer valorar la fertilidad de un terreno en base solamente a la determinación de actividades enzimáticas, es actualmente, por lo menos, aleatorio. No es pensable que la determinación de una sola actividad enzimática, por ejemplo, de las catalasas o de las invertasas, pueda conducir a un índice numérico que refleje fielmente los múltiples factores de la fertilidad del terreno. La relación será por tanto, más casual, cuanto menos importante resulte el enzima elegido, en lo que habíamos definido como especialización enzimática del terreno; el análisis enzimático será siempre de limitada utilidad hasta que esta especialización no sea conocida más orgánicamente y el resultado de la determinación constituya un dato asimismo confirmante.

Es indicado accidentalmente, por no ser objetivo de esta reseña profundizar en el argumento, el hecho de que las indagaciones sobre el mecanismo de acción de los enzimas del terreno, comportan notables dificultades, dada la heterogeneidad del medio: en las reacciones en fase heterogénea se debe tener en cuenta un número de factores, a veces, realmente importante (McMAREN y PARKER, 1970).

Una contribución de interés para la comprensión de las propiedades de los enzimas del terreno, puede venir dada por los nuevos conocimientos sobre el mecanismo de acción y sobre la estabilidad de los enzimas fijados sobre un soporte insoluble; los enzimas pueden ser insolubilizados incluso encerrándoles en la malla de un polímero como la poliacrilamida y en este estado, aparecen bastante próximos a las condiciones previstas por la hipótesis de BURNS *et al.* Pero el mecanismo de acción de los enzimas del terreno se puede diferenciar del de los enzimas en solución, incluso sencillamente por el comportamiento del sustrato y de los productos (CERVELLI *et al.*, 1973) por ej., se ha demostrado que la constante de Michaelis de la fosfatasa ácida del terreno, a diferencia de lo que anteriormente se creía, es muy similar a la de las plantas y los microorganismos, y que los datos precedentes (TABATABAI y BREMNER, 1969) estaban falseados por la adsorción del sustrato por parte del terreno. Estos resultados constituyen uno de los modelos del complejo estudio cinético de los enzimas del terreno, aunque su mayor interés quizás radique precisamente en la confirmación de que el mecanismo con que funcionan los citados enzimas, es muy similar al que presentan microorganismos y plantas.

A continuación se considerarán algunas notas de los estudios actuales sobre los enzimas del terreno, evidenciándose caso por caso, los aspectos más aplicados.

INTERACCIONES ENTRE ENZIMAS DEL TERRENO Y PRODUCTOS RESIDUALES (INSECTICIDAS, FUNGICIDAS Y HERBICIDAS)

Se trata de un capítulo muy vasto de la moderna enzimología del terreno, que no puede ser agotado en breve espacio. Para los objetivos de este trabajo puede ser suficiente el planteamiento del problema, que parece uno de los más importantes en la práctica agronómica de hoy.

La influencia de los productos residuales en la actividad enzimática del terreno ha sido estudiada por muchos autores y depende de un gran número de factores, entre los que se pueden recordar la naturaleza y la dosis del compuesto, el tipo de enzima, el tipo de terreno, las condiciones experimentales y así sucesivamente. Se pueden verificar 3 condiciones diversas:

a) La actividad enzimática aumenta después del tratamiento. El fenómeno se puede dar en el caso en que el producto sea utilizado por algunas clases de microorganismos y la proliferación microbiana conduzca a un aumento de la actividad enzimática extracelular.

b) La actividad enzimática permanece inalterada. Se trata, generalmente, de actividades enzimáticas no implicadas en la transformación, ni inhibidas por el producto residual, o bien, no presentes en el terreno en estado extracelular. Esta situación puede ser muy importante. VOJINOVIC *et al.* (1961) señalan que un terreno biológicamente muerto por suministro masivo de un herbicida tóxico, puede conservar una actividad enzimática muy elevada.

c) La actividad enzimática viene reducida o anulada por el tratamiento. Se trata de la situación que más que cualquier otra puede conducir a consecuencias agronómicas incluso graves: el producto residual es un fuerte inhibidor enzimático.

Las 3 situaciones en realidad pueden veri-

ficarse al mismo tiempo mediante diversas actividades enzimáticas. Es necesario tener presente que las actividades enzimáticas del terreno, aunque tengan mayor estabilidad, no poseen la versatilidad de un organismo vivo. Si un herbicida, por ej., es añadido en dosis masivas a un terreno y es capaz de ejercer una fuerte inhibición sobre una o más actividades enzimáticas, se alterará el equilibrio del conjunto enzimático del terreno, con reflejos más o menos pronunciados para todo el ecosistema y frecuentemente con importantes consecuencias de naturaleza agronómica. Las investigaciones sobre estas interacciones son, por tanto, urgentes e indispensables para la agricultura moderna.

INFLUENCIA DE LOS BIOCIDAS SOBRE LOS ENZIMAS DEL TERRENO

Efectos directos

La inhibición de las ureasas en el terreno ha sido estudiada por varios autores. Según CERVELLI *et al.* (1975), algunos herbicidas (ureas substituidas tales como, fenuron, monuron, diuron, sinuron, neburon, fig. 4),

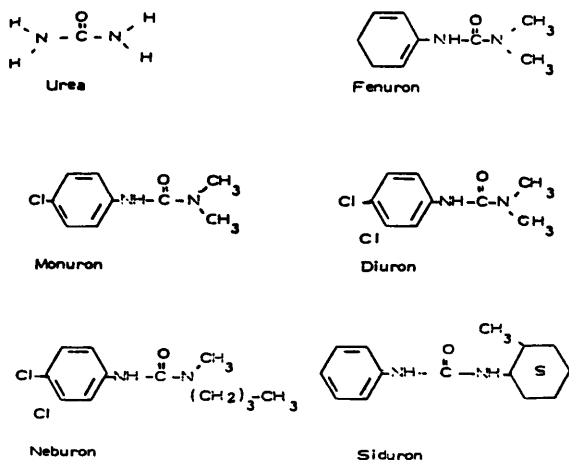


Fig. 4.—Urea y algunas ureas substituidas (CERVELLI *et al.*, 1975).

pueden inhibir de distinta forma las ureasas en función de la persistencia del halógeno substituido en el anillo fenílico. Se ha propuesto que la molécula del enzima reacciona con el agente inhibidor a través del átomo de oxígeno del grupo carbonílico, formando un complejo que puede ser fácilmente estabilizado por resonancia (fig. 5).

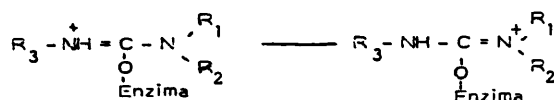


Fig. 5.—Fórmulas propuestas de resonancia de complejos inhibidores de ureasas (CERVELLI *et al.*, 1975).

Estos herbicidas constituyen un excelente medio para estudiar el mecanismo de acción de los enzimas ureásicos. Otros autores han demostrado efectos similares a éstos en el suelo y relativo a ureas substituidas suministradas, parece justo pensar que estos compuestos tengan un efecto directo sobre los enzimas extracelulares que se acumulan en el terreno. Recientemente CORBETT (1975) ha demostrado que cada vez que un enzima es inhibido, se debe al hecho de que un sitio activo del mismo, se enlaza con el inhibidor covalente o no covalentemente.

Los inhibidores que se enlazan no covalentemente, comúnmente son compuestos análogos al substrato que compite por dicho sitio y con el cual éstos están en equilibrio reversible. En general, la incidencia de un efecto directo del biocida sobre el enzima es atribuible tanto a la estructura molecular de éste, como a su capacidad de reaccionar con un sitio específico (fig. 6).

Efectos indirectos

Los efectos indirectos de un biocida sobre los enzimas del suelo son aquellos que inciden sobre los microorganismos, los cuales a su vez contribuyen al acúmulo de la activi-

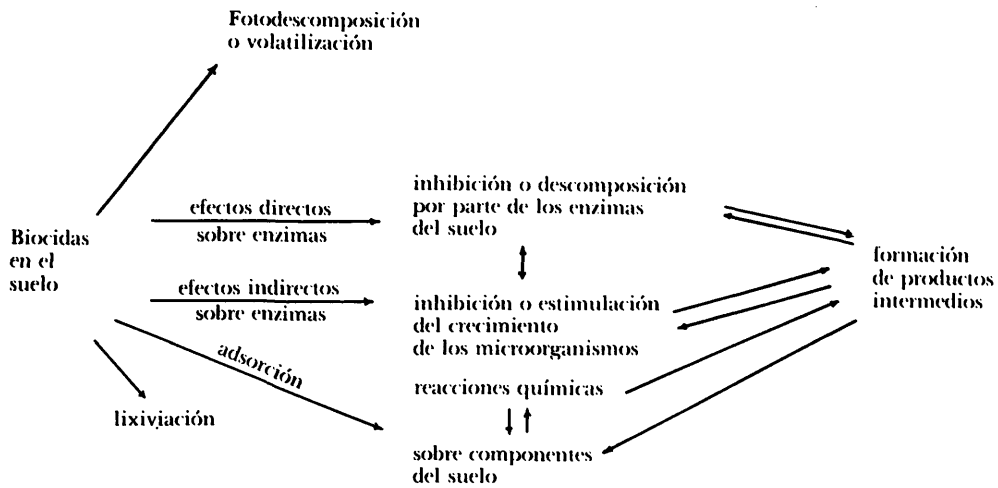


Fig. 6.—Destino de los biocidas en el suelo (CERVELLI *et al.*, 1978).

dad enzimática. Los biocidas por tanto, pueden explicar su acción indirecta sobre los enzimas, alterando las funciones vitales de los microorganismos, modificando la permeabilidad de las membranas celulares de los mismos, o interfiriendo la regulación enzimática de la biosíntesis proteica (fig. 6).

Alteraciones de las funciones vitales de los microorganismos

Los enzimas del suelo son producidos por organismos vivos, por eso cualquier acción que altere sus funciones vitales podría indirectamente modificar la actividad enzimática del terreno. Esto sería cierto, tanto si los enzimas fuesen producidos por los microorganismos como si se acumularan en ellos, o bien si derivasen de los residuos de plantas producidos por la acción de las bacterias, hongos, o gusanos. El nivel de cada actividad enzimática podría variar según su específico «turnover» en el suelo.

Los biocidas son usualmente una fuente de nutrición que estimula consiguientemente el crecimiento de poblaciones del suelo. Por otro lado, el suministro de biocidas, incre-

menta aquellas poblaciones bacterianas capaces de degradarlos y utilizarlos como fuente de nutrición.

Un biocida si no es inmediatamente metabolizado en el suelo, puede ejercer un efecto fisiológico sobre los organismos vivos (fig. 7). Si los organismos no son capaces de sobrevivir, su muerte puede causar la lisis celular y un eventual aumento de la función extracelular de los enzimas del suelo. Esto podría también causar la necrosis de las células radicales de la planta, si bien es difícil que esta modificación ocurra.

Generalmente, los tejidos y las células muertas podrían ser utilizadas por otros organismos del suelo; un efecto similar sería inducido por modificaciones provocadas por cualquier biocida sobre la descomposición de la amplia producción de los enzimas animales del suelo o de las clases de los gusanos del terreno. Si los organismos son capaces de sobrevivir a las aplicaciones del biocida, se pueden tener otros efectos. En el interior de la célula, puede ocurrir la inhibición de la actividad de algunos enzimas, así como la inhibición de la biosíntesis de otros.

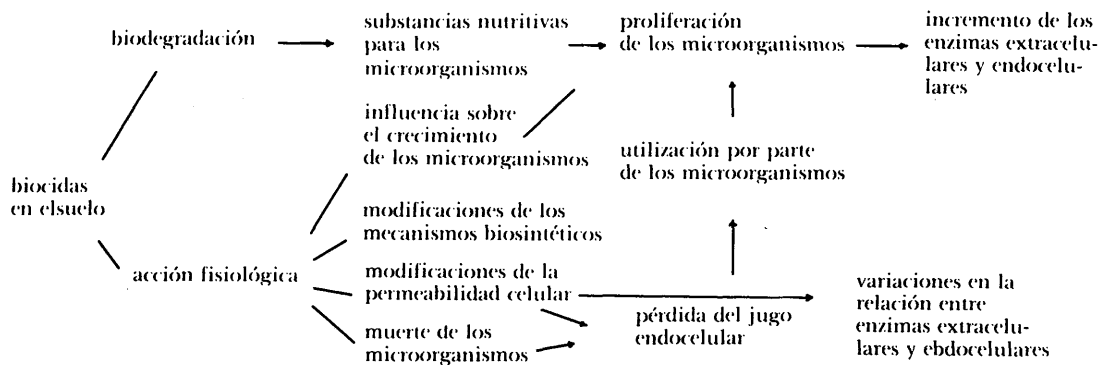


Fig. 7.—Efectos de los biocidas sobre los enzimas del suelo a través de su acción sobre los microorganismos del suelo (CERVELLI *et al.*, 1978).

La acción de algunos biocidas incide sobre la mayoría de los organismos del suelo: gusanos del terreno, algas, hongos y bacterias; la incertidumbre en torno a la síntesis de los enzimas del suelo, puede justificar el intento de generalización del esquema. En cuanto se refiere al efecto de dichos compuestos sobre las raíces de las plantas, se puede sugerir que como organismos del suelo implicados en la génesis de los enzimas, su respuesta a los biocidas se puede comparar a la de las algas.

y del aminotriazol, de los cuales ha sido referida la inhibición de la síntesis de endopeptidasas y aminopeptidasas en *Aeromonas proteolytica* (LICHFIED y HUBEN, 1973). Desafortunadamente, el conocimiento del modo de acción de los presuntos inhibidores en las reacciones biosintéticas es más bien escaso y se requieren más estudios con «cell-free systems» para confirmar los mecanismos postulados (ASHTON y CRAFTS, 1973; CORBETT, 1974; CHERRY, 1976).

Alteraciones de la síntesis enzimática

Muchas modificaciones inducidas por los biocidas suceden a nivel de la biosíntesis proteica. Como ya se ha dicho, es esencial la distinción entre enzimas endocelulares y exocelulares. Si la acción de los biocidas es importante solamente en la biosíntesis de los enzimas endocelulares, el efecto sobre el conjunto de los enzimas exocelulares se puede determinar únicamente después de la muerte de las células. En todo caso, el efecto podría ser evidenciado inmediatamente, si la inhibición ocurriese a nivel de la biosíntesis de los enzimas segregados normalmente por la célula. Este podría ser el caso del chlordane

Regulación de la biosíntesis proteica

La inducción o represión de la síntesis de los enzimas específicos, podría ser la consecuencia más importante del suministro de un biocida. Muchos enzimas se consideran fuertemente influenciados por los tratamientos del suelo. Por ej., la actividad ureásica no es específicamente inducible en el suelo por compuestos nitrogenados (como sulfato y o carbonato amónico), ni de la misma urea (PAULSON y KURTZ, 1970; ZANTUA y BREMNER, 1976). Por el contrario, la actividad celulósica del suelo es específicamente inducible: aumenta después de la incubación con celulosa y disminuye después de la acción de glucosa; una celulasa (C₁) es tam-

bién estimulada por la presencia de N, mientras que la otra celulosa (C_x) aumenta después de añadir fosfato (AMBROZ, 1973).

El nivel de fosfatasa en el suelo ha sido relacionada con la falta de fosfato inorgánico (SKUJINS, 1967). Actualmente se observa que en cultivos puros este enzima es represible, disminuyendo su contenido cuando los microorganismos son transferidos de un medio insuficiente en fosfato a uno normal (MILLS y CAMPBELL, 1974; IHLENFELDT y GIBSON, 1975).

NANNIPIERI *et al.* (1978) mostraron que en un terreno limoso arenoso, se producía un marcado aumento de la actividad fosfatásica tras añadir glucosa y nitrato sódico. Este incremento lo relacionaron con el aumento de poblaciones bacterianas, que es determinado por conteo directo. En presencia de fosfatasa inorgánica, la actividad fosfatásica no aumentaba y permanecía casi constante, así como la actividad de control del suelo. Desde el momento que las fosfatasas del suelo no disminuyen tras la adición de fosfato inorgánico —a diferencia de lo que sucede a las fosfatasas procedentes de microorganismos en cultivo puro— es posible que una fracción substancial de la actividad pueda ser considerada como relativa a un enzima extracelular.

Efectos sobre la membrana citoplasmática de los microorganismos

La acción de los biocidas sobre la membrana citoplasmática puede variar desde la desorganización de las estructuras físicas, a las modificaciones del proceso de transporte o de excreción. Las consecuencias de estos intercambios pueden incluir variaciones en la relación enzimática intra/extracelular, o cambios bioquímicos en la actividad de los enzimas coligados a las células.

Se puede tener una completa desorganización de la estructura de la membrana, cada

vez que un biocida sea capaz de disociar la estabilidad polar o los enlaces hidrofóbicos entre componentes proteicos y fosfolipídicos. Por ej., dodine y guazatine pueden perjudicar las membranas celulares; estos fungicidas tienen una larga cadena alquílica unida a un grupo guanidínico y su estructura molecular puede descomponer la estructura de las membranas (BROWN y SISLER, 1960; PRESSMAN, 1963; SOMMERS y PRING, 1966). Ejemplos de ambos tipos de reacción han sido citados en la bibliografía, pero no se han llevado a cabo estudios detallados para aclarar los fenómenos implicados.

La alteración de la estructura de la membrana puede depender también de sustancias no activas presentes en productos comerciales. Por ej., los biocidas son con frecuencia formulados como concentrados emulsionados, consistentes en soluciones de estos productos en aceite, o en algunos otros solventes orgánicos adecuados, junto a aceites emulsionantes. Los aceites de petróleo consisten en gran medida, en hidrocarburos alifáticos saturados e insaturados. CURRIER (1951) indicó que pequeñas exposiciones de plantas de cebada, zanahoria y tomate al vapor de benceno, xileno, trimetilbenceno o tolueno, producen un rápido oscurecimiento de las puntas de las hojas: hecho que consideró debido a la salida de jugo celular.

Cuando los hidrocarburos se disuelven en la membrana, se separan como consecuencia las cadenas de los ácidos grasos de los fosfolípidos. Inicialmente, esto sólo puede incrementar la permeabilidad, pero apenas la concentración de los hidrocarburos aumenta en la membrana, podría ser completamente disociada la configuración de doble estrato. Por otra parte, influenciando las interacciones lípido-lípido, los hidrocarburos probablemente rompen los enlaces hidrofóbicos entre los lípidos y las regiones apolares de las proteínas de la membrana (DALLYN y SWEET, 1951; CURRIER y PEOPLES, 1954).

El daño a las membranas citoplasmáticas

puede ocurrir asimismo, como resultado de la interacción entre lípidos y radicales libres, como sucede en el caso del suministro de herbicidas de bipyridylum. HARRIS y DODGE (1972) han sugerido que este efecto puede ser debido a un ataque sobre los lípidos de la membrana celular, causado por los radicales libres de peroxilo e hidroxilo, derivados del peróxido de hidrógeno formado en la reacción del oxígeno con radicales libres de bipyridylum (CALDERBANK, 1968). Tiocarbamato, sulfalato y herbicidas ácidos alifáticos clorados, originan la reducción de la cera en plantas (GETNER, 1966; MANN y PU, 1968; MARTIN y JUNIPER, 1970; STILL *et al.*, 1970; WILKINSON y HARDCASTLE, 1970). Tal reducción puede ser causada por la acción sobre la síntesis de los lípidos, que a su vez puede alterar los procesos de excreción celular.

EFFECTO DE LA ACIDA DE SODIO Y DEL BROMURO DE METILO SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DEL TERRENO

KELLEY y RODRIGUEZ KABANA (1979) han demostrado que la acida de sodio y el bromuro de metilo pueden alterar la actividad enzimática del terreno sobre el cual éstos dos biocidas han sido aplicados. En efecto, enzimas como las catalasas, sacarosas y amilasas, son sensibles a la presencia de los 2 biocidas, aumentando o disminuyendo su propia actividad enzimática.

En relación con la actividad catalásica, se ha observado que aumenta con el tiempo (Fig. 8), pero que en terrenos tratados con bromuro de metilo, se produce una disminución de la misma. Asimismo, la amilasa se ha mostrado muy sensible al bromuro de metilo; en efecto, después de un cierto período del tratamiento, se ha podido notar que su actividad sufre una notable disminución (Fig. 9). Inversamente, en el caso en que el terreno ha sido tratado con azida de

sodio, la actividad amilásica experimenta un notable incremento respecto al control e igual sucede en la actividad sacarásica (Fig. 10).

METABOLISMO DE LOS BIOCIDAS

El metabolismo relativo a los biocidas puede ser de 2 tipos:

I) Las sustancias químicas pueden actuar como sustancias de crecimiento, asegurando una fuente de C, de energía y ocasionalmente de N y S; en este caso la densidad de las poblaciones microbianas presentes en el suelo, aumenta considerablemente y las células se multiplican a causa del biocida. Junto con la proliferación de los microorganismos y el consiguiente incremento, se produce asimismo un aumento en la desaparición del producto empleado.

Los organismos de este tipo pueden ser fácilmente aislados, mediante terrenos de cultivo enriquecidos que contienen el biocida como fuente de C, N y S. La consecuente utilización del biocida como sustancia nutritiva, implica su degradación y la producción de compuestos intermedios, que continuamente son utilizados por los microorganismos para su crecimiento.

II) Puede ocurrir, que el biocida sea metabolizado y que los productos de su metabolismo no sirvan como fuente de nutrición. En este caso tal transformación se denomina «cometabolismo». Este término viene a significar una activa metabolización de los microorganismos, que no implica necesariamente la utilización del compuesto para fines nutritivos. Estos microorganismos heterótrofos, no pueden ser fácilmente aislados sobre terrenos enriquecidos en los cuales esté el biocida.

En el metabolismo de los biocidas, los microorganismos pueden efectuar diversas reacciones. El tipo de transformación depende de la especie microbiana considerada.

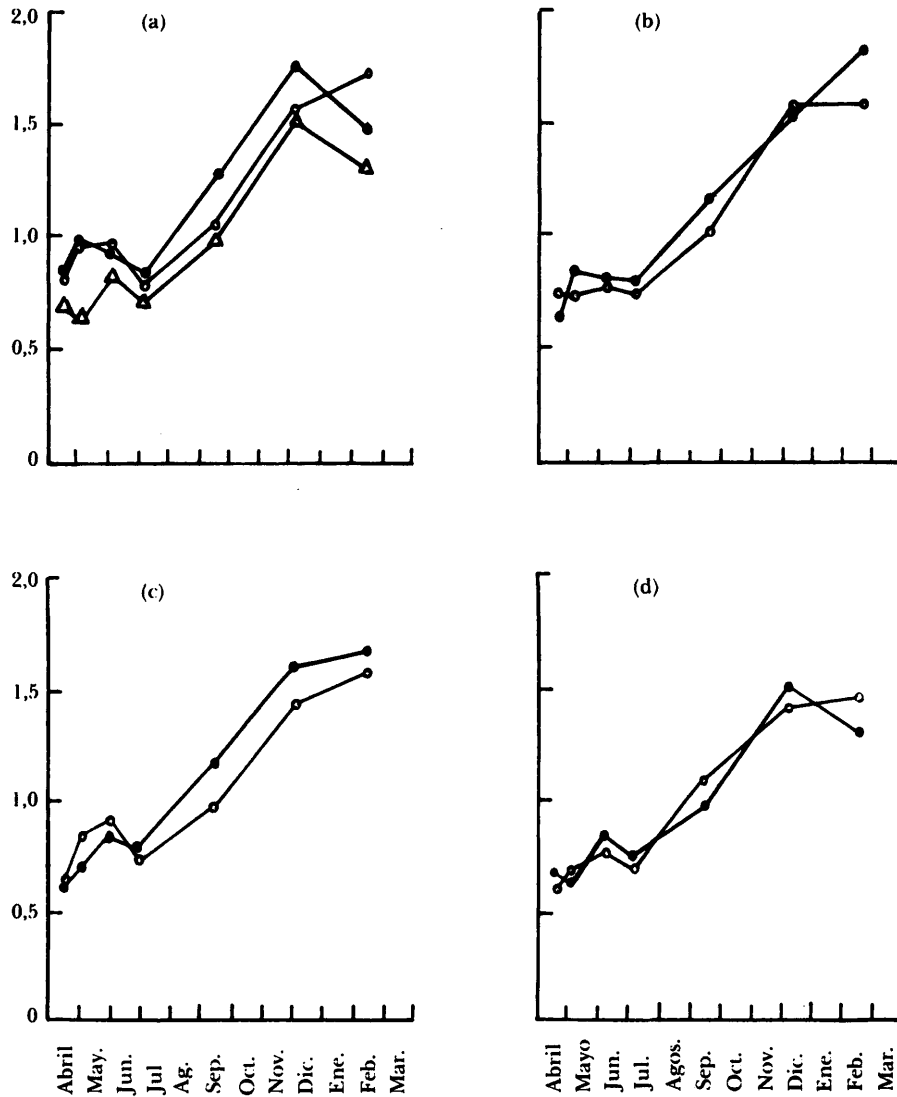


Fig. 8.—Actividad catalásica del suelo en función del tiempo, después del tratamiento. Dicha actividad viene expresada como valor de la tangente θ de la pendiente inicial. (a) Curvas relativas a las parcelas tratadas con CH_3Br y a las no tratadas usadas como control (O: cubiertas con agua; ●: cubiertas con polietileno; Δ : tratadas con CH_3Br). (b) Curvas relativas a las parcelas tratadas con azida de sodio a razón de 22,4 kg/ha. (●: cubiertas con agua; O: cubiertas con polietileno). (c) Parcelas tratadas con azida de sodio a razón de 67,2 kg/ha (●: cubiertas con agua; O: cubiertas con polietileno). (d) Parcelas tratadas con azida de sodio a razón de 134 kg/ha; ●: cubiertas con agua; O: cubiertas con polietileno) (KELLEY y RODRÍGUEZ-KABANA, 1979).

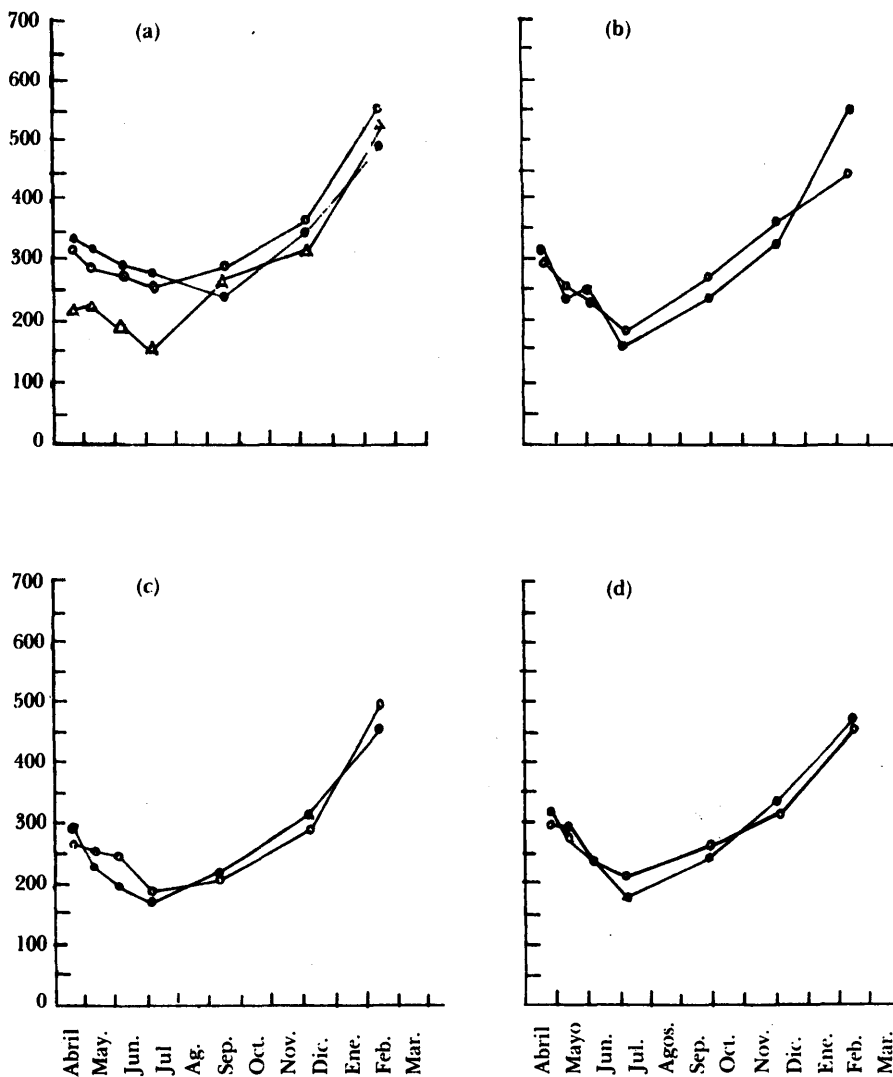


Fig. 9.—Actividad sacarásica del suelo en función del tiempo después del tratamiento. Dicha actividad viene expresada por la liberación de los grupos reductores (equivalentes de glucosa en μg) por gr de suelo seco, después de 3 horas de incubación a 37°C . (a) Control (O: cubiertas con agua; ●: cubiertas con polietileno y Δ) parcelas tratadas con CH_3Br . (b) Parcelas tratadas con azida desodio a razón de 22,4 kg/ha (O: cubiertas con agua; ●: cubiertas con polietileno). (c) Parcelas tratadas con azida de sodio a razón de 67,2 kg/ha (O: cubiertas con agua; ●: cubiertas con polietileno). (d) Parcelas tratadas con azida de sodio a razón de 134,5 kg/ha (O: cubiertas con agua; ●: cubiertas con polietileno). (KELLEY y RODRÍGUEZ-KABANA, 1979).

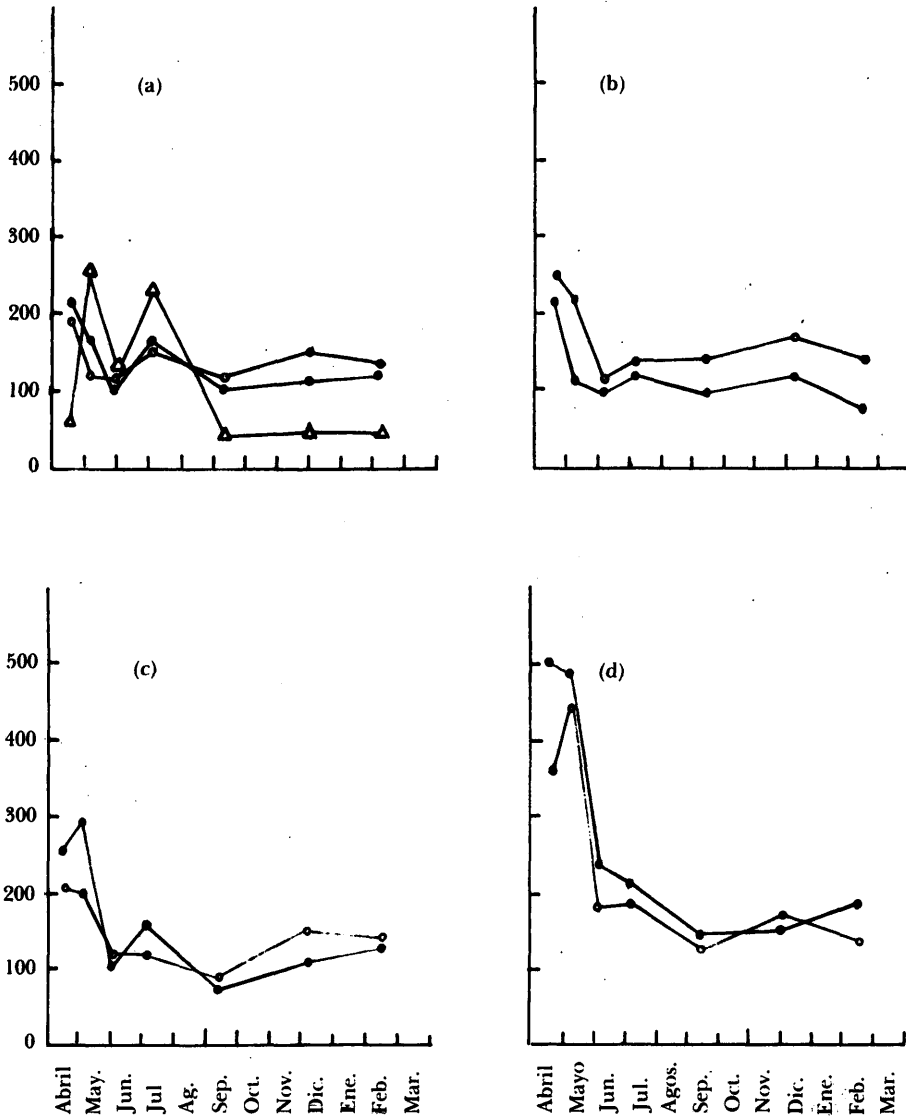


Fig. 10.—Actividad amilásica del suelo en función del tiempo después del tratamiento. Dicha actividad viene expresada por la liberación de los grupos reductores (equivalentes de glucosa en μg) por gr de suelo seco, después de 3 horas de incubación a 37°C . (a) Control (O: cubiertas con agua; ●: cubiertas con polietileno y (Δ) parcelas tratadas con CH_3Br . (b) Parcelas tratadas con azida de sodio a razón de 22,4 kg/ha (O: cubiertas con agua; ●: cubiertas con polietileno). (c) Parcelas tratadas con azida de sodio a razón de 67,2 kg/ha (O: cubiertas con agua; ●: cubiertas con polietileno). (d) Parcelas tratadas con azida de sodio a razón de 134,5 kg/ha (O: cubiertas con agua; ●: cubiertas con polietileno). (KELLEY y RODRIGUEZ-KABANA, 1979).

Estas reacciones pueden ser, en síntesis, clasificadas:

a) Reacciones de desintoxicación:

Consisten en la conversión de una molécula de biocida en otras de carácter no tóxico.

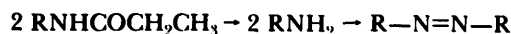
b) Reacciones de degradación

Basadas en la transformación de una sustancia compleja en productos más simples; la degradación frecuentemente es considerada sinónimo de mineralización; en este caso se producen CO_2 , H_2O , NH_3 , o cloruros si la molécula de biocida contiene N y Cl. La reacción de desintoxicación se produce rápidamente, como consecuencia de una amplia degradación en la que intervienen muchos enzimas.

c) Reacciones de conjugación, de formación de complejos o reacciones aditivas

En este tipo de reacciones, el microorganismo puede complejar el biocida, o bien combinarlo con metabolitos celulares. La conjugación o la formación de productos aditivos puede ser efectuada por organismos que catalizan reacciones que conducen a la adición de un aminoácido, de un ácido orgánico, o de otro tipo de sustrato. Estos procesos son llamados igualmente desintoxicantes.

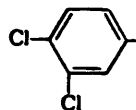
La conjugación o condensación tiene lugar, por ej., en el metabolismo del propilo. Este herbicida es primero convertido microbiológicamente a 3,4-dicloro anilina, que a su vez se condensa con otra molécula, hasta formar un producto con 2 anillos bencénicos:



propil

3,4-dicloro
anilina

R es



Las reacciones de conjugación son también evidentes en el metabolismo de un fungicida, el sodio dimetilditiocarbamato. En este caso los microorganismos son capaces de combinar el biocida con un aminoácido, normalmente presente en la célula (KAARS SIJPESTEIJN *et al.*, 1962).

d) Reacciones de activación

Estas reacciones transforman sustratos o biocidas no tóxicos en tóxicos. Un ej., es el herbicida ácido butírico 4-(2,4-diclorofenóxido) o [(4-(2,4-BI)] y el insecticida forato, ambos transformados y microbiológicamente activados en el suelo en metabolitos tóxicos por malas hierbas e insectos (GEIZIN y SHANKS, 1970; GUTENMANN *et al.*, 1964).

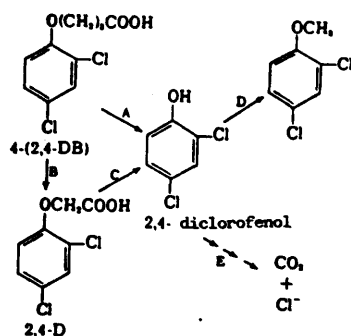
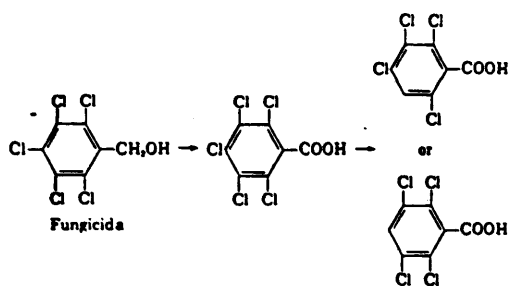
e) Reacciones de desactivación

Consisten en la conversión de una molécula tóxica —que podría ser un biocida si es sujeto a activación enzimática— en una molécula no tóxica, que no puede ser posteriormente activada (McRAE y ALEXANDER, 1963).

f) Reacciones de cambio del espectro de toxicidad

Algunos biocidas tóxicos para un grupo de organismos, en cuanto utilizados para su control, pueden ser metabolizados y trans-

formados en productos tóxicos por diversos microorganismos. Un ejemplo en este caso, viene dado por el fungicida pentaclorobencilalcohol, el cual puede ser transformado en ácidos benzoicos clorados, tóxicos para la planta:



- A: Desactivación (*Flavobacterium*)
 B: Activación (suelo)
 C: Desintoxicación (*Arthrobacter*, suelo)
 D: Reacciones aditivas (*Arthrobacter*)
 E: Degradación (*Pseudomonas*, suelo)

Fig. 11.—Estados iniciales en el metabolismo de varios herbicidas fenoxialcanoatos (GUTENMANN *et al.*, 1964; McRAF y ALEXANDER, 1963; EVANS *et al.*, 1971; LOOS *et al.*, 1967; TIEDJE *et al.*, 1969).

La figura anterior muestra algunos ejemplos de las citadas reacciones, en las que están implicados herbicidas del tipo 2,4-D.

Puesto que los microorganismos, como se ha visto hasta ahora, son capaces de transformar los biocidas de tantas formas diversas

y al existir la posibilidad de que tales productos de tales transformaciones puedan resultar dañosos para las plantas, animales y hombres, en los últimos años se han llevado a cabo diferentes estudios sobre el metabolismo de numerosos insecticidas, herbicidas y fungicidas. No ha sido fácil seguir la biodegradación de los biocidas, debido a que muchos de ellos son aplicados al terreno en bajas concentraciones y, por lo tanto, ha sido difícil seguir la formación de los productos intermedios. Actualmente, no obstante, se dispone de instrumentos sofisticados que permiten el estudio de tales productos metabólicos.

La figura 12 muestra el mecanismo de la degradación de herbicidas (2,4-D) y la formación de un compuesto intermedio de baja persistencia. Se puede notar, que si el número de las células activas en la degradación del compuesto inicial es pequeño, no se puede observar ninguna pérdida significativa del herbicida.

Esta aparente fase de latencia en la degradación del compuesto químico, no implica necesariamente una análoga fase latente del crecimiento bacteriano, pero probablemente refleje la incapacidad del instrumento, en apreciar pequeñísimas variaciones en la composición del biocida. Para poder suplir parcialmente estas deficiencias técnicas, la investigación relativa al metabolismo de los biocidas, ha sido desarrollada con pruebas de degradación *in vitro*.

Con tal objetivo, los organismos biodegradantes han sido cultivados y mantenidos sobre terrenos enriquecidos que contenían también el biocida en examen, o bien, ha sido puesto el biocida en presencia de enzimas extraídos de los microorganismos.

En el caso de que se trate de un biocida, que sea utilizado por los microorganismos, según un proceso de cometabolismo, la situación que se genera en éstos es distinta. En efecto, éstos pueden degradar el biocida pero no utilizarlo como sustancia nutritiva;

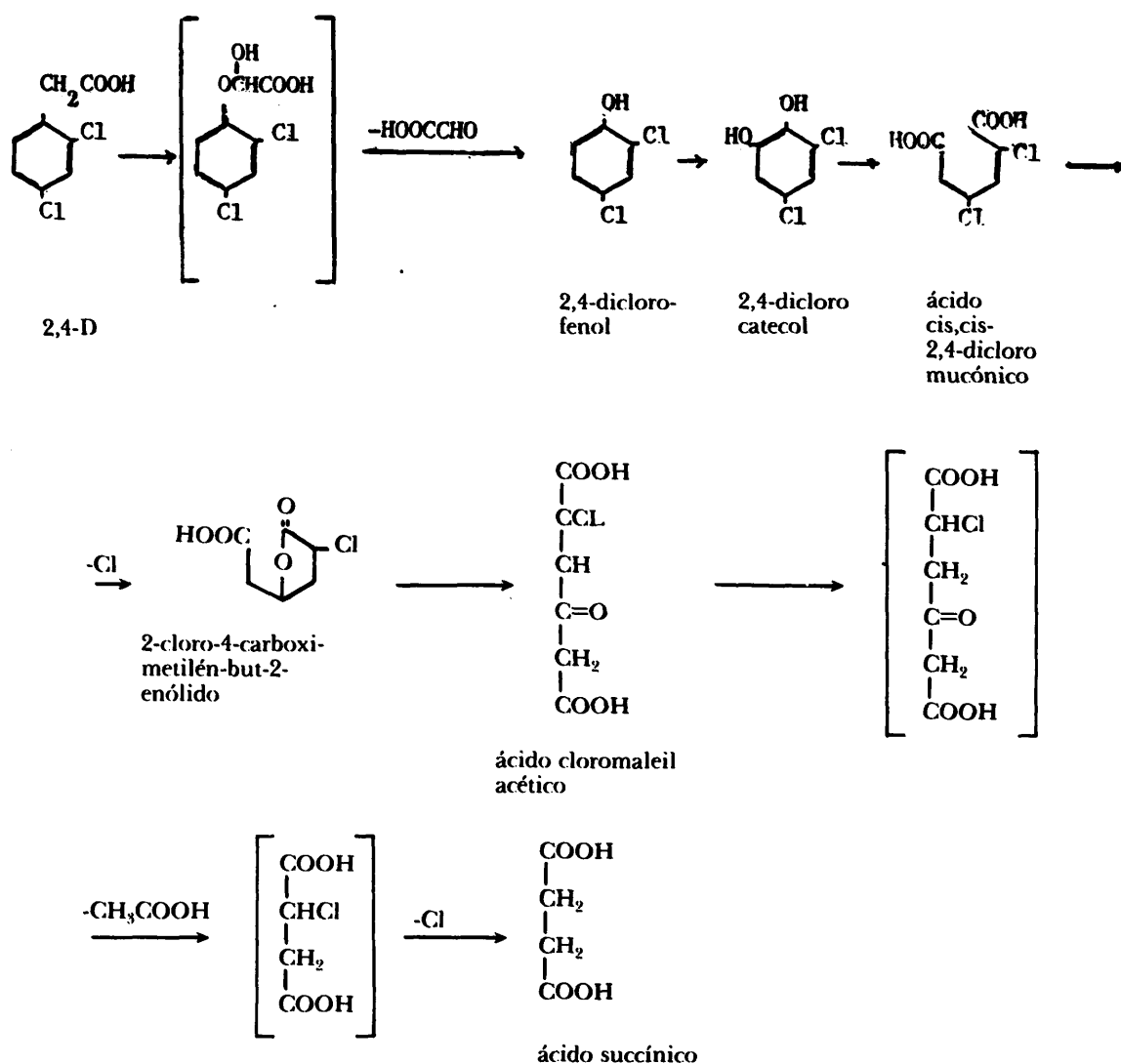


Fig. 12.—Vía de degradación del 2,4-D (ALEXANDER, 1977).

es decir, se observa que la velocidad de degradación del biocida, no concuerda con el incremento en el tiempo del número de microorganismos.

Si el número de bacterias o de hongos responsables de tal degradación es pequeño, la velocidad de degradación del biocida es baja, mientras que el significado de este postulado relativo al cometabolismo, no ha

sido todavía confirmado experimentalmente. Entre los biocidas implicados en el cometabolismo es útil recordar el DDT (PFAENDER y ALEXANDER, 1972), endrín (MATSUMURA *et al.*, 1971) y el heptacloro (MILES *et al.*, 1969).

Puesto que los compuestos químicos utilizados en agricultura son muy numerosos, el impacto de éstos sobre los microorganismos es muy diferente. Es lógico pensar que las

posibles reacciones serán muy variadas. Hasta ahora se conoce un amplio número de reacciones metabólicas implicadas en la degradación de los biocidas, el tipo de reacciones en las que un biocida está interesado conduce a la formación de compuestos intermedios comúnmente utilizados por parte de los heterótrofos.

En el caso contrario, es decir, en el caso en que los productos de transformación del biocida no sean utilizados por el microorganismo, se acumulan en el terreno.

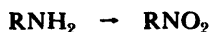
Por estos motivos, muchos de los compuestos intermedios que se generan en el interior de los microorganismos, son inmediatamente metabolizados por diversos enzimas, por lo que no pueden ser aislados del terreno; sólo unos pocos de ellos permanecen fuera de la célula y persisten durante breves períodos en el suelo.

Hasta hoy han sido evidenciadas las siguientes reacciones, por lo que se refiere a las fases iniciales del metabolismo de los biocidas (ALEXANDER, 1977):

a) Adición de un grupo hidroxílico:

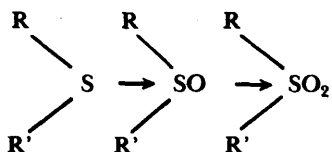


b) Oxidación de un grupo amínico:



c) Oxidación del S en el interior de una molécula.

Pueden ser añadidas al S uno o dos átomos de O:



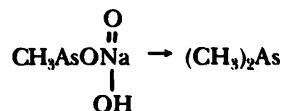
d) Formación de compuestos epoxídicos con adición de un átomo de O al doble enlace:



Normalmente, la formación del epóxido confiere al biocida una mayor resistencia hacia el microorganismo.

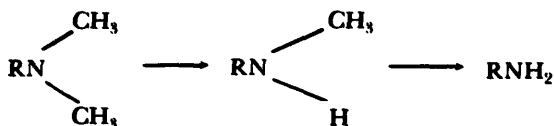
e) Metilación

Este tipo de reacción tiene lugar en el caso de diversos biocidas. Dentro de ellos se encuentran los que tienen As:



f) Reacciones de dimetilación

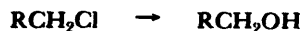
Los herbicidas y otros compuestos sintéticos pueden tener uno o dos grupos metílicos ligados a un átomo de N, pudiendo perder uno o ambos grupos:



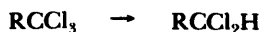
Algunos biocidas pueden presentar grupos alquílicos de mayor longitud que el simple grupo metílico e incluso en este caso pueden ser substituidos.

g) Desplazamiento del Cl.

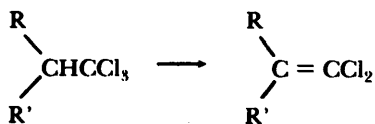
En muchos biocidas está presente el Cl, que puede ser substituido por grupo alcohólico:



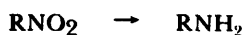
o bien por un átomo de H



o bien pueden ser desplazados ambos, los átomos de Cl e H:

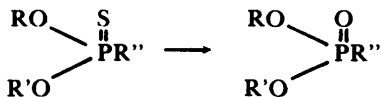


h) Reducción de grupos nitroso:



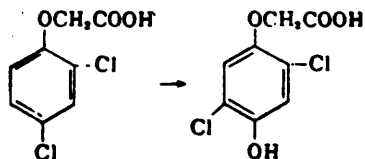
i) Sustitución de un átomo de S por un átomo de O.

Esta reacción se realiza con frecuencia en los insecticidas que contienen P=S en la molécula:



j) Desplazamiento del Cl en un anillo bencénico.

El desplazamiento del Cl unido a un átomo de C en un anillo bencénico puede ser catalizado por microorganismos y conduce a la adición de un grupo alcohólico en dicho anillo:

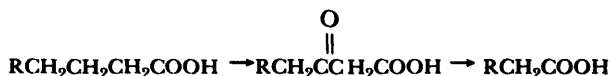


k) Rotura de un enlace éster:



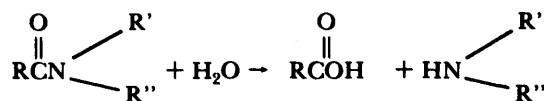
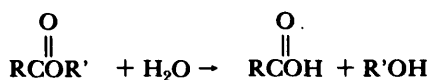
l) Degradación de las cadenas colaterales.

A veces sucede que cadenas ligadas a anillos, son antes degradadas o desplazadas mediante reacciones de β -oxidación:



m) Reacciones de hidrólisis.

Rotura de una molécula por la adición de una molécula de agua:



n) Rotura del anillo bencénico

Estas reacciones se dan para muchos insecticidas y herbicidas.

En base a las reacciones descritas, es posible predecir lo que puede acaecer a una reacción de biocida metabolizada por microorganismos y sobre todo comprender cuáles son los productos intermedios que se pueden acumular o no en el suelo.

En algunos casos, la vía degradatoria puede ser atribuida a la actividad metabólica de un solo tipo de microorganismos, en otros casos, en cambio, una completa biodegradación del biocida requiere la presencia de diversos microorganismos.

EFFECTOS DE LOS MICROORGANISMOS SOBRE LOS BIOCIDAS.

Herbicidas

Resultado de investigaciones llevadas a cabo en los últimos decenios relativas a

algunos herbicidas, han puesto de manifiestos mecanismos de degradación:

a) Se puede originar una degradación del biocida que puede, en diversa medida ser utilizado como fuente de C y energía para el crecimiento de los microorganismos degradadores.

b) La biodegradación puede ser parcial y los productos que se obtienen pueden ser utilizados como fuente de C y energía para sostener el crecimiento de los microorganismos y por tanto, la degradación es más lenta.

Un caso de degradación del primer tipo viene dada por los herbicidas: ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y por ácido β -metil (-clorofenoxiacético), (MCPA). En estos 2 casos han sido identificadas más de una docena de especies bacterianas y de hongos del suelo, capaces de degradar los citados compuestos.

Para la degradación del 2,4-D y del MCPA, han sido propuestas por lo menos 2 vías de degradación distintas (fig. 13-1, fig. 13-2).

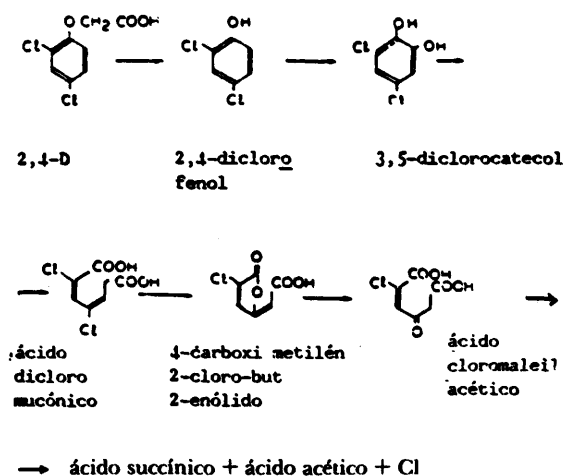


Fig. 13 - 1.—Vía metabólica de degradación del 2,4-D, por *Arthrobacter* sp (WALKER, 1982).

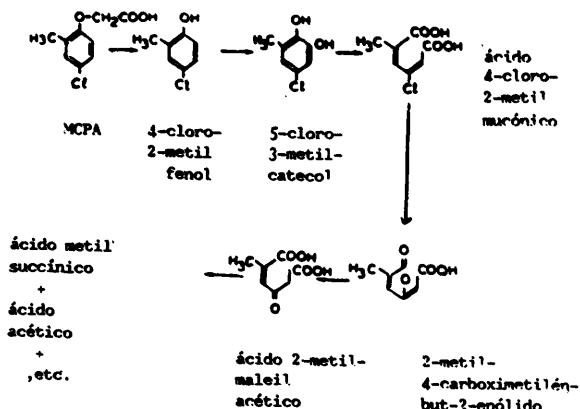


Fig. 13 - 2.—Vía metabólica de degradación del MCPA, por *Pseudomonas* sp (WALKER, 1982).

Se han mostrado muy interesantes los resultados relativos a la vía metabólica del ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5-T), el cual es mucho más persistente que el 2,4-D, o que el MCPA y para el que no ha sido identificado el cultivo puro de un microorganismo capaz de metabolizarlo completamente.

Existen, sin embargo, datos químicos que hacen pensar en una vía cometabólica del 2,4,5-T, que conduce a la formación del 3,5-diclorocatecol, con liberación de un átomo de Cl (HORWTH, 1970). Es oportuno recordar los resultados de AUDUS, que han demostrado cómo por tratamiento del suelo con 2,4-D y sucesivamente con MCPA, éste se vuelve capaz de metabolizar también el 2,4,5-T. La estabilidad de este compuesto hacia los microorganismos biodegradantes, puede ser debida a la presencia de átomos de Cl en posición meta, ya que el ácido metaclorofenoxiacético es también muy resistente a la oxidación microbiana.

Algunos herbicidas del grupo de los derivados clorados del ácido benzoico, se revelan muy estables, a diferencia del ácido benzoico, el cual puede ser fácilmente utilizado por los microorganismos. Por ejemplo, resulta poco claro el modo en que el ácido 2,3,6-

triclorobenzoico, pueda constituir una fuente de C para los microorganismos, si bien HORVATH (1971) ha aislado una especie del género *Brevibacterium* que crecida sobre benzoato, podría oxidar parcialmente el tricloro a 3,5-dicloro catecolamina y liberar CO₂ y un átomo de Cl.

SPOKES y WALKER (1974) han referido el cometabolismo de diversos clorobenzoatos de varias bacterias del suelo, incluyendo especies del género *Bacillus*, que consiguen transformar el ácido 3,6-diclorosalicílico, con liberación de CO₂. Asimismo otros biocidas como el bromoxinil (3,5-dibromo-H-hidroxi-benzonitril) y el ioxinil (3,5-diiodo-H-hidroxi-benzonitril), pueden ser más fácilmente degradados en el terreno. SMITH y CULLIMORE (1974) han señalado que especies del género *Flessibacterium* transforman la 3,5-dibromo-4-hidroxibenzoamida en ácido 3,5-dibromo-4-hidroxibenzoico.

De igual modo, otros autores han demostrado que *Fusarium solani* es capaz de transformar el ioxinil en por lo menos 8 compuestos intermedios, estando entre éstos el 3,5-diiodo-4-hidroxibenzoamida y el ácido 3,5-diiodo-4-hidroxibenzoico.

Entre ambos herbicidas, el grupo nitrilo -CN es convertido en un grupo carboxílico, mediante hidrólisis y oxidación.

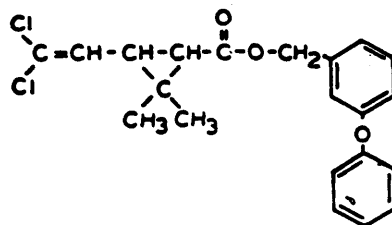
Muchos herbicidas importantes pertenecen a grupos de la fenil urea y fenil carbamato substituidos. Todos estos compuestos son derivados de aminas aromáticas. Otros herbicidas, en cambio, como las cloroanilinas, son derivados acílicos de la amina, por ejemplo, el propanil (3,4-dicloroanilina).

Muchas si no todas estas sustancias, son degradadas en tiempos muy cortos. Así incluso la anilina es degradada en tiempos muy breves en el terreno y puede ser metabolizada por las bacterias; la degradación se verifica por hidroxilación, pérdida de amoníaco y probablemente rotura del anillo hasta catecol. Tal como sucede para muchos compuestos aromáticos, la introducción de

átomos de halógenos incrementa la persistencia, pero no necesariamente prevé la degradación microbiana.

BRIGGS y WOLKER (1973) han demostrado que la 4-cloro anilina es degradada por bacterias del suelo, dando origen al 2-hidroxi-4-cloroanilina y que 2 moléculas de ésta pueden condensarse para formar un pigmento fenoxiazinona, lo que implica un cometabolismo de las anilinas monohalogenadas. Del mismo modo, algunos herbicidas, tales como los fenilcarbamatos o fenilureas, pueden ser hidrolizados en el suelo y formar cloroanilinas substituidas. Por ejemplo, el propilo puede dar 3,4-dicloroanilina, si bien algunas cloroanilinas pueden ser transformadas derivados azobencénicos. Por ejemplo, el *Fusarium* transforma la 3,4-tricloroanilina en 3,3',4,4'-tetracloroazobenceno (KAUFMAN *et al.*, 1972). Herbicidas fenil ureicos, como monuron, diuron, linuron, cloroxuron, pueden ser débilmente degradados en el suelo. Los compuestos con grupos N-dimetil pueden ser dimetilados (monuron, diuron), mientras aquellos que contienen grupos N-metil metoxílicos (linuron), pueden ser hidrolizados a aminas aromáticas libres.

Los herbicidas derivados de ácidos alifáticos clorados, tales como el dalapon (ácido 2,2-dicloropropiónico) y el ácido tricloroacético, son fácilmente degradables en el terreno (JENSEN, 1957), no presentando su uso ningún problema residual. Por el contrario, algunos herbicidas derivados de la triazina, como la antrazina y el permetryme:



se han mostrado altamente resistentes en el terreno. En muchos casos, estos herbicidas

son degradados lentamente y son metabolizados completamente.

Durante la parcial degradación, normalmente, la cadena contituida por grupos alquílicos, es utilizada como fuente de C, o, N por parte de los microorganismos. Estos, frecuentemente, son especies de hongos pertenecientes a los géneros: *Aspergillus*, *Penicillium* y *Trichoderma*.

Los herbicidas biperidílicos, como diquat y paraquat, son degradados anaeróticamente por bacterias anaeróbicas y por especies de levaduras pertenecientes al género *Lycopmyces*.

Insecticidas

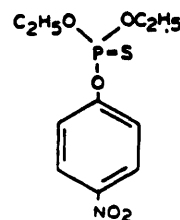
A diferencia de los herbicidas, los insecticidas son generalmente empleados en menor cantidad, pero resultan ser mucho más tóxicos.

Los insecticidas derivados de los hidrocarburos clorados, tienen baja solubilidad en agua y son fuertemente adsorbidos por los constituyentes del suelo y consecuentemente escasamente disponibles para la actividad de degradación de los microorganismos. El compuesto mejor conocido es el DDT (1,1,1-tricloro-2,2-bis (p-clorofenil)etanol)), el cual puede ser parcialmente degradado más fácilmente en condiciones anaeróbicas que aeróbicas. Por ejemplo, FOCHT y ALEXANDER (1971) han demostrado el cometabolismo del diclorofenilmetano, efectuado por especies del género *Hydrogenomonas*, identificando algunos metabolitos tales como 1,1-difenil-2,2,2-tricloroetano, mientras PFAENDER y ALEXANDER (1972) han identificado como metabolito 1-cloro-2,2-bis (p-clorofenil)etano y 4,4'-diclorobenzofenona. Esto lleva consigo la rotura de un grupo fenílico en el anillo del DDT. Asimismo, cultivos de *Mucor alternans* (ANDERSON y LICHTENSTEIN, 1972) degradan el DDT, hasta convertirlo en compuestos solubles en agua. El hexaclorocicloexano (γ -BCH-lindano), es menos persis-

tente que el DDT, pero incluso dicho compuesto es lentamente degradado por parte de los microorganismos en condiciones de anaerobiosis (HAIDER y JAGNOW, 1975).

Diversos autores han identificado muchos metabolitos, entre los que figuran algunos isómeros del BCH formados por la pérdida de uno o dos átomos de Cl (KOHNEK *et al.*, 1975).

Algunos insecticidas organofosforados, utilizados en muchos casos en sustitución de los hidrocarburos enumerados, pueden sufrir una degradación por parte de los microorganismos en tiempos breves. Compuestos típicos de este reagrupamiento es el parathion:

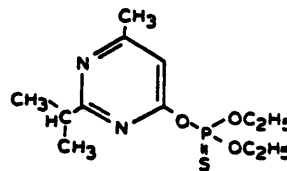


(diethyl-4-fenil-fosforotionato), que puede ser descompuesto de varios modos:

a) Mediante reducción e hidrólisis se forma 4-amino-parathión, p-nitrofenol y p-aminofenol (GRIFFITHS y WALKER, 1970; HSU y BARTHA, 1979).

b) Mediante hidrólisis se obtiene el ácido dietilfosfórico y el p-nitrofenol.

Especies del género *Flavobacterium* pueden transformar el parathion en p-nitrofenol. El diazinón (diethyl-2-isopropil-6-metil-4-pirimidinil):



puede asimismo no ser fácilmente degradado por diversos microorganismos del terreno.

(GUNNER y ZUCKERMAN (1968) han observado que un streptomyceto y especies del género *Arthrobacter*, pueden degradar este compuesto mediante hidrólisis. El diazinón puede ser transformado en 2-isopropil-6-hidroxipirimidina.

De igual modo, especies del género *Flavobacterium* hidrolizan el diazinón a 2-isopropil-6-metil-4-hidroxipirimidina, el parathión a p-nitrofenol y cloropyrifos (durbans), probablemente es su constituyente tricloropiridinil.

Los enzimas capaces de hidrolizar estos ésteres organofosfóricos, son del tipo constitutivo y no inducido. Otro insecticida carbonado, el carbaryl, puede ser degradado y transformado en compuestos intermedios,

como el 1-naftil-(hidroximetil) carbamato, 4 y 5-hidroxi-naftil, metilcarbamato.

Finalmente, por lo que se refiere a la piretrina sintética, conviene recordar que por hidrólisis se obtienen algunos derivados entre los que figuran el alcohol 3-fenoxibencílico y el ácido fenoxibenzoico. Los microorganismos responsables de esta degradación no han sido aislados.

AGRADECIMIENTOS

Mi sincero agradecimiento al Prof. L. Sparapano del Insto. de «Patología Vegetal» de la Univ. de Bari (Italia), por su efectiva y desinteresada colaboración en toda la extensión de este trabajo.

GIMÉNEZ VERDÚ, I., 1984: Efecto inhibitorio de algunos biocidas sobre la actividad enzimática del suelo. *Bol. Serv. Plagas*, 10: 257-298.

Some features on the interaction among soil microorganisms, biocides and enzymes in the soil system are discussed.

Different groups of edaphic microorganisms, as so as enzymic and cinetical soil processes in relation to soil fertility are indicated, including several notes on the metabolic pathways of biocides, its indirect effects on soil enzymes and some examples for herbicides and insecticides.

REFERENCIAS

- ABDEL-YUSSIF, R. M.; V. A. ZINCHENKO y G. S. GRUZDEV (1976): *Izv. Timiryazev. Sel'skokhoz. Akad.* (1), 206-214.
- ALEXANDER, M. (1977): In *Introduction to soil Microbiology* John Wiley & Son, New York 447-456.
- AMBROZ (1973): *Rostl Viroba* 19: 207-212.
- ANDERSON, J. P. E. y E. P. LICHTENSTEIN (1972): *Canadian Journal of Microbiology*, 18: 553-560.
- ARDAKANI, M. S.; M. G. VOLZ y A. D. McLAREN (1975): *Can J. Soil Sci.*, 55: 83-91.
- ARISTOVSKAYA, T. V. (1965): Traduc. inglesa del Can. Dept. Sect. Dstate.
- ASHTON, F. M. y A. S. CRAFTS (1973): Jhon Wiley, New York.
- BARANOVSKAYA, A. V. (1954): *Pochvovedenie*, 11: 41.
- BARTHA, R. y L. M. BORDELEAU (1969): *Bact. Proc.*, 4: A26.
- BARTHA, R. y L. M. BORDELEAU (1969): *Soil Biol. Biochem.*, 1: 139-143.
- BARTHOLOMEW, W. V. (1965). In «Soil Nitrogen» (W. V. Bartholomew and F. E. Clark, Eds.) 10: 285-306, Amer., Soc. Agron., Inc., Madison.
- BECK, T. (1971): *Z. Pflanzenernahr. Dung. Bodenkd*, 130: 68-81.
- BENOIT, R. E. y R. L. STARKEY (1968): *Soil Sci*, 105: 203-208.
- BLAGOVESHCHENSKAYA, Z. K. y N. A. DANCHENKO (1974): *Pochvovedenie*, 10: 124-130.
- BORDELEAU, L. M. y R. BARTHA (1972): *Can. J. Microbiol.*, 18: 1857-1864.
- BREMNER, J. M. y M. A. TABATABAI, M. A. (1973): *Soil Biol. Biochem.*, 5: 385-386.
- BRIGGS, G. G. y N. WALKER (1973): *Soil Biology and Biochemistry*, 5: 695-697.

- BROWN, I. F. y H. D. SISLER (1960): *Phytopathology*, 50: 830-839.
- BULL, A. T. (1980): *Contemporary Microbial Ecology*. Academic Press, New York.
- BUNDY, L. G. y J. M. BREMNER (1973): *Soil Biol. Biochem.*, 5: 847-853.
- BURGE, W. D. (1973): *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, 37: 392-395.
- CACCO, G. y A. MAGGIONI (1976): *Soil Biol. Biochem.*, 8: 321-325.
- CALDERBANK, A. (1968): *Adv. Pest. Control Res.*, 8: 127-135.
- CERNA, S. (1966): *Acta Univ. Carol. Bid.*, 1: 83-89.
- CERNA, S. (1970): *Acta Univ. Carol. Biol.*, 6: 461-466.
- CERVELLI, S., P. NANNIPIERI, B. CECCANTI y P. SEQUI (1973): *Soil Biol. Biochem.*, 5: 841.
- CERVELLI, S., P. NANNIPIERI, G. GIOVANNINI y A. PERNA (1975): *Pest. Biochem. Physiol.*, 5: 221-225.
- CERVELLI, S., P. NANNIPIERI y P. SEQUI (1978): In *Soil Enzymes* R. G. Burns 255-293.
- CHERRY, J. H. (1976): *Herbicides physiology, biochemistry, ecology*, 1: 525-546, Academic Press, New York.
- CONRAD, J. P. (1942): *Soil Sci.*, 54: 367.
- CORBETT, J. R. (1974): Academic Press, New York.
- CORBETT, J. R. (1975): *Proc. 8th British Insect. Fung. Conf.*, 981-993.
- CORTEZ, J., G. BILLES y P. LOSSAINT (1975): *Rev. Ecol. Biol. Sol.*, 12: 141-156.
- CORTEZ, J., P. LOSSAINT y G. BILLES (1972): *Rev. Ecol. Biol. Sol.*, 9: 1-19.
- CURRIER, H. B. (1951): *Hilgardia*, 20: 383-406.
- CURRIER, H. B. y S. A. PEOPLES (1954): *Hilgardia*, 23: 155-173.
- DALLYN, S. L. y R. D. SWEET (1951): *Proc. Am. Soc. Hort. Sci.*, 57: 347-354.
- DROBNIK, J. (1955): *Folia Biol.*, Prague, 1: 29.
- DROBNIK, J. (1956): *Cesk. Mikrobiol.*, 1: 47.
- DURAND, G. (1961): *Compt. Rend.*, 252: 1687.
- DURAND, G. (1965): *Ann. Inst. Pasteur.*, 109, Suppl. No. 3, 121.
- EVANS, W. C., B. S. W. SMITH, H. N. FERNLEY y J. I. DAVIES (1971): *Biochem. J.*, 122: 543-551.
- FLORENZANO, G. (1976): *Elementi di microbiologia del terreno*, 87: 110. Reda, Roma.
- FOCHT, D. D. y M. ALEXANDER (1971): *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 19: 20-22.
- FRANZ, G. (1973): *Pedologia*, 13: 423-436.
- GALSTYAN, A. S. (1958): *Dokl. Akad. Nauk Arm. SSR* 26: 285-288.
- GALSTYAN, A. S. (1958): *Dokl. Akad. Nauk Arm. SSR*, 26: 29.
- GALSTYAN, A. S. (1963): *Dokl. Akad. Nauk Arm. SSR* 36: 225.
- GALSTYAN, A. S. (1965): *Dokl. Akad. Nauk Arm. SSR* 40: 39-42(b). *Pochvovedenie* 2: 68-74 (a).
- GETNER, W. A. (1966): *Weeds*, 14: 27-31.
- GETZIN, L. W. y I. ROSEFELD (1971): *Biochim. Biophys. Acta*, 235: 442-453.
- GETZIN, I. W. y C. H. SHANKS JR. (1970): *J. Econ. Entomol.*, 63: 52-58.
- GNITKE, J. y C. KUNZE (1975): *Zbl. Bakt. Parasitenkd. Abt.*, 130: 37-40.
- GRIFFITHS, D. C. y WALKER, N. (1970): *Mededelingen Faculteit Landbouw Wetenschappen Gent*, 35: 805-810.
- GUNNER, H. B. y B. M. ZUCKERMAN (1968): *Nature*, London, 217: 1183-1184.
- GUTENMANN, W. H., M. A. LOOS, M. ALEXANDER y D. J. LISK (1964): *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 28: 205-207.
- GVRILOVA, A. N.; N. I. SAUGHENKO y N. A. SHYMKO (1974): *Trans. 10th Int. Congr. Soil Sci.*, 4: 281-289.
- HAIDER, K. y G. JAGNOW (1975): *Archives of Microbiology*, 104: 113.
- HAIG, A. D. (1955): Thesis, Univ. Calif., Davis.
- HARRIS, M. y A. D. DODGE (1972): *Planta*, 104: 210-219.
- HAYANO, K. (1973): *Soil Sci. Pl. Nutr.*, 19: 103-108.
- HAYANO, K. y M. SHIOJIMA (1974): *Trans. 10th Int. Congr. Soil Sci.*, 3: 136-142.
- HOBBIE, J. E. y C. C. CRAWFORD (1969): *Limnol. Oceanogr.*, 14: 528-532.
- HOFFMANN, G. (1959). *Z. Pflanzenernaehr. Dueng. Bodenkd.*, 85: 97a, 193b.
- HOFFMANN, G. (1968): *Z. Pflanzenernaehr. Düng. Bodenkd.* 118: 153-160.
- HOFMANN, E. y G. HOFFMANN (1954): *Biochem. Z.*, 325: 329.
- HOFFMANN, G. y J. PALLAUF (1965): *Z. Pflanzenernaehr. Düng. Bodenkd.*, 110: 193-201.
- HORVATH, R. S. (1971): *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 19: 291-293.
- HORWTH, R. S. (1970): *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 5: 537-541.
- HSU, T. S. y R. BARTHA (1979): *Journal of Applied and Environmental Microbiology*, 37: 36-41.
- IHLENFELDT, M. J. y J. GIBSON (1975): *Arch. Microbiol.*, 102: 23-28.
- JENSEN, H. I. (1957): *Canadian Journal of Microbiology*, 3: 161-164.
- KAARS SJPESTEIJN, A., J. KASLANDER y G. J. M. van der KIRK (1962): *Biochim. Biophys. Acta*, 62: 587-589.
- KAISER, P. y M. S. MONZON DE ASCONEGUI (1971): *Biol. Sol* 14: 16-19.
- KAUFMAN, D. D., J. R. PLIMMER, J. IWAN y U. I. KLINGGEBIEL (1972): *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 20: 916-919.
- KELLEY, D. y R. RODRÍGUEZ-KABANA (1979): *Pestic. Sci.*, 10: 207-215.
- KHAN, S. U. (1970): *Soil Biol. Biochem.*, 2: 137-139.
- KHAZIEV, F. KH. (1972): *Biol. Sol*, 16: 22-23.
- KISS, I. (1957): *Agrokem. Talajtan*, 6: 65.
- KISS, I. (1958): *Studia Univ. Babes-Bolyai*, 3: (7), 51.
- KISS, S., DRAGANBULRADA, M. y F. K. KHAZIEV (1972): *Lucr. Conf. Nat. Stiinta Solului*, 451-462.
- KISS, S. y S. PETERFI (1959): *Studia Univ. Babes-Bolyai Ser. 2* (2), 179.
- KISS, S. y S. PETERFI (1960): *Studia Univ. Babes-Bolyai Ser.*, 2: 2, 275.
- KISS, S. y S. PETERFI (1961): *Studia Cerectari Biol. (Cluj)* 12: (2) 209.
- KOHNEN, K., K. HAIDER y G. JAGNOW (1975): *Environmental Quality and Safety*, 3.
- KONIG, J., J. HSENBAUMER y COPPENRATH (1906): *Landwirtsch. Versuchs-Stationen*, 63: 471.
- KOZLOV, K. (1964): *Folia Microbiol. (Praga)*, 9: (3), 145.
- KOZLOVSKAYA, N. A., G. D. NIKITINA y S. V. RUNKOV (1972): *Agrokimiya*, 5: 144-149.
- KROLL, L. y M. KRAMER (1955): *Naturwiss.*, 42: 157.
- KUPREVICH, V. F. (1949): *Dokl. Akad. Nauk SSSR* 68, 953.

- KUPREVICH, V. F. (1951): *Dokl. Akad. Nauk SSSR* 79, 863.
- KUPREVICH, V. F. y T. A. SHCHERBAKOVA (1971): *Soil Biology*, 2: 167-201.
- LADD, J. N. y J. H. A. BUTLER (1972): *Soil Biol. Biochem.*, 4: 19-30.
- LADD, J. N. y J. H. A. BUTLER (1975): *Soil Biochemistry*, 4: 143-194.
- LADD, J. N. y PAUL, E. A. (1973): *Soil Biol. Biochem.*, 5: 825-840.
- LAUGENSEN, K. (1972): *Tidsskr. Pl.* 76: 221-229.
- LENHARD, G. (1962): *z. Pflanzenernachr. Dueng. Baden*, 99: 182.
- LICHFIELD, C. D. y R. P. HUBEN (1973): *Bull. Ecol. Res. Comm.* (Estocolmo) 17: 464-466.
- LOOS, M. A., R. N. ROBERTS y M. ALEXANDER (1967): *Can. J. Microbiol.*, 13: 691-699.
- MATSUMURA, F., V. G. KHANVILKAR, K. C. PATIL y G. M. BOUSH (1971): *J. Agr. Food Chem.*, 19: 27-31.
- MANN, J. y M. PU (1968): *Weed Sci.*, 16: 197-198.
- MARKUS, I. (1955): *Agrokem. Talajtan*, 4: 207.
- MARTÍN SMITH, M. (1963): *Nature*, 197: 361.
- MARTÍN, J. T. y B. E. JUNIPER (1970): *Edward Arnold*, London.
- MAY, D. W. y P. I. GILE (1909): *Puerto Rico Agr. Expt. Sta. Circ.*, 9.
- MAYAUDON, J., L. BATISTIC y J. M. SARKAR (1975): *Soil Biol. Biochem.*, 7: 291-286.
- MAYAUDON, J., M. EL-HALFAWI y M. A. CHALVIGNAC, M. A. (1973): *Soil Biol. Biochem.*, 5: 369-383.
- MEYER, J. A., E. D. GARBER y S. G. SHAEFFER (1964): *Botany Gaz.*, 125: 298.
- MILLS, C. y J. N. CAMPBELL (1974): *Can. J. Microbiol.*, 20: 81-90.
- MILES, J. R. W., C. M. TU y C. R. HARRIS (1969): *J. Econ. Entomol.*, 62: 1334-1338.
- McLAREN, A. D. (1972): *C.N.R. Conferenze*, 1.
- McLAREN, A. D. y E. F. ESTERMANN (1957): *Arch. Biochem. Biophys.*, 68: 157.
- McLAREN, A. D. y E. I. PARKER (1970): *Adv. Enzymol.*, 33: 245.
- McRAE, I. C. y M. ALEXANDER (1963): *J. Bacteriol.*, 86: 1231-1235.
- NAMDEO, K. N. y DUBE, J. N. (1973): *Ind. J. Exper. Biol.*, 11: 117-119.
- NAMDEO, K. N. y J. N. DUBE (1973): *Soil Biol. Biochem.*, 5: 805-859.
- NANNIPIERI, P., B. CECCANTI, S. CERVELLI y P. SEQUI: *Soil Biol. Biochem* (in corso di stampa).
- NANNIPIERI, P., S. CERVELLI y F. PEDRAZZINI (1975): *Experientia* 31: 513-515.
- NANNIPIERI, P., S. CERVELLI y A. PERNA (1974): *L'Agricoltura italiana* 73: 367.
- NANNIPIERI, P., R. L. JHONSON y E. A. PAUL (1978): *Soil Biol. Biochem.* (In stampa).
- NORSTADT, F. A., C. R. FREY y H. SIGG (1973): *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, 37: 880-885.
- PANCHOLY, S. K. y J. Q. LYND (1972): *Soil Biol. Biochem.*, 4: 257-259.
- PANCHOLY, S. K. y J. K. LYND (1973): *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, 37: 51-52.
- PANCHOLY, S. K. y E. L. RICE (1972): *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, 36: 536-537.
- PANCHOLY, S. K. y E. L. RICE (1973): *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, 37: 47-50.
- PAULSON, K. N. y L. T. KURTZ (1969): *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 33: 897.
- PAULSON, K. N. y L. T. KURTZ (1970): *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, 34: 70-72 (a); (1969), 33: 897-901 (b).
- PFENDER, F. K. y M. ALEXANDER (1972): *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 20: 842-846.
- POKORNA, V. (1964): *Pochvovedenie*, 1: 106-109.
- PRESSMAN, B. C. (1963): *J. Biol. Chem.*, 238: 401-409.
- RAGUOTIS, A. D. (1967): *Pochvovedenie*, 6: 51-57.
- RAMÍREZ-MARTÍNEZ, J. R. y A. D. McLAREN (1966): *Enzymologia*, 31: 23.
- RANKOV, V. y G. DIMITROV (1971): *Pochvozn. Agrokhim.*, 6: 93-98.
- ROGERS, H. T. (1942): *Soil Sci.*, 54: 439.
- ROZIN, M. y V. I. EGOROV (1972): *Pochvovedenie*, 3: 106-114.
- ROSS, D. J. (1965): *J. Soil Sci.*, 16: 86.
- ROSS, D. J. (1968): *Trans 9th Int. Congr. Soil Sci.*, Adelaide 3: 299-308.
- ROSS, D. J. (1976): *Soil Biol. Biochem.*, 8: 351-356.
- ROSS, D. J. y B. A. McNEILLY (1973): *N. Z. J. Sci.*, 16: 241-257.
- ROTTINI, O. T. (1933): *Atti della Soc. Italiana per il progresso delle Scienze, XXI Riunione*, Roma 1932, 2.
- ROTTINI, O. T. (1935): *Ann. Labor. Ferm.*, «Spallanzani», 3: 173.
- ROTTINI, O. T. y L. CARLONI (1953): *Ann. Sper. Agrar.* Roma, 7: 1789.
- ROWELL, M. J., J. N. LADD y E. A. PAUL (1973): *Soil Biol. Biochem.*, 5: 699-703.
- SMITH, A. E. y D. R. CULLIMORE (1974): *Canadian Journal of Microbiology*, 20: 773-776.
- SPOKES, J. R. y WALKER, N. (1974): *Archiv fur Mikrobiologie*, 96: 125-134.
- STILL, G. G., D. G. DAVIS y ZANDER, G. L. (1970): *Pl. Physiol.*, 46: 307-314.
- SATYNARAYANA, T. y L. W. GETZIN (1973): *Biochemistry*, 12: 1566-1572.
- SEQUI, P. (1974): *Italia Agricola*, 3: 91-109.
- SHAEFFER, R. (1963): *Ann. Inst. Pasteur*, 195: 326.
- SHCHATSMA, I. I. y T. F. KALIKINA (1972): *Dokl. Vses. Akad. Sel'skokhoz. Nauk*, 4: 15-16.
- SIMPSON, J. R. (1968): *Trans. 9th Int. Congr. Soil Sci.*, Adelaide 2: 459-466.
- SKUJINS, J. J. (1967): *Soil Biochemistry*, 1: 371-414.
- SKUJINS, J. (1973): *Bulletins from the Ecological Research Committee*, Sweden 17, 235-241.
- SKUJINS, J. J., L. BRAAL y A. D. McLAREN (1962): *Enzymologia*, 25: 125.
- SKUJINS, J. J. y A. D. McLAREN (1969): *Soil Biol. Biochem.*, 1: 89.
- SOMMERS, E. y R. J. PRING (1966): *Ann. Appl. Biol.*, 58: 457-466.
- SØRENSEN, H. (1957): *Acta Agr. Scand. Suppl.* 1: 1.
- SPRINODOV, Y. Y. y SPRINODOVA (1973): *Agrokhimiya*, 3: 122-131.
- STEFANIC, G. (1971): *Biol. Sol.*, 14: 10-11.
- STEVENSON, I. L. (1962): *Can. J. Microbiol.*, 8: 501.
- STEVENSON, I. L. y E. KATZNELSON (1958): *Bacteriol. Proc.*, 58: 10.
- STUBRAHMANYAN, V. (1927): *J. Agr. Sci.*, 17: 449.
- SUCIU, M. (1970): *Graduate Thesis*, Babes-Bolyai University Cluj.

- TABATABAI, M. A. y J. M. BREMNER (1969): *Soil Biol. Biochem.*, 1: 301-307 (b); 3: 317 (a).
- THENTE, B. (1970): *Lantbrukshogsk. Annlr*, 36: 401-418.
- TIEDJE, J. M., J. M. DUXBURY, M. ALEXANDER y J. E. DAWSON (1969): *J. Agr. Food. Chem.*, 17: 1021-1026.
- TROJANOWSKI, J. y J. MARTWIJOW (1964): *Roczniki Gleboznawcze*, 14 (suppl), 45.
- TSIRKOV, I. (1970): *Pochvozn. Agrokhin*. 4: 85-88.
- TYLER, G. (1974): *Pl. Soil*, 41: 303-311.
- VERMA, L., J. P. MARTÍN y K. HAIDER (1975): *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, 39: 279-284.
- VLASYUK, P. A., K. M. DOBROTIVORSKAYA y S. A. GOR-
DIENKO (1957): *Dokl. Vses. Akad. Selskokhoz. Nauk*, 22 (3), 14.
- VOJINOVIC, Z., J. POCHON y J. TARDEUX (1961): *Ann. Inst. Pasteur*, 101: 801.
- WALKER, N. (1982): In *Advances in Agricultural Microbiology* N. S. Subba Rao, 377-395.
- WILKINSON, R. E. y W. S. HARDCASTLE (1970). *Weed. Sci.*, 18: 125-128.
- ZANTIUA, M. I. y J. M. BREMNER (1976): *Soil Biol. Biochem.*, 8: 369-374.
- ZINCHENKO, V. A. y OSINSKAYA, T. V. (1969): *Agrokhi-miya*, 9: 94-101.