

BIOQUIMICA DE SUELOS DERIVADOS DE CENIZAS VOLCANICAS.
VII. DETERMINACION DE DESHIDROGENASAS¹

Biochemistry of soils derived from volcanic ashes.

VII. Dehydrogenases determination

María Aguilera S.², Gilda Borie B.², Pamela Rokov C.³ y Pedro Peirano V.²

SUMMARY

Dehydrogenase and respiratory activities were studied in six soils, five of volcanic origin and the other alluvial, as a reference. Dehydrogenase activity was measured by the reduction of 2, 3, 5-Triphenyl Tetrazolium Chloride (TTC) to Triphenylformazan (TFF). TFF being deep red, facilitates its quantification by spectrophotometry.

The Osorno soil exhibited the highest contents of dehydrogenases, followed by Corte Alto, Frutillar and Arrayán, all of them being of volcanic origin and having high content of organic matter. Puerto Octay showed values similar to Olivos, which is alluvial and of a low content of organic matter.

The effect of humidity levels on dehydrogenases content varied according to soil characteristics. TFF adsorption by these soils turned out to be very high.

INTRODUCCION

En general, altos contenidos de materia orgánica (m. o.) en los suelos, correlacionan con niveles altos de fertilidad. Lo anterior no siempre ocurre en suelos derivados de cenizas volcánicas, lo que se explicaría porque, pese al gran contenido de m.o. que presentan, ésta no ofrece un adecuado aporte de C disponible, dado su alto grado de humificación. Por otra parte, estos suelos presentan carencia de nutrientes, como P y N, fenómeno al cual no es ajena la influencia de esta m.o. altamente estabilizada.

Estas características de la m.o. de los suelos derivados de cenizas volcánicas, han motivado estudios sistemáticos sobre su dinámica y los factores que la afectan.

Se ha estudiado, en suelos volcánicos chilenos, la microflora y su actividad, la cantidad y calidad de la m. o., las modificaciones que experimenta la actividad biológica al adicionar nutrientes, etc. (Borie, Quinteros y Aguilera, 1983; Martín y otros, 1982; Milla, 1985; Zunino y otros, 1982a y b).

Entre los métodos de estudio más adecuados para conocer la dinámica de la m.o., figura la medición de diversas actividades enzimáticas, ya que la estabilización o degradación de ella depende, fundamentalmente, de procesos biológicos, en los que las enzimas juegan un importante papel. Debido a esto, se han estudiado muchas enzimas que están relacionadas con el movimiento del C y de otros nutrientes en los suelos. Así, se ha descrito la actividad de las fosfatasas, ureasas, nitrogenasas y oxidoreductasas, entre las que se pueden destacar las polifenoloxidasas, deshidrogenasas y peroxidasas. Estas oxidoreductasas cumplen un papel preponderante en los procesos de formación o degradación de la m.o. y, más específicamente, del humus (Burns, 1978).

Las deshidrogenasas (DH) son enzimas que catalizan la deshidrogenación con gran especificidad y cumplirán

¹ Recepción de originales: 30 de julio de 1987.

Investigación financiada por el Departamento de Investigación y Bibliotecas, Dirección General Académica y Estudiantil, U. de Chile.

² Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, U. de Chile, Casilla 233, Santiago, Chile.

³ Memorista para optar al título de Químico-Farmacéutico de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, U. de Chile.

un significativo rol en la oxidación de la m.o. del suelo, ya que la oxidación biológica de compuestos orgánicos es, generalmente, un proceso de deshidrogenación, que se efectúa a través de la acción de distintos tipos de DH (Tabatabai, 1982). Todos los procesos de deshidrogenación pueden ser presentados como sigue:



XH₂: compuesto orgánico (dador de hidrógenos)

A: aceptor de hidrógenos

Por lo tanto, las DH son enzimas que transfieren hidrógeno desde un dador a un aceptor.

Sobre la actividad de las DH en suelos, se ha encontrado que guarda relación especialmente con su m.o. y fertilidad y con la actividad de la biomasa. Wada, Saito y Takai (1978) pudieron observar que la acción enzimática de las DH está íntimamente ligada a la m.o.; sin embargo, dicha relación no es uniforme, ya que depende del tipo de m.o. (Skujins, 1978, Tabatabai, 1982).

En general, la actividad de las DH sería un buen índice de actividad biológica (Okazaki, Hidrata y Tensho, 1983). En suelos con alto contenido de m.o., hay una buena correlación de actividad de las DH con los niveles de fertilidad y productividad (Bolton y otros, 1985). Sin embargo, Moore y Russell (1972) no encontraron correlaciones claras en ese sentido.

Como es natural, dicha actividad guarda relación directa con la biomasa del suelo: sin embargo, ello no implica que toda la biomasa participa en igual medida, ya que depende fundamentalmente de la naturaleza de la microflora y, en alguna medida, del habitat en que ésta se desarrolla. Es así como algunos autores

encontraron una correlación directa entre actividad de las DH y el recuento microbiológico total (Skujins, 1978; Tabatabai, 1982) y, en otros suelos en cambio, no existe dicha relación (Ladd, 1978). Por otra parte, Casida, Klein y Santoro (1964) encontraron que dicha actividad enzimática estaba muy ligada a la población bacteriana, especialmente a los gram positivos, pero no a la de hongos y actinomicetes.

Al estudiar la actividad enzimática en suelos, se ha podido observar que ella es muy sensible a una serie de factores ambientales, como son temperatura, grado de humedad, acidez del suelo, presencia o carencia de algunos iones, por ser ellos contaminantes o nutrientes para la microflora del suelo, etc. (Dkhar y Mishra, 1983; Tabatabai, 1982). Por lo tanto, cualquier estudio enzimático debe contemplar estos factores y los resultados que se obtengan, tienen la validez de mediciones relativas para el estudio en particular.

El presente trabajo tuvo como objetivo montar la técnica para determinar DH, descrita por Casida y otros (1964), para ser usada en suelos volcánicos chilenos. Con la técnica ya establecida, se mide luego la actividad DH en cinco de estos suelos y en un suelo aluvial, usado como valor comparativo. Además, se hace un estudio de la variación que experimenta dicha actividad al modificar el grado de humedad a que se somete habitualmente un suelo en el laboratorio; o sea, con su humedad original, seco al aire y con 60% de su capacidad de retención de agua.

Con esto, esperamos determinar una nueva variable biológica, que permita profundizar los conocimientos sobre la dinámica de la m.o. en suelos derivados de cenizas volcánicas.

Entre las características importantes de los suelos de origen volcánico, está la gran actividad superficial debido a los muchos materiales amorfos o de baja cristalinidad que ellos poseen. Por ello, es de interés incluir un breve estudio sobre la capacidad de adsorción que presentan sobre el producto final coloreado, originado por la actividad de las DH.

MATERIALES Y METODOS

- Suelos: Se usaron 6 muestras recolectadas en diciembre de 1984. Algunas de sus características químicas se indican en el Cuadro 1 (más adelante).
- Determinaciones realizadas:
 - a. Humedad: por pérdida de peso a 105° C durante 24 hr.

CUADRO 1. Características de los suelos utilizados y su actividad de deshidrogenasas

TABLE 1. Properties of the soils under study and its dehydrogenase activity

Suelo	pH	CRA o/o	C orgánico o/o	DH µg TFF/g
Osorno	5,6	111,10	8,5	335
Corte Alto	5,7	122,30	9,3	150
Pto. Octay	5,9	97,93	7,2	3
Arrayán	6,5	65,16	5,9	83
Frutillar	5,4	118,24	9,7	178
Olivos	5,7	35,19	1,5	3

CRA: capacidad de retención de agua

b. Capacidad de retención de agua (CRA): se pesa un filtro-crisol de Gooch de 50 ml, con aproximadamente 10 g de suelo seco y tamizado. Luego se humecta el suelo, por capilaridad, hasta que la superficie de éste se vea totalmente húmeda; se deja reposar el filtro-crisol sobre papel filtro, para eliminar el exceso de humedad y se pesa. La diferencia de peso se considera equivalente a la CRA de la muestra.

c. Carbono orgánico: por el método de combustión seca.

d. pH: en la pasta saturada con H₂O.

e. Deshidrogenasa: se pesa el equivalente a 3,0 g de suelo seco, en un frasco de vidrio de 30 ml, con tapa rosca. Se adiciona Ca(OH)₂, en la cantidad adecuada para llevar el suelo a pH cercano a 8,5, que es el óptimo para la determinación de DH. Se agrega 0,5 ml de TTC (2, 3, 5-Trifenil Tetrazolio 3^o/o p/v) y agua destilada suficiente para humectar (aproximadamente 1,7 ml). Se homogeniza y se incuba a 37° C durante 24 hr. El Trifenil Formazán (TFF) formado durante el proceso, se extrae con 5 ml de metanol, se agita el frasco durante 1 min, se deja reposar 3 min y se filtra, recibiendo el filtrado en un matraz aforado de 50 ml. Se repite el proceso extractivo seis veces más, para extraer todo el formazán producido. Luego, se enrasa con metanol y se lee en un espectrofotómetro a 480 nm, contra un blanco de metanol.

Curva patrón: se prepara una solución patrón de 40 ppm de TFF disuelto en metanol y a partir de ésta se preparan soluciones de 2, 4, 8, 12 y 20 ppm. Se leen estas soluciones a 480 nm, contra un blanco de metanol.

f. Adsorción de TFF: a muestras de suelo al 60% de su CRA y a muestras de suelos secas al aire, ambas equivalentes a 1,6 g de suelo seco, se les agrega 0,292 mg de TFF disuelto en metanol. La suspensión se deja a 37° C durante 24 hr y se extrae el TFF con metanol, como se describe en el procedimiento antes señalado.

RESULTADOS Y DISCUSION

El pH óptimo para la determinación de DH en suelos varía entre 7,4 y 8,5 (Ross, 1971). En la técnica descrita por Casida y otros (1964), se propone utilizar 200 mg de CaCO₃ por cada 20 g de suelo, para obtener el rango de pH antes señalado.

Esta cantidad de base resulta insuficiente para alcalinizar los suelos derivados de cenizas volcánicas, por su grado de acidez y por su capacidad de estabilizar el pH, como consecuencia de su alto contenido en

m.o.; por ello, se utilizó Ca(OH)₂, determinándose previamente para cada suelo, la cantidad necesaria para llegar al pH óptimo señalado.

En cuanto a la extracción del formazán producido por la DH, ésta se logra con eficiencia mediante 7 extracciones sucesivas, con porciones frescas de metanol.

En el Cuadro 1, se presenta algunas características de los suelos estudiados, como pH, CRA, contenido de C orgánico y su actividad en DH.

Interesa destacar el valor elevado en actividad de DH del suelo Osorno, seguido por los valores alcanzados en suelos Frutillar, Corte Alto y Arrayán. Estos cuatro suelos tienen un alto contenido de m.o., lo que podría indicar una buena correlación entre estos dos factores. Sin embargo, escapa a la tendencia anteriormente destacada, el suelo Puerto Octay, que presenta una actividad en DH semejante a la del suelo aluvial Olivos, de bajo contenido de m.o.

Naturalmente, el muestreo fue insuficiente para obtener conclusiones definitivas sobre la relación m.o.—DH en suelos chilenos derivados de cenizas volcánicas y será necesario trabajar un mayor número de muestras para establecer conclusiones más válidas al respecto.

En trabajos anteriores (Zunino y otros, 1982a), relacionados con la determinación de actividades biológica o bioquímica de suelos, se constató que el trabajar con las muestras reguladas a una humedad equivalente al 60% de la CRA y manteniendo todo el sistema en incubación a 22° C, se logran condiciones óptimas para la medición de actividad respiratoria, medida como evolución de CO₂ desde el sistema suelo.

Con el objeto de comprobar si las condiciones de temperatura y humedad son determinantes para poner en evidencia la actividad de DH, se diseñó una experiencia que permite comparar los valores de esta actividad enzimática, cuando se aplica la técnica de Casida a muestras de suelo fresco, de suelo secado al aire y de suelo secado al aire y rehumectado posteriormente al 60% de su CRA y mantenido así por 24 hr, a 22° C.

En el Cuadro 2, se indica las humedades resultantes de los diferentes tratamientos para cada suelo y en el Cuadro 3, se encuentra los valores de la actividad en DH para las mismas muestras. Destaca que en las muestras rehumectadas al 60% de su CRA, los valores de DH son en general similares o superiores a los medidos en muestras frescas. Esto demuestra que un aumento importante en la humedad y temperatura de la muestra (Cuadro 2) es, en la mayoría de los casos, favorable y estimula una mayor actividad enzimática.

CUADRO 2. Contenido de agua (0/o) de los suelos utilizados

TABLE 2. Water content (0/o) of soils under study

Suelo	Muestra fresca	Muestra seca al aire	Muestra humedecida al 60°/o CRA
Osorno	32,73	22,73	66,70
Corte Alto	30,35	18,99	73,40
Pto. Octay	45,65	27,37	68,60
Arrayán	20,20	11,74	39,10
Frutillar	50,61	26,54	70,90
Olivos	5,03	5,03	21,10

CRA: capacidad de retención de agua

El secado al aire provoca un comportamiento errático en la actividad en DH de los diferentes suelos; en algunos casos, ésta disminuye y en otros se mantiene o aumenta.

Llama la atención el suelo Frutillar, pues presenta un gran aumento de actividad enzimática al ser secado al aire, pero luego al ser rehumectado al 60°/o de su CRA, la actividad vuelve a cifras semejantes a las del suelo fresco. Como explicación para este comportamiento, se puede aceptar que la humedad tan alta que posee el suelo Frutillar fresco es el factor limitante para el desarrollo de la microflora involucrada con la actividad de DH.

CUADRO 3. Actividad de deshidrogenasas en los suelos utilizados y variación que experimenta ante cambios de humedad

TABLE 3. Studied soils' dehydrogenase activity and its variation with changes in water content

Suelo	µg de formazán/g de suelo seco		
	Muestra fresca	Muestra seca al aire	Muestra humedecida al 60°/o CRA
Osorno	337	335	335
Corte Alto	98	19	150
Pto. Octay	2	2	3
Arrayán	23	50	83
Frutillar	164	341	178
Olivos	3	3	3

CRA: capacidad de retención de agua

Desde este mismo punto de vista, cabe destacar el comportamiento del suelo Osorno: presenta un elevado valor en actividad de DH y su biomasa tiene la capacidad de mantener alta esta actividad enzimática, en un amplio rango de variación de humedad.

En el Cuadro 4, se presenta los resultados de la adsorción de TFF por los suelos. Destaca la intensidad de la adsorción y la similitud de comportamiento entre los distintos suelos y tipos de muestras, con la excepción del suelo Arrayán. Si excluimos éste último, podría aproximarse a una adsorción del 75°/o para los suelos secos y un 86°/o para los suelos húmedos.

Finalmente, se puede concluir que la determinación de DH propuesta es una excelente variable bioquímica para medir actividad biológica de un suelo y que los valores de DH entregados por esta técnica presentan un error por defecto, cosa que probablemente puede ocurrir con los datos de la literatura. No obstante, estimamos que dada la similitud del fenómeno de adsorción encontrado, los valores de DH permiten establecer comparaciones válidas.

Sería de interés estudiar un mayor número y variedad de suelos, para establecer un factor de corrección general, que permita tomar valores reales de actividad DH.

CUADRO 4. Adsorción (0/o) de trifenilformazán en los suelos utilizados

TABLE 4. Triphenyl formazan adsorption (0/o) in the soils under study

Suelo	Muestra seca al aire	Muestra humedecida al 60°/o CRA
Osorno	75,00	84,80
Corte Alto	69,70	87,10
Pto. Octay	78,10	87,50
Arrayán	17,20	52,60
Frutillar	75,60	87,80
Olivos	78,90	84,00

CRA: capacidad de retención de agua

RESUMEN

Se estudió la actividad de deshidrogenasas (DH) en seis suelos chilenos, cinco de origen volcánico y uno aluvial, a modo de comparación. La actividad de DH fue medida por la reducción de cloruro de 2, 3, 5-trifeniltetrazolio (TTC) a trifenilformazán (TFF), que es de intenso color rojo, lo que permite su cuantificación por espectrofotometría.

Los contenidos más altos de DH se encontraron en el suelo Osorno, seguido por Corte Alto, Frutillar y Arrayán, todos ellos de origen volcánico y con alto

contenido de m.o. El suelo Puerto Octay presentó valores similares al Olivos, que es de origen aluvial y con bajo contenido de m.o.

Se estudió el efecto del grado de humedad de las muestras en el contenido de DH y se encontró que se producen variaciones que son dependientes de las características del suelo. Finalmente, se estudió la adsorción de TFF en estos suelos y se encontró que este fenómeno se manifiesta con gran intensidad.

LITERATURA CITADA

- BOLTON Jr., H.; ELLIOT, L. F.; PAPENDICK, R. J.; and BEZDICEK, D.F. 1985. Soil microbial biomass and selected soil enzyme activities: Effect of fertilization and cropping practices. *Soil Biol. Biochem.* 17 (3): 297-302.
- BORIE, F.; QUINTEROS, J. y AGUILERA, M. 1983. Bioquímica de suelos derivados de cenizas volcánicas. IV. Solubilización de fosfatos por hongos del suelo. *Agricultura Técnica (Chile)* 43 (4): 371-376.
- BURNS, R.G. 1978. *Soil Enzymes*. Academic Press, London.
- CASIDA Jr., L. E.; KLEIN, D. A.; and SANTORO, T. 1964. Soil dehydrogenase activity. *Soil Sci.* 98: 371-376.
- DKHAR, M.S. and MISHRA, R.R. 1983. Dehydrogenase and urease activities of maize (*Zea mays* L.) field soils. *Plant and Soil* 70: 327-333.
- LADD, J. N. 1978. Origin and range of enzymes in soil. En: R.G. Burns (Ed.), *Soil Enzymes*. Academic Press, London p.: 61.
- MARTIN, J.P.; ZUNINO, H.; PEIRANO, P.; CAIOZZI, M.; and HAIDER, K. 1982. Decomposition of ¹⁴C-labeled lignins. Model humic acid polymers, and fungal melanins in allophanic soils. *Soil Biol. Biochem.* 14: 289-293.
- MILLA, P. 1985. Dinámica de la materia orgánica de suelos volcánicos chilenos. Estudio de los métodos de extracción y técnicas de determinación de hidratos de carbono. Fac. de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, U. de Chile (Tesis para optar al título de Químico-Farmacéutico).
- MOORE, A.W. and RUSSELL, J. S. 1972. Factors affecting dehydrogenase activity as an index of soil fertility. *Plant and Soil* 37: 675-682.
- OKASAKI, M.; HIDRATA, E.; and TENSHO, K. 1983. TTC reduction in submerged soil. *Soil Sci. Plant Nutr.* 29 (4): 489-497.
- ROSS, D. J. 1971. Some factors influencing the estimator of dehydrogenase activities of some soils under pasture. *Soil Biol. Biochem.* 3: 97-110.
- SKUJINS, J. 1978. History of abiotic soil enzyme research. En: R.G. Burns (Ed.) *Soil Enzymes*. Academic Press, New York. p.: 1-33.
- TABATABAI, M. A. 1982. Soil enzymes. En: A.L. Page, R.H. Miller, and D.R. Keeney (Ed.), *Methods of soil analysis, Part 2. Chemical and microbiological properties*. p.: 937-940.
- WADA, H.; SAITO, M.; and TAKAI, Y. 1978. Effectiveness of tetrazolium salts in microbial ecological studies in submerged soil. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 24 (3): 349-356.
- ZUNINO, H.; BORIE, F.; AGUILERA, S.; MARTIN, J.P., and HAIDER, K. 1982a. Decomposition of ¹⁴C-labeled glucose, plant and microbial and phenols in volcanic ash-derived soil of Chile. *Soil Biol. Biochem.* 14: 17-41.
- ZUNINO, H.; BORIE, F.; AGUILERA, M.; PEIRANO, P.; CAIOZZI, M. y MARTIN, J.P. 1982b. Bioquímica de suelos derivados de cenizas volcánicas. I. Ecología microbiana y su relación con algunas propiedades físico-químicas de ellos. *Agricultura Técnica (Chile)* 42 (1): 55-60.