

ENZIMAS NO SOLO¹

Wanderley José de Melo²

RESUMO

Os estudos sobre as exoenzimas do solo tiveram início apenas no final do século passado a se desenvolverem mais em países da Europa como Bélgica, Alemanha, França, União Soviética. Nos Estados Unidos da América, apenas em 1965 ocorreu a primeira citação sobre enzimas do solo. As exoenzimas do solo são produzidas pelos seres vivos que o habitam, os quais as excretam para o meio ambiente com finalidades metabólicas, tais como a degradação de moléculas de elevado peso molecular. Por outro lado, a lise de células mortas ou alteradas na permeabilidade da membrana celular também libera enzimas para o ambiente do solo, as quais aí permanecem, ativas, por um período variável de tempo, dependendo das condições reinantes, e, de um modo geral, complexadas aos seus colóides orgânicos ou inorgânicos. Nestas condições, há de se supor que medidas de avaliação da atividade de uma determinada enzima ou de suas características cinéticas possam se constituir em um mecanismo para se avaliar a fertilidade de um solo ou seu estado de atividade biológica. Com esta finalidade, várias enzimas têm sido estudadas, como proteases, celulase, urease, fosfatases, sulfatases, mas, à medida que se amplia o conhecimento sobre o comportamento destas enzimas, mais difícil tem se tornado fazer generalizações a respeito de fertilidade do solo. Outro aspecto a se considerar com relação às exoenzimas do solo é sua atuação sobre insumos agrícolas a ele adicionados direta ou indiretamente, assim como sobre poluentes industriais ou agroindustriais. Hoje se sabe, por exemplo, que grande parte do fertilizante nitrogenado usado na forma de uréia pode se perder devido à ação da urease. A luz dos conhecimentos atuais sobre as exoenzimas do solo, o que se pode concluir é que os estudos sobre as mesmas podem levá-las a se constituírem em importante ferramenta para o manejo adequado do solo, dos insumos agrícolas a dos poluentes, havendo, contudo, muito a se fazer para se atingir tal objetivo.

¹ Trabalho publicado em MONIZ, A.C. et al. (eds). A responsabilidade social da Ciência do Solo. Campinas, Sociedade Brasileira de Ciência do solo, 1988. p. 365-378.

² Prof. Titular em Biogeoquímica junto ao Departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal.

SUMMARY

Soil enzymes

The first reports on extracellular soil enzymes appeared in the late last century mainly in Western and Eastern Europe (Belgium, Germany, France, Rumania, USSR). In the United States of America the first citation on soil enzymes occurred in 1965. Soil organisms excrete enzymes to the soil environment with metabolic purposes as the degradation of high molecular weight molecules. On the other hand, the lysis of dead cells or membrane alterations on the permeability of living organisms, also contribute to the soil extracellular enzyme bulk. These enzymes can be complexed by the soil components and stay active for long periods of time. On this way, it is supposed that the soil enzyme properties may be used as a parameter for soil fertility or soil biological activity evaluation. With this goal, some soil enzymes as cellulase, urease, phosphatase, sulphatase, protease have been studied. However, as research and knowledge on soil enzymes advance more difficult has been to make generalizations about their use for soil fertility purposes. Another view about soil enzymes is related to their ability to decompose agrochemicals and pollutants. We know that a high percentage of the urea nitrogen fertilizer is lost from the soil and that urease has an important participation in this process. Though, there is no doubt that the studies on soil enzymes will contribute significantly for an adequate amendment of the soil, use of agrochemicals and control of pollutants. In this paper we made some considerations about the origin and the state of the soil enzymes, the enzymatic kinetics, the methods for their study, the effect of agrochemicals on soil enzyme activity, the use of enzymes properties as an index for soil fertility evaluation.

INTRODUÇÃO

O solo é um sistema complexo, onde coabitam seres vivos das mais diferentes espécies, interagindo entre si e com as partículas que o constituem. Neste mesmo sistema existe, ainda, a água, os sais nela dissolvidos, e o ar atmosférico.

Os seres vivos que habitam o solo mantêm uma troca contínua de substâncias com o meio. Por outro lado, ao morrerem, ocorre a lise da parede celular, com a liberação do material que os constituía.

Dentre as diferentes substâncias que os organismos liberam para seu ambiente está um grupo muito complexo de proteínas que são as enzimas.

Há evidências de que algumas enzimas podem continuar ativas dentro da célula, mesmo após sua morte. Desta maneira, um substrato existente no solo, ao se difundir para o interior da célula já morta, pode ser transformado e, posteriormente, liberado.

As enzimas excretadas para fins metabólicos durante os processos vitais, ou mesmo após a morte celular, podem permanecer ativas no solo por um certo período. Neste grupo de enzimas, chamadas extracelulares, exoenzimas ou abióticas, não estão apenas as em estado livre ou as ligadas a componentes inertes do solo, mas também as que se mantêm ativas dentro de células já mortas ou ligadas a fragmentos celulares.

Kiss et al. (1972, 1975) fizeram distinção entre atividade devida a enzimas acumuladas e a microrganismos em proliferação. Assim, surgiu o termo enzimas acumuladas, que são aquelas presentes e ativas em um solo no qual não está havendo proliferação de microrganismos. Esta terminologia inclui as enzimas que têm função extracelular (livres na solução do solo ou ligadas a seus constituintes orgânicos ou inorgânicos), as que estão presentes em fragmentos celulares e as que estão presentes em células mortas ou em células viáveis, mas que não se encontram em proliferação.

O conhecimento sobre as enzimas do solo e seu papel no ciclo dos nutrientes vegetais e de outros elementos do solo ainda se encontra muito atrasado, quando comparado com o conhecimento sobre enzimologia animal ou mesmo da vegetal.

A primeira notícia sobre o estudo de enzimas no solo parece ser devida a Woods que, em 1899, escreveu: "eu também tenho determinado por experimentação que enzimas oxidantes, especialmente a peroxidase, pode ocorrer no solo, e como regra, não são destruídas pelo decaimento natural das bactérias. Estas enzimas entram no solo através da morte de raízes e outras partes das plantas que as contenham" (Skujins, 1978).

Os primeiros estudos sobre enzimologia de solo foram dedicados principalmente a catalase, provavelmente pela facilidade de sua detecção e pela falta de conhecimento sobre outras enzimas. Nos 50 anos subsequentes, trabalhos sobre atividade enzimática no solo apareceram de modo esporádico na literatura, envolvendo catalase, urease, fosfatase e outras enzimas.

Apesar das contribuições de Waksman e outros pesquisadores americanos para a biologia e bioquímica do solo, este ramo da ciência permaneceu quase estagnado nos Estados Unidos por muito tempo [a primeira citação foi feita por Porter (1965)], tendo se desenvolvido mais em países europeus (Bélgica, Alemanha, França, Romênia e União Soviética).

Dois grupos podem ser citados por terem dado ímpeto às pesquisas em enzimologia do solo: V.F. Kuprevich, na União Soviética, E. Hoffmann e G. Hoffmann, na Alemanha. Outros que também merecem ser citados são os de Galstyan, na Armênia, a Kiss, na Romênia.

Com o incremento do uso de produtos químicos na agricultura e o advento de poluentes industriais, incluindo os pesticidas, houve um aumento no interesse da pesquisa sobre as interações entre estas substâncias e as enzimas do solo. Um dos primeiros trabalhos parece ser o de Rotini & Galoppini (1967), que estudaram a decomposição de detergentes sintéticos (dioctilsulfossucinato de sódio), encontrando a existência de enzimas que catalisam tal decomposição. Atualmente existe disponível, na literatura, uma série muito grande de

trabalhos, enfocando a atuação das enzimas extracelulares sobre herbicidas, como se pode observar na extensa revisão realizada por Kiss et al. (1975). A ação de metais pesados sobre as enzimas do solo também tem sido relatada por uma série grande de pesquisadores.

Hoje as questões que pairam no ar, com relação às enzimas extracelulares, dizem respeito ao mecanismo de sua estabilização no solo; ao papel das mesmas em relação à fertilidade do solo e à nutrição das plantas; a relação enzima extracelular-raiz; e a sua contribuição para o ciclo da matéria orgânica e a formação de húmus.

Um conhecimento mais profundo da atuação destas poderá fornecer subsídios para respostas sobre o ciclo de nutrientes no solo e a nutrição de plantas.

ORIGEM E FORMA DE OCORRÊNCIA DAS ENZIMAS

Origem - As enzimas existentes no solo têm origem nos microrganismos, vegetais ou animais.

Muitos microrganismos do solo produzem enzimas extracelulares para degradar biomoléculas de elevado peso molecular que os mesmos não conseguem absorver de modo direto. Estudos com *A. orizae* revelaram que enzimas são liberadas em uma certa seqüência: carbohidrase e fosfatase, proteases e esterases, catalase.

A catalase é considerada tipicamente endocelular, mas tem sido encontrada de forma livre no meio. A invertase normalmente fica na superfície da célula, mas várias espécies de *Saccharomyces* a produzem de forma extracelular. Os vegetais são os maiores fornecedores desta enzima para o solo.

As enzimas que fazem parte do conteúdo celular são liberadas após a morte da célula, devido à lise ou a alterações na permeabilidade celular.

Os fisiologistas vegetais têm evidenciado que raízes de plantas excretam enzimas para a rizosfera com finalidades nutricionais e outras não conhecidas, ou por destruição da membrana celular. As raízes de plantas são citadas como fontes de catalase, tirosinase, asparaginase, urease, amilase, invertase, protease, lipase, dentre outras. Em 1919, Knudson & Smith, citados por Skujins (1978), relataram a excreção de amilase por raízes de plantas, o mesmo ocorrendo com relação à invertase.

Em teste para fosfatase ácida com solo da rizosfera de trigo, demonstrou-se que a enzima estava localizada na plasmalena, nas membranas celulares de bactérias e nas células corticais externas das raízes. O produto da reação também esteve associado a pequenos fragmentos de matéria orgânica, que poderiam ser de membrana celular vegetal (Ladd, 1978). Estermann & McLaren (1961) examinaram a distribuição de fosfatase, invertase e urease entre as raízes e a rizosfera de plantas de cevada, concluindo que a fosfatase e a invertase poderiam ser atribuídas principalmente as raízes, enquanto que a urease, aos organismos da rizosfera.

De uma maneira geral, a atividade de enzimas extracelulares têm sido mais elevada no ambiente da rizosfera do que no solo adjacente, não se sabendo se isto se deve aos microrganismos existentes, as raízes, ou a ambos.

A contribuição da fauna do solo tem sido muito pouco estudada. Sabe-se, por exemplo, que os vermes contribuem com atividade de invertase, principalmente nas camadas superiores, e que as formigas o fazem muito pouco.

Hoje, a consideração mais difundida é que os microrganismos se constituem na maior fonte de enzimas do solo.

Existem, ainda, dificuldades metodológicas muito sérias para se caracterizar com precisão a origem de uma determinada atividade enzimática no solo.

Forma de ocorrência - Quando uma proteína enzimática é liberada para o solo, ela pode ser imediatamente metabolizada pelos microrganismos ou se associar física ou quimicamente aos colóides já presentes, o que a torna mais estável e inacessível a inibidores e extratores. Assim, cerca de um terço do nitrogênio do solo pode estar na forma de complexos protéicos com colóides.

As enzimas, assim complexadas, podem ser liberadas para a solução do solo, com perda pequena de atividade.

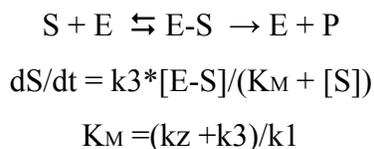
Em 1959, Hoffmann realizou experimentos de fracionamento com a finalidade de localizar a fração do solo com maior atividade enzimática. Para a carbohidrase, o pico de atividade se situou na fração silte, enquanto que, no caso da urease, a fração enriquecida era a argila (Skujins, 1978). Satyanarayana & Getzin (1973) extraíram uma esterase hidrolítica do malathion e concluíram que se tratava de um complexo proteína-carboidrato, estável e persistente no solo. Mayaudon & Sarkar (1974) extraíram difenol oxidases na forma de complexo ácido húmico-proteína.

A urease aparece na forma de partículas coloidais orgânicas, se os poros forem suficientemente grandes para água, uréia e amônia, mas pequenos para impedir a entrada de enzimas proteolíticas. Estes constituintes podem ser considerados como húmus nativo.

Parece que as enzimas se complexam ao húmus por meio de ligações iônicas, covalentes ou de hidrogênio, sendo que a maior parte da atividade das enzimas extracelulares do solo é estabilizada na forma de complexos húmico-protéicos.

Cinética enzimática - As enzimas extracelulares fazem parte de um sistema heterogêneo, no qual as reações ocorrem nas interfaces sólido/ líquido. Nestas condições, não são todas as moléculas de substrato que se encontram disponíveis, pelo menos de imediato, para a formação do complexo enzima-substrato. Por outro lado, há que se levar em consideração o fato de, durante as determinações das constantes de reação, ter ou não havido proliferação de microrganismos. As cargas existentes na superfície dos colóides do solo e na própria molécula do substrato também devem ser levadas em consideração.

Para caracterizar a atividade de uma determinada enzima do solo, alguns autores têm feito uso da cinética clássica de Michaelis-Menten (determinação de K_M , que vem a ser a concentração de substrato que faz com que a reação ocorra com a metade de sua velocidade máxima). Este modelo clássico de cinética pode ser assim resumido:



S= substrato

E= enzima

E-S= complexo enzima-substrato

P= produto

K_M = constante de Michaelis

k_1 , k_2 , k_3 = constantes de equilíbrio da reação

Contudo, a cinética usada para enzimas em solução nem sempre pode ser aplicada a sistemas heterogêneos.

Tabatabai & Bremner (1971) determinaram o K_M para arilsulfatase (substrato p-nitrofenilsulfato de potássio) e para fosfatase (substrato p-nitrofenilfosfato de sódio), encontrando, para ambos os casos, valores diferentes para diferentes tipos de solo. Quando a incubação era levada a efeito sem agitação, o K_M para arilsulfatase, nos nove solos estudados, variou de $1,37 \cdot 10^{-3}$ M a $5,69 \cdot 10^{-3}$ M, enquanto que, para a fosfatase, a variação foi de $1,26 \cdot 10^{-3}$ M a $4,58 \cdot 10^{-3}$ M. A agitação durante a incubação determinou diminuição nos valores de K_M e reduziu a variação entre solos, aumentando os valores de V_{max} .

Tabatabai (1973) realizou estudos semelhantes com a urease. Em ambos os casos ficou evidente que as condições experimentais e o comportamento do solo introduziram parâmetros não considerados na avaliação do K_M e da velocidade máxima de reação. Melo et al. (1983) estudaram a atividade de amilase em quatro solos de região tropical, verificando que a cinética enzimática seguiu o modelo de Michaelis-Menten (Figura 1).

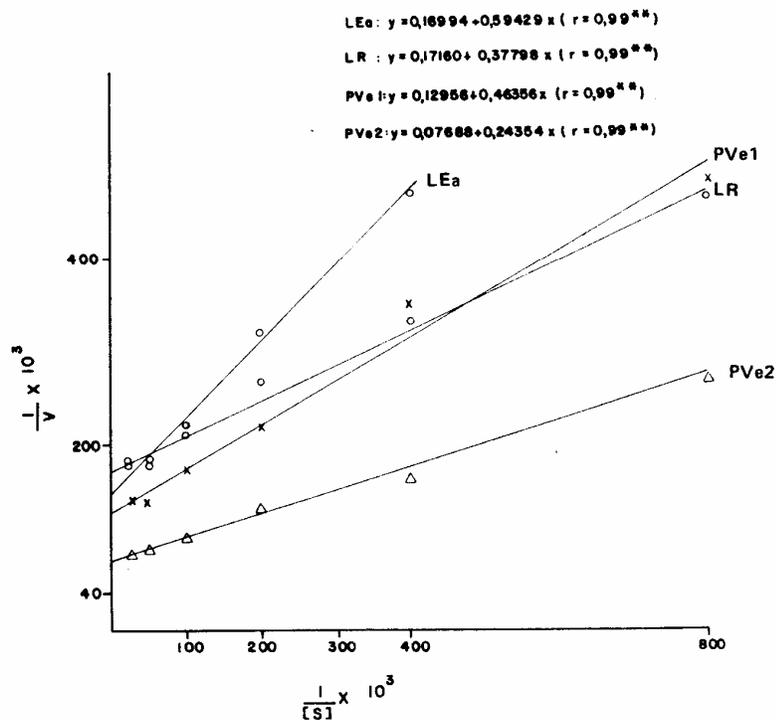


Figura 1. Equações de Lineweaver-Burk para atividade de amilase (Melo et al., 1983). LEa: latossolo vermelho-escuro textura média; LR: latossolo roxo; PVe₁: podzólico vermelho-amarelo eutrófico, relevo fortemente ondulado; PVe₂: podzólico vermelho-amarelo eutrófico, relevo suavemente ondulado.

Paulson & Kurtz (1970) aplicaram a cinética de Michaelis-Menten para urease e evidenciaram a possibilidade de se distinguir valores de K_M para a atividade de microrganismos em proliferação e para enzimas abiônicas.

Com o objetivo de se determinar o valor de K_M para reações enzimáticas no solo, têm surgido metodologias novas, como o uso das isotermas de absorção de Freundlich ou o método do gotejamento em coluna.

Cervelli et al. (1973) determinaram o valor de K_M para a fosfatase ácida (usando como substrato fosfato de p-nitrofenil), considerando a absorção do substrato pelo solo através da isoterma de Freundlich. Encontraram valores de K_M variando de $9,7 \cdot 10^{-3}$ a 10^{-2} M, enquanto que os valores de K_{MC} variaram de $0,35 \cdot 10^{-3}$ a $5,40 \cdot 10^{-3}$ M, evidenciando que, em um sistema heterogêneo como o solo, não é todo o substrato que está disponível para a reação enzimática. Logo, deve haver um aumento na sua concentração para se obter um efeito semelhante aos sistemas homogêneos.

Saliente-se que a relação K_M/K_{MC} aumenta com o teor de matéria orgânica do solo.

Em outro estudo, a atividade de fosfatase foi avaliada em extratos que passaram através de uma coluna de solo (Brams & McLaren, 1974). A cinética de Michaelis-Menten foi observada para uma concentração de

substrato de $1,0 \cdot 10^{-4}$ a $1,0 \cdot 10^{-3}$ M e o valor para os extratos obtidos das colunas foi cerca de 2,5 vezes maior que no sistema convencional.

Todavia, o problema é complexo e novas considerações teóricas e metodológicas deverão surgir para sua resolução.

METODOLOGIA PARA ESTUDO

De uma maneira geral, os métodos para a determinação da atividade de enzimas extracelulares em amostras de terra envolvem a adição de um substrato adequado e a incubação, por determinado tempo, seguindo-se a quantificação do produto da transformação do substrato ou da quantidade do mesmo que ainda restou.

Para essa determinação, entretanto, alguns cuidados devem ser tornados com relação aos seguintes aspectos: características do local de amostragem do solo; obtenção, preparo e armazenamento das amostras; inibição da atividade microbiana; concentração do substrato, pH do meio; tempo de incubação das amostras.

Obtenção a preparo das amostras de terra - A amostra de terra deve ser representativa do solo em estudo. Há que se considerar, por outro lado, que os dados de pesquisas têm evidenciado que a atividade enzimática é afetada pelo tipo de solo, pela topografia, pela profundidade, pela presença do sistema radicular, pelo tipo de vegetação e pelo clima.

Os tratamentos a que o solo foi submetido antes da amostragem (tipo de cultura, adubação, aplicação de agroquímicos) podem afetar a atividade de uma determinada enzima. Deve-se também observar, inicialmente, se a amostra pode ser seca ao ar e, se puder ser armazenada, quais as melhores condições de armazenamento, e levar em conta, ainda, se há conveniência de um tratamento inicial de esterilização.

A época e a hora da amostragem devem ser levadas em consideração. Melo et al. (1982) observaram que tanto o dia como a hora do dia (9 ou 14 h) afetaram de modo significativo a atividade de amilase em um latossolo.

O manuseio e a secagem das amostras de terra podem determinar alterações consideráveis no número de microrganismos e na atividade das enzimas extracelulares, diminuindo a reprodutibilidade dos resultados. Os efeitos da secagem ao ar dependem da temperatura e do tempo necessários para se atingir o novo equilíbrio e parecem ser específicos para cada tipo de enzima. A atividade de invertase decresceu 15-20%, enquanto que a de β -glicosidase se alterou muito pouco, em amostras secas ao ar e armazenadas por um ano.

Logo, não há uma regra estabelecida como melhor tratamento das amostras, devendo-se, em cada caso, considerar a enzima e a própria amostra para definir o melhor manuseio da mesma.

Inibição do crescimento microbiano - Substâncias inibidoras, antibióticos, o calor seco ou úmido a irradiação das amostras de terra têm sido utilizados para se evitar a proliferação de microrganismos durante a incubação para determinação da atividade de enzimas abiômicas.

O método ideal deve inibir o crescimento de microrganismos, sem determinar a lise ou alterações na permeabilidade celular, e não deve afetar a enzima em estudo.

Nenhum dos agentes químicos propostos para inibição dos microrganismos (fenol, acetona, timol, clorofórmio, éter, tolueno, dentre outros) durante as incubações têm se mostrado totalmente eficiente.

Para determinação da atividade de urease, Rotini (1935), citado por Skujins (1967), encontrou, em ordem crescente de eficiência de inibição: água, fenol 5%, acetona, tolueno, timol (10% em álcool), clorofórmio. Por outro lado, Haig (1955), citado pelo mesmo autor, estudou o óxido de etileno como agente esterilizante, detectando um efeito de inativação sobre a atividade de urease e esterase e uma redução na atividade de acetilesterase.

O agente químico mais usado tem sido o tolueno, o qual, no entanto, permite o crescimento microbiano após alguns dias de incubação e afeta a atividade de algumas enzimas como oxidases de carboidratos. Kiss & Boarn (1965) demonstraram que o tolueno (10-25% na amostra) pode prevenir a assimilação do substrato ou seus produtos de reação e concluíram que o mesmo é efetivo na inibição, previne a síntese de novas enzimas, não destrói microrganismos do solo e, se permitir seu desenvolvimento, este não chega a alterar os resultados.

O tolueno é decomposto por microrganismos, mas somente se usado em concentrações menores que 0,1%, portanto muito abaixo das indicações para estudos enzimológicos.

Segundo Beck & Poschenrieder (1963) a concentração de tolueno ou seu efeito inibitório dependem do teor de umidade das amostras, sendo de no mínimo 20% no caso de amostras secas ao ar, secas e reumedecidas ou naturalmente úmidas. No caso de suspensões de solo, pode-se usar uma concentração da ordem de 5-10%.

Os microrganismos se comportam de modo diferente na presença de tolueno. As bactérias Gram(+) e os estreptomicetos são mais resistentes que as bactérias Gram(-).

A primeira tentativa para verificar os efeitos da irradiação do solo sobre a atividade enzimática foi feita por Scharrer (1928), citado por Skujins (1967), que usou da radiação ultravioleta. Dommergues (1960), também citado pelo mesmo autor, estudou o efeito da radiação infravermelha sobre a atividade de invertase, detectando pouca influencia sobre a mesma, Dunn e seus colaboradores, em 1948, foram os primeiros a fazer use da radiação ionizante, tipo de tratamento que talvez mais se aproxime do ideal. Para tal, pode-se fazer use de um feixe de elétrons de 5-10 MeV, raios X ou raios-gama (^{60}Co). Peterson (1962), citado por Skujins (1967), irradiou amostras de terra com um gerador de elétrons de Van der Graaf (3 MeV) e obteve esterilização com doses de $3,3 \times 10^6$ rad, verificando que a atividade respiratória fora mantida.

Quando se aplica radiação ionizante, o número de células diminui como uma função logarítmica da dose utilizada, ou seja, $N/N_0 = e^{-kd}$, onde: N= número final, N_0 = Número inicial, d = dose de radiação, k = constante que depende do tipo de microrganismo, do tipo de solo e dos fatores ambientais. Os fungos são mais susceptíveis à radiação que as bactérias, e as formas vegetativas das bactérias são mais sensíveis que os esporos. Além do tipo de microrganismo, a matéria orgânica e a umidade do solo podem influir na resposta à radiação.

A radiação não determina a morte do microrganismo, mas elimina sua capacidade de se dividir, sendo que muitas de suas atividades bioquímicas permanecem ativas. Por outro lado, altas doses de radiação podem determinar destruição da permeabilidade seletiva da membrana, permitindo a entrada ou a saída de substâncias, com conseqüente alteração na atividade enzimática.

O solo é um bom protetor com relação ao calor, sendo o calor úmido mais eficiente que o seco para fins de esterilização. A inativação das enzimas do solo se inicia por volta dos 60-70°C, sendo total nas proximidades dos 100°C, geralmente cerca de 10°C acima do que o necessário com a enzima em solução.

A invertase é uma das enzimas mais resistentes ao calor, mantendo-se ativa mesmo após repetidos tratamentos do solo por vaporização, sendo que sua destruição é conseguida por aquecimento prolongado a 150°C ou por autoclavagem. Já a amilase mantém atividade após 3 horas de aquecimento a 150°C, sendo facilmente destruída pela autoclavagem.

O aquecimento, o vapor ou a autoclavagem destroem a atividade de catalase, permitindo diferenciá-la de catalisadores não enzimáticos.

Armazenamento das amostras de terra - Há evidências de que, após a secagem ao ar, as amostras de terra podem ser armazenadas por longos períodos de tempo sem que venham a ocorrer alterações significativas na atividade enzimática.

A menor perda de atividade da amilase ocorre quando as amostras são armazenadas úmidas e sob temperatura de 4°C (Ross, 1965). A atividade da glicosidase é pouco afetada, se as amostras de terra forem armazenadas secas ao ar (Hoffmann, 1959, citado por Soberge, 1978), ou úmidas a 4°C (Tyler, 1974).

Ladd (1972) encontrou que a atividade enzimática de extratos de solos recém-amostrados decresceu durante o armazenamento das amostras úmidas a 20-25°C por vários meses, enquanto que a atividade complementar, extraída dos sedimentos do solo permaneceu relativamente constante, concluindo que as enzimas extraídas eram derivadas de uma fonte, possivelmente resíduos vegetais, que se decompuseram de modo relativamente rápido sob as condições de umidade, que favorecem o crescimento microbiano.

Quando se deseja ou há necessidade de se armazenar uma amostra de terra antes da determinação da atividade enzimática, há que se levar em consideração o tipo de enzima envolvida, para então optar-se pelas melhores condições de estocagem.

pH, temperatura, tempo de incubação, concentração do substrato - A capacidade de catalisar reações químicas das enzimas é influenciada por uma série de fatores, podendo-se destacar: pH, temperatura, tempo de incubação a concentração do substrato, dentre outros.

Valores de pH muito altos ou muito baixos tendem a diminuir a atividade enzimática ou mesmo inibir a enzima de maneira total. Algumas enzimas requerem um valor de pH bem definido para a expressão de sua atividade máxima, enquanto que outras a expressam em uma determinada faixa de pH. O pH do meio deve ser controlado por meio de solução tampão na melhor faixa de pH para a enzima. No caso da amilase, por exemplo, o pH pode ser tamponado com solução de acetato-fosfato 0,5M, pH 5,5 (0,5M ácido acético, 0,5M Na₂HPO₄).

O efeito da temperatura sobre a atividade enzimática pode ser observado de forma generalizada na Figura 2, que sugere sejam os ensaios enzimáticos conduzidos sob temperatura adequada para a enzima em estudo. No caso de amilases de solo, a temperatura indicada é de 37°C.

A presença de um inibidor, como por exemplo o tolueno, pode alterar o comportamento da enzima em relação à temperatura (Dalal, 1975), como se pode observar pela análise da Figura 3.

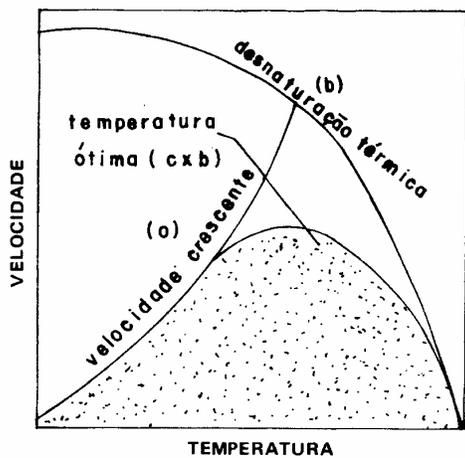


Figura 2. Efeito da temperatura sobre a atividade enzimática.

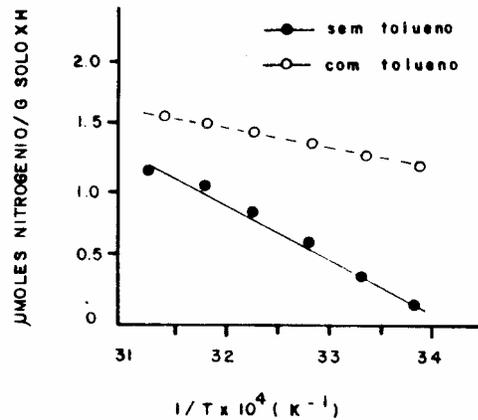


Figura 3. Efeito da temperatura sobre a atividade de urease (K₃) (Dalal, 1975).

O tempo de incubação deve ser também adequado à sensibilidade do método, uma vez que a quantidade de substrato transformado é, dentro de certos limites, proporcional ao tempo de incubação.

Melo et al. (1983) verificaram que a atividade de amilases foi mais ou menos constante em latossolos (sob eucalipto) durante incubação de 69 horas, enquanto que, em solos podzolizados (sob cultura anual), houve um aumento sensível no período 6 a 20 horas, seguido de diminuição, praticamente se igualando à atividade nos latossolos, após 69 horas (Figura 4). Para o caso das amilases, os autores recomendam um período de incubação de 24 horas.

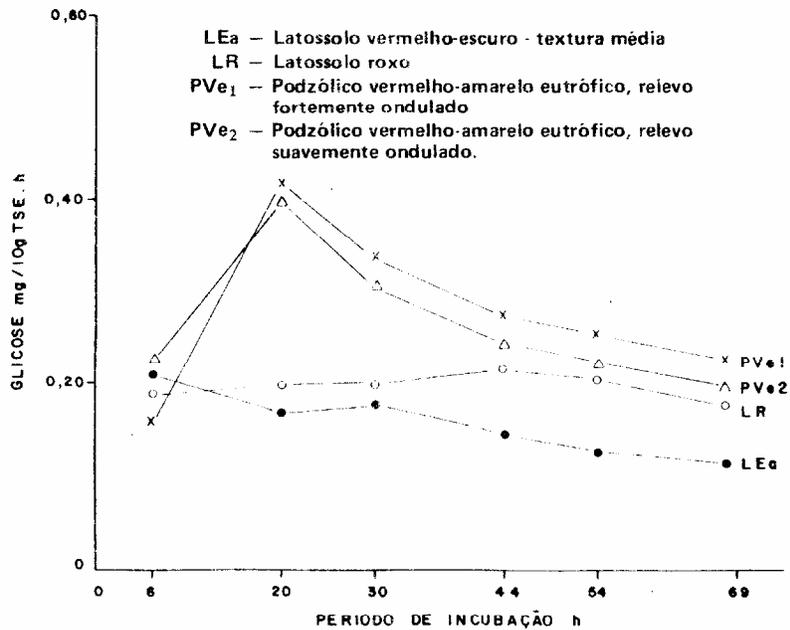


Figura 4. Efeito do tempo de incubação sobre a atividade de amilase (Melo et al., 1983).

Para catalisar reações químicas, a enzima necessita formar um complexo com o substrato, envolvendo o sítio ativo da sua molécula. Para máxima velocidade de reação, há necessidade de que todos os sítios ativos da molécula estejam ocupados por moléculas de substrato.

No caso da celulase, por exemplo, a concentração de carboximetilcelulose (substrato) no meio de reação deve ser no mínimo 0,4%, de modo a haver um aumento linear da atividade celulolítica em função do tempo (Tonescu, 1970, citado por Skujins, 1978). No caso das amilases, recomenda-se o uso de 20 mL de uma solução de amido a 2% para 10 g de amostra de terra.

Efeito da vegetação a dos resíduos vegetais - A atividade de diversas enzimas tem sido afetada pela natureza da cobertura vegetal. Todavia, não tem sido detectada correlação entre atividade enzimática no solo e teor de matéria orgânica (Ladd, 1978).

Melo & Pizauro Jr. (1985) verificaram que a atividade de amilases em um Latossolo Vermelho-escuro era maior em amostras que haviam recebido restos da cultura de labe-labe, comparada com as que haviam recebido restos da cultura de sorgo (Tabela 1).

Tabela 1. Atividade de amilases em amostras de Latossolo Vermelho-escuro textura média incubadas a 30°C e 60% da capacidade de campo na presença e na ausência de resíduos das culturas de sorgo e labe-labe.

Tratamento	Tempo de Incubação (dias)					Média
	0	5	10	15	50	
	----- mg glicose 10 ⁻¹ g TFSA.24 ⁻¹ h -----					
Testemunha	6,49	2,03	1,50	1,54	5,03	3,32
Labe-labe ¹	9,28	10,72	10,02	7,64	6,34	8,80
Sorgo ²	9,52	7,64	6,57	4,80	4,27	6,56

¹. 0,46 g de matéria seca/150 g de terra.

². 0,60 g de matéria seca/150 g de terra.

Melo et al. (1985) observaram efeito significativo do estágio de desenvolvimento de *Dohcho,s lablab* por ocasião de sua incorporação ao solo sobre a atividade de celulase (Tabela 2).

Estádio	Tempo após incorporação do labe-labe (dias)						
	0 ¹	7	14	21	28	35	42
	----- µg glicose g ⁻¹ TFSA.24h ⁻¹ -----						
Testemunha	393 b	273 c	337 c	302 b	314 c	301 c	444 a
Florescimento	454 a	371 b	479 ab	452 a	390 ab	443 b	389 b
Frutificação	446 a	418 ab	530 a	459 a	367 b	436 b	432 a
Maturação	460 a	431 a	420 bc	358 b	428 a	511 a	454 a

¹. Plantas nos estádios de florescimento (21/05/82), frutificação (18/06/82) e maturação (04/08/82). Na mesma coluna, médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Extração a purificação - As dificuldades para se extraírem enzimas do solo residem nas pequenas quantidades de ocorrência a nas formas de ligação com colóides orgânicos e inorgânicos.

Após muitas tentativas, Antonioni et al. (1954) conseguiram extrair enzima ativa do solo com sulfato de amônio e tungstato de sódio como agentes precipitantes. Posteriormente, Brigg & Segal (1963) relataram o isolamento de uma urease, partindo de 25 kg de amostra de terra. Desde então, diversas enzimas têm sido isoladas e suas propriedades estudadas, o que tem se constituído em um fator importante para o entendimento das características das enzimas do solo, principalmente de sua estabilidade.

Para a extração das enzimas do solo têm sido usados diferentes métodos de dispersão da matéria orgânica e diferentes extratores. McLaren e seus colaboradores têm feito use de solução de uréia ou do ultra-som com a

finalidade de isolar urease de amostras de terra. Ladd (1972) extraiu proteinases de diferentes amostras de terra, fazendo use de uma solução tampão Tris 0,1 M.

Após a extração, o extrato obtido deve ser purificado, e a metodologia usada também tem sido variada. Mayaudon & Sarkar (1974), para o estudo de difenoloxidasas, fizeram use das técnicas de liofilização e cromatografia em DEAE celulose. Outros autores têm feito use da ultra centrifugação e da precipitação fracionada.

EFEITO DE AGROQUÍMICOS SOBREE AS ENZIMAS DO SOLO

O efeito dos agroquímicos sobre as enzimas do solo depende das doses e da configuração química do produto.

De uma maneira geral, para estudos sobre efeitos dos agroquímicos, avalia-se a atividade da enzima após tratamento de amostras de terra com o produto em estudo.

Efeitos diretos - Uma classe comumente usada de herbicidas é a da uréia substituída (Figura 5).

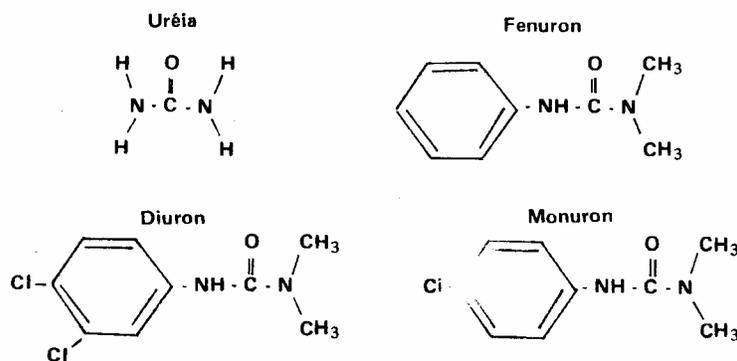


Figura 5. Herbicidas da classe da uréia substituída

Sabe-se que, dependendo do tipo de substituição, tais herbicidas podem inibir de maneira diferencial a urease de *Canavalia* sp. A molécula enzimática reage com o inibidor por meio do átomo de oxigênio do grupo carboxila da uréia substituída, formando um complexo que pode ser estabilizado por ressonância (Figura 6). Este mecanismo tem sido proposto para a urease do solo, admitindo-se que o efeito direto desta classe de herbicidas se dá nas ureases extracelulares livres e nas acumuladas.

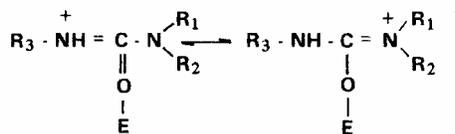


Figura 6. Fórmula de ressonância do complexo enzi-
ma-substrato.

O solo pode influenciar o comportamento dos agroquímicos e, portanto, o efeito destes sobre as enzimas do solo somente pode ser postulado a partir de resultados experimentais com extratos de solo purificados. Assim, enzimas, quando no ambiente do solo, podem ser indiferentes a fatores que determinam ativação ou inibição das enzimas purificadas. É o caso da esterase de malathion obtida de extratos de solo e parcialmente purificada, que se mostra estável na presença de íons metálicos e muitos dos inibidores comuns das enzimas, sendo parcialmente inibida apenas por metais pesados (prata, mercúrio e chumbo) em altas concentrações.

Efeitos indiretos - Os efeitos indiretos dos agroquímicos sobre as exoenzimas são, na verdade, os efeitos sobre os organismos produtores destas enzimas.

Freqüentemente, os agroquímicos se constituem em fontes de nutrientes para os organismos do solo, promovendo seu crescimento. Em alguns casos, contudo, a adubação pode determinar a diminuição de uma certa população de organismos do solo, como é o caso da adubação nitrogenada com relação aos fixadores de nitrogênio e dos adubos que determinam acidificação, os quais tendem a diminuir a população de vermes.

O produto adicionado poderá determinar a morte de organismos do solo ou a lise da membrana celular, do que resultará a liberação de enzimas e outros componentes celulares.

No caso de o organismo sobreviver na presença do agroquímico adicionado ao solo, ainda assim poderão ocorrer alterações, como a inibição de enzimas internas ou a inibição da biossíntese de novas moléculas enzimáticas.

Muitas das modificações induzidas pelos agroquímicos ocorrem a nível de biossíntese de proteínas. O clordane, por exemplo, inibe a biossíntese de endopeptidase e aminopeptidase em *Aeromonas proteolytica* (Cervelli et al., 1978).

Se a ação do agroquímico se dá sobre uma enzima endocelular, seu efeito somente será sentido após a morte deste microrganismo. Contudo, se o efeito ocorre sobre a síntese de uma exoenzima, o mesmo é sentido de modo imediato.

A atividade de urease não é induzida por compostos nitrogenados (sulfato de amônio, carbonato de amônio e uréia), ao passo que a atividade de celulase é induzida pela celulose e inibida pela glicose.

A adubação pode afetar de modo significativo a atividade de fosfatase. A atividade desta enzima aumentou após a adição de pequenas doses de fertilizantes, mas decresceu com doses mais elevadas. Segundo Skujins

(1967), uma atividade elevada de fosfatase esta relacionada com baixos níveis de fosfatos inorgânicos. Em culturas puras, a concentração de fosfatase decresce, quando os microrganismos são transferidos de meios deficientes para meios com conteúdo normal de fosfato.

Nannipieri e outros, citados por Cervelli et al. (1978), mostraram que a adição de glicose e nitrato de sódio em solo limo-arenoso determinou aumento na atividade de fosfatase devido ao aumento da população de bactérias.

Os agroquímicos podem desorganizar a estrutura física da membrana celular dos microrganismos e modificar os mecanismos de transporte e excreção. As conseqüências destas modificações podem incluir alterações na relação entre enzima intracelular e extracelular ou modificações bioquímicas na atividade de enzimas ligadas às células.

A desorganização da membrana pode ocorrer se o agroquímico desestabilizar ligações entre os componentes protéicos e fosfolipídicos das membranas. Os fungicidas dodine e guazatine podem causar dano às membranas celulares, pois possuem uma longa cadeia alquílica ligada ao grupo guanidino, e esta estrutura pode desorganizar o modelo da membrana.

A modificação da membrana celular também pode ser causada por impurezas presentes nos produtos comerciais. Os pesticidas, por exemplo, são formulados em óleo ou outro solvente orgânico adequado, que podem determinar aumento na permeabilidade, afetar as interações lipídeo-lipídeo e até romper a ligação hidrofóbica entre lipídeos e regiões apolares da membrana. Danos podem também ser causados por uma interação entre lipídeos e radicais livres no caso dos herbicidas do grupo bipiridílio. Tal efeito se deve ao ataque dos radicais peroxi e hidroxil sobre os lipídeos da membrana celular (Harris & Dodge, 1972).

Todavia, o modo de ação de muitos agroquímicos ainda não é bem conhecido.

Influencia sobre a dinâmica de populações - Raramente os agroquímicos têm um impacto variável sobre a população total dos microrganismos do solo. Contudo, podem modificar as inter-relações entre determinados grupos de organismos e, com isso, influir na quantidade e tipo de enzimas produzidas em um dado momento. Por exemplo, o número de Colêmbolos do solo cresce após aplicação de DDT devido a uma redução dos seus inimigos naturais.

É importante lembrar que, devido à grande biomassa em relação à disponibilidade de substrato, quase todos os microrganismos estão vivendo em condições de fome. Assim, podem-se admitir três possibilidades de atuação dos agroquímicos no sentido de alterar aquele estado:

- a.. morte dos organismos sensíveis e o uso de seu material orgânico como fonte de nutrientes pelos sobreviventes;
- b. uso direto do agroquímico por organismos capazes de metabolizá-los;

c.. desenvolvimento de populações que dependem dos produtos de decomposição do agroquímico.

A evolução das comunidades microbianas do solo é de grande interesse e, às vezes, pode ter papel primordial na eliminação de agroquímicos orgânicos. Senior et al. (1976) descreveram a evolução de enzimas em uma comunidade microbiana crescendo na presença de Dalapon (2,2'-ácido dicloropropiônico). Esta comunidade inclui decompositores primários e secundários, que podem crescer nos metabólitos produzidos diretamente do catabolismo do herbicida, nos metabólitos excretados pelos decompositores primários, ou nos produtos de lise das células. Um membro da comunidade secundária, identificado como *Pseudomonas putida*, cresceu tendo o herbicida como única fonte de carbono e energia, graças à produção da dehalogenase.

APLICAÇÕES

Fertilidade do solo - Pesquisas sobre enzimologia do solo têm conduzido a uma série de observações sobre a distribuição horizontal e vertical das enzimas em vários tipos de solo e ecossistemas e sobre as práticas de correção do solo, práticas culturais, respostas a fatores ambientais e climáticos.

A grande meta é o uso da atividade enzimática como um índice para avaliar a fertilidade do solo e sua atividade biológica, índice este que possa ser utilizado para fins agrícolas.

De um modo geral, tem sido observado que a atividade enzimática diminui com a profundidade, mas não se tem observado correlações entre atividade enzimática e atividade respiratória ou número de microrganismos.

Hoffmann & Seegerer (1950) sugeriram que a atividade de invertase é mais útil para fins de indicação da fertilidade do solo do que medidas da atividade microbiana, como por exemplo a avaliação da produção de CO₂.

Moureaux (1957) observou variações significativas na atividade de invertase em função do tipo de solo, topografia e cobertura vegetal. Os valores de atividade geralmente refletiam a produtividade de um dado tipo de solo, sendo que o autor recomendou que se fizessem testes biológicos para complementar as análises físicas e químicas, para fins de avaliação da fertilidade do solo.

Lajudie & Pochon (1956) sugeriram que os solos podem ser classificados de acordo com sua atividade proteolítica e que esta classificação estaria de acordo com a atividade biológica e a fertilidade aparente.

Outros autores aventaram, para fins de avaliação da fertilidade do solo, o uso da atividade de enzimas como asparaginase, urease, celulase, protease (Skujins, 1978).

Yaroshevich (1966) examinou solos adubados durante 50 anos, verificando que o uso contínuo de adubo orgânico determinava aumento na atividade respiratória e enzimática do solo, enquanto que a adubação mineral equivalente levava a um efeito oposto. Em um número de parcelas em que o solo tinha o mesmo valor de fertilidade, para as plantas, a atividade enzimática variou de acordo com o tipo de adubação e não evidenciou correlações com a produção de beterraba açucareira.

Tabatabai & Bremner (1971), ao estudarem a atividade de arilsulfatase e da fosfatase em nove solos de Iowa, não encontraram correlações significativas entre os valores de K_{tm} e algumas propriedades do solo como pH, capacidade de troca catiônica, porcentagem de carbono orgânico, porcentagem de argila, porcentagem de areia.

À medida que a disponibilidade de informações a respeito da atividade enzimática de enzimas extracelulares aumenta, tem se tornado mais difícil fazer correlações com a fertilidade do solo e mais difícil ainda formular generalizações. Desta forma, ainda nos anos 50, diversos autores concluíram que não havia correlações muito estreitas entre atividade enzimática e nível de nutrientes no solo, ou entre atividade enzimática e atividade respiratória, e, portanto, a atividade enzimática não poderia fornecer um quadro completo sobre o estado biológico do solo e também não serviria como um critério para o nível de fertilidade.

De fato, parece improvável que a atividade de uma única enzima possa se constituir em um índice para avaliar a fertilidade do solo. Todavia, a avaliação da atividade enzimática pode fornecer informações importantes sobre o andamento de um determinado processo no solo. Assim, por exemplo, a urease poderá fornecer informações sobre a disponibilidade de nitrogênio para as plantas, enquanto que a atividade de celulase ou carbohidrases poderá fornecer informações sobre a decomposição do material orgânico adicionado ao solo.

Interações com fertilizantes - A literatura já dispõe de informações da ação de enzimas do solo sobre alguns fertilizantes.

A degradação metabólica da calciocianamida no solo envolve sua transformação em uréia. De acordo com Schmalfluss (1938), aquela transformação é principalmente enzimática, enquanto Rotini (1940) e Rotini et al. (1967, 1971) acham que o processo é apenas uma catálise inorgânica, tendo em vista a elevada energia de ativação da reação. Ernst (1967) estudou a decomposição da calciocianamida marcada com ^{15}N e verificou que, no tratamento esterilizado por irradiação gama, a decomposição se deveu às catalises inorgânica e enzimática; nas amostras tratadas por autoclavagem ou óxido de etileno, a decomposição foi atribuída à catálise inorgânica. A contribuição das enzimas presentes nos microrganismos em proliferação variou de 50 a 80% da transformação total, enquanto que as enzimas acumuladas contribuíram com 20 a 50% e a catálise inorgânica, com apenas 5% (Cervelli et al., 1978).

A uréia, no solo, sofre um processo de hidrólise com produção de amônia e dióxido de carbono, sendo que a enzima que catalisa tal reação é a urease. Há muitas evidências de que tal enzima se encontra acumulada no solo e diversos autores conseguiram extrair uma fração com atividade de urease.

Muito importante, com relação à nutrição nitrogenada das plantas, são os processos de nitrificação e desnitrificação, os quais são considerados por demais complexos para dependerem apenas de enzimas acumuladas no solo. Cawse (1968) observou, em solo esterilizado por radiação gama, rápida oxidação da amônia a nitrato, o que atribuiu principalmente a microrganismos que não estavam em processo de proliferação.

Logo, as enzimas que participam da nitrificação permanecem ativas em células que perderam sua viabilidade após um processo de irradiação. Cawse & Cornfield (1969, 1972) não observaram aumento no teor de nitrito, quando a irradiação foi precedida de autoclavagem, o que se explicaria pelo fato de o calor destruir a nitrato redutase. Todavia, se o tratamento com radiação gama fosse muito intenso, ocorria a produção de nitrito, o que se atribuiu a uma gama radiólise do nitrato.

Dos metafosfatos a pirofosfatos, sabe-se que os mesmos são transformados a fosfatos, que.r por catálise enzimática, quer pela inorgânica, a qual contribui com cerca de dois terços do total. Hossner & Philips (1971) realizaram estudos para estimar o valor da energia de ativação da hidrólise do pirofosfato em solos inundados, encontrando um valor de $18.900 \text{ J mol}^{-1}$ para a pirofosfatase e 105.000 para a catálise química.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTONIONI, C.; MONTANARI, T. & CAMORIANO, A. Soil enzymology. I. Cathepsin-like activity. A preliminary note. Ann. Eac. Agric. Univ. Milano, 3:99-101, 1954.

BECK, T. & POSCHENRIEDER, H. Experiments on the effect of toluene on the soil microflora. Pl. Soil, Hague, 18:346-357, 1963.

BRAMS, W.H. & McLAREN, A.D. Phosphatase reactions in columns of soil. Soil Biol. Biochem., Oxford, 6:183-189, 1974.

BRIGS, M.H. & SEGAL, L. Preparation and properties of a free soil enzyme. Life Sci., Oxford, 12:69-73, 1963.

CAWSE, P.A. Effects of gamma radiation on accumulation of mineral nitrogen in fresh soils. J. Sci. Food Agric., London, 19:395-398, 1968.

CAWSE, P.A. & CORNFIELD, A.H. The reduction of ^{15}N -labelled nitrate to nitrite by fresh soils following treatment with gamma radiation. Soil Biol. Biochem., Oxford, 1:287-274, 1969.

CAWSE, P.A. & CORNFIELD, A.H. Biological and chemical reduction of nitrate to nitrite in gamma-irradiated soils and factors leading to eventual loss of nitrite. Soil Biol. Biochem., Oxford, 4:497-511, 1972.

- CERVELLI, S.; NANNIPIERE P.; CECCANTI, B. & SEQUI, P. Michaelis constant of soil acid phosphatase. *Soil Biol. Biochem.*, Oxford, 5:841-843, 1973.
- CERVELLI, S.; NANNIPIERI, P. & SEQUI, P. Interactions between agrochemicals and soil enzymes. In: BURNS, R.G. (ed), *Soil Enzymes*. London, Academic Press, 1978. p.251-293.
- DALAL, R.C. Effect of toluene on the energy barriers in urease activity of soils. *Soil SO.*, Baltimore, 120:256-260, 1975.
- ESTERMAN, E.F. & McLAREN, A.D. Contribution of rhizoplane organism to the total capacity of plants to utilize organic nutrients. *Pl. Soil*, Hague, 15:243-260, 1961.
- HARRIS, M. & DODGE, A.D. Effect of paraquat on flax cotyledon leaves. Physiological and biochemical changes. *Planta*, NewYork, 104:210-219, 1972.
- HOFFMANN, E. & SEEGERER, A. Soil enzyme as measure of biological activity. *Biochem. Z.*, Berlin, 321-397, 1950.
- HOSSNER, L.R. & PHILIPS, D.P. Pyrophosphatase hydrolysis in flooded soil. *Proc. Soil Sci. Soc. Am.*, Madison, 35:379-383, 1971.
- KISS, S. & BOARN, M. Methods for determination of dehydrogenase activity in soil. In: *Symposium on Methods in Soil Biology*, Bucharest, 1965. p.137-143.
- KISS, S.; DRAGAN-BULARDA, M. & RADULESCU, D. Biological significance of the enzymes accumulated in soil. In: *Symp. Soil Biology*, 3., Bucharest, 1972. p.19-78.
- KISS, S.; DRAGAN-BULARDA, M. & RADULESCU, D. Biological significance of enzymes in soil. *Adv. Agron.*, Madison, 27:25-87, 1975.
- LADD, J.N. Properties of proteolytic enzymes extracted from soil. *Soil Biol. Biochem.*, Oxford, 4:227-237, 1972.

LADD, J.N. Origin and Range of Enzymes in Soil. In: BURNS, R.G. (ed), Soil Enzymes. London, Academic Press, 1978. p.51-96.

LAJUDIE, J. & POCHON, J. Studies on the proteolytic activity of soils. Trans. VI Int. Soil Sci. Congr., 1956. p.271-273.

MAYAUDON, J. & SARKAR, J.M. Chromatography and purification of the diphenol oxydases of soil. Soil Biol. Biochem., Oxford, 6:275-285, 1974.

MELD, W.J.; DEMATTE, J.B.I.; PIZAURO JR., J.M. & CASSIANO SOBRINHO, F. Efeito do metodo de irrigação sobre a atividade de amilase e hidrolase em um Latossol Roxo cultivado com cenoura *Daucus carota* L. cultivar Kuroda. Cientifica, Jaboticabal, 10:41-48, 1982.

MELD, W.J.; PIZAURO, J.M. SARTORI, J.L. & KANESIRO, M.A.B. Amilase em solos do municipio de Jaboticabal (SP). R. bras. Ci. Solo, Campinas, 7:213-215, 1983.

MELD, W.J. & PIZAURO JR., J.M.. Efeito da adição de resíduos das culturas de sorgo e feijão sobre a atividade de hidrolase e amilase de um Latossol Vermelho Escuro - fase arenosa. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIENCIA DO SOLO, 20., Belem (PA). Resumos. Campinas, Sociedade Brasileira de Ciencia do Solo, 1985. p.69.

MELD, W.J.; OLIVEIRA, H.; VITTI, G.C. & FORNASIERI FILHO, D. Efeito de épocas de incorporação de feijão ao solo sobre a atividade da celulase. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIENCIA DO SOLO, 20., Belem (PA), Resumos. Campinas, Sociedade Brasileira de Ciencia do Solo, 1985. p.69-70.

MOUREAUX, C. Biochemical tests on some Madagascar soils. Mem. Inst. Sci. Madagascar, 8:225-241, 1957.

PAULSON, K.N. & KURTZ, L.T. Michaelis constant of soil urease. Proc. Soil Sci. Soc. Am., Madison, 34 70-72, 1970.

PORTER, L.K. Enzymes. In: BLACK, C.A., EVANS, D.D., WHITE, J.L., ENSMINGER, L.E. & CLARK, F.E. (eds.) Methods of Soil Analysis. Part. 2. Chemical and Microbiological Properties. Madison. American Society of Agronomy, p.1.536-1.549, 1965. (Agronomy Series, 9)

ROBERTSON, J.D. The ultrastructure of soil membranes and their derivatives. *Biochem. J.*, Colchester, 65:43-51, 1957.

ROSS, D.J. A seasonal study of oxygen uptake of some pasture soils and activities of enzymes hydrolysing sucrose and starch. *J. Soil Sci., Londo* 1, 16:73-85, 1965.

ROTE, J.T. & GALOPPINI, C. Effect of synthetic detergents on soil and crops. In: PAQUOT, C. (ed), *Chemistry, Physics and Application of Surface Active Substances*. London, Gordon and Breach, 1967. v. 3, p. 451-460.

SATYANARAYANA, T. & GETZIN, L.W. Properties of a stable cell-free esterase from soil. *Biochemistry, Washington*, 12:1.566-1.572, 1973.

SENIOR, E.: BULL, A.T. & SLATER, J.M. Enzyme evolution in a microbial community growing on the herbicide dalapon. *Nature, London*, 263:476-479, 1976.

SKUJINS, J. Enzymes in soil. In: McLAREN, A.D. & PETERSON, G.H. (eds), *Soil Biochemistry*. New York, Marcel Dekker, 1967. p.371-414.

SKUJINS, J. History of abiotic soil enzyme research. In: BURNS, R.G. (ed). *Soil Enzymes*. London, Academic Press, 1978. p.149.

SOBERGE, M.R. Methodology of soil enzyme measurement and extraction. In: BURNS, R.G. (ed),

TABATABAI, M.A. Michaelis constants of urease in soils and soil fractions. *Proc. Soil Sci. Soc. Am., Madison*, 37:707-710, 1973.

TABATABAI, M.A. & BREMNER, J.M. Michaelis constants of soil enzymes. *Soil Biol. Biochem.* Oxford, 3:317-323, 1971.

TYLER, G. Heavy metal pollution and soil enzymatic activity. *PI. Soil, Hague*, 41:303-311, 1974.

YAROSHEVICH, I.V. Effect of fifty years' application of fertilizers in a rotation on the biological activity of a Chernozem. *Agrokhimiya*, Moscow, 6:14-19, 1966.