

BIOQUIMICA DE SUELOS DERIVADOS DE CENIZAS VOLCANICAS. V. DETERMINACION DE POLIFENOLOXIDASAS¹

Biochemistry of soils derived from volcanic ashes. V. Polyphenol oxidases activity determination

Pedro Peirano V.², Gilda Borie B.² y María Aguilera S.²

S U M M A R Y

A technique was studied and later implemented to determine the amount of polyphenoloxidase removable from soils. This enzymatic activity favors oxidation processes such as those of phenols. These are the foundations for the synthesis of highly stable polymers, such as soil humus.

A prospection of polyphenoloxidase activity was performed in seven volcanic soils, with high content of stabilized organic matter, humus type, and in two alluvial soils, of low content of organic matter.

The polyphenoloxidase activity was greater in volcanic than in alluvial soils. Besides, such activity underwent periodical variations of relative importance in some soils.

Storage and changes in soil moisture depressed polyphenoloxidase activity.

INTRODUCCION

Con el avance en el conocimiento de la bioquímica, se reconoció que muchas reacciones involucradas en las transformaciones de la materia orgánica (m.o.) de los suelos, son catalizadas por enzimas. Estas enzimas, de origen animal o vegetal, se encuentran también en el sistema suelo en forma extracelular y son estabilizadas por adsorción a las fracciones húmicas o a los minerales de la arcilla (Skujins y Bruns, 1978; Mayaudon y Sarkar, 1974; Kiss, Dragan—Bularda y Radulescu, 1975).

Considerando las características de los suelos volcánicos chilenos, m.o. altamente estabilizada en el complejo humus—alofán (Zunino y otros, 1982 y 1982a) y flora microbiana muy activa (Zunino y otros, 1982b; Borie, Quinteros y Aguilera, 1983), se puede anticipar que los procesos enzimáticos cumplen un papel importante en la actividad biológica de estos suelos.

Entre las actividades enzimáticas señaladas en la literatura, la de las polifenoloxidasas (PFO) parece ser una de las más específicas, que participan en los procesos de síntesis del humus (Kuprevich y Shcherbakova, 1971). Por lo tanto, estudiar su determinación proveería una excelente herramienta para estudiar la acumulación o humificación que la m.o. experimenta en los suelos volcánicos.

Las PFO son enzimas cuprosas, que actúan sobre sustratos fenólicos, catalizando dos tipos de reacciones: a) la reacción de monofenoles a difenoles; y b) la oxidación de difenoles a las formas quinónicas respectivas. Se ha descrito que son esas formas quinónicas las más activas en la síntesis de polímeros húmicos (Dawson y Tarpley, 1963; Brown y Bocks, 1963; Suflita y Bollag, 1981).

Si consideramos que el aporte de sustratos fenólicos a los suelos es el resultado de la descomposición de residuos vegetales y animales (Haider y Martin, 1975) y que en los suelos volcánicos chilenos hay acumulación de m.o. en forma de humus, podemos concluir que la actividad de PFO debe ser alta en estos suelos.

Para montar una técnica adecuada para determinar PFO en suelos, se estudió y adaptó la técnica descrita

¹ Recepción de originales: 22 de agosto de 1986.

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.

por Yamaguchi, Hwang y Campbell (1970), usada para la determinación de PFO en hongos. Esta técnica determina por absorciometría la coloración roja que se produce por la reacción entre la prolina y quinona; esta última proveniente de la oxidación, fundamentalmente enzimática, del catecol, que se usa como sustrato específico.

Para poder aplicar dicha técnica, fue necesario resolver una serie de problemas inherentes a las características de los suelos. Entre ellos, cabe destacar las interferencias del alofán y de la m.o., que dificultan obtener la "enzima extraíble" en soluciones límpidas, cuyas actividades sean reproducibles.

Una vez montada la técnica, se realizó una prospección de la actividad de PFO en suelos de origen volcánico y, también, en dos suelos no alofánicos, usados como medida de comparación. Además, se estudió la variación que experimenta la actividad enzimática de un suelo en función de sus condiciones de humedad y temperatura, por efecto del almacenaje y manejo de la muestra.

MATERIALES Y METODOS

Suelos: Se escogieron seis suelos de origen volcánico y dos suelos aluviales, para una primera prospección de PFO. Los suelos escogidos y algunos de sus principales características se indican en el Cuadro 1.

Las muestras de suelos utilizadas se recolectaron en diciembre de 1981 y 1982 y corresponden al horizonte superficial. El pH de los suelos se determinó sobre pasta a saturación; el C orgánico se determinó por el método de combustión seca.

CUADRO 1. Algunas características y actividad de polifenol oxidasas de suelos estudiados

TABLE 1. Some characteristics and polyphenol oxidases' activity of the soils under study

| Suelos | pH | C org. % | µg de PFO/g suelo seco | | | |
|--------------|-----|-------------|------------------------|------|-----|------|
| | | | I | II | III | IV |
| Osorno | 5,6 | 8,5 | 8,0 | 6,9 | 2,1 | 7,5 |
| Corte Alto | 5,7 | 9,3 | 7,9 | 11,1 | 0,7 | 25,9 |
| Metrenco | 5,7 | 11,2 | 9,1 | 7,9 | 0,5 | 8,8 |
| Arrayán | 6,5 | 5,9 | 5,5 | 5,8 | 2,7 | 19,9 |
| Puerto Octay | 5,9 | 7,2 | 55,4 | 2,5 | 2,5 | nd |
| Frutillar | 5,4 | 9,7 | 11,4 | 8,6 | 3,6 | 15,8 |
| Olivos | 5,7 | 1,5 | 4,2 | 2,5 | 0,0 | 2,5 |
| Lo Aguirre | 5,5 | 0,6 | 3,9 | 2,8 | 3,8 | nd |

I = suelos recolectados en diciembre, 1981; II = idem I, pero valorados después de 4 meses de almacenamiento; III = idem I, incubados a 22° C durante 8 meses y con una humedad igual al 60% de su capacidad de retención de agua; y IV = suelos recolectados en diciembre, 1982.

nd = no se determinó.

Extracción de PFO del suelo: En un frasco de 150 ml de capacidad, se coloca el equivalente a 10 g de suelo seco previamente tamizado por una malla de 2 mm, se le agregan 20 ml de solución tampón de fosfato de sodio 0,1 M de pH 6,5. El frasco se agita por 3 hr en un agitador horizontal y luego se centrifuga por 10 min sobre 3.000 rpm. El sobrenadante se filtra a través de papel filtro de poro fino, para obtener la solución de suelo que contiene la "PFO-extraíble", libre de los coloides que interfieren en la determinación espectrofotométrica.

Determinación espectrofotométrica de PFO: Se preparan tres tubos de ensayo: uno para la muestra, uno para un blanco del suelo y un tercero para el blanco de reactivos.

Procedimiento: En el tubo de muestra se miden, con exactitud, 2 ml de la solución de suelo, a los que se agregan 2 ml de solución de Catecol 0,02M y 2 ml de solución de Prolina 0,02M.

En el tubo blanco-suelo se colocan los 2 ml de solución de suelo, 2 ml de solución de Prolina y se sustituyen los 2 ml de solución de Catecol por 2 ml de solución tampón fosfato.

Finalmente, en el tubo blanco-reactivo, se sustituye los 2 ml de solución de suelo por tampón fosfato y se procede a la adición de solución de Catecol y de Prolina. Es necesario que, en la secuencia de adición de reactivos, el último sea la Prolina, pues su presencia inicia la reacción colorimétrica a determinar.

Una vez homogenizadas las soluciones de los tres tubos, se dejan en reposo por 2 hr a temperatura ambiente y, luego, se determina la absorción a 525 nm, de la muestra y del blanco-suelo, frente al blanco-reactivo.

Curva de calibración: Se prepara una solución patrón de tirosinasa, que contenga 5 mg de liofilizado de hongos I.C.N., en 25 cc de solución tampón fosfato. Luego se preparan soluciones en una gradiente de concentración midiendo, en distintos tubos, volúmenes de 100 a 200 µl de la solución patrón de tirosinasa y completando los 2 ml de volumen final, con tampón fosfato. A cada tubo se le agregan 2 ml de solución de Prolina. Se deja en reposo 2 hr a temperatura ambiente y se procede a medir la absorción a 525 nm, contra blanco-reactivo.

Los resultados se expresan como microgramos de enzima por gramo de suelo, equivalente a la actividad que presenta el contenido de enzima de la solución patrón de liofilizado de hongos. El contenido de enzima en el suelo se obtiene restando al valor de la muestra el valor del blanco-suelo.

Reactivos: Los reactivos utilizados corresponden a calidad pro-análisis. El liofilizado de tirosinasa es preparado por I.C.N. Pharmaceutical Inc. Cleveland Ohio (actividad 500 unidades por mg).

Almacenamiento de muestras: Las muestras recolectadas se guardan en bolsas plásticas, que se cierran cuidadosamente. Se mantienen a t° ambiente y al momento de ser usadas se tamizan por malla de 2 mm.

Incubación de suelos: Las muestras de suelo se incuban en un sistema cerrado, con aireación y humedad controlada y a 22° C (Zunino y otros, 1982).

RESULTADOS Y DISCUSION

La reacción descrita por Yamaguchi y otros (1970), es sensible, rápida y tiene lugar al mezclar el sustrato catecol (o-difenol), con liofilizado de hongos, reactivo usado como producto enzimático patrón. El catecol es rápidamente transformado en la forma quinónica respectiva, lo que se evidencia por el color amarillo débil que comunica a la solución. La quinona se hace reaccionar con el aminoácido Prolina, con lo que se forma un compuesto coloreado rojo, que se puede cuantificar espectrofotométricamente a 525 nm. La intensidad del color es proporcional a la actividad enzimática.

Se estudió la técnica de extracción de la enzima soluble desde suelos y, para ello, se escogió el suelo Osorno, que según experiencias anteriores de Zunino y otros (1982), presenta una alta actividad microbiana y, por lo tanto, se anticipa una actividad de PFO elevada.

Por las características de este suelo, se escogió como solución extrayente, tampón fosfato de pH 6,5, que permite trabajar en el pH óptimo de la enzima y, además, tiene una acidez cercana a la natural del suelo.

La primera dificultad que se presentó para la aplicación de la técnica y en especial por tratarse de suelos volcánicos, fue establecer las condiciones necesarias para obtener una solución de PFO extraída que fuera límpida y libre de partículas coloidales, que pueden interferir en la posterior determinación espectrofotométrica. Esto se logró centrifugando sobre 3.000 rpm durante 10 min y filtrando, posteriormente, el sobrenadante.

Una dificultad mayor que la anterior se presentó al aplicar a los extractos de suelo la reacción descrita por Yamaguchi y otros (1970); en efecto, mientras con la solución patrón la reacción procedía en forma casi instantánea, en los extractos de suelo ésta se producía lentamente a temperatura ambiente, necesitán-

dose a lo menos de 120 min para que la reacción se pudiera medir en forma analíticamente satisfactoria.

No disponemos de una explicación para este comportamiento de la PFO y menos podemos señalar el o los componentes del extracto de suelo responsables de este retardo en el desarrollo de la reacción.

Por otro lado, considerando la presencia de compuestos quinónicos, productos de la oxidación natural que experimentan los fenoles presentes en el suelo, se incluyó el denominado blanco-suelo, con el objeto de poder restar el aporte de estas quinonas a la reacción de coloración con la Prolina. Además, se anula la absorción que a 525 nm experimenta la m.o., que pudiera ser extraída por la acción del tampón fosfato.

Para la expresión de resultados, se escogió el relacionarlos con actividad enzimática equivalente a la que manifiesta un producto liofilizado de hongos, fácil de obtener y manipular en un laboratorio químico. Es preciso señalar que, en relación a PFO, hay controversias sobre los mecanismos de su acción y de ahí que diversos autores expresan la actividad que ejerce esta enzima de manera distinta a las clásicas expresiones con que esto se hace en bioquímica.

Para la determinación de PFO en suelos, se escogieron seis suelos volcánicos y dos aluviales, cuyas actividades biológicas y contenido de m.o. han sido valorados en estudios anteriores (Zunino y otros, 1982b): algunas características químicas de estos suelos se presentan en el Cuadro 1. De los suelos escogidos: Frutillar es un suelo Nadi; Arrayán, Osorno, Corte Alto y Puerto Octay son trumaos típicos y todos con un alto contenido en m.o.; en cambio los otros dos con bajo contenido de materia orgánica corresponden a suelos aluviales de la serie Maipo y los nombres con que se han designado representan la ubicación geográfica de su lugar de recolección: Olivos, terrenos de la Facultad y Lo Aguirre en la ruta 68, previo al acceso del túnel Lo Prado.

Los resultados obtenidos en este trabajo se resumen en el Cuadro 1. En las columnas I y IV se encuentran las actividades de PFO de los suelos muestreados en diciembre de 1981 y 1982, respectivamente; en ellas se puede observar que, para los suelos volcánicos, la actividad de "PFO-extraíbles" es importante, si se la compara con los suelos aluviales, cuyas actividades son muy inferiores. Este hecho era esperado de acuerdo a la población microbiana que ellos tienen y a los contenidos de carbono orgánico de los suelos que siguen la misma tendencia.

Además, si se compara la actividad que presentan los suelos de distintos años, pero en igual período (columnas I y IV), se pueden observar valores relativa-

mente estables en los suelos Osorno y Metrenco, mientras que el resto de los suelos manifiestan fluctuaciones bastante acentuadas. Del mismo modo, si se comparan las columnas I, II y III, se pueden observar las fluctuaciones a lo largo del tiempo que experimenta la actividad enzimática. Tanto estas fluctuaciones como las anuales, reseñadas anteriormente, deben obedecer fundamentalmente a los distintos ciclos biológicos de los microorganismos y las diferencias que se observan entre los distintos suelos se pueden atribuir a las diferencias en la calidad y la cantidad de la microflora microbiana, como también al habitat en que esta biomasa se desarrolla en cada suelo.

Consecuente con lo anterior, el almacenamiento o envejecimiento de una muestra de suelos altera los valores de actividad de PFO, como queda en evidencia al comparar las columnas I y II.

La actividad enzimática de PFO sufre un marcado deterioro a través del tiempo, columna III, a pesar de las condiciones de incubación óptimas, para la actividad biológica, a que fueron sometidos los suelos en estudio.

Variaciones en los niveles de actividad de PFO en los suelos por efecto de humedad, temperatura, pH, acción de agentes esterilizantes, han sido descritas (Ross y Mc Neilly, 1973). Sin embargo, la magnitud y dirección de las variaciones encontradas en nuestra experiencia, no son semejantes a las citadas en la literatura. Se necesitarán mayores estudios para determinar si este comportamiento de la enzima obedece a características de los suelos trumacos y es general para toda actividad enzimática o se trata de un efecto particular sobre PFO, por condiciones experimentales provocadas por humedad, temperatura o iluminación.

En general, se puede concluir que:

— La determinación de "PFO" en suelos es posible, con la aplicación de una técnica sencilla, como la descrita.

— La actividad de PFO experimenta, en forma natural, variaciones que pueden ser más o menos importantes, según los distintos tipos de suelos, ya sea en función de las variaciones estacionales de humedad y temperatura o por el almacenamiento de muestras de laboratorio. Por todo esto, el uso de testigos es fundamental para cualquier estudio en que se quiera determinar la actividad de PFO como índice de actividad biológica, y los resultados sólo tendrán validez como valor comparativo y no podrán extrapolarse a sistemas diferentes al estudiado.

En lo particular, para los suelos estudiados se puede concluir que:

— El contenido de "PFO—extraíbles" en suelos alofánicos es mayor que en los aluviales, lo que guarda relación con los niveles de carbono orgánico, en ambos tipos de suelos.

— El suelo Puerto Octay escapa a lo anterior, ya que presentó niveles enzimáticos iguales o semejantes a los suelos aluviales. Es necesario revisar si es un comportamiento general de ese suelo u obedece a un muestreo anómalo.

— Finalmente, estos resultados alientan a buscar o mejorar técnicas para medir esta actividad enzimática, u otras relacionadas, ya que parecen ser estas variables las que mejor reflejarían la real actividad biológica de un suelo y, por lo tanto, la dinámica de la materia orgánica en ellos.

RESUMEN

Con el objeto de profundizar los conocimientos sobre los procesos de síntesis y degradación que afectan a la m.o. de suelos, se estudió y montó una técnica para medir polifenoloxidasas (PFO) extraíbles de ellos.

Estas enzimas están involucradas en procesos oxidativos, como los que experimentan los fenoles, que son la base para la síntesis de polímeros de alta estabilidad, como el humus de suelo.

Se hizo una prospección de la actividad de PFO en siete suelos volcánicos, con alto contenido de m.o.

estabilizada, del tipo humus, y en dos suelos aluviales, de bajo contenido de m.o.

La actividad de PFO resultó ser mayor en los suelos volcánicos que en los aluviales. Además, tal actividad experimentó variaciones periódicas de relativa importancia en ambos suelos. Por otra parte, el almacenamiento y los cambios en la humedad del suelo fueron factores negativos para la actividad de PFO.

LITERATURA CITADA

- 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.
- BROWN, B. and BOCKS, Sh. M. 1963. Some new enzymic reactions of phenols. En: J.B. Pridham (Ed.). *Enzyme Chemistry of Phenolic Compounds*. Pergamon Press, New York. p.: 129–138.
- DAWSON, C.R. and TARPLEY, W.B. 1963. On the pathway of the catechol–tyrosinase reaction. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 100: 937–947.
- HAIDER, K. and MARTIN, J.P. 1975. Humus biochemistry. En: E.A. Paul and A.D. McLaren. *Soil Biochemistry*, Vol. 14. Marcel Dekker, New York.
- KISS, S.; DRAGAN–BULARDA, M.; and RADULESCU, D. 1975. Biological significance of enzymes accumulated in soil. *Adv. Agron.* 27: 25–87.
- KUPREVICH, V.F. and SHCHERBAKOVA, T.A. 1971. Comparative enzymatic activity in diverse types of soil. En: A.D. McLaren and J. Skujins (Ed.). *Soil Biochemistry*, Vol. 2. Marcel Dekker, New York.
- MAYAUDON, J. et SARKAR, J.M. 1974. Chromatographie et purification des diphenol oxidase du sol. *Soil Biol. Biochem.* 6: 275–285.
- ROSS, D.J. and Mc Neilly, B.A. 1973. Biochemical activities in a soil profile under hard beech forest. 3. Some factors influencing the activities of polyphenol-oxidising enzymes. *N.Z. J. Science* 16: 241–257.
- SKUJINS, J. and BURNS, R.G. 1978. *Soil Enzymes*. Academic Press, London.
- SUFLITA, J.M. and BOLLAG, J. 1981. Polymerization of phenolic compounds by a soil–enzyme complex. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 45: 197–302.
- YAMAGUCHI, M.; HWANG, P.M.; and CAMPBELL, J.D. 1970. Latent o–diophenol oxidase in mushrooms. *Can. J. Biochem.* 48: 198–202.
- ZUNINO, H.; BORIE, F.; AGUILERA, S.; MARTIN, J.P.; and HAIDER, K. 1982. Decomposition of ^{14}C –labelled glucose, plant and microbial products and phenols in volcanic ash–derived soils of Chile. *Soil Biol. Biochem.* 14: 37–43.
- ZUNINO, H.; PEIRANO, P.; CAIOZZI, M.; MARTIN, J.P.; and HAIDER, K. 1982a. Decomposition of ^{14}C –labelled lignins, model humic acid polymers, and fungal melanins in allophanic soils. *Soil Biol. Biochem.* 14: 289–293.
- 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.