

LAS ENZIMAS DEL SUELO Y SU APLICACIÓN EN LA CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE SITIOS.

Por Jorge E. Paolini

IVIC, Centro de Ecología, Apdo. 21827, Caracas 1020-A (Venezuela)

e-mail: jpaolini@ivic.ivic.ve

RESUMEN

En el ciclaje de nutrientes del suelo participan un sinnúmero de enzimas, las cuales transforman los elementos unidos en formas orgánicas a formas inorgánicas disponibles a las plantas.

Las enzimas principalmente son de origen microbiano aunque también pueden derivarse de los restos de animales y vegetales. En el suelo se encuentran en diferentes estados; variando desde asociadas a los organismos vivientes (endoenzimas) hasta inmovilizadas en forma de complejos con las arcillas y las sustancias húmicas (exoenzimas o abióticas). Debido a su origen microbiano, las actividades enzimáticas pueden ser usadas como indicadores o biosensores para detectar cambios tempranos en la biología y bioquímica del suelo causados, por ejemplo, por diferentes formas de manejo (adición de fertilizantes y pesticidas, labranza, rotación de cultivos, etc.) y por factores ambientales.

En el presente trabajo se estudiaron las actividades enzimáticas de suelos bajo condiciones naturales del Alto Llano Central de Venezuela. Las enzimas escogidas estaban relacionadas con el ciclo del nitrógeno (ureasa y proteasa), del fósforo (fosfomonoesterasas) y la actividad biológica (deshidrogenasa).

Los suelos bajo vegetación boscosa mostraron mayores actividades en las enzimas fosfomonoesterasa ácida, proteasa y deshidrogenasa al compararse con los suelos de vegetación natural de sabana, lo cual está asociado a una mayor fertilidad natural de los mismos. Algunas de las características fisicoquímicas (C_{org} , N_{total} , conductividad y calcio intercambiable) se correlacionan significativamente con las actividades enzimáticas.

INTRODUCCION

Dentro de las transformaciones biológicas que tienen lugar en el suelo se sabe que las enzimas, y la actividad que éstas desarrollan juegan un papel relevante (Burns, 1978).

Las enzimas son proteínas que actúan como catalizadores orgánicos, transformando sustancias orgánicas e inorgánicas sin experimentar cambios en si. Ellas disminuyen la energía de activación

de las reacciones bioquímicas y permiten que las mismas se produzcan a temperaturas y presiones a las que normalmente no tendrían lugar.

Una parte de las enzimas del suelo son, sin duda, extracelulares siendo liberadas durante el metabolismo y muerte celular; otras son intracelulares, formando parte de la biomasa microbiana. También existen enzimas inmovilizadas que son las que pueden mantener un nivel constante y estable de la actividad enzimática en el suelo, independiente de la proliferación microbiana y de las formas usuales de regulación de la síntesis y secreción de enzimas. Este tipo de enzimas inmovilizadas pueden permanecer unidas a coloides minerales (arcillas) u orgánicos (sustancias húmicas) siendo muy resistentes a los procesos de desnaturalización.

Nannipieri et al. (1990) indicaron que las actividades enzimáticas son específicas de un sustrato y están relacionadas con reacciones específicas. Por ello es difícil inferir, mediante un solo valor de actividad enzimática, el conocimiento del estado general de nutrientes de un suelo o determinar la actividad microbiológica del mismo. Sin embargo, las mediciones simultáneas de varias enzimas si pueden resultar útiles como marcadores de bioactividad y pueden utilizarse como índices de fertilidad bioquímica de los suelos (Gil Sotres et al., 1992).

De las enzimas determinadas en suelos, las hidrolasas son las más estudiadas, si bien también lo han sido otros grupos entre las que se pueden citar a las oxidoreductasas, liasas y transferasas. Muchas de ellas están relacionadas a los ciclos de elementos tan importantes como el carbono (celulasas, β -glucosidasa), nitrógeno (ureasa y proteasa), fósforo (fosfatasa) y azufre (arilsulfatasa).

Las determinaciones de actividades enzimáticas han sido utilizadas con diferentes propósitos en los estudios realizados sobre el tema: como indicadores de la productividad, como medida indirecta de la biomasa microbiana, para comparar los efectos de la rizósfera, como índice potencial del suelo para descomponer distintos materiales orgánicos (por ejemplo composts, residuos orgánicos, lodos activados, etc.), como indicadores de posible contaminación con metales pesados o pesticidas, etc. (Burns, 1982; Dick, 1992; Dick y Tabatabai, 1993).

A continuación procederemos a discutir algunas de las características de las enzimas estudiadas en este trabajo:

1. Actividad deshidrogenasa

Se considera que la actividad deshidrogenasa se produce de manera intracelular y que esta asociada a los procesos respiratorios de los microorganismos, por ello se estima que es más dependiente del estado metabólico y de la actividad biológica general que cualquiera de las demás enzimas presentes en el suelo. De esta manera ha sido utilizada como un indicador de la actividad microbiana del suelo (Nannipieri et al., 1990). La medida de esta actividad enzimática en el suelo comprende distintos sistemas de deshidrogenasas, involucradas en la oxidación biológica de compuestos orgánicos mediante procesos de deshidrogenación, representadas por la siguiente reacción:



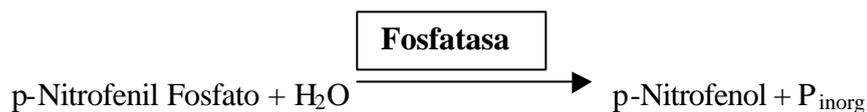
Donde XH_2 es un compuesto orgánico (donador de hidrógenos) y A es un aceptor de hidrógenos.

Este tipo de reacciones supone la existencia de un aceptor de electrones que en nuestro caso, es una sal de tetrazolio (TTC, cloruro de trifeniltetrazolio) la cual será reducida a la correspondiente sal de formazano coloreada e insoluble en agua, y después se extraerá con un disolvente orgánico (p. ej. metanol). La medida colorimétrica de la cantidad de sustrato transformado en trifenilformazano, cuantificará la actividad deshidrogenásica.

2. Actividad de las fosfatasas

La disponibilidad del fósforo para los cultivos depende, en gran parte de la mineralización que experimenten las diferentes fracciones orgánicas, por lo que las enzimas fosfatasas del suelo tendrán un papel importante en las reacciones que tengan en dicho proceso. Las fosfatasas son enzimas inducibles y la intensidad de su excreción por las raíces de las plantas y los microorganismos, obviamente esta determinada por sus requerimientos de fosfatos de éstos. En general, los cambios producidos sobre estas enzimas por la aplicación de fertilizantes se deben a un aumento de los microorganismos del suelo y a un mayor desarrollo de la planta, lo que conlleva un incremento de la materia orgánica y de la actividad enzimática (Speir y Ross, 1978).

La determinación de la actividad de la fosfatasa en los suelos se realiza con sustratos artificiales de hidrólisis rápida como el p nitrofenolfosfato (p-NFF), el cual se hidroliza a p nitrofenol (p-NF) desarrollando un color amarillo en medio básico susceptible a la determinación colorimétrica (Tabatabai, 1994), tal como se describe en la siguiente reacción:



Las fosfatasas poseen dos intervalos óptimos de pH para realizar su actividad catalítica y habitualmente se refieren a fosfatasas ácidas y fosfatasas alcalinas. Tabatabai (1994) indica que la fosfatasa ácida es producida tanto por bacterias, hongos y actinomicetos, como por las raíces de las plantas. Sin embargo, éstas no producen fosfatasas alcalinas, siendo totalmente de origen microbiano.

3. Actividad de la ureasa

La enzima ureasa cataliza la reacción de hidrólisis de la urea a amonio y dióxido de carbono, y se encuentra presente en plantas superiores y en los microorganismos (particularmente las bacterias). Bajo el nombre común de ureasas se aglutinan numerosas amidohidrolasas e hidrolasas que actúan sobre enlaces C-N (no peptídicos) de amidas lineales.

La reacción catalizada por esta enzima puede ser representada por la siguiente reacción:



Durante largo tiempo, esta enzima ha sido objeto de numerosos estudios, puesto que afecta a las reacciones de uno de los fertilizantes nitrogenados más utilizados en la agricultura, como lo es la urea. Su presencia en los suelos, mayoritariamente, tiene un origen microbiano, liberada tanto por células vivas como por células microbianas que se han desintegrado. Sin embargo, es evidente que esta enzima debe de estar asociada y protegida por los constituyentes del suelo ya que de otra manera sería rápidamente degradada o inactivada (Bremner y Mulvaney, 1978).

La actividad ureásica es afectada por la naturaleza de la cobertura vegetal y además fluctúa a lo largo del tiempo. Aquellos suelos que soportan densas poblaciones vegetales tienden a presentar altos niveles, los cuales pueden ser modificados por cambios de vegetación.

4. Actividad de la proteasa

Las proteasas catalizan la hidrólisis de las proteínas a polipéptidos y la de oligopéptidos a aminoácidos, por lo que están involucradas en el ciclo del nitrógeno. De acuerdo a Nannipieri et al. (1979) la actividad proteásica tiene un origen inducido por la proliferación de las poblaciones microbianas que realizan una síntesis de esta enzima, la cual posteriormente disminuye por tener una corta vida en el suelo. Así como otras enzimas, ésta puede considerarse dependiente de la biomasa microbiana, por ello valores bajos en esta actividad se asocian a una baja actividad

microbiológica del suelo. Para el ensayo de la actividad proteolítica del suelo se usan como sustratos generalmente proteínas de elevado peso molecular, como por ejemplo, caseína y gelatina y se determinan los aminoácidos liberados espectrofotométricamente con el reactivo Folin-Ciocalteu o en su defecto con sustratos sintéticos de bajo peso molecular como la α -benzoil-arginamida y el amonio liberado se determina con electrodos sensitivos a iones o colorimétricamente.

El presente trabajo tiene como objetivo, evaluar la actividad de varias enzimas (deshidrogenasa, fosfomonoesterasa ácida, ureasa y proteasa) en suelos del Alto Llano Central venezolano y establecer algunas relaciones entre las actividades enzimáticas y las propiedades químicas del suelo.

MATERIALES Y METODOS

Dos toposecuencias contiguas de suelos fueron seleccionadas en el área de Calabozo (Edo. Guárico) (ver Tabla 1). La selección de los suelos se llevo a cabo de acuerdo al tipo de vegetación predominante (sabana o bosque); información detallada puede ser consultada en Montes y San José (1995).

Las propiedades químicas de los suelos fueron determinadas por los métodos clásicos de análisis y los ensayos enzimáticos de acuerdo a las metodologías descrita por Tabatabai (1994) y Ladd y Butler (1972).

Tabla 1. Formas de Paisaje y clasificación de los suelos estudiados

Sitio	Paisaje	Clasificación de suelos	Vegetación
CAL 1	Mesa disectada de Calabozo	Haplustox	Sabana
CAL 2	Mesa disectada de Calabozo	Haplustox	Sabana
MAT	Mesa disectada de Calabozo	Haplustox	Bosque semideciduo
BGAL	Planicie aluvial del río Orituco	Haplustalf	Bosque de Galería mixto
PAL	Planicie aluvial del río Orituco	Chromuster	Palmar
BAJIO	Planicie aluvial del río Orituco	Tropaquult	Sabana inundable
BEC 1	Planicie aluvial del río Orituco	Haplustox	Sabana
BEC 2	Planicie aluvial del río Orituco	Haplustox	Sabana

RESULTADOS Y DISCUSION

Los datos de las propiedades químicas se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Propiedades químicas de los suelos.

Suelo	pH	C	Nt	Pt	Cond	Ca	Mg	Na	K	Al	H
		(%)	(%)	mg kg ⁻¹	μS cm ⁻¹	cmol kg ⁻¹					
CAL1	5,55	0,52	0,050	86	13	0,58	0,40	0,01	0,02	0,10	0,10
CAL2	5,20	0,48	0,049	121	13	0,61	0,45	0,02	0,07	0,15	0,01
MAT	5,70	1,68	0,230	108	74	5,09	1,49	0,02	0,27	0,06	0,00
BGA	4,82	0,99	0,108	256	21	0,81	1,01	0,03	0,03	0,64	0,24
PAL	5,60	1,35	0,147	92	14	1,25	3,37	0,23	0,12	0,71	0,43
BAJ	4,85	1,08	0,130	117	15	1,03	2,73	0,23	0,15	4,48	1,16
BEC1	4,85	1,00	0,108	53	14	0,21	0,15	0,02	0,03	1,09	0,61
BEC2	4,65	1,35	0,142	74	14	0,24	0,21	0,02	0,02	1,75	1,15

Todos los suelos presentan un pH ácido, entre 4,8 y 5,7. El contenido de carbono orgánico varió de 0,48% a 1,68 % y, nitrógeno total de 0,05 a 0,23 %. Los valores más altos corresponden al suelo de la comunidad boscosa de la Mesa disectada de Calabozo (MAT) y los más bajos a las sabanas dominadas por las especies de *Axonopus* y *Trachypogon* (CAL 1 y CAL 2). En todos los suelos, los cationes intercambiables fueron extremadamente bajos e inferiores a los niveles críticos para muchos cultivos. El bajo status de nutrientes de los suelos, junto con otras condiciones desfavorables como el fuego y la distribución estacional de la precipitación, limitan la productividad vegetal y hacen las sabanas inadecuadas para los cultivos, y en la mayoría de los casos su uso esta restringido a la ganadería extensiva pero con una baja carga animal de 0,1 UA ha⁻¹ en promedio.

En la Tabla 3 se muestran los valores de las actividades enzimáticas de los suelos estudiados. Estas son similares a los encontrados para suelos naturales o agrícolas.

Los suelos estudiados presentan diferencias, la mayor variación fue para la ureasa (max/min = 17,2) y la menor para la fosfomonoesterasa ácida (max/min = 5,3). El suelo bajo bosque de la Mesa disectada de Calabozo (MAT) mostró los valores más altos de fosfomonoesterasa ácida, proteasa y deshidrogenasa coincidente con el hecho de que éste presenta una mejor condición de fertilidad que los otros.

Tabla 3. Actividades enzimáticas de los suelos estudiados.

Suelo	Deshidrogenasa	Ureasa	Fosfatasa acida	Proteasa
	$\mu\text{g TFF g}^{-1} 24 \text{ h}^{-1}$	$\mu\text{g N-NH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$	$\mu\text{g p-NF g}^{-1} \text{ h}^{-1}$	$\mu\text{g tirosina g}^{-1} \text{ h}^{-1}$
CAL 1	252	8	103	5
CAL 2	427	16	177	9
MAT	618	16	545	55
BGAL	270	7	197	14
PAL	195	86	258	15
BAJIO	47	8	179	16
BEC 1	193	5	248	10
BEC 2	254	19	390	19

DESHIDROGENASA

La actividad de la deshidrogenasa (DH) en los suelos estudiados varía de 47 a 618 $\mu\text{g TFF g}^{-1} \text{ suelo } 24 \text{ h}^{-1}$ (media 282). El suelo bajo vegetación de bosque en la Mesa disectada de Calabozo (MAT) presenta la actividad más alta, en cambio en el suelo de bajío o sabana estacional inundable (BAJ) la más baja. Este último muestra los valores más altos de aluminio e hidrógeno intercambiable. Los niveles de actividad DH en los suelos de Venezuela son comparables a los encontrados por Kulinska et al. (1982) y Baligar et al. (1999) en suelos del cerrado brasileño con una vegetación similar a la de Los Llanos y en otros países tropicales como India (Bopaiah & Shekara, 1991; Sethi et al., 1990) y Costa de Marfil (Bauzon et al., 1977).

La actividad deshidrogenásica correlaciona significativamente con la conductividad ($r = 0,78$), el calcio intercambiable ($r = 0,72$), la actividad proteásica ($r = 0,69$) e inversamente con el aluminio ($r = - 0,69$) y el hidrógeno intercambiable ($r = - 0,70$).

FOSFOMONOESTERASA ÁCIDA.

Los niveles de la fosfomonoesterasa ácida de los suelos de las toposecuencias son comparables a los observados en otros tipos de suelos. El valor más alto fue hallado para el suelo bajo vegetación de bosque (MAT) y el más bajo corresponde a un suelo bajo vegetación típica de sabana (CAL 1).

Así en Venezuela para suelos de sabana Paolini & España (1998) encuentran valores comprendidos entre 72 y 160 $\mu\text{g p-NF g}^{-1} \text{ suelo h}^{-1}$ y López-Hernández y colaboradores (1989)

entre 78 y 323 $\mu\text{g p-NF g}^{-1}$ suelo h^{-1} . Contreras et al. (1996), obtienen para suelos agrícolas degradados enmendados con abonos verdes bajo mínima labranza, valores comprendidos entre 53 y 89 $\mu\text{g p-NFg}^{-1}$ suelo h^{-1} . En Brasil Kulinska et al. (1982) reportan valores entre 181 y 905 $\mu\text{g p-NF g}^{-1}$ y Baligar et al. (1999) entre 55 y 289 $\mu\text{g p-NF g}^{-1}$.

La actividad de la fosfomonoesterasa ácida correlaciona significativamente con el carbono orgánico ($r = 0,86$), el nitrógeno total ($r = 0,89$), la conductividad ($r = 0,80$), el calcio intercambiable ($r = 0,74$) y la actividad proteásica ($r = 0,90$).

UREASA

Los valores de la actividad ureásica varían entre 5 y 86 $\mu\text{g N-NH}_4 \text{g}^{-1}$ suelo. h^{-1} (media 21), la actividad más alta fue observada para el suelo de palmar (PAL) y la más baja para el suelo de sabana de la Mesa disectada de Becerra (BEC 1). A excepción del más alto, los valores observados coinciden con los reportados para suelos de sabana en otras áreas tropicales (Bauzon et al., 1977; Kulinska et al., 1982 y Baligar et al., 1999).

La actividad de la ureasa no muestra ninguna correlación ni con los parámetros fisicoquímicos ni con ninguna otra enzima.

PROTEASA (CASEINASA)

Los niveles de la enzima proteasa varían de 5 a 55 $\mu\text{g tirosina g}^{-1}$ suelo. h^{-1} (media 18). El más alto se observó en el suelo bajo vegetación de bosque en la mesa disectada de Calabozo (MAT). A diferencia de las otras enzimas estudiadas, la disponibilidad de datos en suelos tropicales no es tan abundante; sin embargo, los valores observados son también similares a los encontrados por otros autores en suelos de las zonas templadas (Klein & Koths, 1980; Ross & McNeilly, 1975).

La proteasa mostró una fuerte correlación con el carbono orgánico ($r = 0,78$), el nitrógeno total ($r = 0,89$), la conductividad ($r = 0,96$) y el calcio intercambiable ($r = 0,95$) al igual que la fosfomonoesterasa ácida y adicionalmente con el potasio intercambiable ($r = 0,85$).

A través de un análisis de componentes principales con rotación Varimax se relacionaron las propiedades químicas de los suelos y las actividades enzimáticas con el objeto de determinar la factibilidad de utilizar estas últimas como indicadores de la actividad biológica de los suelos del Alto Llano Central de Venezuela.

El primer componente principal explica un 49,7 % de la varianza total de los datos, y esta asociado a la fertilidad química y biológica del suelo dado que entre los parámetros que tuvieron

altas saturaciones podemos incluir al carbono orgánico, nitrógeno total, conductividad, calcio intercambiable, potasio intercambiable y las actividades de la fosfomonoesterasa ácida y la proteasa. El segundo componente principal explica 21,9 % de la varianza total y representa la acidez del suelo ya que se encuentra asociado al pH, el hidrógeno intercambiable y el aluminio intercambiable. La actividad deshidrogenásica tiene, también una alta saturación.

El tercer componente principal incluye 13,5 % de las variables originales y muestra una alta saturación en el magnesio intercambiable, el sodio intercambiable y la actividad ureásica. El cuarto componente principal contiene apenas 8,5% de la varianza total y se correlaciona con el fósforo total.

CONCLUSIONES

1. Las actividades enzimáticas de las dos toposecuencias en el Alto Llano Central de Venezuela son comparables a las reportadas anteriormente para suelos bajo vegetación natural y suelos agrícolas.
2. Los suelos bajo vegetación de sabana presentan los valores más bajos, comparados con su contraparte de vegetación boscosa.
3. Algunas características químicas correlacionaban significativamente con las actividades enzimáticas.

AGRADECIMIENTO

El autor agradece a la Fundación Alexander von Humboldt (Alemania) el apoyo financiero para la participación en el Seminario Taller “ Estudios de Postgrado para Profesionales Latinoamericanos: Retos y Posibilidades de Cooperación Científica a Nivel Regional y Supraregional para un Desarrollo Sostenible” en San José, Costa Rica (19 al 23 de marzo del 2001).

REFERENCIAS

Baligar, V.C., R.J. Wright, N.K. Fagenia & G.V.E. Piha (1999) Enzyme activities in Cerrado soils of Brazil. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 30(9 & 10): 1551-1560.

Bauzon, D., A.M. Aubry, R. Van den Driessche & Y. Dommergues (1977) Contribution á la connaissance de la biologie des sols de la savane de Lamto, Côte d'Ivoire *Rev. Ecol. Biol. Sol.* 14: 343-361.

- Bopaiah, B.M. & H. Shekara Shetty (1991) Soil microflora and biological activities in the rhizospheres and root regions of coconut based multistoreyed cropping and coconut monocropping system. *Soil Biol. Biochem.* 23: 89-94.
- Bremner, J.M. & R.L. Mulvaney (1978) Urease activity in soils. Pp. 149-196. En: *Soil Enzymes*. Burns, R.G. (Ed.), Academic Press, New York.
- Burns, R.G. (1978) Enzyme activity in soil. Some theoretical and practical considerations. Pp. 295-340. En: *Soil enzymes*, Burns R.G. (Ed.), Academic Press, New York..
- Contreras, F., C. Rivero & J. Paolini (1996) Efecto del uso de residuos orgánicos y dos tipos de labranza sobre la actividad de la fosfatasa ácida de un Alfisol. *Rev. Fac. Agron. (Maracay)* 22: 139-149.
- Dick, R.P. (1992) A review: long-term effects of agricultural systems on soil biochemical and microbial parameters. *Agric. Ecosys. Environ.* 40: 25-36.
- Dick, W.A. & M.A. Tabatabai (1993) Significance and potential uses of soil enzymes. Pp. 95-127. En: *Soil Microbial Ecology. Applications in agricultural and environmental management*. Blaine, F. (Ed.) Marcel Dekker, New York.
- Gil Sotres, F., M.C. Trasar-Cepeda, C. Ciardi & B. Ceccanti (1992) Biochemical characterization of biological activity in very young mine soils. *Biol. Fertil. Soils* 13: 25-30.
- Klein, T.M. & J.S. Kothe (1980) Urease, protease and acid phosphatase in soil continuously cropped to corn by conventional or no-tillage methods. *Soil Biol. Biochem.* 12: 293-294.
- Kulinska, D., V.L.L. Camargo & A. Drozdowicz (1982) Enzyme activities in "Cerrado" soils in Brazil. *Pedobiologia* 24: 101-107.
- Ladd, J.N. & J.H.A. Butler (1972) Short-term assays of soil proteolytic enzyme activities using proteins and dipeptide derivatives as substrates. *Soil Biol. Biochem.* 4: 19-30.
- López-Hernández, D., M. Niño, P. Nannipieri & J.C. Fardeau (1989) Phosphatase activity in *Nasutitermes ephrate* termite nests. *Biol. Fertil. Soils* 7: 134-137.
- Montes, R. & J.J. San José (1995) Vegetation and soil analysis of toposequences in the Orinoco Llanos. *Flora* 190: 1-33.

- Nannipieri, P., S. Grego & B. Ceccanti (1990) Ecological significance of the biological activity in soil. Pp. 293-355. En: Soil Biochemistry, Vol. 6. Bollag J.M. and G. Stotzky (Eds.), Marcel Dekker, New York.
- Nannipieri, P., F. Pedrazzini, P.G. Arcara & C. Piovaneli (1979) Changes in amino acids, enzyme activities, and biomasses during soil microbial growth. Soil Sci. 127: 26-34.
- Paolini, J. & M. España (1998) Phosphatase activity in savanna soils. Proceedings of the 16 th World Congress of Soil Science. Montpellier (France), August 1998.
- Ross, D.J. & B.A. McNeilly (1975) Studies of a climosequence of soils in tussock grasslands. 3. Nitrogen mineralization and protease activity. New Zealand J. Sci. 18: 361-375.
- Sethi, V., A. Kaushik & R. Khatri (1990) Soil dehydrogenase activity and nitrifier populations in relation to different soil-plant associations. Trop. Ecol. 31: 112-117.
- Speir, T.W. & D.J. Ross (1978) Soil phosphatase and sulphatase. Pp. 176-250. In: Soil enzymes (Burns, R.G., Ed.) Academic Press, New York.
- Tabatabai, M.A. (1994) Soil enzymes. Pp. 775-833. En: Methods of soil analysis. Part. 2 Microbiological and biochemical properties. Mickelson S.H. & J.M. Bigham (Eds.) SSSA Book Series, no. 5, Madison, WI.