

# Efeito da temperatura, pH e vestígios de $Hg^{2+}$ e $Pb^{2+}$ na actividade de desidrogenases e urease num solo da região de Évora

## Effect of temperature, pH and $Hg^{2+}$ and $Pb^{2+}$ traces in dehydrogenase and urease activities of a soil from Évora region

M. R. Martins<sup>1,2</sup>, F. Santos<sup>1</sup>, P. Candeias<sup>1</sup> & J. Cruz-Morais<sup>1,2</sup>

### RESUMO

As actividades das enzimas no solo são um importante indicador da sua qualidade. Neste estudo procedeu-se à caracterização da actividade enzimática de desidrogenases (EC 1.1.1) e da urease (EC 3.5.1.5) de um solo sob *Olea europaea* L. da região de Évora. As constantes cinéticas  $K_m$  e  $V_{max}$ , foram determinadas usando como substratos o cloreto de *p*-iodonitrotetrazolio (INT) e a ureia, respectivamente. Foi avaliado o efeito nas referidas actividades provocado pelo pH, temperatura e vestígios de  $Hg^{2+}$  e de  $Pb^{2+}$ .

As actividades máximas obtiveram-se a pH = 8,5 e 40 °C, com  $K_m = 0,5$  mM e  $V_{max} = 5,4 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$ , para a actividade de desidrogenases e a pH = 10 e 37 °C, com  $K_m = 25,7$  mM e  $V_{max} = 2,0 \times 10^{-2} \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$ , para a urease. Estas actividades foram inibidas por diferentes concentrações de  $Hg^{2+}$ , mas apenas a actividade da urease foi inibida pelo  $Pb^{2+}$ . Estes resultados são comparáveis com os referidos na literatura para estas enzimas.

**Palavras-chave:** Desidrogenases, Enzimas do solo, Qualidade do solo, Urease.

### ABSTRACT

Enzyme activities are often used as indicator of soil quality. This study reports on dehydrogenase (EC 1.1.1) and urease (EC 3.5.1.5) activities of a soil under *Olea europaea* L. from Évora region. Kinetic constants  $K_m$  and  $V_{max}$  were determined using *p*-iodonitrotetrazolium chloride (INT) and urea, respectively. Effects of pH, temperature and  $Hg^{2+}$  and  $Pb^{2+}$  traces on both activities were determined.

Maximal activity was obtained at pH = 8.5 and 40 °C,  $K_m = 0.5$  mM and  $V_{max} = 5.4 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$ , for dehydrogenase and at pH = 10 and 37 °C,  $K_m = 25.7$  mM and  $V_{max} = 2.0 \times 10^{-2} \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$ , for urease. These activities were inhibited by different concentrations of  $Hg^{2+}$ , but only the urease activity was inhibited by  $Pb^{2+}$ . Results of this study are comparable to those reported in the literature for these enzymes.

<sup>1</sup> Departamento de Química, Universidade de Évora, Rua Romão Ramalho, 7000-671 Évora, e-mail: cmorais@uevora.pt; <sup>2</sup>ICAM, Universidade de Évora, Apartado 94, 7002-554 Évora

**Key-words:** Dehydrogenases, Soil enzyme, Soil quality, Urease.

## INTRODUÇÃO

A qualidade do solo depende de propriedades físico-químicas e biológicas relacionadas com a sua textura, composição, humidade, pH, microrganismos e enzimas activos nele presentes, os quais podem ser influenciados pelo tipo de culturas, mobilização do solo e aplicação de xenobióticos, como produtos fitofarmacêuticos, poluentes de origem industrial, municipal ou outros. Os enzimas do solo têm um papel relevante na libertação dos nutrientes necessários ao crescimento microbiano e das plantas e na biotransformação de xenobióticos (Dick, 1998). As actividades enzimáticas do solo podem resultar de células activas (animais, plantas e microrganismos), células inteiras já mortas, detritos celulares ou, ainda, de complexos enzima-argila ou colóides húmicos (Taylor *et al.*, 2002).

As actividades enzimáticas de desidrogenases (E.C. 1.1.1), fosfatases (EC 3.1.3.), arilsulfatase (EC. 3.1.6.1.), celulase (E.C. 3.2.1.4),  $\beta$ -glucosidase (E.C. 3.2.1.21) e urease (E.C. 3.5.1.5) têm sido utilizadas, nalguns estudos, como indicadores da qualidade do solo. Desidrogenases, por exemplo, são enzimas endocelulares, presentes apenas nas células viáveis e a sua actividade no solo está descrita como reflexo da actividade de microrganismos, incluindo bactérias e fungos, pelo que é frequentemente utilizada como indicador do metabolismo oxidativo microbiano em função do tipo, profundidade, conteúdo de matéria orgânica e poluentes do solo (Camiña *et al.* 1998; Trasar-Cepeda *et al.*, 2000; Monkiedje *et al.*, 2002; Taylor *et al.*, 2002; Sukul, 2006).

A urease é um enzima extracelular, também presente no interior das células, res-

ponsável pela hidrólise da ureia no solo, com formação de ião amónio e carbonato. A sua actividade está correlacionada com o processo de mineralização do N no solo e a sua presença aqui é originada principalmente a partir de plantas e microrganismos (Marzadori *et al.*, 1998; Sinsabaugh *et al.*, 2000).

A acumulação de metais pesados no solo em quantidades elevadas é um dos factores de maior impacte nos seus processos bioquímicos. Alguns estudos mostram que a presença de metais pesados inibe a actividade de diversos enzimas do solo (Mora *et al.*, 2005; Chaperon *et al.*, 2007, 2008). O grau de inibição das actividades enzimáticas do solo pelos metais pesados está estreitamente correlacionado com o tipo de solo (Brady & Ray, 1999). Mora *et al.* (2005) refere que solos contaminados com os metais As, Cd, Cu, Mn, Pb e Zn apresentaram actividades enzimáticas de desidrogenases, arilsulfatase e  $\beta$ -glucosidase muito baixas, as quais aumentaram após remediação “*in situ*” (Sevilha, Espanha). Segundo Chaperon *et al.* (2007, 2008), a presença de Ag, Cu, Pb, Zn e Hg influenciou as actividades de desidrogenases e da urease em solos de floresta (Canadá), dependendo da concentração, da presença simultânea de alguns destes metais e do tipo de solo.

Estudos de caracterização de actividades de desidrogenases e urease nos solos de Portugal são muito escassos, pelo que foi objectivo do presente estudo caracterizar a actividade enzimática de desidrogenases e da urease num solo da região de Évora (Alentejo) e avaliar o efeito de  $Hg^{2+}$  e  $Pb^{2+}$ , nessas actividades. A actividade de desidrogenases foi determinada pelo método de von Mersi & Schinner (1991) modificado (Camiña *et al.*, 1998) e a da urease pelo método de Kandeler & Gerber (1988) modificado. As constantes cinéticas,  $K_m$  e  $V_{m\max}$  foram determinadas utilizando como substratos o

p-iodonitrotetrazolio (INT) e a ureia, para desidrogenases e urease, respectivamente. Foi ainda avaliado o efeito da temperatura, pH e de vestígios de  $Hg^{2+}$  e  $Pb^{2+}$  nas referidas actividades.

## MATERIAL E MÉTODOS

Estudou-se um solo do sudoeste de Portugal situado em Évora, Alentejo (38°36'N, 1°16'W) com cultura de olival (*Olea europae* L.) em pousio, sem quaisquer tratamentos com pesticidas, adubos ou fertilizantes, durante os últimos 10 anos. De acordo com a carta de solos 36 C dos Solos de Portugal, trata-se de um solo litólico, não húmico de rochas eruptivas (Pmg) (Cardoso, 1974). As amostras foram recolhidas entre os 5 – 15 cm de profundidade, secas ao ar, crivadas por tamiz de malha < 2 mm e guardadas a 4 °C, para análise.

As principais características físico-químicas do solo foram determinadas de acordo com os métodos de referência para análises do solo (Carter, 1993; Rowell, 1994). Os dados da textura foram obtidos por sedimentometria com raios X (Sedi-graph, 5100), corrigidos para o método da análise mecânica, sem destruição de carbonatos. O azoto total foi determinado pelo método de Kjeldahl, o azoto nítrico por potenciometria, utilizando um eléctrodo selectivo de iões, e o fósforo pelo método espectrométrico de Egner-Riehm (Greenberg *et al.*, 1992). A capacidade de troca foi determinada pelo método do acetato de amónio a pH = 7 (Rowell, 1994). O  $Ca^{2+}$  foi quantificado por espectrometria de absorção atómica em câmara de grafite e o  $Na^+$  e  $K^+$  por fotometria de emissão de chama (Rowell, 1994).

A actividade de desidrogenases foi determinada em 1 g de solo (p.s.) pelo método de von Mersi & Schinner (1991) modificado

por Camiña *et al.* (1998), utilizando como substrato o cloreto de 2-*p*-iodofenil-3-*p*-nitrofenil-5-feniltetrazolio (INT), que é convertido por desidrogenases em iodonitrotetrazólio-formazão (INTF). Este foi extraído com uma mistura de dimetilformamida e etanol, de modo a minimizar a adsorção do INTF aos minerais do solo (Camiña *et al.*, 1998) e quantificado a 490 nm (Taylor *et al.*, 2002). Foi efectuado um ensaio em branco nas mesmas condições, tendo-se adicionado o substrato só após a adição da solução extractante.

A actividade da urease foi quantificada pelo método de Kandeler & Gerber (1988) modificado, sendo o amónio libertado determinado pela reacção de Berthelot, na qual o salicilato de sódio reage com o ácido dicloroisocianúrico, na presença de nitroprussiato de sódio, formando um complexo esverdeado em meio alcalino (Kandeler & Gerber, 1988; Taylor *et al.*, 2002). Neste ensaio, adicionou-se 1 g de solo (p.s.) a 0,5 mL de solução de ureia 720 mM e 4 mL de solução tampão borato 75 mM, pH 10 e incubação a 37 °C (b.a.) durante 2 horas, sob agitação. A reacção foi terminada com a adição de 6mL de KCl/HCl pH ~ 2 e, após 30 minutos, procedeu-se à leitura da absorbência a 690nm. Foi efectuado um ensaio em branco nas mesmas condições, tendo-se adicionado o substrato só após a adição da solução de KCl/HCl. Em todas as determinações enzimáticas, foram efectuados 4 replicados.

O efeito da temperatura nas actividades enzimáticas de desidrogenases e urease foi avaliado fazendo variar a temperatura de incubação do solo entre 20 - 50 °C e o pH entre 6,5 e 12, respectivamente, com base em estudos prévios e nos valores indicados na literatura para estes enzimas (Trevors, 1984; Kandeler & Gerber, 1988; Subhani *et al.*, 2001; Taylor *et al.*, 2002).

As constantes cinéticas  $K_m$  e  $V_{máx}$  foram

determinadas recorrendo à linearização de Lineweaver-Burk, usando INT (0,25 - 1,25 mM) ou ureia (80 - 2560 mM) como substrato, para as actividades de desidrogenases e urease, respectivamente.

Os efeitos do Hg<sup>2+</sup> e Pb<sup>2+</sup> nas actividades enzimáticas de desidrogenases e urease do solo foram determinados adicionando à solução do solo, soluções de HgCl<sub>2</sub> (0,23-10,91 mM) e soluções de PbCl<sub>2</sub> (0,14 - 10,91 mM). Nos ensaios em que se observou um efeito inibitório, procedeu-se à determinação dos valores de IC<sub>50</sub> (concentração que levou a uma diminuição de 50 % na actividade enzimática, como resposta dos microrganismos sensíveis ao respectivo metal).

Para avaliação do efeito do Hg<sup>2+</sup> e Pb<sup>2+</sup> nas actividades enzimáticas de desidrogenases e urease, procedeu-se à análise de variância (ANOVA - One way) para um intervalo de confiança de 95 % (P < 0,05), usando o programa SPSS<sup>®</sup> 16.0 para Windows.

O efeito inibitório sobre as actividades de desidrogenases e urease provocado por cada um dos metais em estudo foi determinado usando a correlação dose-resposta para cada um dos metais adicionado ao solo. A Equação 1 foi utilizada para cálculo da resposta da actividade enzimática (Greco *et al.*, 1995)

$$y = A_1 + \frac{A_2 - A_1}{1 + 10^{(\log X_0 - X)/p}} \quad (\text{Equação 1})$$

em que A<sub>2</sub> e A<sub>1</sub> são, respectivamente, as respostas máxima e mínima dos enzimas do solo obtidas com uma amostra controlo, p é o parâmetro de declive da curva dose-resposta, X é a dose aplicada e log X<sub>0</sub> é a concentração que corresponde a 50 % da actividade enzimática. Este modelo não linear foi ajustado utilizando o Origin 7.1 (OriginLab<sup>®</sup> Corporation, 2003).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

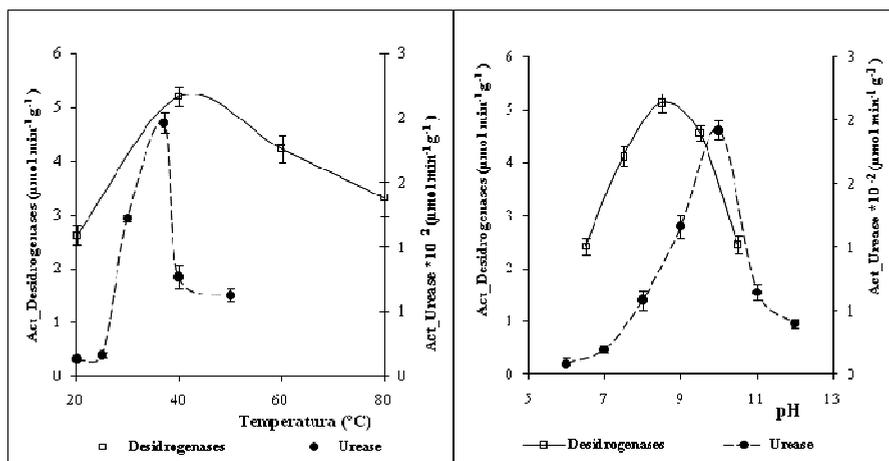
O Quadro 1, mostra que o solo apresentou uma textura franco-argilosa, com pH 6,0, baixos valores de condutividade eléctrica e de matéria orgânica, valores estes que se encontram dentro dos limites referidos para um solo do tipo litólico, não húmico de rochas eruptivas (Pmg), como foi o caso do solo em estudo (Cardoso, 1974).

**Quadro 1-** Principais características do solo em estudo

Solo (10 – 15 cm)		
Argila	36 %	Textura Franco - argilosa
Limo	25 %	
Areia	39%	
pH (H <sub>2</sub> O)		5,97
CE (mmhos cm <sup>-1</sup> )		0,03
Matéria orgânica (g.kg <sup>-1</sup> )		2,00
N total (mg kg <sup>-1</sup> )		5,60
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg kg <sup>-1</sup> )		11,00
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (mg kg <sup>-1</sup> )		6,00
CEC (cmol <sub>(c)</sub> kg <sup>-1</sup> )		12,7
Ca <sup>2+</sup> (cmol <sub>(c)</sub> Kg <sup>-1</sup> )		2,99
Mg <sup>2+</sup> (cmol <sub>(c)</sub> Kg <sup>-1</sup> )		0,50
Na <sup>+</sup> (cmol <sub>(c)</sub> Kg <sup>-1</sup> )		0,15

Neste estudo, as actividades de desidrogenases e urease do solo, foram determinadas a diferentes valores de temperatura, utilizando um valor de pH de ensaio de 8,5 para desidrogenases e de 10,0 para a urease, valores estes seleccionados tendo em conta estudos prévios e também o que se encontra referido na literatura sobre o efeito do pH na actividade destes enzimas (Trevors, 1984; Kandeler & Gerber, 1988).

Na Figura 1, estão representados os valores médio ± desvio-padrão da variação das actividades de desidrogenases e urease no solo em função da temperatura (Figura 1-A) e do pH (Figura 1-B).



**Figura 1** - Representação gráfica do efeito da temperatura (A) e do pH (B) nas actividades de desidrogenases e urease no solo em estudo.

Os valores de temperatura para os quais se obteve a maior actividade de desidrogenases e urease foram, respectivamente, de 40°C e de 37°C (Figura 1-A). Estes valores estão muito próximos, no entanto, como se observa na referida figura, o efeito da temperatura foi muito mais acentuado para a actividade da urease do que para a actividade de desidrogenases, o que poderá significar que, sendo a urease um enzima predominantemente extracelular, estará menos protegido do que as desidrogenases face a alterações da temperatura ambiental (Dick, 1998; Nannipieri *et al.*, 2003).

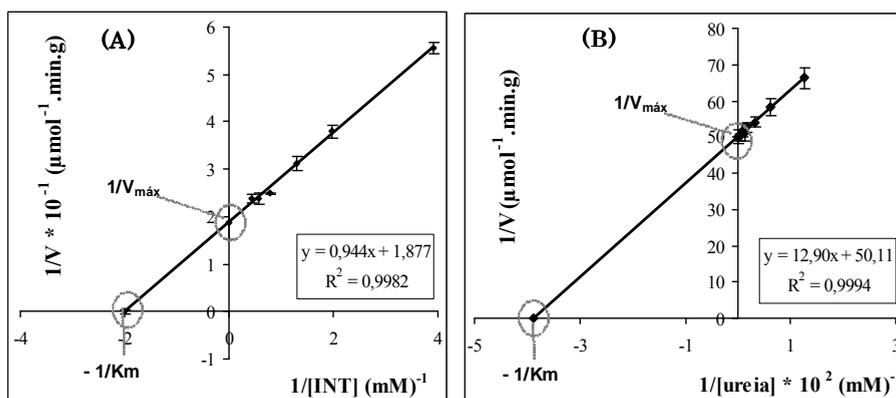
Uma vez determinadas as temperaturas para as quais as actividades de desidrogenases e urease foram máximas, procedeu-se a um estudo do efeito da variação do pH sobre as actividades destes enzimas a essas temperaturas (40 °C e 37 °C, respectivamente).

Os resultados deste estudo estão apresentados na Figura 1- B, mostrando que estes enzimas apresentaram um perfil semelhante de variação da actividade em função do pH do meio, o que poderá ser devido ao facto de, tanto nos microrganismos (desidrogenases), como no solo (urease), existirem sis-

temas tampão que moderam o impacte da variação do pH do meio na actividade destes enzimas (Taylor *et al.*, 2002).

Para a actividade de desidrogenases, o valor máximo foi obtido a pH 8,5, enquanto que para a urease a actividade máxima foi obtida a pH 10,0, mostrando que, no solo em estudo, a actividade destes enzimas face ao pH seguiu um padrão de comportamento dentro do que está referido para estes enzimas (Dick, 1998; Taylor *et al.*, 2002).

Os parâmetros cinéticos das actividades de desidrogenases e urease foram determinados a 40 °C, pH = 8,5 e 37 °C, pH = 10, respectivamente. Para este estudo foram usadas diferentes concentrações dos substratos ([S]) característicos destes enzimas e os correspondentes valores das velocidades iniciais de reacção (V). Os valores das constantes cinéticas,  $K_m$  e  $V_{máx}$  foram, então, determinados recorrendo à equação de Lineweaver-Burk:  $1/V = \{(K_m/V_{máx}) \cdot (1/[S]) + (1/V_{máx})\}$  (Equação 2.), a qual usa o inverso da equação de Michaelis-Menten (Tabatabay & Bremner, 1971). Na Figura 2,  $V_{máx}$  corresponde ao valor de  $1/[S] = 0$  e  $K_m$  ao valor de  $1/V = 0$  da equação anterior.

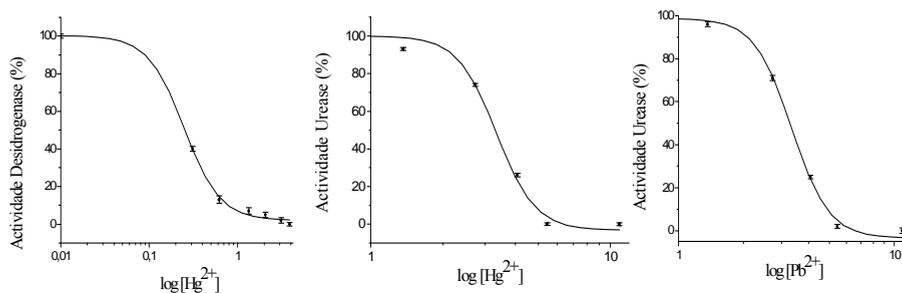


**Figura 2** - Representação gráfica de Lineweaver-Burk para determinação das constantes cinéticas  $K_m$  e  $V_{\text{máx}}$  da reacção de desidrogenases (A) e urease (B) do solo em estudo.

Os valores obtidos foram, para as desidrogenases,  $K_m = 0,50$  mM e  $V_{\text{máx}} = 5,33$   $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$  e, para a urease,  $K_m = 25,73$  mM e  $V_{\text{máx}} = 2,00 \times 10^{-2}$   $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$ . Utilizando a equação de Michaelis-Menten os valores obtidos para as constantes cinéticas foram semelhantes ( $K_m = 0,49 \pm 0,17$  mM;  $V_{\text{máx}} = 5,31 \pm 0,18$   $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$  para a actividade de desidrogenases, e  $K_m = 25,78 \pm 0,27$  mM;  $V_{\text{máx}} = 2,00 \times 10^{-2} \pm 0,03 \times 10^{-2}$   $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$  para a actividade da urease), o que mostra que a equação de Lineweaver-Burk é aplicável neste caso.

Para as actividades de desidrogenases e urease, não se encontram descritos na literatura

estudos para este tipo de solos. Os resultados do presente estudo mostram um valor de actividade de desidrogenases  $10^2$  vezes mais elevado do que os valores obtidos em outros tipos de solo. Tal diferença poderá ter-se devido ao facto de no nosso estudo existir uma flora microbiana mais abundante do que no caso descrito na literatura (Taylor *et al.* 2002; Roldán *et al.*, 2005), o que não foi estudado em ambos os casos; termos utilizado um solo em pousio há 10 anos, pois a actividade de desidrogenases pode diminuir significativamente com a frequência e profundidade da lavoura do solo (Roldán *et al.*, 2005); termos utilizado o



**Figura 3** - Representação gráfica das curvas dose-resposta das actividades de desidrogenases e urease sensíveis à presença de  $\text{Hg}^{2+}$  e  $\text{Pb}^{2+}$ .

INT, pois a maioria dos estudos publicados foram obtidos com TTC (cloreto de 3,5-trifeniltetrazônio) e com este substrato os resultados são normalmente inferiores aos que se obtêm com INT (Trevors, 1984; Friedel *et al.*, 1994); ou, finalmente, termos usado uma mistura extractante constituída por dimetilformamida/etanol, a qual permite quantificar valores mais elevados, nomeadamente em solos com teores médios ou elevados de argila (Camiña *et al.*, 1998), como no solo que estudámos.

Relativamente à urease, os valores de actividade que obtivemos são da mesma ordem de grandeza de alguns descritos por outros investigadores, embora estes valores também sejam dependentes do tipo de solo, profundidade e vegetação (Sinsabaugh *et al.*, 2000; Taylor *et al.*, 2002; Roldán *et al.*, 2005).

A velocidade máxima,  $V_{\text{máx}}$ , mede a quantidade máxima de substrato que é transformado por uma quantidade fixa de enzima, por unidade de tempo, o que nos permite determinar experimentalmente se uma determinada substância é capaz de actuar modificando a actividade enzimática. Sabe-se que numerosas substâncias com circulação ambiental são capazes de inibir a actividade de desidrogenases, da urease e de outros enzimas, afectando os processos naturais em que estes estão envolvidos e, conseqüentemente, a qualidade do solo.

No presente trabalho, depois de termos caracterizado as actividades de desidrogenases e urease do solo em estudo, através da determinação do seu  $V_{\text{máx}}$  e  $K_m$ , procedemos à avaliação do efeito de quantidades crescentes de  $\text{Hg}^{2+}$  e  $\text{Pb}^{2+}$  sobre as actividades dos referidos enzimas, tendo em vista a determinação da concentrações efectivas para as quais se obteria 50% de inibição dessa actividade ( $\text{IC}_{50}$ ), parâmetro este que permite comparar o efeito deletério dos xenobióticos sobre os microrganismos

que lhes são sensíveis.

O efeito de  $\text{Hg}^{2+}$  e  $\text{Pb}^{2+}$  nas actividades de desidrogenases e da urease estão ilustrados no Quadro 2., mostrando que o  $\text{Hg}^{2+}$  diminuiu significativamente as actividades de desidrogenases e urease ( $P < 0,05$ ), enquanto que o  $\text{Pb}^{2+}$  apenas diminuiu significativamente a actividade da urease ( $P < 0,05$ ).

Nos estudos em que se observou uma correlação dose - resposta significativa ( $P < 0,05$ ), os valores de actividade foram analisados de acordo com a Equação 1, referida anteriormente, tendo em vista o cálculo dos valores de  $\text{IC}_{50}$ , e construíram-se as curvas dose-resposta das actividades de desidrogenases e urease *versus* concentrações de  $\text{Hg}^{2+}$  ou  $\text{Pb}^{2+}$ , como ilustrado na Figura 3.

A actividade de desidrogenases mostrou-se sensível à presença de  $\text{Hg}^{2+}$ , com um valor de  $\text{IC}_{50}$  de  $0,249 \pm 0,018$  mM, mas não se mostrou significativamente sensível à presença de quantidades vestigiais de  $\text{Pb}^{2+}$  ( $P > 0,05$ ). Relativamente à actividade da urease, para concentrações até 1,4 mM de  $\text{Hg}^{2+}$  e 0,7 mM de  $\text{Pb}^{2+}$ , observou-se um efeito potenciador desta actividade. No entanto, para concentrações mais elevadas destes metais observou-se uma diminuição da actividade da urease, com valores de  $\text{IC}_{50}$  de  $3,47 \pm 0,17$  mM e de  $3,31 \pm 0,45$  mM, para o  $\text{Hg}^{2+}$  e para o  $\text{Pb}^{2+}$ , respectivamente.

Os estudos referidos na literatura que mais se aproximam do aqui descrito foram efectuados por Chaperon & Sauvé (2007, 2008). Estes investigadores utilizaram quantidades muito menores destes metais e outro tipo de solo com uma ocupação diferente, tendo obtido valores de  $\text{IC}_{50}$  cerca de cem vezes inferiores aos que obtivemos neste trabalho, o que pode querer significar que os enzimas do solo que analisámos são muito mais estáveis à presença de  $\text{Hg}^{2+}$  e  $\text{Pb}^{2+}$  do que no caso referido.

## CONCLUSÕES

No trabalho que aqui apresentamos, diferentes concentrações de  $Hg^{2+}$  e  $Pb^{2+}$  produziram, face a desidrogenases e urease, uma diminuição da actividade enzimática, mas em nenhum caso se obteve uma inibição total das referidas actividades. Isso mostra que num solo em pousio pode existir uma flora resistente à acção do  $Hg^{2+}$  e  $Pb^{2+}$ . Além disso, observou-se que o  $Pb^{2+}$  não inibiu a actividade de desidrogenases, o que levanta a questão da flora microbiana do solo estudado ou de pelo menos uma parte importante da mesma, poder vir a ter interesse para beneficiar solos poluídos pelo  $Pb^{2+}$  em que esta actividade seja muito baixa. É neste sentido que os nossos estudos futuros se irão dirigir.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Brady, N. W. & Ray, R. 1999. *The Nature and Properties of Soils*, 12<sup>th</sup> Edition, MacMillan Publishing Co., New York.
- Camiña, F., Trasar-Cepeda, C., Gil-Sotres, F. & Leirós, C. 1998. Measurement of dehydrogenase activity in acid soils rich in organic matter. *Soil Biology & Biochemistry*, 30: 1005-1011.
- Cardoso, J. C. 1974. A Classificação dos Solos de Portugal – Nova Versão. *Boletim de Solos*, 17: 14-46. SROA, Secretaria de Estado da Agricultura, Lisboa.
- Carter, M.R. 1993. *Soil Sampling and Methods of Analysis*. Canadian Society of Soil Science, Lewis Publishers, CRC Press Inc., USA.
- Chaperon, S. & Sauvé, S. 2007. Toxicity interaction of metals (Ag, Cu, Hg, Zn) to urease and dehydrogenase activities in soils. *Soil Biology & Biochemistry*, 39: 2329-2338.
- Chaperon, S. & Sauvé, S. 2008. Toxicity interactions of cadmium, copper, and lead on soil urease and dehydrogenase activity in relation to chemical speciation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 70 (1): 1-9.
- Dick, R. P. 1998. Soil Enzymes Activities as Integrative Indicators of Soil Health. In C. Pankhurst, B. M. Doube & V. V. S. R Gupta (eds.) *Biological Indicators of Soil Health*, pp.121-156. CAB International, New York, USA.
- Friedel, J.K., Mölter K. & Fischer W. R. 1994. Comparison and improvement of methods for determining soil dehydrogenase activity by using triphenyltetrazolium chloride and iodinitrotetrazolium chloride. *Biology and Fertility of Soils*, 18 (4): 291-296.
- Greco, W.R., Bravo, G. & Parsons, J.C. 1995. The search for synergy: a critical review from a response surface perspective. *Pharmacology Review*, 47: 331-385.
- Greenberg, A. E., Clesceri, L.S. & Eaton, A.D. 1992. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 18th edition. APHA, AWWA, WEF. USA.
- Kandeler, E. & Gerber, H. 1988. Short-term assay of soil urease activity using colorimetric determination of ammonium. *Biology and Fertility of Soils*, 6: 68-72
- Marzadori, C., Miletti, S., Gessa, C. & Ciurli, S. 1998. Immobilization of Jack Bean Urease on hydroxyapatite: urease immobilization in alkaline soils. *Soil Biology & Biochemistry*, 30: 1485-1490.
- Monkiedje, A., Ilori, M.O. & Spiteller, M. 2002. Soil quality changes resulting from the application of the fungicides mefenoxam and metalaxyl to a sandy loam soil. *Soil Biology & Biochemistry*, 34: 1939-1948.
- Mora, A. P., Calvo, J. J. O., Cabrera, F. E & Madejón, E. 2005. Changes in enzyme activities and microbial biomass after “in situ” remediation of a heavy metal-

- contaminated soil. *Applied Soil Ecology*, 28: 125-137.
- Nannipieri, P., Ascher, J., Ceccherini, M.T., Landi, L., Pietramellara, G. & Renella, G. 2003. Microbial diversity and soil functions. *European Journal of Soil Science*, 54: 655-670.
- Roldán, A., Salinas-García, J. R., Alguacil, M. M. & Caravaca, F. 2005. Changes in soil enzyme activity, fertility, aggregation and C sequestration mediated by conservation tillage practices and water regime in a maize field. *Applied Soil Ecology*, 30: 11-20.
- Rowell, D.L. 1994. *Soil Science. Methods and Applications*. Longman Scientific Technical, Harlow, England.
- Sinsabaugh, R. L., Reynolds, H. & Long, T. M. 2000. Rapid assay for amidohydrolase (urease) activity in environmental samples. *Soil Biology & Biochemistry*, 32: 2095-2097.
- Sukul, P. 2006. Enzymatic activities and microbial biomass in soil as influenced by metalaxyl residues. *Soil Biology & Biochemistry*, 38: 320-326.
- Taylor, J. P., Wilson, B., Mills, M. S. & Burns, R. G. 2002. Comparison of microbial numbers and enzymatic activities in surface soils and subsoils using various techniques. *Soil Biology & Biochemistry*, 34: 387-401.
- Tabatabai, M. A. & Bremner, J. M. 1971. Michaelis Constants of soil enzymes. *Soil Biology & Biochemistry*, 3: 317-323.
- Trasar-Cepeda, C., Leirós, S., Seoane, S. & Gil-Sotres, F. 2000. Limitations of soil enzymes as indicators of soil pollution. *Soil Biology & Biochemistry*, 32: 1867-1875.
- Trevors, J.T., 1984. Dehydrogenase activity in soil. A comparison between the INT and TTC assay. *Soil Biology & Biochemistry*, 16: 673-674.
- von Mersi, W. & Schinner, F., 1991. An improved and accurate method for determining the dehydrogenase activity of soils with iodinitrotetrazolium chloride. *Biology and Fertility of Soils*, 11: 216-220.