



## **Determinação da atividade de enzimas em solos**

**A.P.D. Silveira, M.F. Abreu, H. Cantarella e F.C.B. Zambrosi**  
Centro de Solos e Recursos Ambientais – IAC

### **Por que analisar enzimas em solos?**

A atividade de enzimas serve como bioindicador da qualidade do solo e o interesse na sua determinação vem de várias décadas. Contudo, devido à dificuldade de interpretar os resultados, em função dos vários fatores que afetam a atividade enzimática, essas determinações estavam restritas a trabalhos de pesquisa ou avaliações para fins específicos. Recentemente, pesquisadores da Embrapa desenvolveram estudos para a interpretação dos resultados em alguns solos brasileiros, calibrando-os com estudos de fertilidade do solo de longa duração. Essas pesquisas mostraram que é possível estender a interpretação dos resultados para amostras secas ao ar e, que a atividade enzimática determinada desse modo é um indicador importante do componente biológico da fertilidade do solo. Essas determinações podem ser feitas em laboratórios de análise de solo de rotina. A Embrapa desenvolveu o BioAS – Tecnologia de Bioanálise de Solo, lançado em 2020 (EMBRAPA, 2020), englobando as determinações das atividades das enzimas arilsulfatase e  $\beta$ -glicosidase, as quais estão associadas aos ciclos de enxofre e do carbono no solo, respectivamente. As análises das atividades dessas enzimas têm sido combinadas com algumas determinações de fertilidade do solo e textura para o cálculo do Índice de Qualidade do Solo (IQS) (Mendes et al., 2018).

A partir dessas pesquisas, a Embrapa passou a difundir e promover a análise de enzimas como uma ferramenta adicional para medir a qualidade do solo e, assim, muitos laboratórios se interessaram em oferecer este serviço adicional.

### **O Ensaio de Proficiência passa a acompanhar as análises de enzimas em solo.**

Os laboratórios que têm interesse em usar o BioAS devem estabelecer um contrato com a Embrapa, que oferece treinamento e coloca o banco de dados já pronto (e em constante desenvolvimento) para a interpretação dos resultados.

O Ensaio de Proficiência (EP) é uma atividade complementar e independente à da Embrapa. A participação no EP permitirá aos laboratórios: aferir seus resultados frente a seus pares, saber se tais resultados ficam dentro do intervalo de confiança estabelecido por meio de procedimentos estatísticos – de modo similar ao que ocorre com as demais determinações de atributos químicos e físicos.

Os laboratórios que quiserem se beneficiar dos demais serviços da BioAS devem entrar em contato com a Embrapa.

### **Os métodos de análise são os mesmos empregados pela Embrapa?**

Não exatamente. Os métodos descritos no presente protocolo e os da Embrapa são baseados em Tabatabai (1994). Os trabalhos recentemente publicados pela Embrapa (Castro et al., 2018; Mendes et al., 2019, Mendes et al., 2021) indicam que a principal diferença do método sugerido pelo BioAS é a retirada do tolueno do procedimento. Entretanto, nesta primeira versão do presente protocolo, o

método original, com tolueno, está sendo sugerido, pois os testes feitos no IAC apontaram que o tolueno traz algumas vantagens. Esta opção poderá ser reavaliada futuramente e o tolueno retirado. De qualquer modo, o objetivo do EP é permitir que os laboratórios se sintam confortáveis com seus resultados. Se tiverem bom desempenho na análise das enzimas com tolueno, certamente o terão sem tolueno.

Uma segunda diferença é a inclusão da determinação de fosfatase ácida, que não consta do BioAS. Os resultados de fosfatase aparentemente não são tão estáveis em amostras secas ao ar e não têm se mostrado bons bioindicadores para as condições de laboratórios de análise de rotina. No entanto, muitos laboratórios podem se interessar em oferecer esta determinação para clientes com demandas especiais.

## Referências

- Castro Lopes, A. A., Sousa, D. M. G., dos Reis, F. B., Figueiredo, C. C., Malaquias, J. V., Souza, L. M., Carvalho Mendes, I. (2018). Temporal variation and critical limits of microbial indicators in Oxisols in the Cerrado, Brazil. *Geoderma Regional* **12**, 72-82.
- EMBRAPA (2020). Tecnologia BioAs. Tecnologia de bioanálise de solo Embrapa como a mais nova aliada para a sustentabilidade agrícola. In EMBRAPA, Brasília. (<https://www.embrapa.br/busca-de-solucoes-tecnologicas/-/produto-servico/6047/bioas-tecnologia-de-bioanalise-de-solo->)
- Mendes, I. C., Sousa, D. M. G., Dantas, O. D., Lopes, A. A. D. C., Reis Junior, F. B. D., Oliveira, M. I., Chaer, G. M. (2021). Soil quality and grain yield: A win-win combination in clayey tropical Oxisols. *Geoderma* doi.org/10.1016/j.geoderma.2020.114880.
- Mendes, I. C., Sousa, D. M. G., Reis Junior, F. B. D., and Lopes, A. A. C. (2018). Bioanálise de solo: como acessar e interpretar a saúde do solo. Vol. Circular Técnica 38, pp. 24p. EMBRAPA, Brasília.
- Mendes, I. D. C., Souza, L. M. D., Sousa, D. M. G., Lopes, A. A. D. C., Reis Junior, F. B. D., Lacerda, M. P. C., Malaquias, J. V. (2019). Critical limits for microbial indicators in tropical Oxisols at post-harvest: The FERTBIO soil sample concept. *Applied Soil Ecology* **139**, 85-93.
- Tabatabai, M. A. (1994). Soil Enzymes. In "Methods of Soil Analysis – Part 2 Microbiological and Biochemical Properties" (R. W. Weaver, S. Angle, P. Bottomley, D. Bezdicek, S. Smith, M. A. Tabatabai, A. Wollum, eds.), pp. 786-944. SSSA, Madison, WI.

# Protocolos para a determinação da atividade de enzimas em solos<sup>1</sup>

## Arilsulfatase, $\beta$ -glicosidase, Fosfatase ácida

Adriana P.D. Silveira, Matheus A. P. Cipriano, Mônica F. De Abreu, Heitor Cantarella,  
Fernando C. B. Zambrosi

Esta é a versão dos protocolos de análise de atividade de enzimas no solo adaptada dos métodos utilizados no Laboratório de Microbiologia do Solo do IAC, com base nos procedimentos desenvolvidos por Tabatabai e coautores e publicados em Tabatabai (1994).

As enzimas arilsulfatase,  $\beta$ -glicosidase e fosfatase ácida estão associadas aos ciclos do enxofre, carbono e fósforo no solo, respectivamente, e podem ser consideradas como bioindicadores da atividade microbiana, um componente da fertilidade integral de solos.

Resultados de determinação da atividade de enzimas em solo têm interpretação complexa, pois podem ser bastante variáveis, dependendo da forma como as amostras são coletadas e armazenadas. Recentemente, estudos realizados no Brasil mostraram que as atividades de arilsulfatase e  $\beta$ -glicosidase apresentam relativa estabilidade quando analisadas em amostras de solo secas ao ar, o que permitiu que as interpretações desses resultados fossem propostas para alguns solos e condições (Mendes et al., 2019, 2021). Isto abre a possibilidade de que essas enzimas façam parte das avaliações feitas por laboratórios de rotina de análise de solo para caracterizar a fertilidade integral de solos, incluindo determinações ligadas à atividade biológica (Mendes et al., 2018).

### Princípio das determinações:

A determinação das atividades das enzimas arilsulfatase,  $\beta$ -glicosidase e fosfatase ácida em solos envolve a medição do p-nitrofenol, liberado quando amostras de solo são incubadas por 1 hora a 37°C e com soluções tamponadas contendo os substratos p-nitrofenil sulfato, p-nitrofenil- $\beta$ -D-glucosídeo e p-nitrofenil fosfato dissódico. Tolueno é adicionado por ser um agente plasmolítico e antisséptico. O tolueno não interfere nas determinações da  $\beta$ -glicosidase e da fosfatase ácida, mas, provoca um ligeiro aumento na atividade da arilsulfatase, o que deve ser considerado na interpretação dos resultados.

O p-nitrofenol liberado pela reação com as enzimas é extraído do solo por filtração após a adição de soluções de  $\text{CaCl}_2$  e NaOH. A determinação envolve a leitura da cor amarela da solução de p-nitrofenol por espectrometria UV-visível. Soluções alcalinas de p-nitrofenol têm coloração amarela, mas as soluções ácidas de p-nitrofenol, bem como as soluções de p-nitrofenil sulfato, p-nitrofenil- $\beta$ -D-glucosídeo e p-nitrofenil fosfato são incolores.

A unidade para expressar os resultados das atividades das enzimas é a quantidade de p-nitrofenol liberado em 1 hora por massa de solo (g). Curvas de calibração são feitas com quantidades conhecidas de p-nitrofenol em meio tamponado.

Amostras em branco devem ser preparadas com a incubação de solo sem os substratos acima, mas contendo o produto da reação (p-nitrofenol). A padronização dos procedimentos é importante para conseguir resultados satisfatórios.

---

<sup>1</sup> Protocolo do Setor de Microbiologia do Solo do IAC. Adaptado para o Ensaio de Proficiência IAC  
Versão Abril de 2022

# Arilsulfatase

## Protocolo do Setor de Microbiologia do Solo do IAC

### Material

- 1- Tubo de ensaio (dimensão 25 mm x 150 mm)
- 2- Incubadora
- 3- Espectrofotômetro UV Visível
- 4- Papel filtro nº 42 (faixa azul – filtragem lenta)
- 5- Agitador tipo Vórtex
- 6 – Pipetas calibradas
- 7 – Banho Maria

### Reagentes

- 1- **Tolueno**;
- 2- **Tampão acetato** 0,5 mol/L pH 5,8 - pesar 68 g de acetato de sódio tri-hidratado (NaOAC 3H<sub>2</sub>O) em 700 mL de H<sub>2</sub>O +1,7 mL de ácido acético glacial (99 %). Completar para 1 L com H<sub>2</sub>O destilada;
- 3- **Solução de p-nitrofenil sulfato de potássio (PNS)** C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>NO<sub>6</sub>SK, 257,26 g/mol) 0,05 mol/L (PNS - Sigma N3877): dissolver 0,614 g de PNS em 40 mL de tampão acetato. Diluir a solução para 50 mL com o tampão. Armazenar em geladeira;
- 4- **CaCl<sub>2</sub> 0,5 mol/L** - dissolver 73,5 g de CaCl<sub>2</sub> em 700 mL de H<sub>2</sub>O e completar para 1 L;
- 5- **NaOH 0,5 mol/L** - dissolver 20 g de NaOH em 700 mL de H<sub>2</sub>O e completar para 1 L;
- 6- **Solução padrão de p-nitrofenol** (Sigma 241326), C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>NO<sub>3</sub>, 139,11 g/mol: dissolver 1 g de p-nitrofenol em 700 mL e completa para 1L com H<sub>2</sub>O destilada. Esta solução contém 1000 µg/mL de p-nitrofenol. Armazenar em geladeira;
- 7 – **Solução padrão diluída de p-nitrofenol (PNF)** Diluir 1 mL da solução padrão de p-nitrofenol em 100 mL (balão volumétrico) e agitar bem. Esta solução será denominada **Solução padrão diluída** e contém 10 µg/mL de p-nitrofenol.

### Procedimentos

**As amostras de solo, a prova em branco da amostra e os pontos da curva de calibração devem ser preparados simultaneamente.**

#### a) Amostras de solo para análise

- 1- Pesar 1,0 g de solo (< 2 mm) em tubo de ensaio (2 repetições e 1 branco);
- 2- Adicionar: 0,25 mL de tolueno; 4 mL de tampão de acetato 0,5 mol/L; 1 mL de solução de substrato **PNS** 0,05 mol/L (Reagentes 3);
- 3- Incubar por 1 h a 37 °C;
- 4- Adicionar 1 mL de CaCl<sub>2</sub> 0,5 mol/L e 4 mL de NaOH 0,5 mol/L. Agitar por 5 segundos (vortex). O volume total de reagentes adicionados ao solo é 10,25 mL;

- 5- Filtrar a suspensão do solo em papel filtro nº. 42 (faixa azul, filtragem lenta). As amostras de solo desenvolvem cor amarela, que é lida no espectrofotômetro;
- 6- Fazer a leitura a 410 nm;
- 7- Caso a leitura do extrato de solo ultrapasse a leitura do padrão 6 (P6, 5 µg p-nitrofenol) da curva padrão (Tabela 2), diluir o extrato da amostra de solo com água.

**b) Prova em branco**

- 1- Pesar 1,0 g de solo, igual nas amostras de solo para análise, adicionar 0,25 mL de tolueno e 4 mL de tampão acetato. Agitar por 5 segundos (vortex);
- 2- Incubar por 1 h a 37 °C;
- 3- **Após a incubação**, adicionar 1 mL de solução de PNS. Notar que, para o Branco, o **PNS não é adicionado antes da incubação**;
- 4- Em seguida, adicionar 1 mL de CaCl<sub>2</sub> 0,5 mol/L e 4 mL de NaOH 0,5 mol/L. Agitar por 5 segundos (vortex). O volume total de reagentes adicionados ao solo é 10,25 mL;
- 5- Filtrar a suspensão do solo em papel filtro nº. 42 (faixa azul, filtragem lenta);
- 6- Fazer a leitura no espectrofotômetro a 410 nm.
- 7- Caso a leitura do extrato de solo ultrapasse a leitura do padrão 6 (P6, 5 µg p-nitrofenol) da curva padrão (Tabela 2), diluir com água o extrato da prova em branco na mesma proporção da diluição da amostra de solo.

**c) Curva de calibração**

- 1- – *Os seis tubos da curva de calibração devem ser incubados do mesmo modo que as amostras*;
- 2- Pipetar alíquotas de 0, 1, 2, 3, 4 e 5 mL da **solução padrão diluída de p-nitrofenol – PNF (Reagentes – 7)** em tubos de ensaio e ajustar o volume a 5 mL com água. Agitar por 5 seg (vórtex). Os volumes precisam ser exatos;
- 3- Adicionar 1 mL de CaCl<sub>2</sub> 0,5 mol/L e 4 mL de NaOH 0,5 mol/L. O volume total de solução em cada frasco da curva padrão é 10 mL (veja Tabela 1). Estas soluções contém 0, 1, 2, 3, 4 e 5 µg de p-nitrofenol por mL;

Tabela 1- Volume de solução padrão diluída, de outros reagentes e concentração final de p-nitrofenol para obtenção da curva de calibração.

Identificação	Alíquota da solução padrão diluída de PNF (mL)	Volume de água (mL)	Volume de CaCl <sub>2</sub> (mL)	Volume de NaOH (mL)	Concentração final de p-nitrofenol (µg/mL)
P1	0	5	1	4	0
P2	1	4	1	4	1
P3	2	3	1	4	2
P4	3	2	1	4	3
P5	4	1	1	4	4
P6	5	0	1	4	5

- 4- Agitar por 5 segundos (vórtex);
- 5- Incubar por 1 h a 37 °C. **Os seis tubos da curva de calibração devem ser incubados do mesmo modo que as amostras de solo.** A curva padrão desenvolve cor amarela, que é lida no espectrofotômetro;

6- Fazer a leitura a 410 nm.

### Cálculo para determinação da atividade da enzima do solo

A enzima arilsulfatase catalisa a hidrólise do sulfato no PNS, liberando sulfato e p-nitrofenol no solo. A quantidade de sulfato é proporcional à de p-nitrofenol na solução. Desse modo, o cálculo da atividade da enzima pode ser feito com base na curva de calibração de p-nitrofenol. A atividade da arilsulfatase é expressa em µg de p-nitrofenol por grama de solo por hora. Para o cálculo, utiliza-se a curva de calibração, produzida diariamente para cada batelada de amostras, e os fatores de diluição embutidos no procedimento. O exemplo abaixo pode ajudar nos cálculos:

Tabela 2. Exemplo de construção da curva de calibração para a determinação da atividade da enzima arilsulfatase a partir de soluções com concentrações conhecidas de p-nitrofenol e respectivas leituras da absorvância. Os valores a seguir são exemplos para um equipamento e condição específica. Os valores serão ligeiramente diferentes em cada laboratório e dia em que a determinação for feita.

Identificação do padrão	Concentração de p-nitrofenol µg/mL	Absorvância
P1	0	0
P2	1	0,102
P3	2	0,149
P4	3	0,223
P5	4	0,312
P5	5	0,382

Plotar os dados da tabela 2 para a obtenção da curva de calibração (Figura 1).

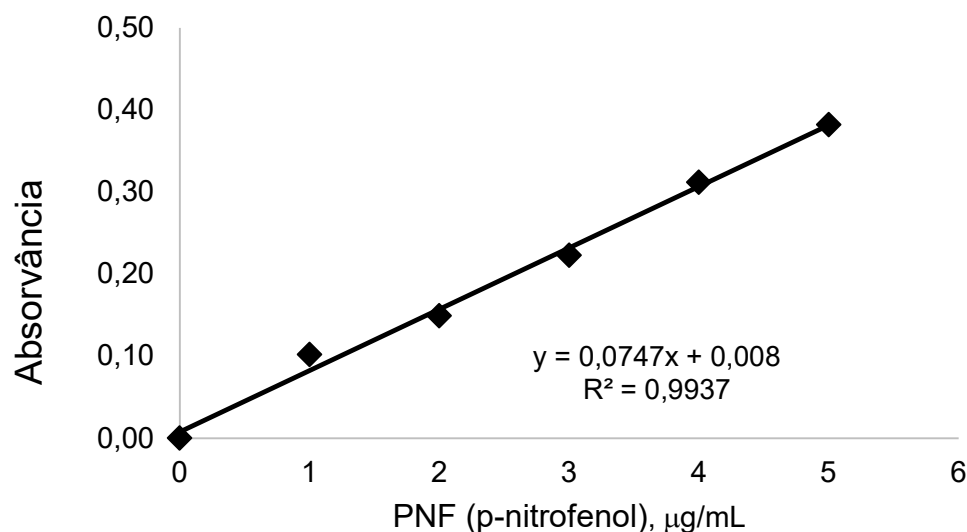


Figura 1. Representação gráfica, construída com planilha Excel, de uma curva de calibração típica para a determinação espectrofotométrica de enzima do solo, utilizando um espectrofotômetro Thermo Scientific™ Multiskan™ GO.

O modelo da equação da reta é  $y = ax + b$  onde Y é a absorvância, x é a concentração de p-nitrofenol, a e b são parâmetros do ajuste do modelo. No exemplo, a = 0,0747 e b = 0,008.

Resolvendo a equação para x (concentração de p-nitrofenol):

$$x = \frac{Y-b}{a} \quad (1)$$

Para calcular a atividade de arilsulfase, usando o exemplo da curva de calibração da Fig. 1.

$$p - nitrofenol (\mu g/mL) = \frac{Y-0,008}{0,0747} \quad (2)$$

O valor de absorvância da leitura da amostra (Y) para uso na equação (2) é a média das leituras de absorvância das duas repetições da amostra de solo, subtraída da absorvância da prova em branco. Considerando, como exemplo, a leitura de absorvância de duas repetições de uma amostra de solo e seu branco:

Leitura da repetição 1: 0,181  
 Leitura da repetição 2: 0,192  
 Leitura da prova em Branco: 0,02

$$Y_{amostra} (absorvância média) = \frac{0,181+0,192}{2} - 0,02 = 0,1665 \quad (3)$$

Substituindo na equação (2)

$$p - nitrofenol \left( \frac{\mu g}{mL} \right) = \frac{0,1665 - 0,008}{0,0747} = 2,122 \mu g \text{ de } p - nitrofenol \quad (4)$$

Para expressar a atividade da enzima em massa de solo, a partir da curva padrão:

$$\text{Atividade no solo: } p - nitrofenol (\mu g g^{-1} h^{-1}) = \frac{C x V}{g x t} \quad (5)$$

Onde,

C = concentração de p-nitrofenol na suspensão de solo, em  $\mu g/mL$  (equação 4)

g = peso do solo seco ao ar (g)

t = tempo de incubação (h)

V = volume da suspensão do solo (10,25 mL)

Se todas as condições do ensaio forem mantidas como descrito no método (1 g de amostra de solo seco ao ar, 1 hora de incubação e 10,25 mL de suspensão = soma do volume de todos os reagentes adicionados ao solo), a equação pode ser simplificada:

$$p - nitrofenol (\mu g g^{-1} h^{-1}) = \frac{C x 10,25 mL}{1g x 1 hora} \quad (6)$$

Ou C x 10,25. Na equação completa:

$$p - nitrofenol (\mu g g^{-1} h^{-1}) = C x \frac{10,25 mL}{g x h} \quad (7)$$

$$p - nitrofenol = \frac{2,122 \mu g}{mL} x \frac{10,25 mL}{g x h} = 21,75 \mu g g^{-1} h^{-1} \quad (8)$$

No exemplo (equação 4), a atividade de arilsulfatase é  $21,75 \mu g g^{-1} h^{-1}$ :

**Observação:** se o extrato de solo tiver sido diluído para se adequar à faixa de leitura da curva padrão, fazer as correções pertinentes no cálculo da atividade enzimática.

A unidade  $\mu g g^{-1} h^{-1}$  é numericamente igual a  $mg kg^{-1} h^{-1}$

## Comentários

- A cor desenvolvida pela reação do p-nitrofenol é estável por cerca de 24 horas.
- A secagem ao ar aumenta a atividade da arilsulfatase. O tampão acetato causa atividades mais elevadas do que outros tipos de tampões.
- A concentração de substrato no ensaio é igual a 5 mmol/L de suspensão de solo; entretanto, em solos com atividades enzimáticas mais altas, maiores concentrações de p-nitrofenil sulfato devem ser usadas, por exemplo, aumentando o volume de solução de PNS 0,05 mol/L adicionada ao solo (item 2 de Procedimentos). Refazer os cálculos pois o volume da suspensão será alterado.
- A adição de tolueno (0,1-1,0 mL) aumenta a atividade da enzima.
- Para diminuir a intensidade da amostra controle, é possível usar éter dietílico para extrair o p-nitrofenol de solos com alto teor de matéria orgânica.
- Poluentes no solo afetam a atividade da arilsulfatase.

## Protocolo adaptado de:

Alef, K. & Nannipieri, P. (1995). *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. London, Academic Press. 420 p.

Tabatabai, M. A. & Bremner, J. M. (1970). Arylsulfatase activity of soils. *Soil Science Society of America Journal*, 34(2), 225-229.



# $\beta$ -glicosidase

## Protocolo do Setor de Microbiologia do Solo do IAC

### Material

- 1- Tubo de ensaio (dimensão 25 mm x 150 mm)
- 2- Incubadora
- 3- Espectrofotômetro UV Visível
- 4- Papel filtro n° 42 (faixa azul – filtragem lenta)
- 5- Agitador tipo Vórtex
- 6 – Pipetas calibradas
- 7 – Banho maria

### Reagentes

- 1- Tolueno;
- 2- **Solução Estoque do Tampão Universal Modificado (MUB)**: dissolver 12,1 g de Tris-hidroximetil-aminometano (THAM); 11,6 g de ácido maleico + 14,0 g de ácido cítrico + 6,3 g de ácido bórico ( $H_3BO_3$ ) em 488 mL de NaOH 1N. Diluir com H<sub>2</sub>O até completar 1L. Armazenar em geladeira;
- 3- **MUB (pH 6) ácido**: adicionar 200 mL de solução estoque do MUB em um bequer, ajustar para pH 6,0 com solução HCl 0,1mol/L e completar o volume para 1 L com água destilada. Armazenar em geladeira;
- 4- **Solução de p-nitrofenil- $\beta$ -D-glicosídeo (PNG)** 0,05 mol/L (PNG Sigma – N7006): dissolver 0,654 g de PNG em 40 mL de MUB pH 6 e ajustar o volume para 50 mL com MUB pH 6;
- 5- **Tris pH 12** (Tris-hidroximetil-aminometano) 0,1 mol/L: dissolver 12,2 g de THAM em 800 mL de água, ajustar para pH 12 com NaOH 0,5 mol/L e completar o volume para 1 L com água destilada;
- 6- **Tris pH 10** (Tris-hidroximetil-aminometano) 0,1 mol/L: dissolver 12,2 g de THAM em 800 mL de água, ajustar para pH 10,0 com NaOH 0,5 mol/L e completar o volume para 1 L com água destilada;
- 7- **CaCl<sub>2</sub>** 0,5 mol/L: dissolver 73,5 g de CaCl<sub>2</sub> em 700 mL de H<sub>2</sub>O e completar para 1 L;
- 8- **Solução padrão de p-nitrofenol (PNF)** (Sigma 241326), C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>NO<sub>3</sub>, 139,11 g/mol: dissolver 1 g de p-nitrofenol em 700 mL e diluir para 1L com H<sub>2</sub>O. Armazenar em geladeira;
- 9 - **Solução padrão diluída de p-nitrofenol (PNF)**: Diluir 1 mL da solução padrão de p-nitrofenol em 100 mL (balão volumétrico) e agitar bem. Esta solução será denominada **Solução padrão diluída de PNF** e contém 10  $\mu$ g/mL de p-nitrofenol.

## Procedimentos

**As amostras de solo, a prova em branco da amostra e os pontos da curva de calibração devem ser preparados simultaneamente.**

### a) Amostras de solo para análise

- 1- Pesar 1,0 g de solo (< 2 mm) em tubo de ensaio (2 repetições e 1 branco);
- 2- Adicionar: 0,25 mL de Tolueno; 4 mL de MUB pH 6 e 1 mL de substrato (solução de PNG);
- 3- Incubar por 1 h a 37 °C;
- 4- Adicionar 1 mL de CaCl<sub>2</sub> 0,5 mol/L e 4 mL de Tris pH 12 0,1 mol/L. Agitar por 5 segundos (vortex). O volume total de reagentes adicionados ao solo é 10,25 mL;
- 5- Filtrar a suspensão do solo em papel filtro nº. 42 (faixa azul, filtragem lenta). As amostras de solo desenvolvem cor amarela, que é lida no espectrofotômetro;
- 6- Fazer a leitura a 410 nm;
- 7- Caso a leitura do extrato de solo ultrapasse a leitura do padrão 6 (P6, 5 µg p-nitrofenol) da curva padrão (Tabela 1), diluir o extrato da amostra de solo com TRIS pH 10,0.

### b) Prova em branco

- 1- Pesar 1,0 g de solo, igual nas amostras de solo para análise, adicionar 0,25 mL de tolueno e 4 mL de MUB pH 6;
- 2- **Após a incubação**, adicionar 1 mL de solução de PNG. Notar que, para o Branco, o **PNG não é adicionado antes da incubação**;
- 3- Em seguida, adicionar 1 mL de CaCl<sub>2</sub> 0,5 mol/L e 4 mL de Tris pH 12 0,1 mol/L. Agitar por 5 segundos (vortex). O volume total de reagentes adicionados ao solo é 10,25 mL;
- 4- Filtrar a suspensão do solo em papel filtro nº. 42 (faixa azul, filtragem lenta). As amostras de solo desenvolvem cor amarela, que é lida no espectrofotômetro;
- 5- Fazer a leitura a 410 nm
- 6- Caso a leitura da prova em branco ultrapasse a leitura do padrão 6 (P6, 5 µg p-nitrofenol) da curva padrão (Tabela 2), diluir o extrato da prova em branco com TRIS pH 10,0 na mesma proporção da diluição da amostra de solo.

### c) Curva de calibração

- 1- *Os seis tubos da curva de calibração devem ser incubados do mesmo modo que as amostras;*
- 2- Pipetar alíquotas de 0, 1, 2, 3, 4 e 5 mL da **solução padrão diluída de p-nitrofenol (Reagentes – 9)** em tubos de ensaio e ajustar o volume a 5 mL com água. Agitar por 5 seg (vórtex). Os volumes precisam ser exatos;
- 3- Adicionar 1 mL de CaCl<sub>2</sub> 0,5 mol/L e 4 mL de Tris pH 12 0,1 mol/L (veja Tabela 1). O volume total de solução em cada frasco da curva padrão é 10 mL. Estas soluções contém 0, 1, 2, 3, 4 e 5 µg de p-nitrofenol por mL;

Tabela 1- Volume de solução padrão diluída, de outros reagentes e concentração final de p-nitrofenol para obtenção da curva de calibração.

Identificação	Alíquota da solução padrão diluída de PNF (mL)	Volume de água (mL)	Volume de CaCl <sub>2</sub> (mL)	Volume de Tris pH 12 (mL)	Concentração final de p-nitrofenol (µg/mL)
P1	0	5	1	4	0
P2	1	4	1	4	1
P3	2	3	1	4	2
P4	3	2	1	4	3
P5	4	1	1	4	4
P6	5	0	1	4	5

4- Agitar por 5 segundos (vórtex);

5- Incubar por 1 h a 37 °C. Os seis tubos da curva de calibração devem ser incubados do mesmo modo que as amostras de solo. A curva padrão desenvolve cor amarela, que é lida no espectrofotômetro;

6- Fazer a leitura a 410 nm;

7 – Plote a curva de calibração como no exemplo da arilsulfase.

### Cálculo para determinação da atividade da enzima do solo

A enzima  $\beta$ -glicosidase catalisa a hidrólise dos glucosídeos no PNG, liberando açúcares e p-nitrofenol no solo. A quantidade de glucosídeos é proporcional à de p-nitrofenol na solução. Desse modo, o cálculo da atividade da enzima pode ser feito com base na curva de calibração de p-nitrofenol. A atividade da  $\beta$ -glicosidase é expressa em µg de p-nitrofenol por grama de solo por hora. Para o cálculo, utiliza-se a curva de calibração, produzida diariamente para cada batelada de amostras analisadas, e os fatores de diluição embutidos no procedimento. Os cálculos são semelhantes aos da determinação da **atividade da arilsulfatase. Usar o exemplo dado no método para a arilsulfatase para os cálculos da  $\beta$ -glicosidase.**

**Observação:** se o extrato de solo tiver sido diluído para se adequar à faixa de leitura da curva padrão, fazer as correções pertinentes no cálculo da atividade enzimática.

### Comentários

- A cor desenvolvida pela reação do p-nitrofenol é estável por cerca de 24 horas.
- A atividade enzimática tem um ótimo em pH 5-6,8.
- A solução PNG permanece estável por vários dias a 4 °C.
- A adição de CaCl<sub>2</sub> e tampão Tris pH12 é necessária para uma extração eficiente do p-nitrofenol do solo.

### Protocolo adaptado de:

Alef, K. & Nannipieri, P. (1995). Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry. London, Academic Press. 420 p.

Eivazi, F. & Tabatabai, M. A. (1988). Glucosidases and galactosidases in soils. Soil Biology and Biochemistry, 20(5): 601-606

# Fosfatase ácida

## Protocolo do Setor de Microbiologia do Solo do IAC

### Material

- 1- Tubo de ensaio (dimensão 25 mm x 150 mm)
- 2- Incubadora
- 3- Espectrofotômetro: 400-420
- 4- Papel filtro n° 42 (faixa azul – filtragem lenta)
- 5- Agitador tipo Vórtex
- 6 – Pipetas calibradas
- 7- Banho maria

### Reagentes

- 1- Tolueno;
- 2- **Solução Estoque do Tampão Universal Modificado (MUB):** dissolver 12,1 g de Tris-hidroximetil-aminometano (THAM); 11,6 g de ácido maleico + 14,0 g de ácido cítrico + 6,3 g de ácido bórico ( $H_3BO_3$ ) em 488 mL de NaOH 1 mol/L. Diluir com  $H_2O$  até completar 1L. Armazenar em geladeira;
- 3- **MUB II (pH 6,5) Ácido:** adicionar 200 mL de MUB em um béquer, ajustar para pH 6,5 com HCl 0,1 mol/L e completar o volume para 1 L com água destilada. Armazenar em geladeira;
- 4- **Solução de p-nitrofenil fosfato dissódico (P-NPP - Sigma N4645):** dissolver 0,840 g de p-NPP em 40 mL de MUB II e ajustar o volume para 50 mL com MUB II (pH 6,5);
- 5-  **$CaCl_2$  0,5 mol/L:** dissolver 73,5 g de  $CaCl_2$  em 700 mL de  $H_2O$  e completar para 1 L;
- 6- **NaOH 0,5 mol/L:** dissolver 20 g de NaOH em 700 mL de  $H_2O$  e completar para 1 L;
- 7- **Solução padrão de p-nitrofenol** (Sigma 241326),  $C_6H_5NO_3$ , 139,11 g/mol: dissolver 1 g de p-nitrofenol em 700 mL e completar para 1L com  $H_2O$ . Armazenar em geladeira.
- 8 – **Solução padrão diluída de p-nitrofenol (PNF)** Diluir 1 mL da solução padrão de p-nitrofenol em 100 mL (balão volumétrico) e agitar bem. Esta solução será denominada **Solução padrão diluída** e contém 10  $\mu g/mL$  de p-nitrofenol.

### Procedimentos

**As amostras de solo, a prova em branco da amostra e os pontos da curva de calibração devem ser preparados simultaneamente.**

#### a) Amostras de solo para análise

- 1- Pesar 1,0 g de solo (< 2 mm) em tubo de ensaio (2 repetições e 1 branco);
- 2- Adicionar: 0,25 mL de tolueno; 4 mL de MUB II pH 6,5 e 1 mL de substrato (**solução de P-NPP**);
- 3- Incubar por 1 h a 37 °C;
- 4- Adicionar 1 mL de  $CaCl_2$  0,5 mol/L e 4 mL de NaOH 0,5 mol/L. Agitar por 5 segundos (vortex). O volume total de reagentes adicionados ao solo é 10,25 mL;

- 5- Filtrar a suspensão do solo em papel filtro nº. 42 (faixa azul, filtragem lenta). As amostras de solo desenvolvem cor amarela, que é lida no espectrofotômetro;
- 6- Fazer a leitura a 410 nm;
- 7- Caso a leitura do extrato de solo ultrapasse a leitura do padrão 6 (P6, 5 µg p-nitrofenol) da curva padrão (Tabela 2), diluir o extrato da amostra de solo com água.

#### b) Prova em branco

- 1- Pesar 1 g de solo, igual nas amostras de solo para análise, adicionar 0,25 mL de tolueno e 4 mL de MUB II pH 6,5;
- 2- **Após a incubação**, adicionar 1 mL de solução substrato (solução de **P-NPP**). Notar que, para o Branco, o **P-NPP não é adicionado antes da incubação**;
- 3- Em seguida, adicionar 1 mL de CaCl<sub>2</sub> 0,5 mol/L e 4 mL de NaOH 0,5 mol/L. Agitar por 5 segundos (vortex). O volume total de reagentes adicionados ao solo é 10,25 mL;
- 4- Filtrar a suspensão do solo em papel filtro nº. 42 (faixa azul, filtragem lenta). As amostras de solo e da prova em branco desenvolvem cor amarela, que é lida no espectrofotômetro;
- 5- Fazer a leitura a 410 nm
- 6- Caso a leitura do extrato de solo ultrapasse a leitura do padrão 6 (P6, 5 µg p-nitrofenol) da curva padrão (Tabela 2), diluir com água o extrato da prova em branco na mesma proporção da diluição da amostra de solo.

#### c) Curva de calibração

- 1- *Os seis tubos da curva de calibração devem ser incubados do mesmo modo que as amostras*;
- 2- Pipetar alíquotas de 0, 1, 2, 3, 4 e 5 mL da **solução padrão diluída de p-nitrofenol (Reagentes – 8)** em tubos de ensaio e ajustar o volume a 5 mL com água. Agitar por 5 seg (vórtex). Os volumes precisam ser exatos;
- 3- Adicionar 1 mL de CaCl<sub>2</sub> 0,5 mol/L e 4 mL de NaOH 0,5 mol/L (veja Tabela 1). O volume total de solução em cada frasco da curva padrão é 10 mL. Estas soluções contêm 0, 1, 2, 3, 4 e 5 µg de p-nitrofenol por mL;

Tabela 1- Volume de solução padrão diluída, de outros reagentes e concentração final de p-nitrofenol para obtenção da curva de calibração.

Identificação	Alíquota da solução padrão diluída de PNF (mL)	Volume de água (mL)	Volume de CaCl <sub>2</sub> (mL)	Volume de NaOH 0,5 mol/L (mL)	Concentração final de p-nitrofenol (µg/mL)
P1	0	5	1	4	0
P2	1	4	1	4	1
P3	2	3	1	4	2
P4	3	2	1	4	3
P5	4	1	1	4	4
P6	5	0	1	4	5

- 4- Agitar por 5 segundos (vórtex);
- 5- Incubar por 1 h a 37 °C. Os seis tubos da curva de calibração devem ser incubados do mesmo modo que as amostras de solo. A curva padrão desenvolve cor amarela, que é lida no espectrofotômetro;

6- Fazer a leitura a 410 nm;

7- Plote a curva de calibração como no exemplo da arilsulfase.

### **Cálculo para determinação da atividade da enzima do solo - exemplo**

A enzima fosfatase ácida catalisa a hidrólise de fosfatos no p-NPP, liberando fosfatos e p-nitrofenol no solo. A quantidade de fosfatos é proporcional à de p-nitrofenol na solução. Desse modo, o cálculo da atividade da enzima pode ser feito com base na curva de calibração de p-nitrofenol. A atividade da fosfatase ácida é expressa em µg de p-nitrofenol por grama de solo por hora. Para o cálculo, utiliza-se a curva de calibração, produzida diariamente para cada batelada de amostras analisadas, e os fatores de diluição embutidos no procedimento. Os cálculos são semelhantes aos da determinação da **atividade da arilsulfatase e β-glucosidase**, mostrados nos métodos anteriores. **Usá-lo como exemplo para os cálculos da fosfatase ácida.**

**Observação:** se o extrato de solo tiver sido diluído para se adequar à faixa de leitura da curva padrão, fazer as correções pertinentes no cálculo da atividade enzimática.

### **Comentários**

- A cor desenvolvida pela reação do p-nitrofenol é estável por cerca de 24 horas.
- A reação enzimática é linear por até 12h.
- Usando ensaios curtos (1-2 h), o tolueno pode ser omitido.
- Uma rápida centrifugação pode ser aplicada em vez da filtração.
- A reação enzimática pode ser interrompida colocando a suspensão de solo em gelo após o final do tempo de incubação.
- A adição de CaCl<sub>2</sub> evita a dispersão das argilas durante o tratamento subsequente com NaOH, que normalmente é usado para extrair o p-nitrofenol do solo.
- É necessário cuidado ao escolher o tampão porque a atividade da fosfatase do solo é inibida pelo tampão de acetato e citrato-fosfato.
- Extração incompleta de p-nitrofenol foi observada em solo com alto teor de matéria orgânica e Fe e Al extraíveis.
- O método utiliza uma concentração de 23 mM de substrato na suspensão do solo, mas concentrações menores (de 1 a 7,5 mM) já foram utilizadas por outros autores. Concentrações tão baixas quanto 1 mM de p-nitrofenil fosfato devem ser evitadas.

### **Protocolo adaptado de:**

Alef, K. & Nannipieri, P. (1995). *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. London, Academic Press. 420 p.

Eivazi, F. & Tabatabai, M. A. (1977). *Phosphatases in soils*. *Soil biology and biochemistry*.