



**Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**  
**Universidade de São Paulo**  
**Departamento de Ciência do Solo**  
**Disciplina de Biologia do Solo**



# **MICROORGANISMOS COMO BIOINDICADORES DA QUALIDADE DO SOLO: AVALIAÇÃO ENZIMÁTICA**

***Cátia Aparecida Simon***

**Doutoranda em Microbiologia Agrícola**

**Mestre em Produção Vegetal – UFMS**

**Licenciada em Biologia - IFST**

**Técnica Agropecuária - EAFST**

**Piracicaba**  
**2017**

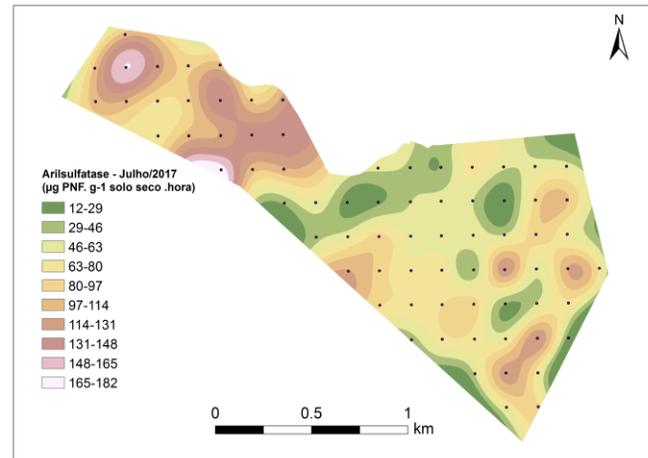
# SOLO

Sustentação da vida no planeta.

Reações químicas e bioquímicas (ciclagem e reciclagem de nutrientes).

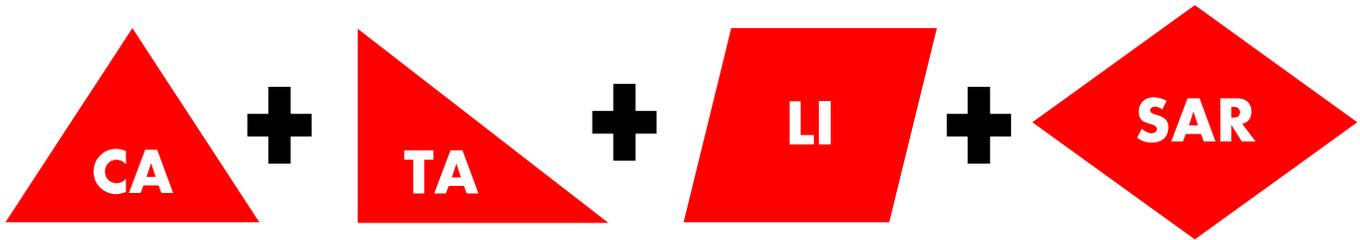
Sistema heterogêneo.

Vida microbiana.



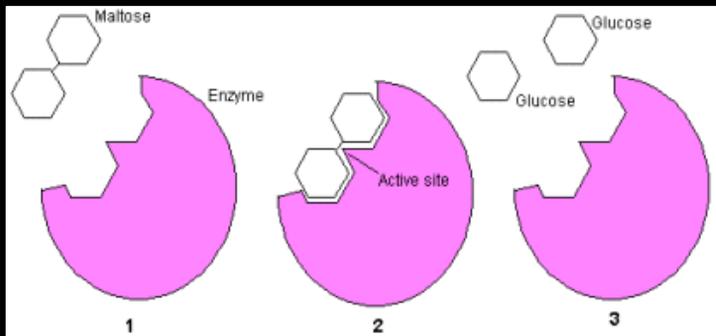
# CONCEITOS BÁSICOS DE ENZIMAS

O que é uma enzima?  
Qual sua função?



São capazes de aumentar de  $10^5$  a  $10^{17}$  vezes a velocidade de uma reação.

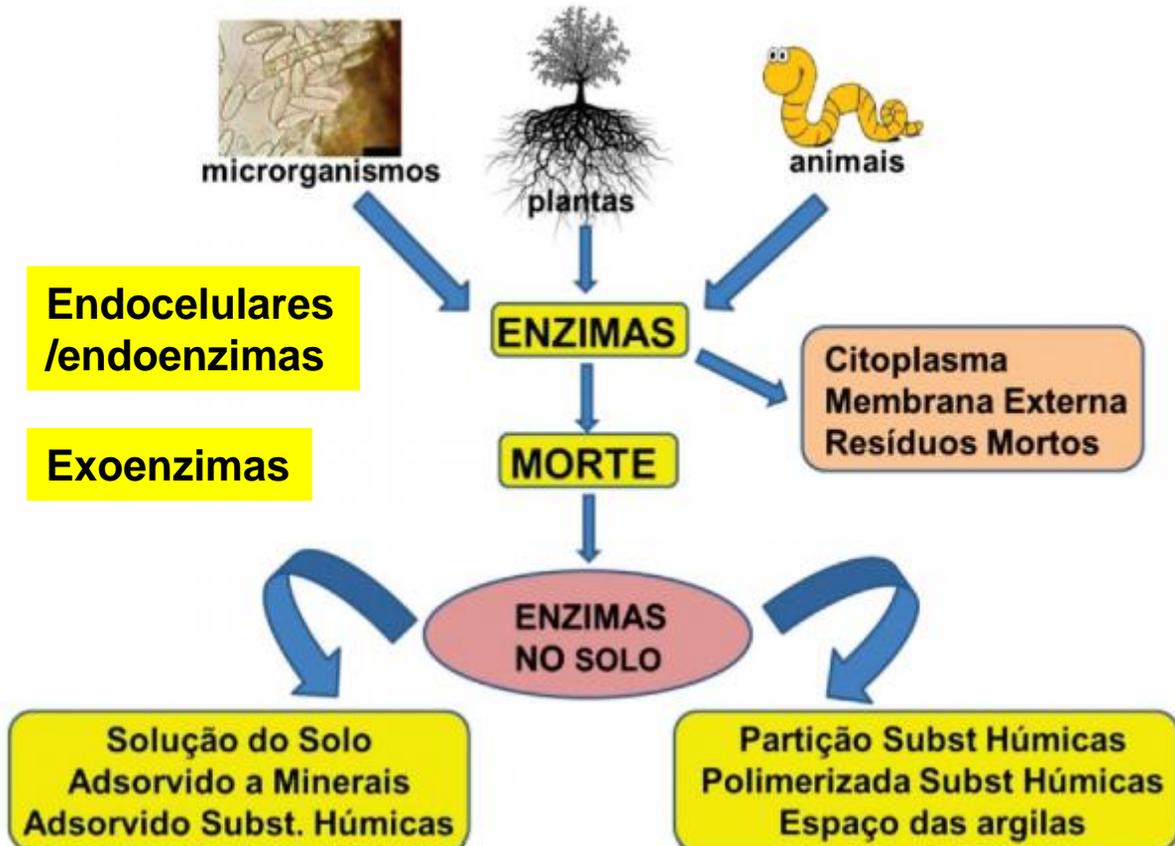
# Baixa energia de ativação



## Modelo chave-fechadura

A especificidade de uma enzima é devida à interação precisa do substrato com a enzima. Tal precisão é resultado da complexa estrutura 3D da proteína/enzima.

# Origem e localização das enzimas no ambiente do solo



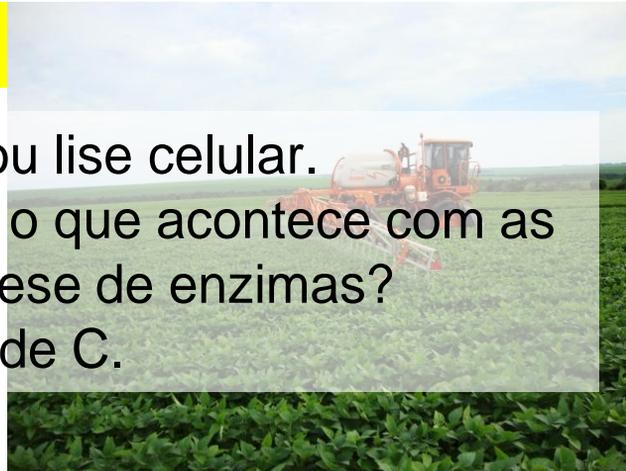
# INIBIÇÃO ENZIMÁTICA

Atuação inibidor direta → sobre a molécula enzimática.

Atuação inibidor indireta → sobre os organismos sintetizantes das moléculas enzimáticas.

## Agroquímicos?

Morte de organismos do solo ou lise celular.  
É se o organismos sobreviver, o que acontece com as enzimas – prejudica a biossíntese de enzimas?  
Agroquímicos ainda são fonte de C.



# FATORES QUE INFLUENCIAM NA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM AMOSTRAS DE SOLO



- 1. Amostragem de solo:**
  - Divisão da área.
  - Tipo de cultura e espaçamento.



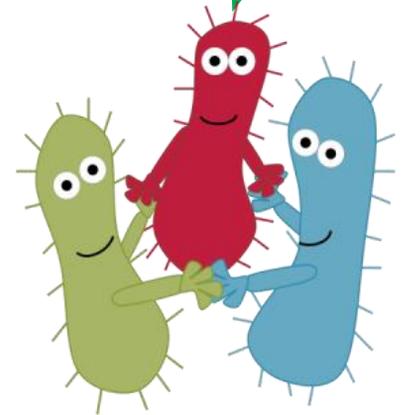
# FATORES QUE INFLUENCIAM NA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM AMOSTRAS DE SOLO

## 1. Amostragem de solo:



São necessários  
vários destes pontos  
por parcela.

Quanto mais melhor!



# FATORES QUE INFLUENCIAM NA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM AMOSTRAS DE SOLO

## 1. Amostragem de solo: E a profundidade de coleta?



# FATORES QUE INFLUENCIAM NA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM AMOSTRAS DE SOLO

- 1. Amostragem de solo:  
E a profundidade de coleta?**

**0,00 - 0,05 m ou 0,00 – 0,10 m → atividade enzimática é maior, bem como a possibilidade de se detectar diferenças entre tratamentos.**

**0,00 – 0,20 m → atividade menor, utilizada para relacionar a atividade enzimática com a fertilidade do solo.**

# FATORES QUE INFLUENCIAM NA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM AMOSTRAS DE SOLO

## 1. Amostragem de solo:

**O que fazer com as amostras após a coleta no campo:**

1. Homogeneizar bem.
2. Peneirar em peneira de malha 4mm.
3. Armazenar a uma temperatura de  $7\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$  até o momento da realização dos ensaios.
4. Remover, cuidadosamente, resíduos de plantas e raízes das amostras de do solo, antes das análises.

# FATORES QUE INFLUENCIAM NA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM AMOSTRAS DE SOLO

## 1. Amostragem de solo:



(-+) E a época de coleta?

(+) E perto das raízes?

(+) E perto do local com adubação orgânica?

# FATORES QUE INFLUENCIAM NA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM AMOSTRAS DE SOLO

## 1. Amostragem de solo:



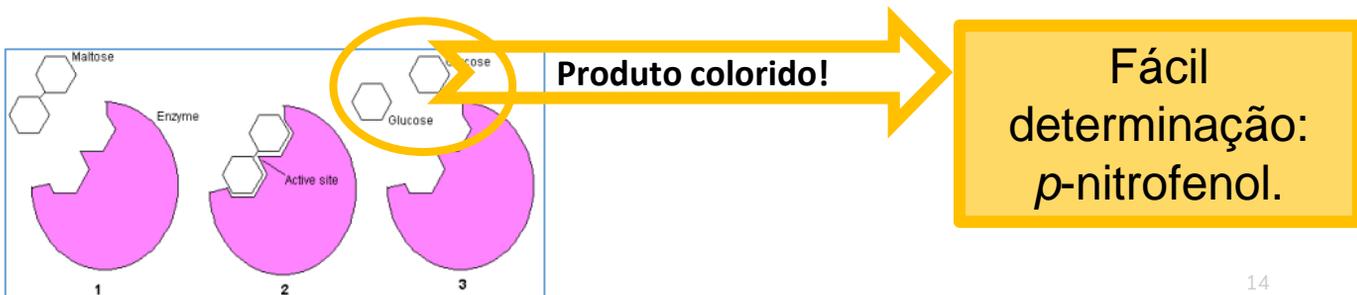
# FATORES QUE INFLUENCIAM NA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM AMOSTRAS DE SOLO

## 2. Substrato:

**Natural** → catálise em condições naturais.

Celulase utiliza a celulose; amilase utiliza amido; dentre outras.

**Sintético** → substâncias artificiais – *p*-nitrofenilfosfato de sódio; *p*-nitrofenilsulfato; dentre outros.



# FATORES QUE INFLUENCIAM NA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM AMOSTRAS DE SOLO

## Sintético: Vantagens X Desvantagem

### Propriedades

Related Categories	<a href="#">p-Nitrophenyl Phosphate Substrate Systems</a> , <a href="#">Alkaline Phosphatase</a> , <a href="#">Alphabetical Listing</a> , <a href="#">Biochemicals and Reagents</a> , <a href="#">Colorimetric</a> , <a href="#">Mais...</a>
InChI Key	KAKKHKRHCKCAGH-UHFFFAOYSA-L
Quality Level	PREMIUM
form	tablet
storage temp.	-20°C

### Disponibilidade e Preços

SKU - Tamanho da Embalagem	Disponibilidade	Preço (BRL)	Quantidade	
N2765-100TAB	✓ Previsão de entrega em 17.10.17	2,946.00	<input type="text" value="0"/>	★ ⓘ
N2765-50TAB	✓ Previsão de entrega em 17.10.17 Os fabricantes para o mercado de diagnóstico e laboratórios de diagnóstico clínico devem utilizar grau alternativo: SRE0026	1,710.00	<input type="text" value="0"/>	★ ⓘ
N2765-5X100TAB	✓ Disponível para enviar no 18.10.17 - DE	7,182.00	<input type="text" value="0"/>	★ ⓘ

# FATORES QUE INFLUENCIAM NA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM AMOSTRAS DE SOLO

## 3. Inibidores de crescimento microbiano

### Pra que serve?

Para as avaliações de fosfatases, arilsulfatase e beta-glucosidase é opcional (**tolueno**).

Isso, porque a incubação é de 1h, e o crescimento de geradores das respectivas enzimas é lento.

Para atividade da uréase é obrigatório a utilização de toluol como inibidor.

# FATORES QUE INFLUENCIAM NA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM AMOSTRAS DE SOLO

## 4. Tempo de incubação

Variável dependente da atividade da enzima a ser avaliada.

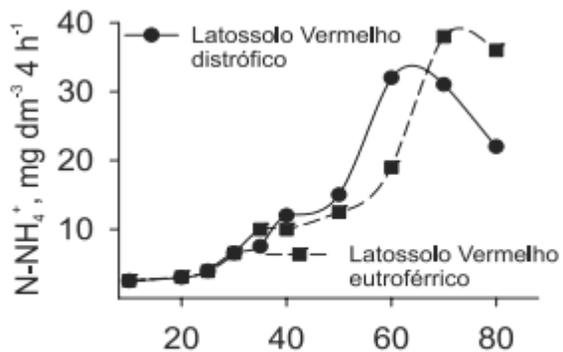
**1h → Arilsulfatase:** sua atividade é alta e a sensibilidade de avaliação do p-nitrofenol formado também.

**24h → celulase:** atividade da enzima é baixa.

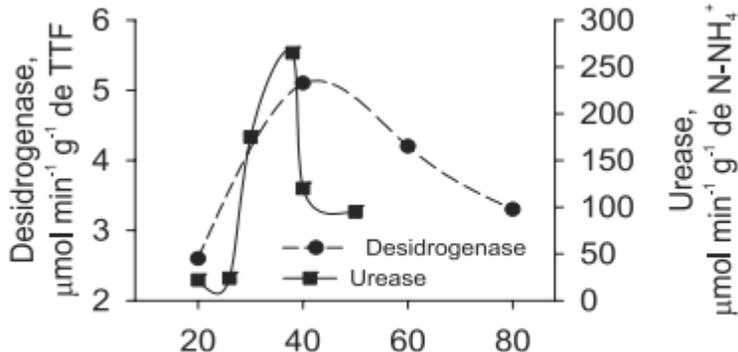
# FATORES QUE INFLUENCIAM NA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM AMOSTRAS DE SOLO

## 5. Temperatura

O complexo coloidal do solo protege as enzimas do efeito da temperatura, de modo que os valores empregados têm sido bem mais elevados que os determinados em sistemas puros.



(a)

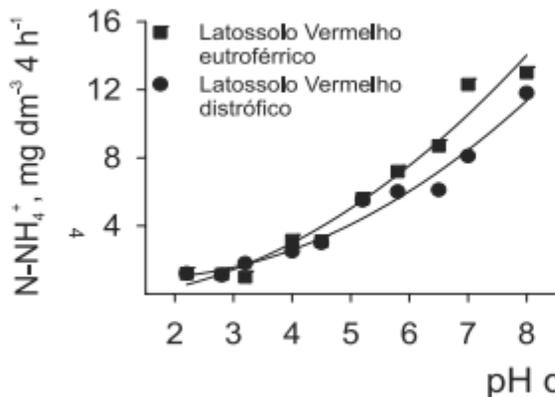


(b)

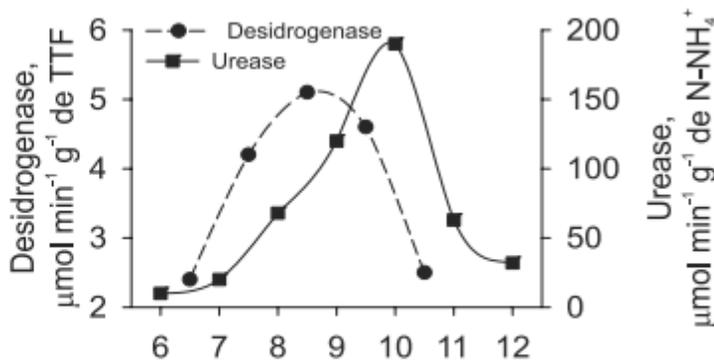
# FATORES QUE INFLUENCIAM NA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM AMOSTRAS DE SOLO

## 6. pH

Quando o objetivo é avaliar o **potencial máximo de atividade da enzima**, faz-se necessário selecionar o **pH em que a atividade seja máxima**, o que é obtido pelo uso de uma solução tampão adequada.



(a)



(b)

# FATORES QUE INFLUENCIAM NA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM AMOSTRAS DE SOLO

## 7. Paralisação da reação

É necessário parar a reação para que **novas transformações do substrato não** ocorram até o momento em que a quantidade do produto formado ou do substrato restante seja determinada.

**Arilsulfatase**  
**CaCl<sub>2</sub>+NaOH**

**Beta-glicosidase**  
**CaCl<sub>2</sub>**

**Fosfatases**  
**CaCl<sub>2</sub>+NaOH**

# FATORES QUE INFLUENCIAM NA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM AMOSTRAS DE SOLO

## 8. Avaliação do extrato de incubação

Concentração final do substrato.

**Fosfatases:** leitura da coloração amarela num espectrofotômetro a 410 nm.

**Substrato:**

*p*-nitrofenilfosfato  
de sódio

Hidrólise

**Produto:**

*p*-nitrofenol



# ATIVIDADE DE ALGUMAS ENZIMAS EM AMOSTRAS DE SOLO

## 1. FOSFATASES

- Classificadas em cinco grandes grupos, sendo o grupo das **fosfomonoesterases** agruparem as fosfatases ácidas e alcalinas.
- Neste grupo o substrato atuam: fitase, nucleotidase, açúcar fosfatase e glicerofosfatase.
- Mineralização do P.

# ATIVIDADE DE ALGUMAS ENZIMAS EM AMOSTRAS DE SOLO

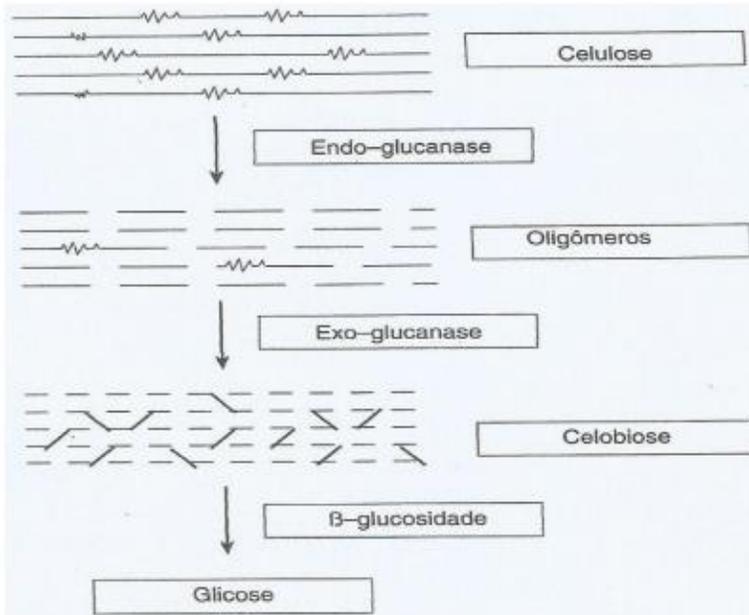
## 1. FOSFATASES

- Correlacionada com a deficiência do P:

**Solos com baixo teor de P → aumento da liberação de fosfatases.**

# ATIVIDADE DE ALGUMAS ENZIMAS EM AMOSTRAS DE SOLO

## 2. $\beta$ -glicosidase



Faz parte de um complexo multi-enzimático **CELULASE** que hidrolisam a celulose.

# ATIVIDADE DE ALGUMAS ENZIMAS EM AMOSTRAS DE SOLO

## 2. $\beta$ -glicosidase

- Promove uma ideia da atividade biológica passada, bem como da capacidade do solo em estabilizar a matéria orgânica.
- Tem relação com M.O.S.
- Usada para detectar o **efeito do manejo** do solo e como **indicadora de qualidade do solo**.

# Algumas considerações

**Impossível coletar informações sobre todos os tipos de substrato utilizáveis pela comunidade microbiana**

**Monitoramento no tempo e no espaço**

**RESILIÊNCIA DO SOLO** capacidade de voltar ao seu estado original após ter sido exposto a algum tipo de estresse.

# Algumas considerações

Quanto **MAIOR A REDUNDÂNCIA FUNCIONAL** e a diversidade, mais rápido o ecossistema pode retornar às condições originais iniciais



**MAIOR A SUA RESILIÊNCIA**

# Algumas considerações: atividade biológica



Dados disponibilizados pela Embrapa Cerrados.

# PRÁTICA

# QUESTÕES PRÁTICAS

1. Uma agricultora do MS tem duas propriedades cultivadas com soja precoce NA5900RR, entretanto, as áreas diferem no *tipo de preparo do solo*, sendo uma cultivada convencionalmente e outra pelo sistema de plantio direto. De acordo com seus conhecimentos práticos descreva:

Sobre a diferença entre cultivo convencional e sistema de plantio direto.

Para a **biologia do solo**, qual dos dois tipos de manejo do solo é mais indicado? Descreva por que (benefícios para a comunidade microbiana do solo – diversidade, fontes de carbono, fatores físicos e químicos do solo, como isso influencia a comunidade microbiana do solo, etc).

# QUESTÕES PRÁTICAS

2. Uma agricultora do ES tem duas pequenas áreas de cultivo em sistema de plantio direto, uma com *Urochloa brizantha* e outra com crambe. Sabe-se que a *U. brizantha* é uma gramínea, com raízes fasciculadas e com grande produção de fitomassa vegetal. Já o crambe pertence à família das Brassicaceae, pode apresentar efeito alelopático (inibir o desenvolvimento de plantas e até influenciar na comunidade microbiana do solo), não-micorrízico, tem sistema radicular pivotante, e quando comparado com a *U. brizantha* tem baixa fitomassa vegetal. Esta agricultora contratou uma empresa de microbiologia do solo, para medir a atividade da enzima da fosfatase ácida, e os resultados encontrados foram:

Área com *U. brizantha*, 572,86 ( $\mu\text{g PNF. g}^{-1}$  solo seco.hora);

Área com crambe, 466,14 ( $\mu\text{g PNF. g}^{-1}$  solo seco.hora).

Qual dos dois cultivos mencionados, após a análise enzimática você, como engenheira (o) agrônomo, indicaria para a produtora? Descreva sobre sua resposta (observe todos os parâmetros: disponibilidade fósforo no solo, secreção de fosfatases, morfologia vegetal, etc).