

Otimização de método para análise de arilsulfatase em solos ⁽¹⁾

Leonardo Vitor Belo Pazutti ⁽²⁾; Guilherme Montandon Chaer ⁽³⁾

⁽¹⁾ Trabalho executado com recursos da Embrapa e do CNPq (processo nº485034/2012-3);

⁽²⁾ Graduando em Química Industrial; Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; Seropédica, RJ; leonardopazutti@yahoo.com.br; ⁽³⁾ Pesquisador, Embrapa Agrobiologia; Seropédica, RJ; guilherme.chaer@embrapa.br.

RESUMO: Várias enzimas hidrolíticas relacionadas à ciclagem de C, N, P e S têm sido propostas como indicadores sensíveis da degradação do solo. Entretanto, o custo da análise dessas enzimas ainda é elevado, considerando sua adoção em rotinas laboratoriais e comparado às análises tradicionais de fertilidade do solo. Este estudo objetivou avaliar modificações ao método de análise da arilsulfatase em solos, originalmente desenvolvido por Bremner e Tabatabai (1970), visando reduzir os custos e o tempo da análise. Essas modificações consistiram em (1) redução em 50% da quantidade de solo e reagentes; (2) uso de tubos de ensaio no lugar de Erlenmeyers; (3) uso de banho maria no lugar de incubadoras para incubação de amostras e (4) substituição da etapa de filtração por uma de centrifugação. Também foi avaliada possibilidade de redução da concentração do substrato *p*-nitrofenilsulfato (PNS) no meio de reação de 50 mM para 25 mM. Para a comparação dos métodos foram usadas 30 amostras de diferentes solos. O método modificado apresentou boa correlação com o método original utilizando tanto PNS a 50 mM quanto a 25 mM. Os resultados permitem concluir que o método modificado proposto produz resultados comparáveis ao método de Bremner & Tabatabai (1970) e reduz o custo de análise significativamente.

Termos de indexação: enzimas do solo, método analítico, indicador de qualidade do solo.

INTRODUÇÃO

As arilsulfatases são enzimas produzidas e excretadas por bactérias em resposta à limitação de enxofre no ambiente do solo (Vong et al., 2003). Essas enzimas são chaves na mineralização do enxofre componente de moléculas orgânicas como ésteres de sulfato ($R-O-SO_3^-$) (Kertesz & Mirleau, 2004). A liberação de íons SO_4^{2-} no solo pelo processo de mineralização do enxofre orgânico promovido pelas arilsulfatases constitui a principal fonte de enxofre para plantas em vários ecossistemas.

A atividade de arilsulfatase tem sido recomendada como indicadora sensível da degradação dos solos por mostrar de forma prematura alterações no conteúdo de matéria

orgânica do solo e de outras propriedades químicas e físicas (Chaer & Fernandes, 2010; Lopes et al., 2013).

O método tradicionalmente utilizado na análise da arilsulfatase foi proposto por Bremner & Tabatabai (1970), o qual foi posteriormente sintetizado em Tabatabai (1994). O método consiste na extração e determinação colorimétrica do *p*-nitrofenol liberado quando a amostra de solo é incubada com solução tamponada contendo *p*-nitrofenil sulfato (PNS) a 37°C por 1 h. Este método, embora amplamente empregado em diversos estudos com solos, apresenta custo relativo elevado quando se considera a possibilidade de aplicação da análise em larga escala e o seu uso em rotinas laboratoriais. O substrato PNS é um dos fatores que pesam no custo da análise sendo estimado em torno R\$ 500,00 para a análise de 100 amostras.

Este trabalho teve como objetivo avaliar mudanças na metodologia de Bremner & Tabatabai (1970) como a redução de escala do meio de reação e da concentração de PNS visando a redução do custo da análise.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização dos ensaios foram utilizadas 30 amostras de solo coletadas na microbacia do rio Batatal em Cachoeiras de Macacu – RJ, sob diferentes usos e tipos de solo (**Tabela 1**). Cada amostra foi representativa de uma unidade pedoambiental da microbacia (área com uso e tipo de solo específicos) e foi composta de oito amostras simples coletadas na profundidade de 0 a 10 cm. Após a coleta, as amostras foram peneiradas em peneira de 2 mm e armazenadas a 4°C até a realização das análises.

A atividade da arilsulfatase foi determinada segundo a metodologia proposta por Bremner & Tabatabai (1970). Resumidamente, em Erlenmeyers de 50 ml foram adicionados 1g de solo, 4 ml de tampão acetato de sódio pH 5,8 e 1 ml de solução de PNS 50 mM preparada no tampão. Os frascos foram fechados, agitados manualmente e incubados em incubadora por 1 h a 37°C. Após este período, foram imediatamente adicionados 1 ml de $CaCl_2$ 0,5 M e 4,0 ml de NaOH 0,5 M seguido de agitação. O meio reacional foi então filtrado em papel de filtro

qualitativo, e a quantidade de *p*-nitrofenol presente no filtrado determinada colorimetricamente a 410 nm e preparo de curva padrão de *p*-nitrofenol.

A atividade da arilsulfatase também foi avaliada utilizando-se as seguintes modificações relativas ao método descrito acima: em tubos de ensaio de 10 ml foram adicionados 0,5 g de solo, 2 ml de tampão acetato de sódio (pH 5,8) e 0,5 ml de solução de PNS 50 mM preparada no tampão. Os tubos foram agitados em agitador mecânico e posteriormente incubados em banho maria por 1 h a 37°C. Após este período, foram adicionados 0,5 ml de CaCl₂ 0,5 M e 2,0 ml de NaOH 0,5 M. Os tubos foram agitados e posteriormente centrifugados por 5 min a 3000 rpm. O sobrenadante foi utilizado para a quantificação do *p*-nitrofenol formado conforme descrito anteriormente para o método original.

A atividade da arilsulfatase também foi avaliada utilizando-se o método modificado com solução na concentração de 25 mM.

Todas as análises, independente do método, foram feitas em duplicata. Também não foi adicionado tolueno à reação (Verchot e Borelli, 2005). Controles para cada amostra foram preparados pela adição de tampão acetato de sódio ao invés de solução com PNS para descontar a cor derivada do solo e não da quebra do PNS. Outros controles contendo a mistura de reação na ausência de solo também foram preparados para descontar possível contaminação do substrato por *p*-nitrofenol.

Os dados de atividade da arilsulfatase foram analisados graficamente e pelo cálculo de coeficientes de correlação de Pearson entre diferentes métodos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Comparação entre os métodos original e modificado com PNS a 50 mM

Houve correlação significativa entre a atividade de arilsulfatase obtida pelos métodos original e modificado usando-se PNS a 50 mM (**Figura 1**). No entanto, o método original apresentou uma atividade média 36% menor do que aquela obtida pelo método modificado. Acreditamos que essa diferença pode estar relacionada à diferença no ambiente de incubação das amostras utilizado em cada método. No método de Bremner & Tabatabai (1970) foi usado incubadora para incubar as amostras, enquanto que no método modificado usou-se banho-maria (o uso de incubadoras no método original é necessário em função do uso de Erlenmeyers para a reação). Em ensaios realizados em nosso laboratório, levou-se aproximadamente 35 min para

a temperatura do meio de reação atingir 35°C quando amostras foram incubadas em incubadora a 37°C e aproximadamente 15 min quando incubadas em banho-maria. Essa diferença advém da maior eficiência de transferência de calor do banho-maria. Logo, pressupõe-se que como no método modificado a incubação ocorre por um período mais longo em temperatura próxima à ótima da enzima, a atividade líquida final medida é maior que no método original.

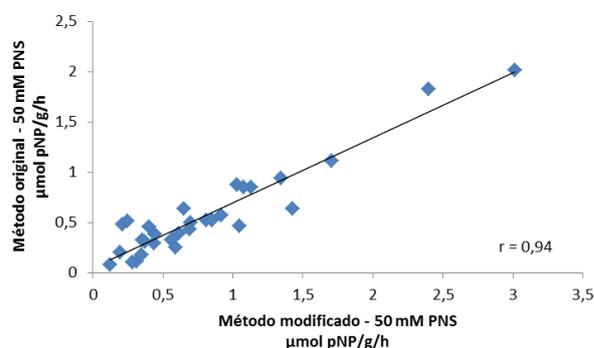


Figura 1: Relação entre a atividade de arilsulfatase obtida pelo método original (Bremner & Tabatabai, 1970) e o modificado. Em ambos os métodos foi adicionado o substrato PNS na concentração de 50 mM.

Avaliação da atividade de arilsulfatase com PNS a 25 mM

Houve alta correlação entre as atividades de arilsulfatase medidas com PNS a 50 mM e a 25 mM (**Figura 2**). Entretanto, a média da atividade da enzima quando usado PNS a 25 mM foi 47% menor em relação à atividade a 50 mM quando usado o método modificado. Já em relação ao método original essa diferença foi de 18% (**Figura 3**).

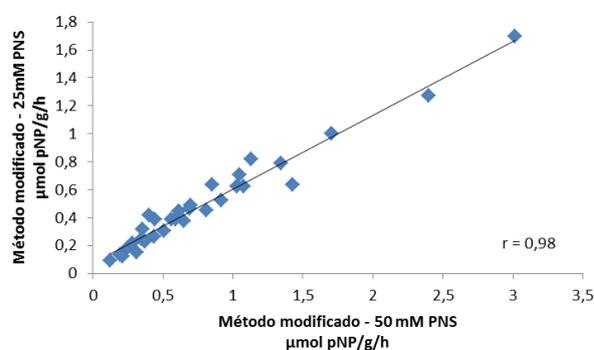


Figura 2: Relação entre a atividade de arilsulfatase obtida pelo método modificado com PNS a 50 mM e a 25 mM

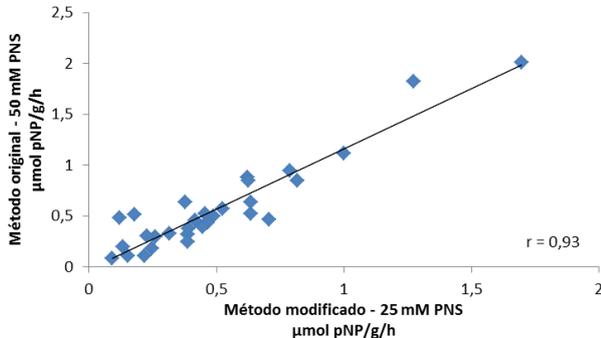


Figura 3: Relação entre a atividade de arilsulfatase obtida pelo método original a 50 mM e o método modificado a 25 mM

Viabilidade e vantagens do método modificado

A aplicação do método modificado, seja usando a concentração original de PNS a 50 mM ou a reduzida de 25 mM, não altera a diferença relativa de atividade de arilsulfatase medida entre as diferentes amostras de solo. Para a comparação de resultados de atividade de arilsulfatase utilizando o método modificado com a de outros estudos que utilizaram o método original, pode-se usar a seguinte relação: *atividade método original PNS 50 mM = 1,1824 x atividade do método modificado com PNS 25 mM – 0,0234*.

Além da redução do gasto com substrato, a modificação proposta no método de análise da arilsulfatase apresenta ainda outras vantagens em relação ao método de Bremner & Tabatabai (1970) (**Tabela 2**). Dentre estas, pode-se citar a redução de espaço laboratorial e vidrarias necessárias para a realização dos ensaios e o menor tempo de análise, especialmente pela substituição da etapa de filtragem pela de centrifugação.

CONCLUSÕES

A análise da arilsulfatase utilizando o método modificado com o substrato PNS na concentração de 25 mM apresenta resultados comparáveis ao método original de Bremner & Tabatabai (1970) e permite uma redução significativa de custo da análise associada ao gasto com o substrato.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Embrapa e ao CNPq pelo apoio concedido na forma de bolsas de estudo e apoio técnico.

REFERÊNCIAS

VERCHOT, L.V. & BORELLI, T. 2005. Application of para-nitrophenol (pNP) enzyme assays in degraded tropical soils. *Soil Biology & Biochemistry*, 37 625-633.

CHAER, G.M. & FERNANDES, M.F. Comparing the sensitivity of physical, chemical and biological properties to a gradient of induced soil degradation. In: 19th World Congress of Soil Science, Brisbane, Austrália. 2010.

KERTESZ, M. & MIRLEAU, P. The role of soil microbes in plant sulphur nutrition. *Journal of Experimental Botany*, 55:1939-1945, 2004.

LOPES, A.A.D.C.; SOUSA, D.M.G.D.; CHAER, G.M.; JUNIOR, F.B.D.R.; GOEDERT, W.J. & MENDES, I.D.C. 2013. Interpretation of Microbial Soil Indicators as a Function of Crop Yield and Organic Carbon. *Soil Science Society of American Journal*, 77:461-472.

TABATABAI, M.A. Soil Enzymes. In: WEAVER, R.W. et al. (Eds.). *Methods of soil analysis. Part 2. Microbiological and biochemical properties*. Madison, WI, SSSA, 1994. p.775-833. (SSSA Book Series: 5).

TABATABAI, M.A. & BREMNER, J.M. 1970. Arylsulfatase activity of soils. *Soil Science Society of American Proceedings*, 34:225-229.

VONG, P.; DEDOURGE, O.; LASSERRE-JOULIN, F. & GUCKERT, A. Immobilized-S, microbial biomass-S and soil arylsulphatase activity in the rhizosphere soil of rape and barley as affected by labile substrate C and N additions. *Soil Biology & Biochemistry*, 35:1651-1661, 2003.

Tabela 1 – Classificação do solo, relevo, uso, conteúdo de C e teor de argila de 30 amostras de solo coletadas de pedoambientes da microbacia do rio Batatal, Cachoeiras de Macacu, RJ.

Amostra	Ordem solo	Relevo	Uso/cobertura	C-org (mg kg ⁻¹)	Argila
1	Cambissolo	Encosta	Pasto	14,5	28
2	Cambissolo	Encosta	Mata estágio inicial	12,4	18
3	Cambissolo	Encosta	Bananal	13,3	22
4	Cambissolo	Encosta	Pasto	10,9	22
5	Cambissolo	Encosta	Mata	12,6	28
6	Latossolo	Encosta	Mata estágio inicial	9,7	18
7	Cambissolo	Encosta	Pasto	8,7	22
8	Cambissolo	Encosta	Pasto	6,7	18
9	Latossolo	Encosta	Pasto	21,4	34
10	Latossolo	Encosta	Mata	12,5	16
11	Latossolo	Encosta	Pasto	10,9	22
12	Cambissolo	Encosta	Mata	9,0	10
13	Cambissolo	Encosta	Bananal	8,1	10
14	Cambissolo	Encosta	Bananal	11,7	18
15	Cambissolo	Encosta	Pasto	10,8	22
16	Cambissolo	Baixada	Agricultura	7,9	18
17	Aluvial	Baixada	Agricultura	9,8	12
18	Cambissolo	Baixada	Bananal	6,7	18
19	Cambissolo	Baixada	Agricultura	9,2	32
20	Cambissolo	Encosta	Mata	9,9	20
21	Cambissolo	Encosta	Agricultura	6,8	26
22	Latossolo	Encosta	Mata	9,5	24
23	Latossolo	Encosta	Pasto	13,9	34
24	Cambissolo	Baixada	Mata	12,2	16
25	Gleissolo	Baixada	Agricultura	14,7	28
26	Cambissolo	Baixada	Agricultura	15,3	12
27	Gleissolo	Baixada	Pasto	6,6	14
28	Cambissolo	Baixada	Pasto	11,9	18
29	Cambissolo	Baixada	Bananal	11,5	18
30	Cambissolo	Baixada	Agricultura	9,7	16

Tabela 2 – Comparação entre os métodos original (Bremner & Tabatabai, 1970) e modificado ressaltando as vantagens do método modificado.

Parâmetro	Método		Vantagem do método modificado
	Eivazi & Tabatabai	Modificado	
Meio de incubação	Erlenmeyers 50 ml	Tubos de ensaio 10 ml	Redução de espaço e vidraria.
Custo do substrato / 100 amostras	R\$ 500,00	R\$ 125,00	Redução de custo do substrato por análise.
Incubação	Incubadora (BOD) (37°C/1h)	Banho-maria (37°C/1h)	Menor tempo para atingir temperatura ótima da enzima.
Obtenção sobrenadante	Filtragem	Centrifugação	Eliminação de papel de filtro. Redução do tempo de análise.
Geração de resíduo / 100 amostras	1000 ml	500 ml	Menor geração de resíduos químicos.