



FELIPE MACÍAS
MONTSERRAT DÍAZ-RAVIÑA
MARÍA TERESA BARRAL
(eds.)

RETOS Y OPORTUNIDADES EN LA CIENCIA DEL SUELO



VI CONGRESO IBÉRICO DE LA CIENCIA DEL SUELO
CICS2014
SANTIAGO DE COMPOSTELA

andavira
e d i t o r a

Quantificação da actividade de algumas enzimas em solo de cultura de arroz, e sua modulação em presença de As (III)

J.D. Nunes^{1,4*}, L. Mouquinho³, C. Alexandre¹, M. R. Martins²

¹ICAAM - Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas, Departamento de Geociências, Universidade de Évora, Ap. 94, 7002-554 Évora, Portugal; *jdnunes@uevora.pt

²ICAAM - Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas, Departamento de Química, Universidade de Évora, Ap. 94, 7002-554 Évora, Portugal.

³Departamento de Química, Universidade de Évora, Évora, Portugal.

⁴Orivárzea-Orizicultores do Ribatejo, S.A., Lagoa das Donzelas, 2120-901 Salvaterra de Magos, Portugal

Resumo

O arroz absorve o As de forma mais eficiente do que outros cereais, em resultado das condições de anaerobiose em que é cultivado. Dada a importância que este cereal tem na alimentação humana, torna-se imperativo reduzir a acumulação de As neste alimento. Por outro lado a qualidade e a conservação dos solos tem vindo a ser uma prioridade, pelo que é extremamente importante fomentar uma gestão sustentável do recurso solo.

De modo a avaliar a qualidade de solos com culturas de arroz, procedeu-se à quantificação das actividades enzimáticas da fosfatase, arilsulfatase, β -glucosidase, desidrogenase e urease, em amostras de solo e estudou-se a sua modulação na presença de As (III).

Na caracterização bioquímica do solo, a quantidade de proteína para as diferentes parcelas de solo variou entre 0,38 e 0,42 mg/g. As actividades enzimáticas fosfatase, arilsulfatase, β -glucosidase, desidrogenases e urease foram de 8,0 - 21,5 $\mu\text{mol/h/g}$, 1,6 - 3,7 $\mu\text{mol/h/g}$, 2,5 - 4,7 $\mu\text{mol/h/g}$, 21,2 - 65,5 $\mu\text{mol/h/g}$ e 3,9 e 36,0 $\mu\text{mol/h/g}$, respectivamente.

O estudo de modulação das actividades enzimáticas pelo As revelou que as actividades enzimáticas em estudo apresentam sensibilidade ao As(III) e que este apresentou toxicidades para todos os marcadores de qualidade do solo estudados, tendo-se obtido valores IC50 – concentração de As(III) correspondente a inibição de 50% de actividade – compreendidos entre os 126 e 1216 ppm.

Palavras-chave: Arsénio; qualidade do solo; Fosfatase, Arilsulfatase, Urease, β -Glucosidase; Desidrogenase; indicadores biológicos; IC50.

Introdução

A planta do arroz (*Oryza spp.*) absorve mais eficientemente o As do que outros cereais (Su *et al.*, 2010), devido às condições anaeróbias que ocorrem nos canteiros de cultivo. O arroz é o alimento básico para cerca de 50% da população do mundo, contribuindo com mais de 70% da energia e 50% de proteína fornecida por ingestão na sua alimentação diária (IRRI, 1993). Estudos alimentares na Europa e nos Estados Unidos mostram que o arroz é a fonte primária de As numa dieta sem alimentos de origem marinha (Robberecht *et al.*, 2002). Dada a importância que este cereal tem na agro-indústria e na economia rural europeia, tem-se assistido a uma pressão no sentido de reduzir a acumulação de As neste alimento.

As enzimas do solo, como fosfatase, arilsulfatase, β -glucosidase, desidrogenase e urease, são bons indicadores biológicos de fertilidade, uma vez que estão envolvidos em diversos ciclos microbiológicos e são proteínas com actividade catalítica de reacções biológicas específicas. Estas dependem de uma variedade de factores tais como pH, temperatura, presença (ou ausência) de inibidores, o clima, as técnicas de cultivo, tipo de cultura e propriedades edáficas (Pascual *et al.*, 1998).

A actividade enzimática do solo pode também ser utilizada como medida de actividade microbiana e produtividade (Pascual, *et al.*, 1998). As enzimas do solo são bons indicadores

biológicos de fertilidade do solo, uma vez que estão envolvidos em diversos ciclos microbiológicos e são proteínas com actividade catalítica de reacções biológicas específicas. Assim, neste estudo, procedeu-se à quantificação das actividades enzimáticas de fosfatase, arilsulfatase, β -glucosidade, desidrogenase e urease, com vista a avaliar o impacto da presença de arsénio e da cultura de arroz na qualidade do solo. Adicionalmente, avaliou-se a sensibilidade destes marcadores de monitorização do solo à presença de concentrações crescentes de As(III), com determinação dos valores de IC50 para cada um dos enzimas em estudo.

Material e métodos

Para este estudo foram colhidas amostras de solos de cultura de arroz de 4 agricultores, 2 do distrito de Lisboa e 2 do distrito Santarém, associados à Orivárzea-Orizicultores do Ribatejo, S.A.. Na tabela 1 apresentam-se as coordenadas e distribuição geográfica das parcelas de solo estudadas.

Tabela 1 - Localização das parcelas de estudo

Parcela/Solo	Coordenadas	Distrito
A	38,86639, -8,84506	Santarém
B	38,88482, -8,78637	Santarém
C	38,89831, -8,97902	Lisboa
D	38,94971, -8,95583	Lisboa

As amostras de solo foram colhidas à superfície do solo até aos 20 cm de profundidade, em pelo menos 12 pontos diferentes do terreno de cada agricultor, escolhidos aleatoriamente, com os quais foi preparada uma amostra composta, representativa do local em análise. A caracterização “*standard*” do solo foi realizada no Laboratório de Química Agrícola no Campus da Mitra, Universidade de Évora, Évora, Portugal, de acordo com as normas em vigor. Na tabela 2 apresenta-se um resumo dos principais parâmetros analisados nas parcelas de solo em estudo.

Tabela 2 - Dados dos solos utilizados nos testes de actividade enzimática

Parcela	pH (H ₂ O)	N g kg ⁻¹	C.E. mOhms ⁻¹	Ca	Mg	Na	K	CTC cmol _c kg ⁻¹	P Extract. / mg kg ⁻¹	K
				Bases de troca / cmol _c kg ⁻¹						
A	5.98	2.0	0.544	13.44	8.54	2.00	0.86	24.56	44.85	312.0
B	6.10	1.4	0.572	11.25	7.29	2.72	0.45	19.32	30.08	166.0
C	7.69	1.6	0.787	18.75	7.71	5.87	1.18	19.92	107.12	480.0
D	7.50	2.8	0.642	21.25	4.9	1.89	0.64	20.04	120.84	312.0

A determinação do teor proteico nas amostras de solo foi efectuada pelo método de Bradford, utilizando o Azul Coomassie G, o qual forma um complexo azul de intensidade proporcional à concentração de proteína presente (Bradford, 1976). A quantificação das actividades enzimáticas foi efectuada pelos seguintes métodos:

- fosfatase - método de Tabatabai e Bremner modificado - baseado na hidrólise do *p*-nitrofenilfosfato (*p*-NPP), com libertação de *p*-nitrofenol (*p*-NP) (Weaver *et al.*, 1994);
- arilsulfatase - método de Tabatabai e Klose - baseado na conversão do *p*-nitrofenilsulfato (*p*-NPS) em *p*-NP (Elgaard. *et al.*, 2003);
- β -glucosidase - método de Eivazi e Tabatabai modificado – no qual o *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosido (*p*-NPG) é hidrolisado, com formação de *p*-NP (Turner *et al.*, 2002).

- desidrogenase - método de Von Mersi e Schinner - utilizando o cloreto de 2-p-iodofenil-3-pnitrofenil-5-feniltetrazolio (INT), como substrato, o qual na presença de desidrogenases forma o sal tetrazolico, iodonitrotetrazólio-formazão (INTF) (Martins *et al.*, 2010);
- urease - método de Berthelot - que se baseia na reação do salicilato de sódio com NH₃ na presença de ácido dicloroisocianúrico, a qual forma um complexo esverdeado (Martins *et al.*, 2010)

O efeito do arsénio foi estudado no solo D, uma vez que o arroz colhido nesta área, foi aquele que apresentava menor quantidade de As. Neste ensaio foram adicionados quantidades crescentes de solução As₂O₃ 1000 mg/L de modo a determinar a concentração de As (III) que causa inibição de 50% de atividade enzimática (IC50).

A avaliação dos valores de actividade enzimática dos diferentes solos foi efectuada por análise de variância (ANOVA - *one way*) e a comparação múltipla de médias foi efectuada pelo teste de Tukey ($P < 0,05$), utilizando o software estatístico “Statistical Package for Social Sciences” (SPSS) para o Windows versão 21, IBM.

Resultados e discussão

A actividade enzimática de fosfatases foi mais elevada nos solos A e B, o que poderá estar relacionado com o menor teor em fósforo presente nestes solos, bem como com o pH mais ácido. Os resultados obtidos parecem estar de acordo com os resultados tabelados (Burns e Dick, 2002), uma vez que a actividade da enzima fosfatase aumenta quando a quantidade de fósforo é baixa ou quando a planta não consegue utilizar o fósforo inorgânico disponível (Tran *et al.*, 2010).

Os valores de actividade enzimática arissulfatase diferiram significativamente entre as quatro amostras de solo estudada, tendo sido máximo para a parcela D, com um valor de 3,65 µmol/h/g. Segundo a bibliografia, estes valores encontram-se de acordo com os valores tabelados o que confere aos solos quantidade de enxofre suficiente para o seu metabolismo (Burns e Dick, 2002).

A actividade enzimática β-glucosidase apresentou valores entre 2.6 e 4.7 µmol/h/g, tendo sido máxima e significativamente diferente para a parcela de solo B. Este facto poderá estar relacionado com os níveis de carbono orgânico presente neste solo, uma vez que esta enzima está envolvido no ciclo do carbono e degradação de compostos glucídicos presentes no solo.

A actividade desidrogenase, enzima presente apenas em células vivas, foi de 21,1 - 65,5 µmol/h/g, tendo sido significativamente superior parcelas de solo C e D. Este facto poderá ser indicativo da existência de uma elevada actividade microbiana, uma vez que esta é uma enzima intracelular relacionada com os processos de fosforilação oxidativa (Burns e Dick, 2002).

Os valores da actividade enzimática urease foram de 3,9 - 36,0 µmol/h/g, tendo sido mínima no solo B. Todas as outras parcelas apresentaram valores de actividade enzimática superior a 15 µmol/h/g. Este facto poderá estar relacionado com os teores de N mais elevados nos solos A, C e D (Burns e Dick, 2002, Martins *et al.*, 2010).

No estudo de modelação pelo As (III) observou-se todos os enzimas testados foram sensíveis à presença deste composto no solo, tendo-se obtido uma curva dose resposta, em que a atividade foi diminuindo à medida que aumentou a quantidade de As(III). Os valores de As (III) correspondentes a uma inibição de 50% da atividade enzimática (IC 50) oscilaram entre 138 e 1216 ppm para os diferentes enzimas estudados no solo D. A actividade enzimática de fosfatases foi a que se mostrou mais sensível à presença de As(III), com um valor de IC 50 de 138 ppm. Contrariamente, a actividade de desidrogenases, foi a que se mostrou mais resistente à presença de As (III), com um valor de IC 50 de 1216 ppm para este solo, o que poderá ser devido à adaptação dos microrganismos presentes no solo D a este xenobiótico. A elevada

sensibilidade para o As (III) das atividades enzimáticas de fosfatases e ureases poderá estar relacionada, respetivamente, com uma diminuição das concentrações de P e de N disponíveis para as plantas, na presença de elevados teores de As (II) e, assim, poder também ter implicações ao nível da produtividade do arroz.

Bibliografia

- Bradford M M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72, 248-254.
- Burns RG, Dick Richard P. 2002. *Enzymes in the Environment: Activity, Ecology, and Applications*, CRC Press.
- Elgaard L, Andersen GH, Eriksen J. 2002. Measurement of arylsulphatase activity in agricultural soils using a simplified assay. *Soil Biology and Biochemistry* 34:79-82.
- International Rice Research Institute (IRRI), 1993. *Rice in Human Nutrition*. Food and Agriculture Organisation of the United Nations, Rome.
- Martins MR, Santos F, Candeias P, Cruz-Morais J. 2010. Efeito da temperatura, pH e vestígios de Hg²⁺ e Pb²⁺ na actividade de desidrogenases e urease num solo da região de Évora. *Rev. de Ciências Agrárias* 33(1): 314-322. ISSN 0871-018X
- Pascual JA, Hernandez T, Garcia C, Ayuso M. 1998. Enzymatic activities in an arid soil amended with urban organic wastes: laboratory experimente. *Bioresource Technology* 64:131-138.
- Robberecht H, Van Cauwenbergh R, Bosscher D, Cornelis R, Deelstra H. 2002. Daily dietary total arsenic intake in Belgium using duplicate portion sampling and elemental content of various foodstuffs. *European Food Research and Technology* 214:27-32.
- Su YH, McGrath SP, Zhao FJ. 2010. Rice is more efficient in arsenite uptake and translocation than wheat and barley. *Plant Soil* 328:27-34.
- Tran HT, Hurley BA, Plaxton WC. 2010. Feeding hungry plants: The role of purple acid phosphatases in phosphate nutrition, *Plant Science* 179:14-27.
- Turner BL, Hopkins DW, Haygarth PM, Ostle N. 2002. β -Glucosidase activity in pasture soils. *Applied Soil Ecology* 20:157-162.
- Weaver RW, Mickelson SH. 1994. *Methods of soil analysis. Part 2 - Microbial and Biochemical properties*. Soil Science Society of America, Wisconsin, USA.
- Williams PN, Villada A, Raab A, Figuerola J, Green AJ, Feldmann J, Meharg AA. 2007. Greatly enhanced arsenic shoot assimilation in rice leads to elevated grain levels compared to wheat and barley. *Environ. Sci. Technol.* 41:6854-6859.

Agradecimentos

Este trabalho é financiado por Fundos FEDER através do Programa Operacional Factores de Competitividade – COMPETE e por Fundos Nacionais através da FCT – Fundação para a Ciência e a Tecnologia no âmbito do Projecto Estratégico PEst-OE/AGR/UI0115/2014. Este trabalho foi realizado no âmbito do projecto “Produção de arroz com baixo teor de arsénio utilizando tecnologias de Agricultura de Precisão” financiado pelo programa PRODER.