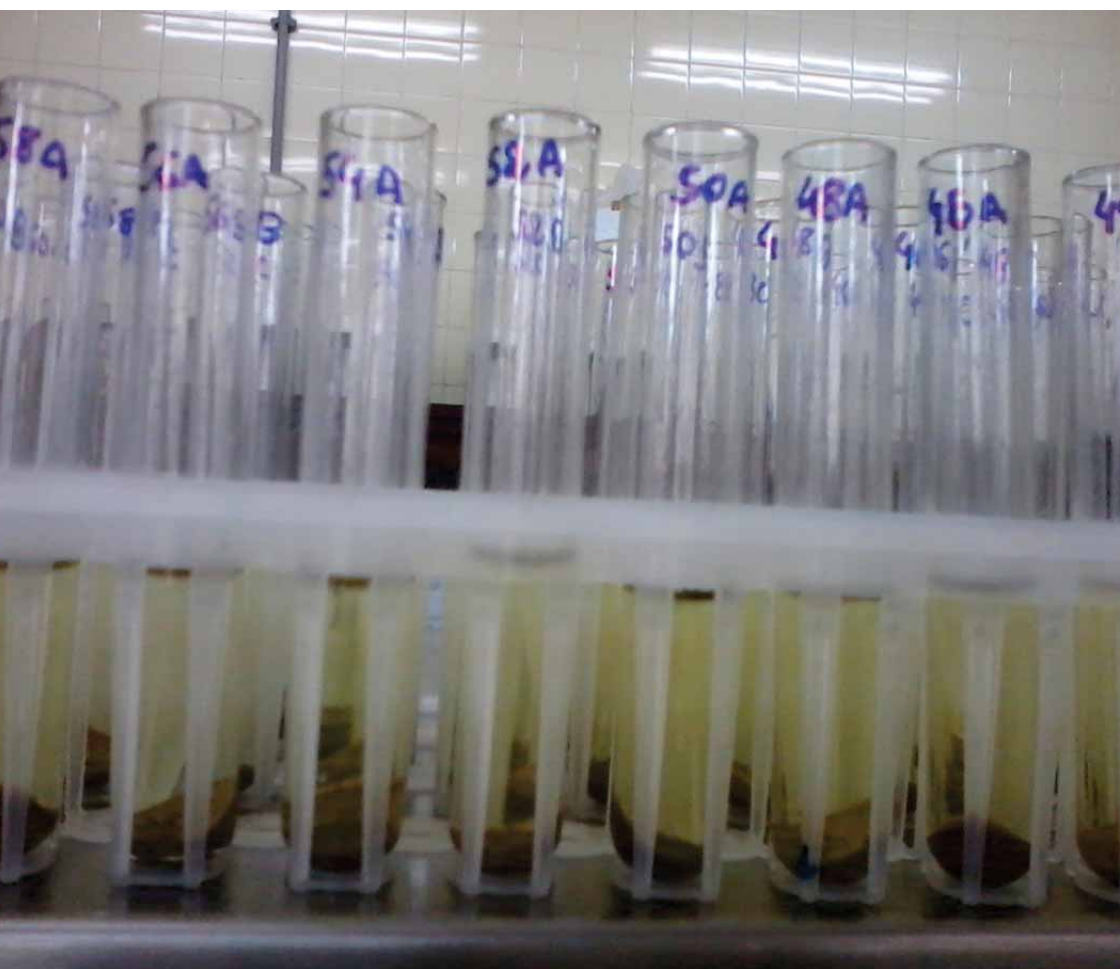


Desenvolvimento de metodologia de baixo custo para análise de β -glicosidase em solos



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Agrobiologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 92

Desenvolvimento de metodologia de baixo custo para análise de β -glicosidase em solos

Leonardo Vitor Belo Pazutti
Guilherme Montandon Chaer

Embrapa Agrobiologia
Seropédica, RJ
2012

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Agrobiologia

BR 465, km 7, CEP 23.890-000, Seropédica, RJ

Caixa Postal 74505

Fone: (21) 3441-1500

Fax: (21) 2682-1230

Home page: www.cnpab.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: Norma Gouvêa Rumjanek

Secretária-Executivo: Marta Maria Gonçalves Bahia

Membros: Bruno José Rodrigues Alves, Carmelita do Espírito Santo, Ednaldo da Silva Araújo, Luís Cláudio Marques de Oliveira, Luiz Fernando Duarte de Moraes, Janaina Ribeiro Costa Rouws, Luc Marie Felicianus Rouws, Marcia Reed Rodrigues Coelho

Supervisora editorial: Norma Gouvêa Rumjanek

Normalização bibliográfica: Carmelita do Espírito Santo

Tratamento de ilustrações: Maria Christine Saraiva Barbosa

Editoração eletrônica: Marta Maria Gonçalves Bahia

Foto da capa: Guilherme Montandon Chaer

1ª edição

1ª impressão (2012): 50 exemplares

Todos os direitos reservados

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Agrobiologia

P348 PAZUTTI, Leonardo Vitor Belo

Desenvolvimento de metodologia de baixo custo para análise de β -glicosidase em solos. / Leonardo Vitor Belo Pazutti e Guilherme Montandon Chaer. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2012. 23 p. (Embrapa Agrobiologia. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 92).

ISSN 1676-6709

1. Enzima do solo. 2. Análise química. 3. Produtividade. I. Chaer, Guilherme Montandon. III. Título. IV Embrapa Agrobiologia. V. Série.

572.567 CDD 23 ed.

Sumário

Resumo	5
Abstract	7
Introdução	9
Material e Métodos	11
Solos	11
Análise da β -glicosidase pelo método original	11
Análise da β -glicosidase pelo método modificado	11
Resultados e Discussão	13
Comparação entre os métodos original e modificado com PNG a 50 mM...	13
Comparação da atividade enzimática com PNG a 10, 50 e 100 mM no método modificado	14
Aplicação e vantagens do método modificado	17
Conclusões	18
Agradecimentos	19
Referências Bibliográficas	20

Desenvolvimento de metodologia de baixo custo para análise de β -glicosidase em solos

Leonardo Vitor Belo Pazutti¹

Guilherme Montandon Chaer²

Resumo

O presente estudo objetiva propor modificações ao método de análise da β -glicosidase em solos, originalmente descrito por Tabatabai (1994), visando a otimização de procedimentos da análise e a redução de custos, especialmente em relação ao substrato *p*-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (PNG). Uma sequência de ensaios foram realizados para comparar o método original ao modificado, o qual incluiu as seguintes modificações: uso de 50% da quantidade de solo e reagentes; uso de tubos de ensaio no lugar de Erlenmeyers para a reação; incubação em banho maria no lugar de incubadoras e o uso de centrifugação no lugar de filtração para separar o solo do meio de reação antes da análise colorimétrica. Além dessas modificações, foi avaliada a possibilidade de redução da concentração do substrato PNG no meio de reação de 50 mM para 10 mM. O método original foi comparado ao método modificado pela análise de 30 amostras de solo contendo diferentes teores de matéria orgânica e diferentes texturas. Os resultados mostraram que o método modificado, utilizando-se

¹ Graduando em Química Industrial; UFRRJ, BR 465, Km 7, Seropédica, RJ, CEP 23890-000, e-mail: leonardopazutti@yahoo.com.br.

² Pesquisador, Embrapa Agrobiologia; BR 465, Km 7, Seropédica, RJ, CEP 23890-000, e-mail: guilherme.chaer@embrapa.br.

o PNG a 50 mM, apresenta alta correlação com o método original utilizando a mesma concentração ($r = 0,86$). Quando se reduziu a concentração de PNG para 10 mM, também houve alta correlação com os resultados obtidos a 50 mM ($r = 0,94$). No entanto, a produção de *p*-nitrofenol com substrato a 10 mM foi reduzida em aproximadamente 40% relativo à reação com substrato a 50 mM, independente do tipo de solo testado. Em razão desse fato, são propostas equações para a comparação de resultados de análise entre os métodos original e modificado. Concluímos que o método modificado utilizando PNG a 50 mM ou 10 mM produz resultados relativos semelhantes ao método de Tabatabai (1994), mas com custo de análise significativamente menor.

Development of low cost methodology for analysis of β -glucosidase in soils

Abstract

*This study aims to propose modifications to the analysis of β -glucosidase in soils, originally described by Tabatabai (1994), to optimize procedures and to reduce costs, especially related to the substrate *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (PNG). A sequence of experiments were made to compare the original method with the modified, which included the following changes: use of 50% of soil and reagents, replacement of Erlenmeyers by test tubes for the reaction, incubation in water bath instead of regular incubators, and the use of centrifugation instead of filtering to separate the soil from the reaction medium before the colorimetric analysis. In addition, it was tested the possibility to reduce the concentration of PNG in the reaction medium from 50 mM to 10 mM. The original method was compared to the modified by analyzing 30 soil samples containing different soil organic matter content and textures. The modified method using 50 mM PNG showed high correlation with the original one using the same PNG concentration ($r = 0,86$). Results from tests made with 10 mM PNG also had a high correlation with results obtained at 50 mM PNG ($r = 0,94$). However, the production of *p*-nitrophenol with 10 mM PNG was reduced in 40% approximately, independent of the soil sample. Therefore, equations are proposed to direct comparison of results*

produced by the original and modified methods. We conclude that the modified method using either 50 mM or 10 mM develop results comparable to the Tabatabai (1994) method, but with significantly lower cost of analysis.

Keywords: Soil Enzymes; soil quality; soil bioindicators; laboratory methods.

Introdução

Devido à ampla variedade de ligações glicosídicas de ocorrência natural, existe uma vasta diversidade de enzimas denominadas glicosidases cuja função é a clivagem destas ligações. Esta diversidade é, presumivelmente, consequência da natureza diversa dos tipos de substratos existentes e também das diferentes soluções evolucionárias para o problema da construção de sítios ativos capazes de hidrolisar ligações glicosídicas (WITHERS, 2001). A principal reação catalisada pelas glicosidases é a hidrólise de ligações β -glicosídicas em glicosídeos de baixa massa molecular. Desta forma, o nome β -glicosidase é dado a diferentes tipos de enzimas capazes de hidrolisar ligações β -glicosídicas em dissacarídeos, oligossacarídeos e glicosídeos conjugados liberando açúcar (glicose) que servirá como fonte de energia para os organismos (COULON et al., 1998; SANZ-APARICIO et al., 1998; BHATIA et al., 2002).

As β -glicosidases podem ser produzidas por diversos organismos, como bactérias (KATAYEVA et al., 1992; PAAVILAINEN et al., 1993; SESTELO et al., 2004), fungos (RICCIO et al., 1999; JAGER et al., 2001; YUN et al., 2001; BELANCIC et al., 2003), plantas (SUE et al., 2000; CAMERON et al., 2001; GERALDI et al., 2001) e animais (MARANA et al., 1995; HAYS et al., 1998; PONTOH e LOW, 2002). No solo, quando liberadas no meio pelos organismos, elas podem ser imediatamente metabolizadas por microrganismos ou se associar física ou quimicamente aos colóides do solo, tornando-se mais estáveis e inacessíveis à decomposição (MELO, 1988). Estima-se que cerca de um terço do nitrogênio do solo pode estar na forma de complexos proteicos (incluindo enzimas com sítios ativos) com colóides formados por argilas e outros compostos orgânicos (MELO, 1988). As enzimas, assim complexadas, podem ser liberadas para a solução do solo com perda pequena de atividade.

As β -glicosidases têm participação essencial na ciclagem de carbono (C) no solo, especialmente na decomposição de componentes celulósicos de plantas. Como elas são sintetizadas principalmente pelos organismos

do solo, as condições que favorecem a atividade microbiana, como um ambiente físico e químico equilibrado e aportes regulares de material orgânico, também favorecem a atividade enzimática. Logo, a atividade de β -glicosidasas possui correlação significativa com a matéria orgânica do solo (EIVAZI e TABATABAI, 1988; CHAER et al., 2009), embora a atividade desse grupo de enzimas seja muito mais rapidamente e intensamente alterada em função de mudanças no uso ou manejo do solo (TÓTOLA e CHAER, 2002; MENDES et al., 2012). Dessa forma, a mensuração da atividade dessa enzima no solo tem sido crescentemente recomendada como um bom indicador de qualidade dos solos, especialmente pela alta sensibilidade de tais enzimas às alterações causadas pelo seu uso, manejo ou outras influências antrópicas (MATSUOKA et al., 2003; GIL-SOTRES et al., 2005; CHAER e TÓTOLA, 2007).

O método tradicionalmente utilizado na análise da β -glicosidase foi desenvolvido por Eivazi e Tabatabai (1988), o qual foi posteriormente sintetizado em Tabatabai (1994). Este consiste na extração e determinação colorimétrica do *p*-nitrofenil liberado quando a amostra de solo é incubada com solução tamponada contendo *p*-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (PNG) sob a temperatura de 37°C por 1 hora. Este método, embora padrão e 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 uso dela em rotinas laboratoriais. Esse custo elevado deve-se principalmente ao preço do PNG, um reagente importado e com custo estimado em U\$600,00 para a análise de 100 amostras.

Este trabalho objetivou propor mudanças na metodologia de Eivazi e Tabatabai (1994) como a redução de escala do meio de reação e da concentração do substrato PNG para a redução do custo da análise. Nossa hipótese é que o uso de uma concentração de substrato menor no meio reacional não causa limitação para a atividade da β -glicosidase em diferentes solos.

Material e Métodos

Solos

Para a realização dos ensaios foram utilizadas 30 amostras de variados tipos de solo coletadas de áreas sob diferentes usos na microbacia do rio Batatal em Cachoeiras de Macacu, RJ (Tab. 1). Cada amostra 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.

Análise da β -glicosidase pelo método original

A atividade de β -glicosidase foi determinada segundo a metodologia proposta por Tabatabai (1994). Resumidamente, em Erlenmeyers de 50 ml foram adicionados 1 g de solo, 4 ml de tampão universal modificado - MUB pH 6,0 (Tabatabai, 1994) e 1 ml de solução de PNG 50 mM preparada no tampão. Os frascos foram fechados, agitados manualmente e incubados em estufa do tipo BOD 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 tampão tris(hidroximetil)aminometano - THAM 0,1 M pH 12 (TABATABAI, 1994) seguido de agitação. O meio reacional foi então filtrado em papel de filtro qualitativo, e a quantidade de *p*-nitrofenol (*p*NP) presente no filtrado determinada colorimetricamente em espectrofotômetro ajustado para 410 nm e com o uso de uma curva padrão preparada com quantidades conhecidas de *p*NP.

Análise da β -glicosidase pelo método modificado

A atividade de β -glicosidase foi avaliada utilizando-se as seguintes modificações relativas ao método de Eivazi e Tabatabai (1988): em tubos de ensaio de 10 ml foram adicionados 0,5 g de solo, 2 ml de tampão MUB (pH 6,0) e 0,5 ml de solução de PNG 50 mM preparada no tampão. Os tubos foram agitados em Vortex e posteriormente incubados em banho-maria por 1 hora a 37°C. Após este período, foram adicionados 0,5 ml de CaCl_2 e 2,0 ml de THAM 0,1 M pH 12. Os tubos foram agitados e posteriormente centrifugados por 5 min a 3000 rpm. O sobrenadante foi utilizado para a quantificação do *p*NP formado conforme descrito anteriormente para o método original.

A atividade da β -glicosidase também foi avaliada utilizando-se o método modificado com soluções de PNG nas concentrações de 100 mM e 10 mM.

Todas as análises, independente do método, foram feitas em duplicata para cada um dos 30 tipos de solo (Tab. 1). Controles para cada

Tabela 1. Classificação do solo, posição no relevo e uso do solo dos locais de amostragem e conteúdos de C orgânico e argila das amostras de solo. Amostras foram coletadas na profundidade de 0 a 10 cm.

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	Gleissolo	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

amostra foram preparados pela adição de tampão MUB ao invés da solução com PNG para descontar a cor não derivada da atividade da enzima. Controles contendo a mistura de reação na ausência de solo também foram preparados e analisados em duplicata para cada método testado.

Os resultados de atividade de β -glicosidase obtidos pelos diferentes métodos foram analisados graficamente e pelo cálculo de coeficientes de correlação de Pearson.

Resultados e Discussão

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

Houve correlação entre a atividade de β -glicosidase obtida pelo método de Tabatabai (1994) (doravante denominado 'método original') e o método modificado, ambos usando o substrato PNG a 50 mM ($r = 0,86$; $p < 0,0001$) (Fig. 1). No entanto, o método modificado apresentou uma atividade média 29% maior do que aquela obtida pelo método original. Essa diferença pode estar relacionada à diferença no ambiente de incubação das amostras utilizado em cada método, uma vez que a relação solo:reagentes no meio reacional não foi alterada. No método original foi usada estufa bacteriológica (BOD) para incubar as amostras a 37°C, já que o uso de Erlenmeyers demandam grande quantidade de espaço. A incubação das amostras em estufas é generalizada em laboratórios que realizam análises de β -glicosidase, apesar da metodologia original não especificar esse meio de incubação. Diferentemente, no método modificado proposto foi usado banho-maria como meio de incubação, uma vez que o uso de tubos de ensaio demanda espaço significativamente menor. Como o método original não especifica a necessidade de um período de pré-incubação das amostras, anteriormente à adição do substrato, o meio de reação somente permanece a 37°C durante uma fração do tempo de 1 h de incubação. 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 BOD a 37°C e aproximadamente 15 min quando incubadas em banho-maria, devido à maior eficiência de transferência de calor da água em relação ao ar seco da estufa. Logo, como no método modificado a incubação ocorre por um período mais longo em temperatura próxima à ótima da enzima, é razoável que a atividade líquida final medida seja maior que aquela obtida no ensaio usando o método original.

Comparação da atividade enzimática com PNG a 10, 50 e 100 mM no método modificado

Houve boa correlação ($r = 0,94$) entre as atividades de β -glicosidase medidas com PNG a 50 mM e 10 mM (Fig. 2). Entretanto, a média da atividade da enzima quando usado PNG a 10 mM foi reduzida em aproximadamente 40% em relação à atividade a 50 mM quando usado o método modificado e, em 27%, em relação ao método original. Ao contrário, quando se testou a concentração de PNG a 100 mM a atividade média de β -glicosidase aumentou em aproximadamente 30% em relação à atividade encontrada na concentração de 50 mM (Fig. 3).

Métodos desenvolvidos para a análise da atividade potencial de enzimas hidrolíticas pressupõe a definição de condições ótimas de pH, temperatura e concentração do substrato. Em relação ao último, os ensaios enzimáticos supostamente são realizados sob concentrações saturantes de substrato para assegurar que a velocidade máxima de conversão do substrato da enzima (V_{max}) estará sendo medida (cinética de ordem zero) (GERMAN et al., 2011). A dificuldade nesse aspecto reside no fato de que diferentes solos podem apresentar diferentes V_{max} para dado grupo de enzimas hidrolíticas. No caso das β -glicosidases, isso ocorre porque o pool de enzimas em cada solo pode apresentar diferentes tipos enzimáticos de diferentes origens e o nível de interação das enzimas com substâncias coloidais pode afetar a sua afinidade pelo substrato.

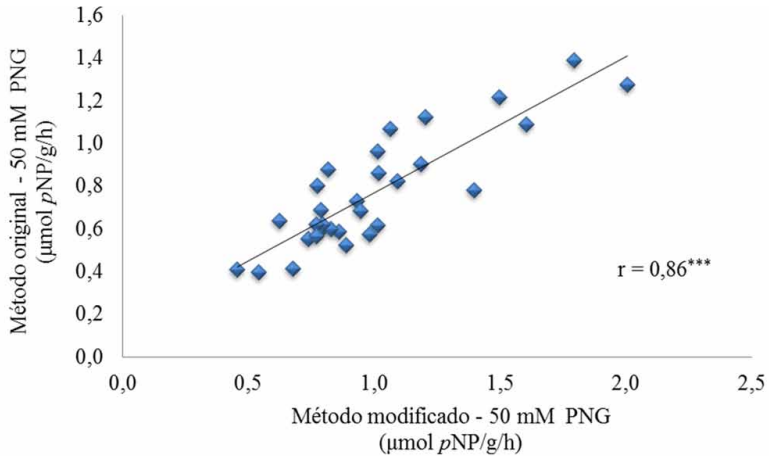


Fig. 1. Relação entre a atividade da β -glicosidase obtida pelo método original de Eivazi & Tabatabai e o método modificado. Em ambos os métodos foi adicionado o substrato PNG na concentração de 50 mM. O coeficiente de correlação de Pearson (r) e a relação entre a média dos resultados obtidos entre os dois métodos são apresentados no gráfico. *** $p < 0,0001$.

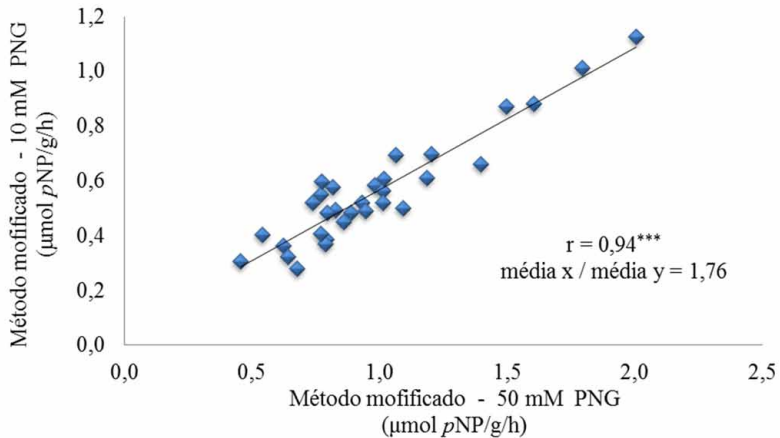


Fig. 2. Relação entre a atividade da β -glicosidase obtida pelo modificado com PNG 50 mM e 10 mM. O coeficiente de correlação de Pearson (r) e a relação entre a média dos resultados obtidos entre os dois métodos são apresentados no gráfico. *** $p < 0,0001$.

No trabalho desenvolvido por Eivazi e Tabatabai (1988), onde foram definidas as condições ótimas para a análise de β -glicosidases em solos, não é relatado como se chegou à concentração de 50 mM de PNG, a qual somente foi posteriormente recomendada em Tabatabai (1994). No entanto, pode-se supor que essa concentração derivou do maior K_m (constante de Michaelis-Menten, que representa $\frac{1}{2}$ da concentração necessária para atingir o V_{max} da enzima) obtido dentre os cinco solos testados naquele trabalho (EIVAZI e TABATABAI, 1988), o qual foi equivalente a 2,4 mM de PNG no meio reacional. Baseado nesse valor, a concentração de substrato necessária para atingir o V_{max} daquele solo seria de 4,8 mM no meio reacional, equivalente a aproximadamente 25 mM na solução de substrato (considerando a diluição de 5x após adição do substrato e do tampão). É possível, portanto, que a recomendação do uso de uma concentração maior, no caso 50 mM, tenha sido uma forma de os autores assegurarem a análise da enzima em condição saturante de substrato em tipos de solo diferentes daqueles por eles estudados.

No entanto, nossos resultados indicaram que a concentração de substrato proposta em Tabatabai (1994), equivalente a 50 mM, encontra-se distante daquela que aproxima a atividade da enzima do seu V_{max} para as amostras de solo usadas nesse estudo (Fig. 3). As 30 amostras utilizadas compreenderam três ordens de solo com conteúdo de C-org variando de aproximadamente 7 a 20 mg kg⁻¹ e de argila variando de 10 a 34%. Pode-se inferir, portanto, que a concentração de PNG proposta por Tabatabai (1994) é insuficiente para atingir o V_{max} de β -glicosidases em diferentes solos brasileiros. Entretanto, deve-se destacar que mesmo nos solos com atividade mais elevada não houve limitação de substrato durante o período de 1 h de incubação a 37°C. Este fato, corroborado pela alta correlação entre os resultados obtidos pelos diferentes métodos, reforça a viabilidade do uso da concentração de PNG a 10 mM, uma condição sabidamente não-saturante de substrato (similar a 50 mM), mas não limitante à expressão dos diferentes níveis de atividade entre as amostras de solo.

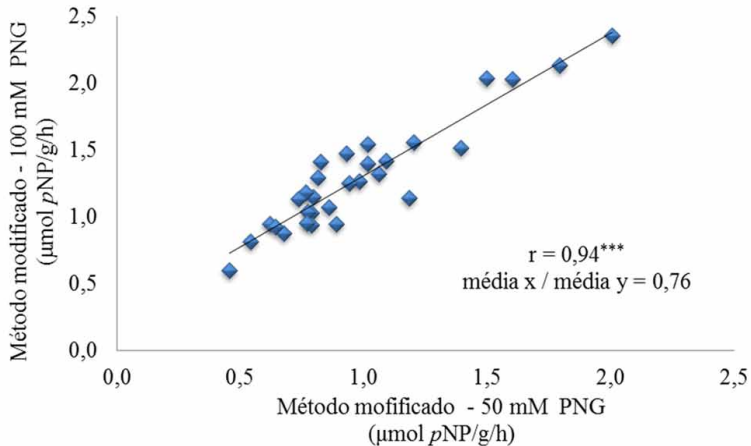


Fig. 3. Relação entre a atividade da β -glicosidase obtida pelo modificado com PNG 50 mM e 100 mM. O coeficiente de correlação de Pearson (r) e a relação entre a média dos resultados obtidos entre os dois métodos são apresentados no gráfico. *** $p < 0,0001$.

É possível a comparação de valores oriundos do método modificado com aqueles de estudos que utilizaram o método original, seja usando a concentração original de PNG de 50 mM ou a reduzida de 10 mM, por meio das seguintes equações:

- Para atividade de β -glicosidase medida com PNG a 50 mM:
 $\text{Atividade método original PNG 50 mM} = 0.6606 \times \text{atividade método modificado} + 0.0608$
- Para atividade de β -glicosidase medida com PNG a 10 mM:
 $\text{Atividade método original PNG 50 mM} = 1.1763 \times \text{atividade método modificado} + 0.0949$

Aplicação e vantagens do método modificado

Considerando o valor médio de mercado atual do PNG, o custo estimado para a análise de 100 amostras de solo é de U\$ 600,00. Usando-se o método modificado proposto nas concentrações de 50 e 10 mM para a análise das mesmas 100 amostras, esse custo pode ser reduzido para U\$ 300,00 e U\$ 60,00, respectivamente.

Tabela 2. Comparação entre os métodos original (Eivazi & Tabatabai, 1988) 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	U\$ 600,00	U\$ 60,00 a U\$ 300,00	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

Além da redução do gasto com substrato, a modificação proposta no método de análise da β-glicosidase apresenta ainda outras vantagens em relação ao método de Eivazi e Tabatabai (1988). Dentre estas, podem ser citados a redução de espaço e gasto de vidraria necessário para a realização dos ensaios, o menor tempo de análise em função da substituição da etapa de filtragem pela de centrifugação, a eliminação do uso de papel filtro e a redução em 50% na geração de resíduos químicos contendo substâncias fenólicas (Tab. 2).

Conclusões

A análise da β-glicosidase utilizando o método modificado apresentou alta correlação com o método original proposto por Tabatabai (1994) em uma ampla variação de tipos de solo. Apesar da atividade enzimática líquida diferir entre os métodos quando utilizado o substrato PNG nas concentrações de 50 mM ou 10 mM, equações lineares podem ser usadas para obter a equivalência dos valores obtidos em relação ao método original.

O uso do método modificado apresentado constitui uma alternativa viável para a análise de β -glicosidase em solos e pode ser adotado por laboratórios de rotina a um custo significativamente menor. Somente considerando o gasto com o substrato PNG, reagente de maior peso na composição de custos dos materiais utilizados na análise, o uso de PNG a 10 mM permite uma redução de 10 vezes no seu uso relativo ao método original.

Agradecimentos

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

Referências Bibliográficas

BELANCIC, A.; GUNATA, Z.; VALLIER, M. J.; AGOSIN, E. β -glucosidase from the native yeast *Debaryomyces vanrijae*: purification, characterization, and its effect on monoterpene content of a muscat grape juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 1453-1459, 2003.

CAMERON, R. G.; MANTHEY, J. A.; BAKER, R. A.; GROHMANN, K. Purification and characterization of a beta-glucosidase from *Citrus sinensis* var. valencia fruit tissue. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 4457-4462, 2001.

COULON, S.; CHEMARDIN, P.; GUEGUEN, Y.; ARNAUD, A.; GALZY, P. Purification and characterization of an intracellular β -glucosidase from *Lactobacillus casei* ATCC 393. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 74, p. 105-114, 1998.

CHAER, G. M.; MYROLD, D. D.; BOTTOMLEY, P. J. A soil quality index based on the equilibrium between soil organic matter and biochemical properties of undisturbed coniferous forest soils of the Pacific Northwest. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 41, p. 822-830, 2009.

CHAER, G. M.; TÓTOLA, M. R. Impacto do manejo de resíduos orgânicos durante a reforma de plantios de eucalipto sobre indicadores de qualidade do solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 3, p.1381-1396, 2007.

DENG, S. P.; TABATABAI, M. A. Effect of tillage and residue management on enzyme activities in soils: III. Phosphatases and arylsulfatase. **Biology and Fertility of Soils**, v. 24, p. 141-146, 1997.

EIVAZI, F.; TABATABAI, M. A. Glucosidases and galactosidases in soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 20, p. 601-606, 1988.

GIL-SOTRES, F.; TRASAR-CEPEDA, C.; LEIROS, M. C.; SEOANE, S. Different approaches to evaluating soil quality using biochemical properties. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 37, p. 877-887, 2005.

HAYS, W. S.; VANDERJAGT, D. J.; BOSE, B.; SERIANNI, A. S.; GLEW, R. H. Catalytic mechanism and specificity for hydrolysis and transglycosylation reactions of cytosolic β -glucosidase from guinea pig liver. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 34941-34948, 1998.

JÄGER, S.; BRUMBAUER, A.; FEHÉR, E.; RÉCZEY, K.; KISS, L. Production and characterization of β -glucosidases from different *Aspergillus* strains. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 17, p. 455-461, 2001.

KATAYEVA, I. A.; GOLOVCHENKO, N. P.; CHUVILSKAYA, N. A.; AKIMENKO V. K. *Clostridium thermocellum* β -glucosidases A and B: purification, properties, localization, and regulation of biosynthesis. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 14, p. 407-412, 1992.

MARANA, S. R.; TERRA, W. R.; FERREIRA, C. Midgut β -D-glucosidases from *Abracris flavolineata* (Orthoptera: Acrididae). Physical properties, substrate specificities and function. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 25, p. 835-843, 1995.

MATSUOKA, M.; MENDES, I. C.; LOUREIRO, M. F. Biomassa microbiana e atividade enzimática em solos sob vegetação nativa e sistemas agrícolas anuais e perenes na região de Primavera do Leste (MT). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 27, p. 425-433, 2003.

MELO, W. J. Enzimas no solo. In: MONIZ, A. C. (Ed.). **A responsabilidade social da ciência do solo**. Campinas: SBCS, 1988. p.365-378.

PAAVILAINEN, S.; HELLMAN, J.; KORPELA, T. Purification, characterization, gene cloning, and sequencing of a new β -glucosidase from *Bacillus circulans* subsp. *Alkalophilus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 927-932, 1993.

RICCIO, P.; ROSSANO, R.; VINELLA, M.; DOMIZIO, P.; ZITO, F.; SANSEVRINO F.; D'ELIA, A.; ROSI, I. Extraction and immobilization in one step of two β -glucosidases released from a yeast strain of *Debaryomyces hansenii*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 24, p. 123-129, 1999.

SESTELO, A. B. F.; POZA, M.; VILLA, T. G. β -glucosidase activity in a *Lactobacillus plantarum* wine strain. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 20, p. 633-637, 2004.

SUE, M.; ISHIHARA, A.; IWAMURA, H. Purification and characterization of a β -glucosidase from rye (*Secale cereal* L.) seedlings. **Plant Science**, v. 155, p. 67-74, 2000.

WITHERS, S. G. Mechanisms of glycosyl transferases and hydrolases. **Carbohydrate Polymers**, v. 44, p. 325-337, 2001.

TABATABAI, M. A. Soil Enzymes. In: **METHODS of soil analysis**: part 2: microbiological and biochemical properties. Madison: SSSA, 1994. p. 775-833. (SSSA Book Series: 5).

TÓTOLA, M. R.; CHAER, G. M. Microrganismos e processos microbiológicos como indicadores da qualidade dos solos. In: **TÓPICOS em ciência do solo**. Viçosa, MG, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2002. p.196-276.

YUN, S. I.; JEONG, C. S.; CHUNG, D. K.; CHOI, H. S. Purification and some properties of a β -glucosidase from *Trichoderma harzianum* type C-4. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 65, p. 2028-2032, 2001.



Agrobiologia

Ministério da
**Agricultura, Pecuária
e Abastecimento**

