

ACTIVIDAD DE LA FOSFOMONOESTERASA EN SUELOS VENEZOLANOS

Jorge E. Paolini y Marisol Sánchez

IVIC, Centro de Ecología, Apdo. 21827, Caracas 1020-A

RESUMEN

La actividad de la fosfomonoesterasa se estudio en doce suelos de diferentes regiones del país. Tres aspectos metodológicos fueron estudiados: dependencia con el tiempo de incubación, cantidad de muestra y pH del buffer.

En los suelos estudiados predomino la fosfomonoesterasa ácida sobre la alcalina con valores comprendidos en el intervalo entre 16 y 158 $\mu\text{g p-NF g}^{-1}\text{h}^{-1}$ para la ácida y entre 18 y 104 $\mu\text{g p-NF g}^{-1}\text{h}^{-1}$ para alcalina.

Palabras claves: enzima, suelo, tropical, fosfomonoesterasa ácida y alcalina,

INTRODUCCION

El fósforo es un nutriente fundamental para el desarrollo de las plantas y en los suelos tropicales es un factor limitante de la productividad vegetal. Los suelos generalmente contienen cantidades significativas de fósforo en el orden de 200 a 3000 mg P kg^{-1} pero apenas una pequeña proporción de este ($< 1\%$) está disponible a las plantas de forma inmediata. Las formas orgánicas constituyen entre 20 y 80 % del fósforo total e incluyen ésteres de inositol, nucleótidos y fosfolípidos (Dalal, 1977). Las enzimas encargadas de la hidrólisis de los compuestos de fósforo orgánico reciben el nombre general de fosfatasas y son responsables de la hidrólisis de los enlaces en los ésteres fosfóricos (C-O-P), anhídridos fosfóricos (P-O-P) y fosfonatos (C-P). Las más estudiadas son las fosfomonoesterasas que se clasifican en ácidas y alcalinas de acuerdo al pH óptimo para su actividad catalítica, las ácidas son producidas por microorganismos y las raíces de las plantas, mientras que las alcalinas son producidas principalmente por microorganismos (Eivazi y Tabatabai, 1977; Speir y Ross, 1978).

En Venezuela en muchos de los estudios bioquímicos se ha incluido la determinación de la actividad de las fosfomonoesterasas así podemos citar los siguientes: Armado et al. (2009), Contreras et al. (2001 y 2005), Chacón et al. (2005, 2009), López-Hernández et al. (1989), López et al. (1999), Paolini y España (1998), Paolini (2003), Ruiz (2002), Salazar et al. (2007), Sánchez-Arias et al. (2011).

El objetivo de este trabajo es la determinación de parámetros metodológicos del ensayo de la actividad de la fosfomonoesterasa en diferentes suelos venezolanos como: valores óptimos de pH, cantidad de muestra y tiempo de incubación.

MATERIALES Y METODOS

Muestras compuestas de suelos de varias regiones del país se colectaron a nivel superficial (0-15 cm). En el laboratorio se tamizaron a 2 mm previa eliminación manual de los restos vegetales (raíces) y piedras. Parte de la muestra fue secada al aire para los análisis fisicoquímicos de rutina de acuerdo a protocolos estándares y el resto se preservó bajo refrigeración a 4 °C para el análisis enzimático según la técnica descrita por Tabatabai y Bremner (1969). El método se basa en la determinación del p-nitrofenol (p-NF) liberado cuando se incuba la muestra del suelo a 37 °C con el sustrato artificial p-nitrofenolfosfato, en una solución buffer (BUM: buffer universal modificado). Como aspectos metodológicos se estudiaron el efecto de la variación del tiempo de incubación (1 a 4 h), peso del suelo (1-4 g) y pH del buffer ajustado a pHs entre 2 y 12.

RESULTADOS Y DISCUSION

Tabla 1. Características fisicoquímicas y actividad de la fosmonoesterasa ácida (pH 6) y alcalina (pH 9) de los suelos estudiados.

Suelo	Vegetac.	pH	COT	Nt	Pt	Porg	Pinorg	Fosfomonoesterasa ($\mu\text{g p-NF g}^{-1}\text{h}^{-1}$)	
			g kg ⁻¹		mg P kg ⁻¹			Acida	Alcalina
MO	morichal	5,1	35,0	0,60	225	114	1,0	53	41
CR	caraota	6,2	12,3	1,89	272	196	1,4	16	18
CC	cacao	7,3	10,2	1,22	235	155	8,3	44	47
FJ	xerófita	7,7	19,4	2,33	187	110	2,2	63	52
S	sabana	3,7	4,4	0,56	142	72	0,9	43	26
F	fresa	6,1	8,0	1,75	306	192	8,0	158	104
CF	café	5,7	29,5	1,61	227	161	7,6	65	76
G I	piña	6,9	3,7	0,49	175	92	1,5	66	27
G II	maní	6,0	3,7	0,35	145	62	1,6	69	28
G III	maní	5,9	3,8	0,28	145	82	1,5	62	31
CS	xerófita	6,7	4,5	0,28	60	40	1,2	25	30
CN	xerófita	6,9	2,6	0,21	70	40	1,2	24	34

Los valores de pH (H₂O) varían de 3,7 en un suelo típico de sabana hasta 7,7 en uno bajo vegetación xerófita con lo cual predominan suelos de ácidos y neutrales. El suelo con mayor contenido de carbono orgánico total corresponde al desarrollado bajo vegetación de morichal (MO) y los más bajos contenidos fueron determinados en los suelos bajo vegetación xerófita (CN y CS) y en sabanas cultivadas con maní y piña (G I, G II y GIII) y sin cultivar (S). Con respecto al nitrógeno total y fósforo total, los suelos agrícolas por efecto de la fertilización mostraron los niveles más altos. El fósforo orgánico constituye una

fracción importante del total entre 43 y 72% a diferencia del inorgánico que apenas varió entre 0,4 y 3,5 %.

Las curvas de actividad enzimática en función del pH se muestran en la Figura 1, de la cual podemos determinar para cada suelo un pH óptimo; el cual está determinado por la desnaturalización de la enzima a pH altos o bajos, y alteraciones en el estado de carga de la enzima y/o el sustrato. Para cualquier enzima los cambios de carga pueden afectar la actividad, ya sea cambiando la estructura o la carga del residuo que funciona para ligar el sustrato o en la catálisis (Murray et al., 1994).

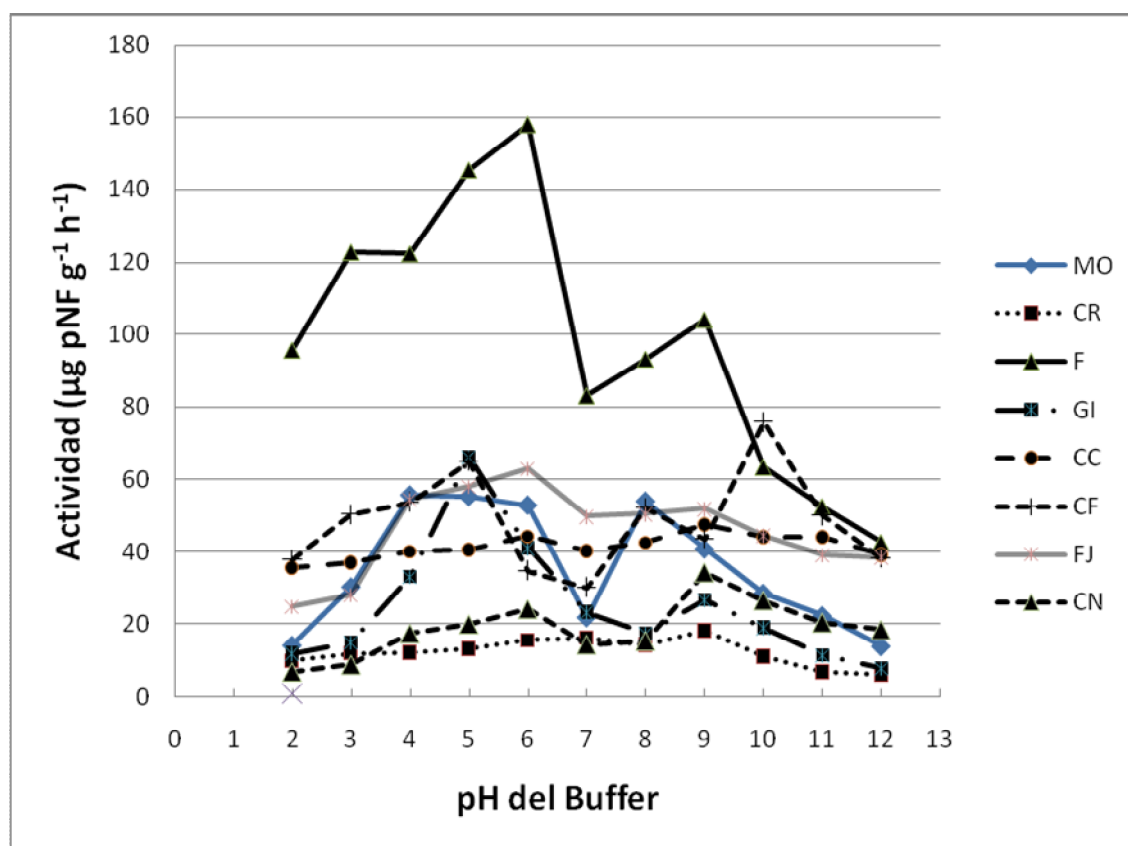


Figura 1. Efecto del pH del buffer sobre la liberación del p-NF en el ensayo de la actividad de la fosfomonoesterasa en varios suelos.

En dicha figura se manifiesta la existencia de ambos tipos de fosfomonoesterasas en cada uno de los suelos estudiados, una en el intervalo de pH ácido entre 5-6 (rango 13 y 157 $\mu\text{g p-NF g}^{-1}\text{h}^{-1}$) y otra en el intervalo de pH alcalino 9-10 (rango 18-104 $\mu\text{g p-NF g}^{-1}\text{h}^{-1}$) consistente con la revisión de Speir y Ross (1978); en la mayoría de los casos predomina la fosfomonoesterasa ácida concordando con los pHs ácidos de los suelos. Los pHs óptimos para cada suelo no coinciden con los sugeridos en el protocolo original de 6,5 y 11

derivados en suelos agrícolas de zonas templadas (Eivazi y Tabatabai, 1977). Sin embargo los valores de este estudio están en el mismo orden de magnitud que los reportados en la literatura para suelos tropicales de carácter ácido.

En la Figura 2 se muestra el efecto del tiempo de incubación sobre la actividad de la fosfomonoesterasa ácida. La tendencia observada se ajusta en la mayoría de los casos a la de la ecuación de una recta con intercepto en cero; para algunos suelos hay desviaciones de la linealidad a partir de los 2 horas. Esta simple relación confirma que la reacción se debe a las enzimas acumuladas en el suelo y no por enzimas sintetizadas durante la incubación. Hay que tener en cuenta que a las muestras se les añadió tolueno como inhibidor de la actividad microbiana con lo cual aun cuando no se use este agente bacteriostático se recomienda tiempos inferiores a 2 horas. Esto confirma el estudio inicial de Tabatabai & Bremner (1969) y como señalan Skujins (1967) y Trasar et al. (2003) se debe evitar un largo periodo de incubación en los ensayos enzimáticos para evitar los riesgos de crecimiento bacteriano a medida que se incrementa el tiempo de incubación, que el sustrato se haga limitante o que haya una asimilación de los productos.

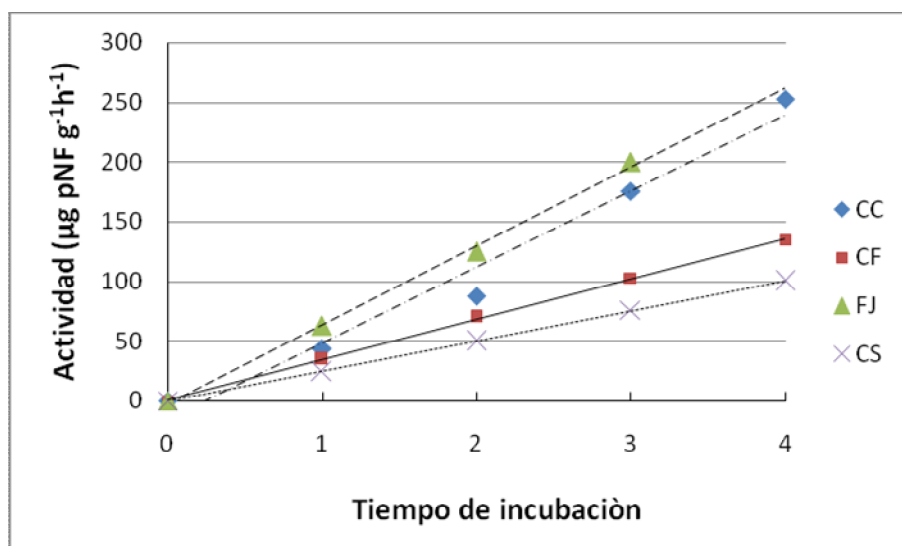


Figura 2. Efecto del tiempo de incubación sobre la liberación del p-NF en el ensayo de la actividad de la fosfomonoesterasa de varios suelos a pH 6.

La relación entre el peso y la actividad enzimática es del tipo lineal (Figura 3) y evidencia de que la concentración de sustrato utilizada en el método no fue limitante cumpliendo con el requisito de una cinética de orden cero (saturación de la enzima por sustrato).

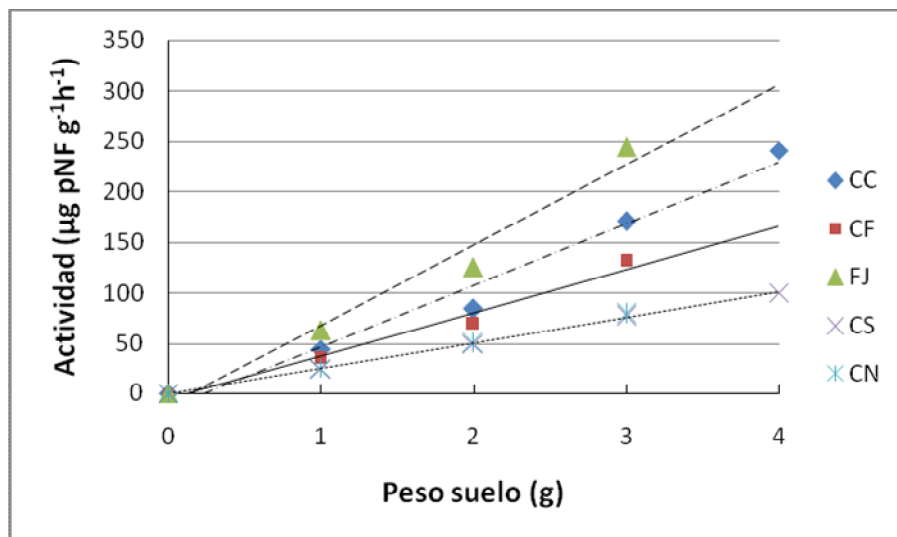


Figura 3. Efecto de la cantidad de suelo sobre la liberación del p-NF en el ensayo de la actividad fosfomonoesterasa de varios suelos a pH 6.

CONCLUSIONES

El pH óptimo de la fosfomonoesterasa vario entre los suelos estudiados y predominaron en este caso las ácidas (rango pH 5-6). Para el análisis de la actividad enzimática recomendamos cantidades inferiores a los 2 gramos y un tiempo de incubación menor a las 2 horas.

BIBLIOGRAFIA

- ARMADO, A., CONTRERAS, F., GARCIA, P. & J. PAOLINI (2009) Correlación de actividades enzimáticas con la respiración basal en suelos cacaoteros del occidente venezolano. *Avances en Química* 4: 73-77.
- CHACON, N.; DEZZEO, N. & FLORES, S. (2005) Effect of particle size distribution, soil organic matter content and organo-mineral aluminium complexes on acid phosphatases of seasonlly flooded forest soils. *Biology and Fertility of Soils* 41: 69-72.
- CHACON, N., HERRERA, I.; FLORES, S.; GONZALEZ, J.A. & NASSAR, J.M. (2009) Chemical, physical, and soil biochemical properties and plant roots as affected by native and exotic plants in Neotropical arid zones. *Biology and Fertility of Soils* 45: 321-328.
- CONTRERAS, F., RIVERO, C. & PAOLINI, J. (2001) Efecto de dos tipos de labranza con y sin incorporación de residuos de cultivo sobre la actividad enzimática en un Alfisol de Venezuela. *Venesuelos* 9: 32-38.
- CONTRERAS, F., PAOLINI, J. & RIVERO, C. (2005) Efecto de la adición de enmiendas orgánicas sobre la actividad de las enzimas fosfomonoesterasa ácida y arilsulfatasa en suelos del municipio Rivas Dávila (estado Mérida). *Revista de la Facultad de Agronomía (Maracay)* 31: 53-66.
- DALAL, R.C. (1977) Soil organic phosphorus. *Advances in Agronomy* 29: 83-117.

- EIVAZI, F. & TABATABAI, M.A. (1977) Phosphatases in soils. *Soil Biology & Biochemistry* 9: 167-172.
- GOMEZ, Y. & PAOLINI, J. (2004) Efecto de la variabilidad temporal y el manejo del suelo sobre parámetros bioquímicos específicos en suelos de sabanas de los Llanos Orientales de Venezuela. *Suelos Ecuatoriales (Colombia)* 34: 119-125.
- LOPEZ, M.; RAMIREZ, R. & PAOLINI, J. (1999) Actividad de la fosfatasa ácida en la rizosfera de tres cultivares de sorgo fertilizados con superfosfato triple y roca fosfórica. *Agronomía Tropical (Maracay)* 49: 119-134.
- MURRAY, R.K.; GRANNER, D.K.; HAYES, P.A.; RODWELL, V.W. (1994) Bioquímica de Harper. 13ª edición. Editorial El Manual Moderno, México, pp. 93-94.
- PAOLINI, J. (2003) Actividades enzimáticas en suelos de los Altos Llanos Centrales (estado Guárico). *Venezuelos* 11: 39-46.
- PAOLINI, J. & ESPAÑA, M. (1998) Phosphatase activity in savanna soils. Proceeding of the 16th World Congress of Soil Science, Montpellier (France) August 1998. Symposium 13B; Scientific Registration N° 1057.
- PAOLINI, J. & ACEA, M.J. (2006) Actividades enzimáticas en suelos de un sistema agrícola con descansos largos en los páramos venezolanos. Memorias del Coloquio Internacional: Contribución de los Humboldtianos a la investigación y el desarrollo en los países andinos: Hacia una red interdisciplinaria. Castañeda, V.M. (editor). Lima, 8-10 de marzo de 2006. Universidad Alas Peruanas, escuela de Postgrado, Lima, pp. 504-515.
- RUIZ, M. (2002) Características de la materia orgánica y la actividad biológica de suelos de la depresión del Lago de Valencia sometidos a diversas formas de manejo. Tesis Doctoral. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía, postgrado en Ciencia del Suelo, Maracay, pp. 257.
- SANCHEZ-ARIAS, L.; PAOLINI, J. & RODRIGUEZ, J.P. (2010) Dinámica de las propiedades del suelo en bosques de *Rhizophora mangle* L. (Rhizophoraceae) en Isla de margarita, Venezuela. *Revista de Biología Tropical* 58: 547-564.
- SALAZAR, L.; CONTRERAS, F.; BIANCHI, G.R. & BIANCHI, G. (2007) Efecto del tamaño de las partículas de suelo sobre la determinación de la actividad enzimática de la fosfatasa ácida. *Revista de la Facultad de Agronomía (Maracay)* 33: 1-11.
- SKUJINS, J.J. (1967) Enzymes in soil. In: *Soil Biochemistry*; MacLaren, A.D. y Peterson, G.H. (eds.). Marcel Dekker, New York, pp. 371-414.
- SPEIR, T.W. & ROSS, D.J. (1978) Soil phosphatase and sulphatase. In: *Soil Enzymes*; Burns, R.G. (editor). Academic Press, London, pp. 197-250.
- TABATABAI, M.A. & BREMNER, J.M. (1969) Use of p-nitrophenylphosphate for assay of phosphatase activity. *Soil Biology & Biochemistry* 1: 301-307.
- TRASAR, C.; LEIROS, M.C. & GIL-SOTRES, F. (2003) Consideraciones generales sobre la determinación de las actividades enzimáticas del suelo. In: *Técnicas de Análisis de Parámetros Bioquímicos en suelos: Medida de Actividades Enzimáticas y Biomasa microbiana*; García, C.; Gil-Sotres, F., Hernández, T. & Trasar, C. (editores). Editorial Mundi-Prensa, Madrid, pp. 24-50.