

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/288482294>

# Enzimas e seu papel na qualidade do solo

Article · June 2013

CITATIONS

17

READS

10,562

8 authors, including:



**Elcio L. Balota**

Instituto Agronômico do Paraná

25 PUBLICATIONS 978 CITATIONS

SEE PROFILE



**Marco Nogueira**

Brazilian Agricultural Research Corporation (EMBRAPA)

173 PUBLICATIONS 6,200 CITATIONS

SEE PROFILE



**Iêda De Carvalho Mendes**

Brazilian Agricultural Research Corporation (EMBRAPA)

148 PUBLICATIONS 3,873 CITATIONS

SEE PROFILE



**Mariangela Hungria**

Brazilian Agricultural Research Corporation (EMBRAPA)

689 PUBLICATIONS 23,110 CITATIONS

SEE PROFILE

# ENZIMAS E SEU PAPEL NA QUALIDADE DO SOLO

Elcio Libório Balota<sup>(1)</sup>, Marco Antonio Nogueira<sup>(2)</sup>, Iêda Carvalho Mendes<sup>(3)</sup>,  
Mariangela Hungria<sup>(2)</sup>, Dáfila Santos Lima Fagotti<sup>(4)</sup>, Gabriel Mauricio Peruca  
Melo<sup>(5)</sup>, Renata Carolini Souza<sup>(4)</sup> & Wanderley José de Melo<sup>(6)</sup>

Introdução .....	222
Origem e ocorrência das enzimas do solo .....	222
Inibição enzimática .....	223
Inibição enzimática reversível .....	223
Inibição enzimática irreversível .....	225
Fatores que INFLUENCIAM a Avaliação da atividade enzimática em amostras de solo .....	229
Amostragem de solo .....	229
Preparo e armazenamento das amostras .....	230
Substrato .....	231
Inibidores do crescimento microbiano .....	232
Tempo de incubação .....	234
pH .....	235
Temperatura de incubação .....	236
Paralisação da reação .....	237
Avaliação do extrato de incubação .....	237
atividade de algumas enzimas em amostras de solo .....	238
Amilases .....	238
Celulase (b-glucan-4-glucanoidrolase) .....	241
Urease (ureia amida hidrolase) .....	242
Arilsulfatases .....	242
Fosfatases .....	243
Proteases .....	244
Desidrogenases .....	244
Hidrólise do diacetato de fluoresceína (FDA) .....	245
b-Glicosidase .....	246
Enzimas como indicadores de qualidade de solo .....	246
EFEITO DO Uso e manejo do solo sobre a atividade enzimática .....	254
Uso de enzimas em biorremediação .....	261
Enzimas extracelulares .....	261
Enzimas extracelulares de origem microbiana .....	262
Enzimas extracelulares de origem vegetal .....	264
Imobilização de enzimas .....	264
Metagenômica e enzimas do solo .....	267
Literatura Citada .....	271

favor completar a  
nota de rodapé com  
função, instituição,  
endereço e e-mail  
de cada autor.

<sup>(1)</sup> Instituto Agronômico do Paraná, Londrina PR.

<sup>(2)</sup> Embrapa Soja, Londrina PR.

<sup>(3)</sup> Embrapa Cerrados, Planaltina DF.

<sup>(4)</sup> Universidade Estadual de Londrina, Londrina PR.

<sup>(5)</sup> Universidade Camilo Castelo Branco, Descalvado SP.

<sup>(6)</sup> Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal SP

## INTRODUÇÃO

O solo é fundamental para a manutenção da vida no planeta, funcionando como substrato e fornecendo água e nutrientes para as plantas. Nele ocorrem reações químicas e bioquímicas que permitem a ciclagem dos elementos na natureza, garantindo sua reutilização pelos seres vivos. Nesse ambiente complexo, plantas, macro, meso e microrganismos interagem constantemente na competição por alimentos, ocorrendo as mais variadas relações ecológicas entre as espécies em um espaço físico em que há variação pontual na concentração de elementos químicos, gases, água e de substâncias diversas a partir da superfície de partículas que podem atingir dimensões coloidais. No espaço poroso, ocorre variação na relação água/ar, definindo um potencial redox que irá possibilitar tanto o desenvolvimento de organismos aeróbios quanto anaeróbios.

Entre os constituintes do solo, encontram-se moléculas de natureza proteica, especializadas em catalisar reações químicas termodinamicamente possíveis, denominadas enzimas, que exercem papel fundamental nos ciclos biogeoquímicos, transformam o material orgânico, aceleram a ciclagem dos elementos químicos e colaboram com a sustentabilidade dos ecossistemas.

## ORIGEM E OCORRÊNCIA DAS ENZIMAS DO SOLO

A manutenção do estado vital exige que as reações no interior da célula ocorram em velocidade compatível com as exigências momentâneas do indivíduo. Para tal, as reações que integram as diferentes vias metabólicas são moduladas por enzimas, que aceleram ou retardam a velocidade das reações, de modo a atender às necessidades do organismo. Essas enzimas recebem a denominação de biônticas ou endoenzimas, por estarem no interior das células.

Quando ocorre a lise celular, seu conteúdo é liberado para o solo. As enzimas liberadas podem manter sua atividade ao serem complexadas por coloides orgânicos e inorgânicos, que as protegem por algum tempo da ação de proteases. Essas enzimas recebem a denominação de abiônticas, por não estarem no interior da célula viva.

A maior parte das enzimas do solo é produzida por microrganismos; as que se encontram no interior da célula recebem a denominação de endocelulares ou endoenzimas e quando estão ligadas à membrana externa

ou são excretadas para o ambiente, de exoenzimas. No caso das endoenzimas, substratos de baixo peso molecular, como a ureia, são absorvidos e metabolizados no interior da célula. Entretanto, substratos de elevada massa molecular, como proteínas, lipídeos e polissacarídeos, que não conseguem adentrar a célula, são transformados no ambiente externo, em reações catalisadas por exoenzimas, sendo os produtos com menor massa molecular absorvidos e metabolizados no interior da célula. Algumas enzimas, como a arilsulfatase, são encontradas tanto no interior como no exterior da célula, enquanto as fosfatases ácida e alcalina encontram-se apenas no exterior da célula (Margon & Fornasier, 2008).

Em resumo, as enzimas do solo podem estar no interior da célula ou ligadas externamente à membrana celular, na solução do solo, adsorvidas à superfície de minerais de argila ou substâncias húmicas, em partição ou formando polímeros com substâncias húmicas, ou no espaço interlamelar de minerais de argila (Figura 1).

Nem todas as enzimas que chegam ao solo permanecem ativas, sendo degradadas por proteases. Entretanto, em condições favoráveis, enzimas podem permanecer ativas no solo por mais de 5.000 anos. Melo et al. (1998) observaram que a atividade da urease se manteve em amostras de Latossolo armazenadas em temperatura ambiente por até um ano, mas também já se observou atividade em amostras de solo armazenadas por 80 anos (Skujins & McLaren, 1969).

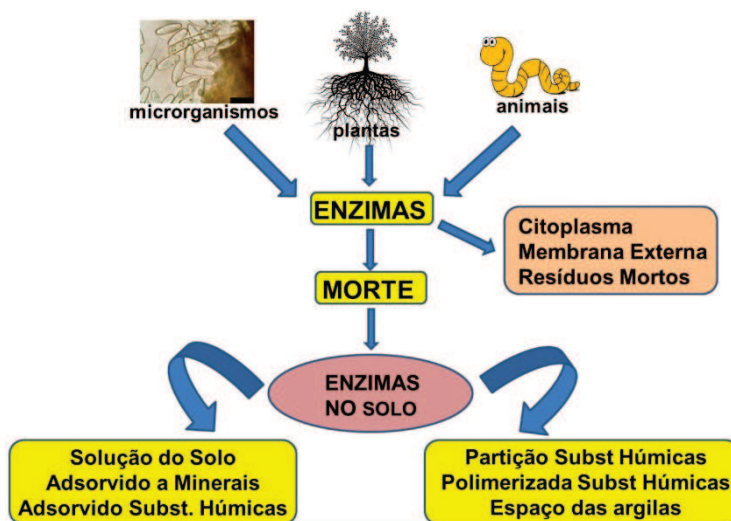


Figura 1. Origem e localização das enzimas no ambiente do solo.

## INIBIÇÃO ENZIMÁTICA

Algumas moléculas, como agrotóxicos e elementos químicos, assim como os elementos-traço, podem inibir a atividade enzimática de forma reversível ou irreversível (Figura 2).

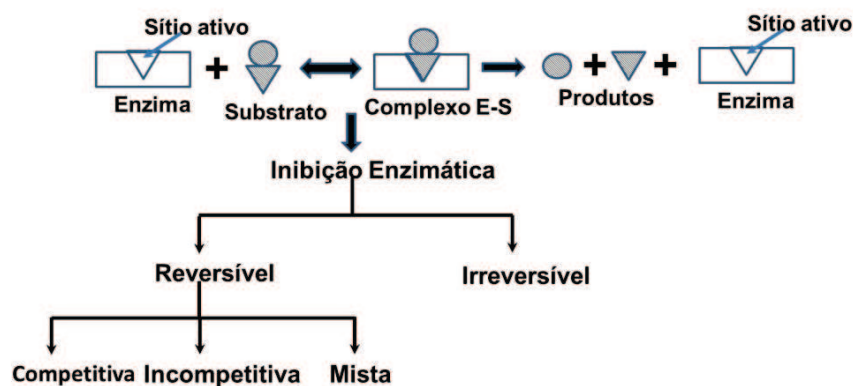


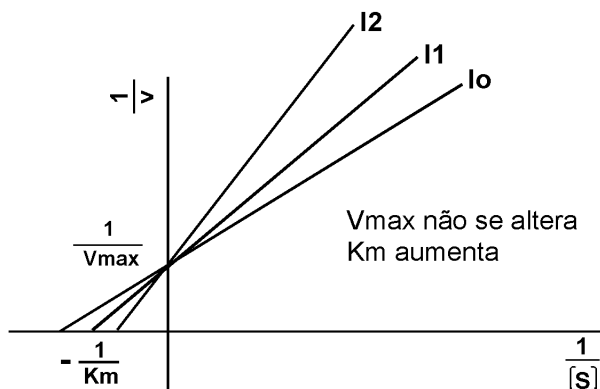
Figura 2. Esquema simplificado de uma reação enzimática e tipos de inibição que podem ocorrer.

### Inibição enzimática reversível

Há três tipos principais de inibição enzimática reversível: competitiva, incompetitiva e mista (Figura 2); nesses três tipos, o inibidor (I) reage reversivelmente com a enzima, formando o complexo enzima-inibidor (E-I).

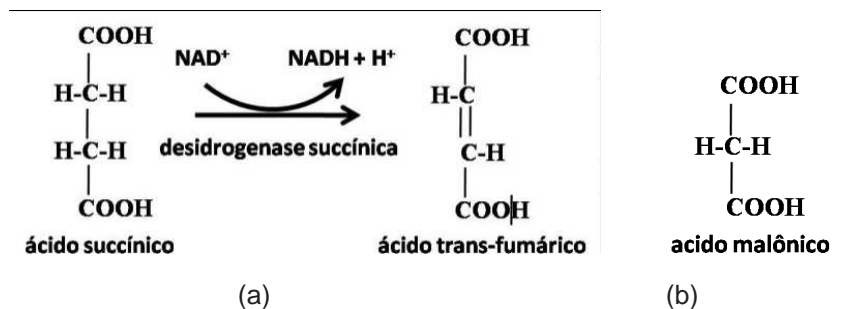
Na inibição enzimática competitiva, o inibidor tem configuração muito semelhante à do substrato, de modo que ambos competem pelo sítio ativo da enzima. O inibidor forma com a enzima um complexo instável, que não gera produto e se dissocia, liberando a enzima em sua forma ativa. Como o complexo E-I é dissociável, ao se aumentar a concentração do substrato, aumenta-se a probabilidade desse alcançar o sítio ativo da enzima, de forma que a velocidade da reação pode ser restaurada.

A presença de um inibidor competitivo aumenta a constante de Michaelis-Menten ( $K_M$ ) da enzima, ou seja, é necessária concentração mais elevada do substrato para se atingir a metade da velocidade máxima da reação. Em uma inibição enzimática competitiva, o  $V_{max}$  não é alterado e a inclinação da reta indica a força da ligação do inibidor com o substrato (Figura 3).



**Figura 3.** Efeito do inibidor competitivo sobre o  $K_M$  e a velocidade máxima da reação.  $I_0$ : ausência de inibidor.  $I_1$  e  $I_2$ : concentrações crescentes de inibidor.

Um exemplo clássico de inibição competitiva é a da desidrogenase succínica pelo malonato e outros ânions dicarboxílicos (Figura 4a). O ácido malônico (Figura 4b), que é um ácido dicarboxílico com estrutura muito semelhante ao ácido succínico, consegue competir com esse para ocupar o sítio ativo da desidrogenase succínica, estabelecendo uma competição reversível, mas o ácido malônico não é desidrogenado.

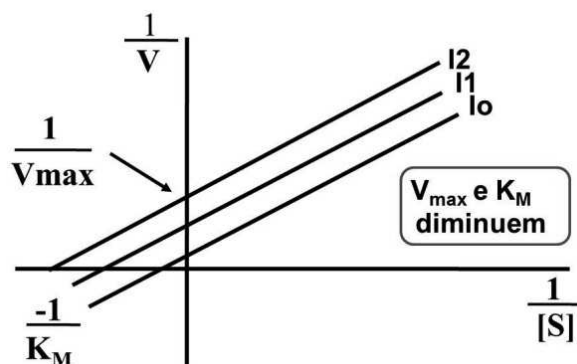


**Figura 4.** Ação da desidrogenase succínica levando à formação de ácido transfumárico pela desidrogenação do ácido succínico (a). Estrutura do ácido malônico (b).

Na inibição enzimática incompetitiva, o inibidor liga-se irreversivelmente a um local da enzima que não é o sítio ativo, alterando sua conformação de tal forma que o substrato não mais consegue se ligar ao sítio ativo para formar o complexo E-S. Dessa forma, a velocidade da reação catalisada é

alterada, pois o substrato liga-se somente às moléculas enzimáticas que não estão ligadas ao inibidor. Nesse tipo de inibição, mesmo aumentando-se a concentração do substrato, a velocidade da reação não é restaurada, uma vez que não há competição pelo sítio ativo da enzima. O inibidor pode ligar-se também ao complexo E-S.

Na inibição incompetitiva, tanto o valor de  $K_M$  como o de  $V_{max}$  são diminuídos (Figura 5). Na presença de concentrações crescentes do inibidor, são obtidas retas paralelas e com valores de  $1/V_{max}$  maiores. Esse tipo de inibição é raro em reações com um único substrato, mas comum em reações com dois substratos.



**Figura 5.** Efeito da inibição enzimática incompetitiva sobre os valores de  $V_{max}$  e  $K_M$ .

Na inibição enzimática mista, as seguintes características são observadas:

- O inibidor liga-se a um local da enzima que não é o sítio ativo.
- O inibidor pode se ligar à enzima ou ao complexo enzima-substrato.
- Tanto o  $K_M$  como o  $V_{max}$  são alterados, pois o  $V_{max}$  diminui e  $K_M$  aumenta (Figura 6a).
- Há uma condição especial em que o valor de  $K_M$  não se altera, enquanto o de  $V_{max}$  diminui. Esse tipo de inibição recebe o nome de inibição mista não competitiva (Figura 6b).

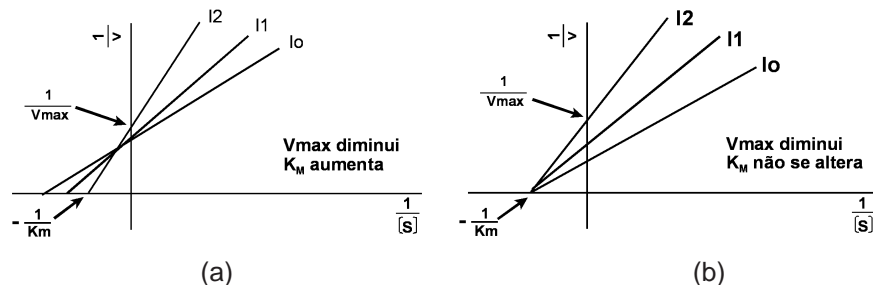


Figura 6. Efeito da inibição enzimática mista (a) e da inibição enzimática mista não competitiva (b) sobre os valores de  $V_{max}$  e  $K_M$ .

### Inibição enzimática irreversível

Na inibição enzimática irreversível, o inibidor liga-se covalente e permanentemente a um grupo funcional necessário para a catálise, tornando a molécula enzimática inativa. Esse tipo de inibição não pode ser analisado pelos princípios de Michaelis-Menten, que consideram a formação do complexo E-I ou E-S-I como reversível. Um exemplo de inibição irreversível é a inibição de enzimas que possuem sulfidril (-SH) no sítio ativo pelo acetato de iodo (Figura 7).

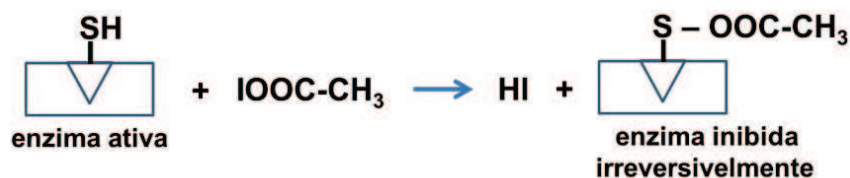


Figura 7. Inibição irreversível do grupo sulfidril pelo acetato de iodo.

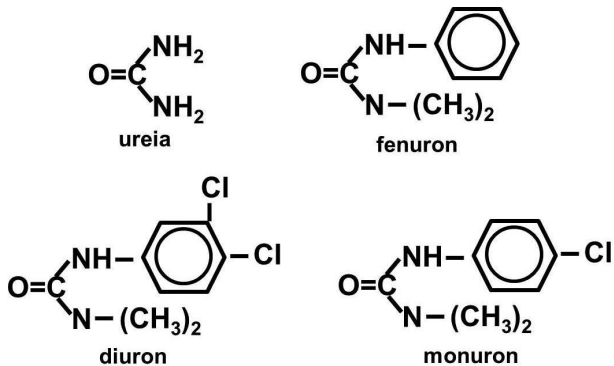
Os ativadores e inibidores podem ter ação direta ou indireta sobre a atividade enzimática de amostras de solo. A ação direta é quando esses atuam sobre a molécula enzimática, causando alteração no sítio ativo, com perda parcial ou total da atividade; e a indireta é quando os inibidores agem sobre os organismos responsáveis pela síntese das moléculas enzimáticas, diminuindo sua quantidade no solo.

O efeito dos agroquímicos sobre as enzimas do solo depende das doses e da configuração química do produto, que podem desorganizar a estrutura física da membrana celular dos microrganismos e modificar os mecanismos de transporte e excreção. As consequências dessas modificações podem



incluir alterações na relação entre enzima intracelular e extracelular ou mudanças bioquímicas na atividade de enzimas ligadas às células. Fungicidas que possuem longa cadeia alquílica ligada ao grupo guanidino podem desorganizar o modelo da membrana. A modificação da membrana celular também pode ser causada por outras substâncias empregadas nas formulações dos produtos comerciais. Os agroquímicos são formulados em óleo ou outro solvente orgânico, que podem aumentar a permeabilidade da membrana, influenciar as interações lipídeo-lipídeo e até romper a ligação hidrofóbica entre lipídeos e regiões apolares da membrana. Danos também podem ser causados por interação entre lipídeos e radicais livres no caso dos herbicidas do grupo bipyridílio. Tal efeito se deve ao ataque dos radicais peróxi e hidroxil sobre os lipídeos da membrana celular (Harris & Dodge, 1972).

Uma classe de herbicida comumente usada e que causa efeito direto sobre as enzimas do solo é a da ureia substituída (Figura 8). A molécula enzimática reage com o inibidor por meio do átomo de oxigênio do grupo carboxila, formando um complexo que pode ser estabilizado por ressonância. Esse mecanismo tem sido proposto para a urease, admitindo-se que o efeito direto dessa classe de herbicidas ocorra nas ureases extracelulares livres.



**Figura 8. Herbicidas derivados da ureia.**

O solo pode influenciar o comportamento dos agroquímicos e, portanto, o efeito desses sobre as enzimas do solo somente pode ser postulado a partir de resultados experimentais com extratos de solo purificados. Assim, enzimas do solo podem ser indiferentes a fatores que determinam ativação ou inibição de enzimas purificadas. É o caso da esterase de malation obtida de extratos de solo e parcialmente purificada, que se apresenta estável na

presença de íons metálicos e muitos dos inibidores comuns das enzimas, sendo parcialmente inibida apenas por Ag, Hg e Pb em altas concentrações.

O agroquímico adicionado pode causar a morte de organismos do solo ou a lise celular, do que resultará a liberação de enzimas e outros componentes celulares. No caso de o organismo sobreviver, ainda assim poderão ocorrer alterações, como a inibição de enzimas internas ou interrupção da biossíntese de novas moléculas enzimáticas. Entretanto, em muitos casos, os agroquímicos são fontes de nutrientes para os organismos do solo, promovendo seu crescimento e, conseqüentemente, aumento da atividade de algumas enzimas.

Muitas das modificações induzidas pelos agroquímicos ocorrem na biossíntese de proteínas. O clordane, por exemplo, inibe a biossíntese de endopeptidase e aminopeptidase em *Aeromonas proteolytica* (Cervelli et al., 1978). Se a ação do agroquímico se dá sobre uma enzima endocelular, seu efeito somente será sentido após a morte do microrganismo. Contudo, se o efeito ocorrer na síntese de uma exoenzima, esse é sentido de imediato. Os agroquímicos podem modificar as inter-relações entre determinados grupos de organismos e, com isso, influenciar a quantidade e o tipo de enzimas produzidas em um dado momento.

É importante lembrar que, em razão da escassez de fontes de nutrientes, C e energia no solo, quase todos os microrganismos do solo estão vivendo em condições de fome. Assim, podem-se admitir três possibilidades de atuação dos agroquímicos no sentido de alterar o estado nutricional dos microrganismos: morte dos organismos sensíveis e o uso de seu material orgânico como fonte de nutrientes pelos sobreviventes; uso direto do agroquímico por organismos capazes de metabolizá-lo; e desenvolvimento de populações que dependem dos produtos da decomposição do agroquímico.

Senior et al. (1976) descreveram o aumento da atividade de enzimas em uma comunidade microbiana crescendo na presença de Dalapon (2,2'-ácido dicloropropiônico). Essa comunidade inclui decompositores primários e secundários, que podem crescer nos metabólitos produzidos pelo catabolismo do herbicida, nos metabólitos excretados pelos decompositores primários, ou nos produtos de lise das células. Um membro da comunidade secundária, *Pseudomonas putida*, cresceu usando o herbicida como única fonte de C e energia graças à produção da dehalogenase.

Os elementos-traço constituem outro grupo de inibidores, que podem formar complexos com a proteína enzimática, chegando a causar sua precipitação, o que causa inibição da atividade. Alguns fertilizantes, como

os fosfatados, contêm Cd na sua constituição, o qual pode causar inibição enzimática. Isso também ocorre com o uso de lodo de esgoto, do composto de lixo urbano e outros resíduos que contenham elementos-traço na sua constituição (Oliveira, 2008). Elementos-traço altamente tóxicos para algas, como  $\text{Hg}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$ , causam diminuição da atividade da fosfatase ácida mesmo em pequenas concentrações. Cerca de 90 % da atividade foi reduzida em *Scenedesmus bijuga* por uma solução  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  de  $\text{Hg}^{2+}$ . O  $\text{Cu}^{2+}$  diminuiu a atividade específica em cerca de 50 % em *Chlorella vulgaris*, quando a alga foi exposta a uma concentração de  $31 \mu\text{mol L}^{-1}$  em culturas crescidas em pH 4, enquanto em pH 6,8 a redução foi de cerca de 20 % (Jonsson & Aoyama, 2010).

A fosfatase alcalina foi influenciada pelo Pb (0, 150, 300 e  $600 \text{ mg dm}^{-3}$ ); nas doses mais elevadas, houve redução de 60 % na atividade, enquanto as atividades de desidrogenases e arilsulfatase não foram alteradas (Andrade & Silveira, 2004). A atividade da urease também foi inibida pelo Pb, o que não foi observado para a atividade de desidrogenases. As atividades de desidrogenases e urease foram inibidas por diferentes concentrações de Hg (Martins et al., 2010).

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

### Amostragem de solo

Um primeiro aspecto a se considerar na amostragem de solo para fins de avaliação da atividade enzimática é a uniformidade do terreno. Se a área não for uniforme, deve-se dividi-la em parcelas o mais homogêneas possível, retirando-se uma amostra composta em cada parcela. Em cada área homogênea, é recomendável retirar no mínimo 20 amostras simples que, depois de juntadas e homogeneizadas, formarão a amostra composta representativa da área.

As amostras devem ser colocadas em caixas de isopor, contendo gelo comum ou gelo seco, e enviadas o mais rápido possível para o laboratório onde serão analisadas. O gelo comum deve ser colocado em saco plástico, devidamente vedado, para não haver risco de umedecer as amostras de solo com a água do degelo. No caso de avaliações de enzimas anaeróbias, a amostragem e condução da amostra ao laboratório devem ser feitas em

condições anaeróbias. O transporte pode ser feito em jarras em que o ar é substituído por um gás inerte como  $N_2$  ou He.

Outra decisão importante a se considerar na amostragem é a profundidade em que as amostras serão obtidas, pois a atividade enzimática diminui com a profundidade (Garcia & Nahas, 2007). Em experimentos em que se deseja avaliar os efeitos de práticas de manejo do solo sobre a atividade enzimática, é recomendável obter amostras na profundidade 0-5 ou 0-10 cm, em que as atividades serão mais altas e a possibilidade de se detectarem diferenças entre tratamentos é maior. Quando se pretende relacionar a atividade enzimática com o nível de fertilidade do solo, a amostragem deve ser realizada na profundidade 0-20 cm, que é a usada naquele tipo de avaliação.

A época e amostragem também é fator de grande importância. Nos meses quentes e chuvosos, a atividade enzimática é maior que nos meses secos e frios, como observado por Longo & Melo (2005a) para a urease. Em períodos secos, em solos arejados, a atividade da redutase do nitrato não foi detectada, enquanto uma elevação da umidade para 15 % causou aumento na atividade da enzima (Szajdak & Gaca, 2010).

Nas proximidades de raízes ou de locais onde foram aplicados fertilizantes, principalmente orgânicos, as atividades enzimáticas são geralmente maiores que em solo não rizosférico ou não fertilizado.

A atividade de diversas enzimas pode ser influenciada pela natureza da cobertura vegetal. Melo & Pizauro-Júnior (1985) verificaram que a atividade de amilases em um Latossolo Vermelho-Escuro era maior em amostras que receberam restos da cultura de labe-labe, comparada com as que receberam restos da cultura de sorgo. Apesar de vários autores terem observado a importância da adição de restos vegetais ao solo sobre a atividade enzimática, Ladd (1978) afirmou não ter encontrado correlação entre a atividade enzimática e o teor de matéria orgânica do solo. Posteriormente, outros autores, como Ma et al. (2010), encontraram correlações altamente significativas entre o teor de C orgânico total e a atividade de  $\alpha$  e  $\beta$ -glicosidase,  $\alpha$  e  $\beta$ -galactosidase em diferentes tipos de manejo do solo, assim como correlação positiva entre o teor de S orgânico de um Latossolo Vermelho distrófico e a atividade da arilsulfatase (Nogueira & Melo, 2003).

## **Preparo e armazenamento das amostras**

Extrair e purificar enzimas do solo são tarefas árduas, pois essas encontram-se complexadas com os coloides orgânicos e inorgânicos e estão em baixas concentrações. Mesmo para enzimas fracamente ligadas ao

complexo coloidal, é necessário grande volume de amostra para se obterem quantidades suficientes para as análises. Para a extração de 25 mg da urease do solo, Briggs & Segal (1963) usaram 25 kg de amostra de solo. Dessa forma, a realização de ensaios com amostras integrais predomina nos estudos enzimáticos em amostras de solo, de modo que os resultados obtidos são valores aparentes.

Trabalhar com a amostra *in natura*, sem a aplicação de pré-tratamento como a secagem ao ar, também dificulta os estudos com enzimas do solo e seu uso na prática.

A forma e o tempo de armazenamento também são fatores importantes, pois podem modificar as atividades ao causarem alterações na comunidade microbiana e na estrutura da molécula enzimática. O armazenamento em temperaturas muito baixas pode causar o congelamento do conteúdo celular, cujo aumento de volume pode romper a membrana celular, com a liberação de endoenzimas.

Secar as amostras ao ar e à sombra é prática que se observa em algumas publicações e tem sido adotada quando há muitas amostras a serem analisadas ou quando o local de amostragem é distante do laboratório onde serão realizadas as análises. Nesse caso, devem-se levar em consideração os efeitos que a secagem ao ar causa na atividade, pois provoca alterações na estrutura das enzimas, bem como na morte de microrganismos, cuja lise celular resulta na liberação de enzimas endocelulares para o solo. Durante a secagem, dependendo do teor de água na amostra, poderá haver o crescimento de microrganismos e a síntese de novas moléculas enzimáticas.

Em um estudo com nove solos sob pastagem na Nova Zelândia, observou-se que a secagem ao ar causou diminuição na atividade enzimática, que pode ser leve, como no caso da sulfatase, ou alta, como no de proteases (Speir & Ross, 1981). Longo & Melo (2005b) avaliaram o efeito da secagem ao ar sobre a atividade da urease em dois Latossolos, que não se alterou no Latossolo Vermelho eutrófico, porém aumentou no Latossolo Vermelho distrófico. Torello & Wehner (1983) também não detectaram efeito da secagem ao ar sobre a atividade da urease.

É também importante considerar o tempo entre a amostragem de solo, as condições em que a amostra foi armazenada e a análise. Mesmo sendo a amostra protegida contra a secagem e mantida sob baixas temperaturas, há os riscos de crescimento microbiano, alterações na membrana celular dos microrganismos da amostra e modificações na estrutura da proteína enzimática. Amostras de solo armazenadas por 28 dias, secas ao ar ou com umidade natural, e mantidas em temperatura ambiente, a 5 e -20 °C,

evidenciaram perda da atividade de urease, mais sensível em Latossolo Vermelho distrófico, que apresentava menores teores de matéria orgânica e argila (Longo & Melo, 2005b).

O armazenamento em temperaturas abaixo de zero promove o congelamento da água presente na amostra, cuja expansão pode causar a lise celular dos microrganismos. Após o degelo, ocorre a liberação de enzimas para a amostra, causando aumento na atividade das enzimas abiônicas. Todavia, tem sido observada diminuição na atividade pelo congelamento e descongelamento, quando a atividade é avaliada em frações da amostra de solo (Lähdesmäki & Pnspanen, 1992).

## Substrato

O substrato a ser usado para avaliação da atividade enzimática em amostras de solo pode ser natural ou sintético. O substrato natural é aquele sobre o qual a enzima realiza a catálise em condições naturais. No caso da celulase, é a celulose; no da amilase, o amido; e no da urease, a ureia. É a substância que ocorre naturalmente no solo. Já os substratos sintéticos são substâncias artificiais com as quais a enzima é capaz de formar o complexo E-S, transformando-as em produto. É o caso do *p*-nitrofenilfosfato de sódio, substrato sintético usado para determinar a atividade de fosfatases; do *p*-nitrofenilsulfato de potássio, a fim de definir a atividade de arilsulfatases; e da carboximetilcelulose, para precisar a atividade da celulase.

O uso de substratos sintéticos facilita as atividades no laboratório e a obtenção de resultados mais exatos. Deve-se optar por um substrato cujo produto da ação enzimática seja uma substância colorida, de fácil determinação, como o *p*-nitrofenol, resultado da hidrólise do *p*-nitrofenilfosfato de sódio ou *p*-nitrofenilsulfato de potássio, que apresenta coloração amarela e é facilmente dosado por espectrofotometria na região do visível. Muitas vezes, o substrato natural não é facilmente obtido na forma de solução, como são os casos do amido e da celulose. A desvantagem dos substratos artificiais reside no preço, geralmente mais elevado.

É importante reforçar que a concentração do substrato deve ser tal que a enzima trabalhe com o sítio ativo saturado, de modo a se obter a velocidade máxima da reação. No caso da celulase, por exemplo, a concentração de carboximetilcelulose (substrato) no meio de reação deve ser de no mínimo 0,4 %, para haver aumento linear da atividade celulolítica em razão do tempo (Skujins, 1967). No caso das amilases, recomenda-se o uso de 20 mL de uma solução de amido a 2 % para 10 g de amostra de solo. É evidente que,

por causa da atividade na amostra de solo, essas indicações podem ser alteradas, de modo que a enzima permaneça com o sítio ativo saturado.

Finalmente, a marca do produto a ser usado como substrato é importante na obtenção de bons resultados. Muitos produtos não fornecem uma solução ou emulsão adequada.

## **Inibidores do crescimento microbiano**

Na avaliação da atividade enzimática, é preciso atentar para que não haja crescimento microbiano durante a incubação, o que resultará na síntese de novas moléculas enzimáticas. Isso é particularmente importante na determinação da atividade de endoenzimas, ou quando o período de incubação é longo, como no caso da amilase e da celulase, que exigem incubação por 24 h. Nesses casos, é recomendável o uso de inibidor de crescimento microbiano, pois durante a incubação pode haver multiplicação significativa dos microrganismos presentes no meio (Burns, 1978).

A determinação da atividade enzimática em amostras de solo pode se feita na presença ou ausência de inibidor do crescimento microbiano. No caso de avaliações em que o tempo de incubação é pequeno, como no caso da atividade da arilsulfatase, cujo tempo de incubação é de 1 h, não há necessidade de se usar inibidor de crescimento microbiano. Porém, em alguns casos, como na definição da atividade da urease, embora o tempo de incubação seja de 1 h, emprega-se o toluol como inibidor (May & Douglas, 1976), o que se justifica quando o crescimento dos organismos geradores da enzima é rápido. Outros inibidores como antibióticos, calor seco ou úmido e irradiação das amostras de solo têm sido utilizados para se evitar a proliferação de microrganismos durante a incubação para indicar a atividade de enzimas abiômicas.

O método ideal deve inibir o crescimento de microrganismos sem causar a lise ou alterações na permeabilidade da membrana celular, assim como não deve influenciar a enzima em estudo. Nenhum dos agentes químicos propostos para inibir os microrganismos em avaliações enzimáticas (fenol, acetona, timol, clorofórmio, éter, tolueno, dentre outros) apresenta total eficiência. Para determinar a atividade da urease, Rotini (1935) encontrou, em ordem crescente de eficiência de inibição do crescimento microbiano: água, fenol 5 %, acetona, tolueno, timol (10 % em etanol) e clorofórmio. Haig (1955) estudou o óxido de etileno como agente esterilizante, detectando que esse causa inativação de urease e esterase e redução na atividade de acetilesterase.



O inibidor microbiano mais comumente usado é o tolueno, mas ainda permite o crescimento microbiano após alguns dias de incubação e afeta a atividade de algumas enzimas como oxidases de carboidratos. Os microrganismos têm comportamento distinto quanto à presença de tolueno, sendo as bactérias Gram(+) e as actinobactérias mais resistentes que as bactérias Gram(-). Kiss & Boarn (1965) demonstraram que o tolueno (10-25 % na amostra) pode prevenir a assimilação do substrato ou seus produtos de reação e concluíram que esse é efetivo na inibição, previne a síntese de novas enzimas, não destrói microrganismos do solo e, se permitir seu desenvolvimento, esse não chega a alterar os resultados. O efeito inibitório do tolueno depende do teor de água da amostra; a concentração mínima deve ser de 20 % para amostras secas ao ar, secas e reumedecidas ou naturalmente úmidas (Beck & Poschenrieder, 1963). No caso de suspensões de solo, pode-se usar concentração de 5-10 %. O tolueno é decomposto por microrganismos, mas somente se usado em concentrações menores que 0,1 %, valor muito abaixo das indicações para estudos enzimológicos.

Dommergues (1960) avaliou o efeito da exposição por sete dias à radiação infravermelha sobre a atividade da sacaridase, observando que o efeito variou com o tipo de solo, sendo pequeno em solo argiloso de região tropical e severo, em hidromórfico aluvial. Dunn et al. (1948) foram os primeiros a fazer uso da radiação ionizante, tipo de tratamento que talvez mais se aproxime do ideal. Para tal, pode-se empregar um feixe de elétrons de 5-10 MeV, raios-X ou raios-gama ( $^{60}\text{Co}$ ). A irradiação de amostras de solo com gerador de elétrons de van der Graaf (3 MeV) proporcionou esterilização com doses de  $3,3 \times 10^{-6}$  rad (Skujins, 1967).

A radiação não causa a morte do microrganismo, mas elimina sua capacidade de multiplicar-se; no entanto, muitas de suas atividades bioquímicas permanecem ativas. Altas doses de radiação podem causar perda da permeabilidade seletiva da membrana, permitindo a entrada ou a saída de substâncias, com consequente alteração na atividade enzimática do solo. Os fungos são mais susceptíveis à radiação que as bactérias e as formas vegetativas dessas são mais sensíveis que os esporos. A matéria orgânica e a umidade do solo podem influir na resposta à radiação.

O calor úmido é mais eficiente que o seco para fins de esterilização. A inativação das enzimas do solo se inicia por volta dos 60-70 °C, sendo total nas proximidades dos 100 °C, geralmente cerca de 10 °C acima do necessário para inativar a enzima em solução.

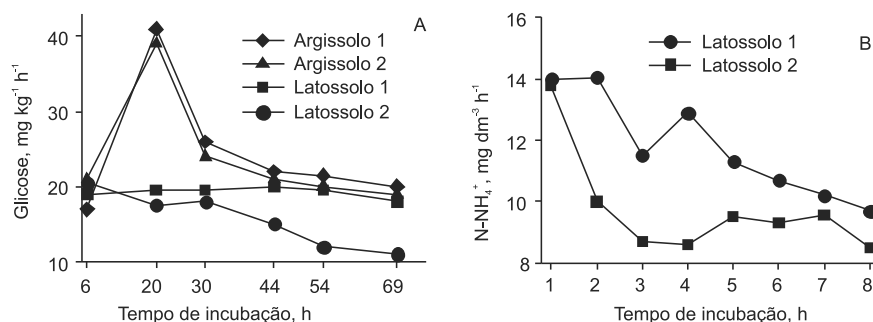


## Tempo de incubação

O tempo de incubação é uma variável que depende da atividade da enzima a ser avaliada e da sensibilidade do método empregado para determinar o substrato restante ou o produto formado. O tempo de incubação não deve permitir que a concentração do substrato diminua a ponto de o sítio ativo da enzima não permanecer saturado. Nas condições ideais de incubação, a atividade aumenta linearmente com o tempo.

Em amostras de solo em que a atividade da enzima a ser avaliada é alta, ou que o método usado para definir o produto ou substrato é bastante sensível, o tempo de incubação de 1 h pode ser suficiente. É o caso da avaliação da atividade da arilsulfatase, que consiste na incubação da amostra de solo com *p*-nitrofenilsulfato de potássio e avaliação do *p*-nitrofenol formado durante a incubação (Tabatabai & Bremner, 1970). De modo geral, a atividade de arilsulfatase é alta e a sensibilidade de avaliação do *p*-nitrofenol também. Quando a enzima apresenta baixa atividade, como é o caso da celulase, não obstante o método para determinação do açúcar redutor formado durante a incubação seja bastante sensível (Oser, 1965), faz-se o uso de 24 h de incubação (Pancholy & Rice, 1973).

Em Argissolos, Melo et al. (1983) constataram que a atividade de amilase aumentou até cerca de 20 h de incubação, caindo em seguida até aproximadamente 60 h, enquanto a atividade caiu levemente ou permaneceu praticamente estável em Latossolos (Figura 9a). Em Latossolos, Longo & Melo (2005b) observaram que a atividade da urease caiu linearmente em Latossolo Vermelho eutroférico até 8 h de incubação, enquanto em Latossolo Vermelho distrófico a atividade enzimática caiu rapidamente até 4 h e depois se estabilizou (Figura 9b). Tais resultados deixam claro que o tempo de incubação ideal em um método para se avaliar atividade enzimática em amostras de solo varia com o tipo de enzima e o de solo. Ensaio prévios são necessários para definir o melhor tempo de incubação para cada situação solo-enzima.



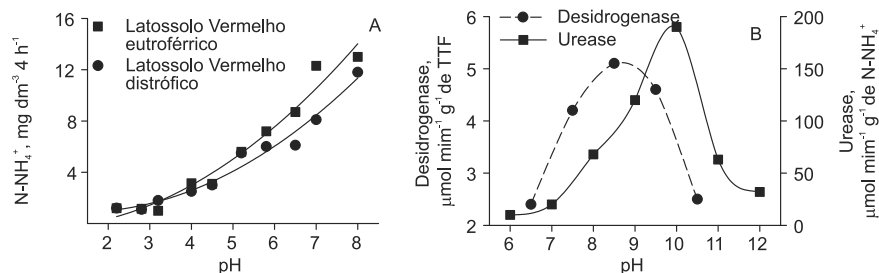
**Figura 9. Efeito do tempo de incubação sobre a atividade da amilase em Argissolos e Latossolos (a) e da urease em Latossolos (b).**

Fonte: Adaptado de Melo et al. (1983) e Longo & Melo (2005b).

## pH

Os ensaios enzimáticos podem ser conduzidos com pH natural do solo ou no pH ideal para a atividade da enzima. 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. No caso da amilase, o pH pode ser tamponado com solução de acetato-fosfato 0,5 mol L<sup>-1</sup>, pH 5,5 (ácido acético 0,5 mol L<sup>-1</sup>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,5 mol L<sup>-1</sup>). Em estudos para avaliar a qualidade do solo, o ideal é desenvolver a análise no pH natural do solo, obtendo-se a atividade da enzima próxima à que estaria ocorrendo *in loco*.

Avaliando o efeito do pH sobre a atividade da urease em Latossolo Vermelho distrófico e Latossolo Vermelho eutrófico, Longo & Melo (2005b) encontraram aumento na atividade com o pH, variando de 2 a 8 (Figura 10a), não atingindo o pH em que a enzima começaria a perder atividade. Martins et al. (2010) encontraram que o pH ótimo para atividade da urease em um solo litólico situava-se nas proximidades de 10, enquanto para as desidrogenases o pH ótimo se situava próximo a 9 (Figura 10b). O pH ótimo para a hidrólise do diacetato de fluoresceína (FDA), um método para se estimar a atividade microbiana do solo, situa-se na faixa de 7 a 8.



**Figura 10. Efeito do pH na atividade da urease em Latossolo Vermelho eutroférico e Latossolo Vermelho distrófico (a) e nas atividades de desidrogenase e urease (b). TFF: cloreto de trifetil formazana.**

Fonte: Adaptado de Longo & Melo (2005b) e Martins et al. (2010).

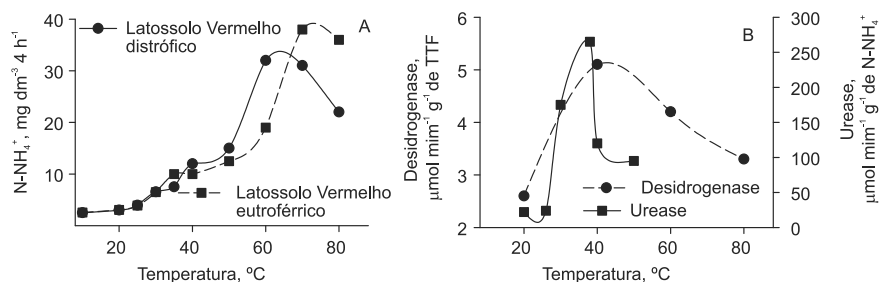
## Temperatura de incubação

Nos métodos para medir a atividade enzimática em amostras de solo, tem-se feito uso da temperatura que garanta a máxima atividade. Conforme já discutido, o complexo coloidal do solo protege as enzimas do efeito da temperatura, de modo que os valores empregados têm sido bem mais elevados que nos determinados em sistemas puros.

A invertase é uma das enzimas mais resistentes ao calor, mantendo-se ativa mesmo depois de repetidos tratamentos do solo com vapor fluente; a inativação dela é conseguida por calor seco a 150 °C ou por autoclavagem. As amilases mantêm atividade após 3 h de exposição a calor seco a 150 °C, mas são facilmente inativadas pela autoclavagem. O calor seco e o vapor fluente ou a autoclavagem inativam a enzima catalase, permitindo diferenciá-la de catalisadores não enzimáticos. Já a α-glicosidase perde atividade quando aquecida acima de 70 °C (Tabatabai, 1994).

Em estudo com urease extraída de sementes de melancia, Mohamed et al. (1999) avaliaram que não houve perda significativa da atividade pela exposição a 40 °C por 30 min, mas houve perda total da atividade em temperatura de 80 °C por 5 min. Em Latossolo Vermelho eutroférico e Latossolo Vermelho distrófico, a atividade da urease aumentou até 70 °C (Longo & Melo, 2005b), quando tendeu a diminuir, sendo a queda menos sensível no primeiro solo, mais argiloso (Figura 11a). Martins et al. (2010) encontraram a máxima atividade de urease e desidrogenases nas temperaturas de 38 e 46 °C, respectivamente (Figura 11b).

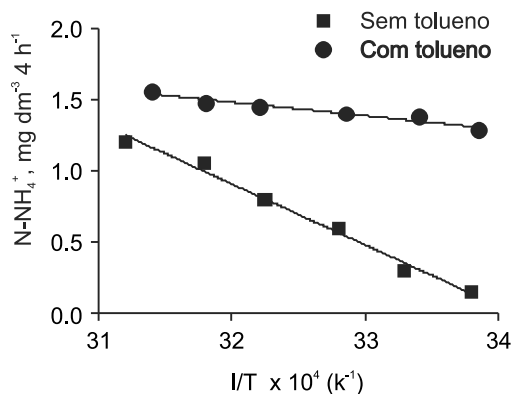
A atividade da redutase do nitrato é fortemente inibida a 40 °C (Abdelmagid & Tabatabai, 1987). No caso de amilases, a temperatura indicada é de 37 °C.



**Figura 11. Efeito da temperatura na atividade da urease em Latossolo Vermelho distrófico e Latossolo Vermelho eutroférico (a) e nas atividades de desidrogenase e urease (b). TFF: Cloreto de trifetil formazana.**

Fonte: Adaptado de Longo & Melo (2005b) e Martins et al. (2010).

A presença de um inibidor, como o tolueno, pode alterar o comportamento da enzima em relação à temperatura (Dalal, 1975), como se pode observar pela análise da figura 12.



**Figura 12. Efeito do tolueno sobre a temperatura de incubação na atividade da urease.**

Fonte: Adaptado de Dalal (1975).

## Paralisação da reação

Ao final do tempo de incubação, definido no método para avaliação da atividade enzimática, 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. Essa operação é tanto mais importante quanto maior a atividade da enzima

em avaliação. As substâncias usadas com o objetivo de parar a reação são muito variáveis (Quadro 1).

### **Avaliação do extrato de incubação**

No extrato de incubação, além das substâncias adicionadas durante as etapas do método, estarão presentes os produtos da atividade enzimática sobre o substrato. Para estimar a atividade enzimática, pode-se discriminar a concentração final do substrato, que diminui com o tempo de incubação. Pela diferença entre as concentrações inicial e final de substrato, estima-se a atividade da enzima. Todavia, o que tem sido mais utilizado é a definição do produto formado. No caso da atividade de amilases e celulase, têm sido usados métodos para delimitar os açúcares redutores, como o descrito em Oser (1965). Para facilitar a determinação, alguns métodos empregam substratos sintéticos, como o *p*-nitrofenilfosfato de sódio, usados na designação da atividade de fosfatases, cujo produto de hidrólise é o nitrofenol, de cor amarela e facilmente dosado por espectrofotometria de absorção molecular na região do visível.

## **ATIVIDADE DE ALGUMAS ENZIMAS EM AMOSTRAS DE SOLO**

Existem vários métodos para medir a atividade de enzimas em amostras de solo, como pode ser observado nas publicações de Alef & Nannipieri (1995) e Melo et al. (2010). No quadro 1, resumem-se as principais características dos métodos mais comumente usados na avaliação da atividade enzimática em amostras de solo.

### **Amilases**

A amilase é uma enzima envolvida na liberação de açúcares de baixo peso molecular, que servem de fonte de energia para os microrganismos do solo. Compreendem um grupo de enzimas, basicamente a  $\alpha$ - e a  $\beta$ -amilase, que catalisam a hidrólise do amido a unidades de glicose. A  $\alpha$ -amilase é sintetizada pelas plantas, animais e microrganismos, enquanto a  $\beta$ -amilase é desenvolvida principalmente pelas plantas. Essas enzimas são largamente distribuídas nas plantas e nos solos e têm importante papel na hidrólise do amido.

Quadro 1. Principais características dos métodos mais comumente usados na avaliação da atividade enzimática em amostras de solo

Enzima	Substrato	Massa	Inibidor	pH	Temperatura	Tempo	Paralisação reação	Produto reação	Referência
		g			°C	h			
Amilase	Amido	10	Toluol	5,5	30	24	Não usa	Açúcar redutor	Melo et al. (1983)
Arisulfatase	<i>p</i> -nitrofenilsulfato de potássio	1	Toluol	5,8	37	1	CaCl <sub>2</sub> + NaOH	<i>p</i> -nitrofenol	Tabatabai & Bremner (1970)
β-glicosidase	PNG	1	Toluol	6,5	37	1	CaCl <sub>2</sub>	<i>p</i> -nitrofenol	Eivazi & Tabatabai (1988)
Catalase	Peróxido de hidrogênio	5-10	Não usa	6,8	20	1/20	Não usa	O <sub>2</sub>	Beck (1971)
Celulase	Carboximetil-celulose	10	Toluol	5,5	30	24	Não usa	Açúcar redutor	Pancholy & Rice (1973)
Desidrogenase	TTC	5	Não usa	7,6	30	24	Acetona	TTF	Thalmann (1968)
Fosfatase	<i>p</i> -nitrofenilfosfato de sódio	1	Toluol	6,5 11,0	37	1	CaCl <sub>2</sub> + NaOH	<i>p</i> -nitrofenol	Eivazi & Tabatabai (1977)
Hidrólise FDA	FDA	2	Não usa	7,6	24	1	Acetona	Fluoresceína	Schnürer & Rosswall (1982)
L-glutaminase	L-glutamina	5	Toluol		37	2	KCl + Ag(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	N-amoniacal	Frankenberger Jr. & Tabatabai (1991)
L-histidina amônia liase	L-histidina	5	Toluol	9,0	37	48	CaCl <sub>2</sub> + NaOH	N-amoniacal	Frankenberger Jr. & Johanson (1982)
Lipase	Heptanoato de 4-metilumbeliferone	0,1	Não usa		30	10	Não usa	4-metil umbeliferone	Schinner et al. (1991)
Protease	Caseinato de sódio	1	Não usa	8,1	50	2	Ácido tricloroacético	Tirosina	Melo et al. (2010)
Quitinase	Quitina	1	Não usa	6,0	37	16	Não usa	N-acetilglicosamina	Rössner (1991)
Redutase do nitrato							Não usa		Abdelmagid & Tabatabai (1987)
Sacarase ou invertase	Sacarose	5	Não usa	5,5	50	3	Não usa	Açúcar redutor	Schinner & von Mersi (1990)
Urease	Ureia	30	Toluol	Natura I	30	1	Acetato de fenil-mercúrio	N-amoniacal	Longo & Melo (2005b)
Xilanase	Xilano	5	Não usa	5,5	50	1	Não usa	Açúcar reutor	Schinner & von Mersi (1990)

TTC: cloreto de trifeniltetrazólio; TPF : trifenilformazan; FDA : diacetato de fluoresceína; e PNG: *p*-nitrofenil-β-D-glicosídeo

O amido é um homopolissacarídeo formado pela amilose e amilopectina. A amilose é formada por unidades de glicose unidas pela ligação glicosídica  $\alpha$ -1,4, enquanto a amilopectina é formada por unidades de glicose em ligação glicosídica  $\alpha$ -1,4 e  $\alpha$ -1,6. As amilases hidrolisam as ligações glicosídicas da molécula de amido, liberando unidades de maltose e, no estágio final de hidrólise, moléculas de glicose. Assim, após a hidrólise, o amido é convertido em açúcar redutor.

Os vários tipos de amilase atuam de maneira diferenciada, promovendo a quebra da molécula em posições diferentes. As  $\alpha$ -amilases ou endoamilases hidrolisam as ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 ao acaso, liberando uma mistura de glicose, maltose, maltotriose e dextrinas. As  $\beta$ -amilases removem unidades de maltose (duas glicoses em ligação glicosídica  $\alpha$ -1,4) a partir de uma extremidade não redutora. Outras enzimas que hidrolisam o amido são:  $\alpha$ -amilase, fosforilases, enzima R e amilo-1,6-glicosidase (as duas últimas são capazes de promover a hidrólise da ligação glicosídica  $\alpha$ -1,6).

Essas enzimas são influenciáveis pelo tipo de solo e pelo manejo, como o tipo de vegetação e a adição de resíduos ao solo (Pancholy & Rice, 1973). As plantas influenciam a atividade das amilases diretamente pelo fornecimento de enzimas, ou outros componentes excretados, e pelos resíduos incorporados ao solo ou indiretamente, fornecendo substrato para o crescimento dos microrganismos que as produzem.

Assim, um maior entendimento dessas enzimas no solo é fundamental para possibilitar a utilização de práticas de manejo com potencial para maximizar os benefícios delas na sustentabilidade dos ecossistemas.

### **Celulase ( $\beta$ -glucan-4-glucanoidrolase)**

A celulase é uma enzima que catalisa a hidrólise da celulose, cadeia de polissacarídeo formado por moléculas de glicose em ligação glicosídica  $\beta$ -1,4. Nessa reação, a celulose é clivada em unidades de celobiose, que é um dissacarídeo formado por unidades de glicose em ligação glicosídica  $\beta$ -1,4. Posteriormente, a celobiose é hidrolisada em reação catalisada pela  $\beta$ -glicosidase, resultando em moléculas de glicose.

O crescimento e a sobrevivência de muitos microrganismos que executam funções relevantes nos solos são dependentes do C contido na celulose (Deng & Tabatabai, 1994). Entretanto, para que esse C seja liberado como fonte de energia para ser utilizada, a celulose tem que ser degradada em

unidades com menor massa molecular pela celulase. A celulose constitui o mais abundante polímero orgânico na biosfera, perfazendo quase 50 % da biomassa sintetizada pela fixação fotossintética do  $\text{CO}_2$  (Eriksson et al., 1990).

A celulase é produzida por microrganismos e plantas, podendo ocorrer livre no solo, ou em complexos enzimáticos em bactérias celulotíticas anaeróbias (Bayer et al., 1998). As celulasas são excretadas principalmente por fungos (Andersson et al., 2004) e respondem a várias condições ambientais, como temperatura, pH, qualidade da matéria orgânica e componentes minerais do solo (Doyle et al., 2006), inclusive a disponibilidade de N mineral (Andersson et al., 2004).

### **Urease (ureia amida hidrolase)**

A urease catalisa a hidrólise da molécula de ureia em amônia e gás carbônico e tem grande importância no solo, sendo considerada vital para a regulação do suprimento de N às plantas, uma vez que a ureia é uma das principais formas de fertilizante nitrogenado.

Se a atividade da urease for alta, há rápida formação de amônia, que pode ser perdida por volatilização para a atmosfera. No solo, a amônia vai se transformar no íon amônio, que pode ser absorvido pelas plantas ou nitrificado, correndo o risco de se perder por lixiviação. Se a atividade da urease for baixa, a produção de N-amoniaco pode ser menor que as exigências nutricionais da planta (Melo et al., 2010).

A urease do solo tem origem principalmente vegetal e microbiana, sendo encontrada tanto intra como extracelularmente (Burns, 1986). A urease purificada extraída de plantas e microrganismos é rapidamente degradada pelas enzimas proteolíticas, quando adicionada ao solo. Entretanto, ela é relativamente persistente, quando associada ao complexo húmico ou argilas, permanecendo estável por longo período (Borghetti et al., 2003); pode ainda estar protegida da ação de proteases por permanecer no interior de agregados, onde o substrato (ureia) consegue penetrar, mas não moléculas de maior massa molecular, como as proteases.

### **Arilsulfatases**

A arilsulfatase é constituída por um grupo de enzimas que catalisam a hidrólise de ésteres de aril sulfatos orgânicos ( $\text{R-O-SO}_3^- + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{R-OH} + \text{H}^+$



+  $\text{SO}_4^{2-}$ ). É detectada em plantas, microrganismos e animais e considerada responsável por parte da ciclagem do S nos solos, atuando na mineralização do S orgânico para  $\text{SO}_4^{2-}$ , forma absorvida pelas plantas. Boa parte do S na superfície dos solos está presente na forma de éster sulfato (sulfato orgânico), sugerindo que a arilsulfatase pode ter importante papel no processo de mineralização do S orgânico do solo (Tabatabai, 1994).

Parte considerável das arilsulfatases nos solos é secretada por bactérias em resposta à limitação do S (McGill & Colle, 1981); normalmente, sua ocorrência nos solos é correlacionada com a biomassa microbiana e o nível de imobilização do S (Klose & Tabatabai, 1999).

## Fosfatases

Fosfatase é a denominação genérica de um grupo de enzimas que catalisam a hidrólise do éster e anidridos de fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ). Essas enzimas são classificadas em grandes grupos, de acordo com os compostos que hidrolisam: fosfomonoesterases, fosfodiesterases, fosfotriesterases, metafosfatases e pirofosfatases. Pela ação das fosfatases, moléculas orgânicas que apresentam fosfato como radical sofrem clivagem, liberando álcool e ácido fosfórico.

As fosfomonoesterases são denominadas de acordo com o substrato sobre o qual atuam: fitase, nucleotidase, açúcar fosfatase e glicerofosfatase. As fosfodiesterases catalisam a hidrólise dos ácidos nucleicos (nucleases), enquanto as fosfolipases catalisam a hidrólise dos fosfolipídeos. As fosfotriesterases atuam sobre grupos fosforil, contendo anidrido e as fosfoamidases agem sobre a ligação P-N.

As fosfomonoesterases têm sido bastante estudadas, dada a importância delas na mineralização do P de compostos orgânicos e na disponibilização às plantas. Essas enzimas são classificadas como fosfatase ácida e alcalina porque apresentam seu ótimo de atividade em condições de acidez e de alcalinidade, respectivamente.

A maioria dos estudos com fosfatases relata o comportamento da fosfatase ácida, pois grande parte dos solos utilizados com agricultura, principalmente sob condições tropicais e subtropicais, são ácidos.

As fosfatases têm papel fundamental no ciclo do P nos solos, sendo correlacionadas com a deficiência de P e o crescimento das plantas. A adubação pode influenciar a atividade de fosfatases, que geralmente aumenta após a adição de pequenas doses de fertilizantes, mas decresce com doses

mais elevadas, já que o incremento da atividade dessa enzima está relacionado com baixos teores de P inorgânico no solo (Skujins, 1967). Em solos com baixos teores de P, ocorre aumento na liberação de fosfatases, com objetivo de elevar a mineralização e remobilização do fosfato. Em culturas puras, a concentração de fosfatase decresce quando os microrganismos são transferidos de meios deficientes para os com teores suficientes de fosfato. A adição de glicose e nitrato de sódio em solo limo-arenoso intensificou a atividade de fosfatase em razão do aumento da população de bactérias (Nannipieri et al., 1978). Assim, as fosfatases podem ser consideradas como bons indicadores da fertilidade do solo.

## Proteases

Proteases são enzimas que catalisam a hidrólise de proteínas, resultando na produção de aminoácidos, que são passíveis de sofrer desaminação, liberando o N amoniacal. Essa hidrólise é o primeiro passo na mineralização do N proteico, que chega ao solo pela incorporação dos restos culturais, pelos fertilizantes orgânicos ou pela morte de organismos (Melo et al., 2010). Silva & Melo (2004) encontraram correlação positiva entre a atividade de proteases do solo e o teor de N nas folhas de laranjeira cultivada em Latossolo Vermelho distrófico.

A atividade de proteases no solo pode ser indicativo da capacidade biológica desse para a conversão enzimática de substratos, que são dependentes da atividade microbiana (Burns, 1982).

## Desidrogenases

As desidrogenases têm importante papel na oxidação da matéria orgânica porque atuam na transferência de prótons e elétrons do substrato para o aceptor (Casida Jr. et al., 1964), existindo apenas como parte integral de células intactas e não acumulando extracelularmente nos solos.

Essas participam da cadeia respiratória dos microrganismos e estão diretamente relacionadas ao tipo de solo e às condições de aeração e umidade. Os estudos sobre atividade das desidrogenases podem dar indicações do potencial do solo para manter os processos biológicos, que são essenciais para a sua fertilidade e sustentabilidade. Assim, a atividade das desidrogenases é comumente utilizada como indicadora da atividade biológica (Burns, 1978). Estudando o efeito da adubação verde na recuperação de área degradada por mineração de cassiterita na Floresta Nacional do

Jamari, Rondônia, Longo et al. (2011) observaram aumento na atividade de desidrogenases, porém essa atividade foi inferior à do solo sob mata nativa, que apresentava maior teor de N microbiano.

### Hidrólise do diacetato de fluoresceína (FDA)

A hidrólise do 3,6 diacetilfluoresceína (FDA) não expressa a atividade de uma enzima específica, mas a de um grupo de enzimas, que são capazes de realizá-la. Nesse grupo estão lipases, esterases, proteases.

A solução de diacetato de fluoresceína é incolor, enquanto a de fluoresceína é fluorescente e pode ser estimada quantitativamente por espectrofotometria. Esse é o princípio do método para avaliar o potencial de hidrólise do FDA em amostras de solo (Schnürer & Rosswall, 1982). Os ésteres da fluoresceína são apolares e conseguem atravessar a membrana celular, enquanto os produtos da hidrólise são polares e permanecem no interior da célula.

O FDA pode ser hidrolisado por algas, protozoários e tecidos animais, mas não por esporos e células microbianas na fase estacionária de crescimento, de modo que a reação pode ser usada para colorir células microbianas metabolicamente ativas.

### $\beta$ -Glicosidase

As glicosidases são umas das mais comuns e predominantes enzimas dos solos (Tabatabai, 1994) e sua denominação varia de acordo com o tipo de ligação que hidrolisa. A  $\alpha$ -glicosidase realiza a hidrólise limite da celulose e é detectada em animais, plantas e microrganismos. Essa enzima catalisa a hidrólise de um dissacarídeo que possui ligação glicosídica  $\alpha$ -1,4, a celobiose; tem importante papel nos solos porque está envolvida na hidrólise e biodegradação de vários resíduos nos ecossistemas (Tabatabai, 1994); e seu produto final é a glicose, importante fonte de C para os microrganismos.

O *p*-nitrofenil- $\alpha$ -D-glicosídeo é o substrato utilizado para avaliar a atividade da  $\alpha$ -glicosidase em amostras de solo, cujo método baseia-se no fato de que esse substrato é incolor, enquanto o produto da hidrólise, o *p*-nitrofenol, apresenta cor amarela, podendo ser determinado por espectrofotometria na região do visível.

A  $\alpha$ -glicosidade pode dar uma ideia da atividade biológica passada, bem como da capacidade do solo em estabilizar a matéria orgânica. Essa enzima

é usada para detectar o efeito do manejo do solo (Bandick & Dick, 1999) e como indicadora de qualidade do solo (Acosta-Martinez & Tabatabai, 2000). Ela também tem relação com o teor de matéria orgânica do solo.

## ENZIMAS COMO INDICADORES DE QUALIDADE DE SOLO

No Brasil, o interesse pelas determinações de atividade enzimática tem aumentado consideravelmente, desde os primeiros trabalhos publicados em 1982 (Kulinska et al., 1982; Melo et al., 1982). Em uma busca na base de dados *Web of Knowledge*, usando os termos “enzimas” e “solo”, verificou-se que no Brasil, no período de 1980 a 1999, foram publicados 12 artigos técnico-científicos contra um total de 49 no período de 2000 a 2012. Nas décadas de 1980 e 1990, constatou-se que, com exceção do trabalho pioneiro de Kulinska et al. (1982) no Cerrado, os demais estudos com atividade enzimática concentraram-se no Estado de São Paulo, liderados pela Unesp de Jaboticabal, bem como na avaliação de enzimas relacionadas ao ciclo do C (amilases, hidrolases e celulase) e do N (urease e proteases) (Melo et al., 1982, 1983, 1989; Silva & Melo, 1999; Marchiori Júnior & Melo, 1999). Posteriormente, com a ampliação dos estudos incluindo áreas de Cerrado e do sul do Brasil, observou-se uma concentração de trabalhos técnico-científicos na comparação de diferentes sistemas de manejo (27 entre 61 trabalhos) e nos impactos do uso do lodo de esgoto e outros resíduos orgânicos (12 trabalhos). Mais recentemente tem ocorrido aumento nos trabalhos conduzidos no nordeste brasileiro (seis trabalhos), enquanto ainda persiste uma lacuna em solos amazônicos. Embora o uso de enzimas como indicadores de qualidade de solo não esteja explicitado na maioria dos títulos das publicações brasileiras, o tema foi abordado em boa parte desses trabalhos.

A atividade enzimática de um solo pode fornecer informações úteis do ponto de vista de sua qualidade porque boa parte dessa atividade está relacionada à formação de complexos com a matéria orgânica do solo e com a fração argila, indicando se o manejo de solo adotado favorece uma estabilização da matéria orgânica e de outras propriedades estruturais associadas (agregação e porosidade) que não são passíveis de detecção num curto período de tempo (Kandeler et al., 1999; Green et al., 2007; Vallejo et al., 2010; Dick & Burns, 2011). Por essa razão, as enzimas tendem a se comportarem de modo mais semelhante à matéria orgânica do solo,

constituindo-se em impressões digitais dos sistemas de manejo em que o solo foi submetido.

Apesar da importância do solo como base dos sistemas de produção de alimentos, fibras e agroenergia, o conceito de saúde ou de qualidade do solo na agricultura é recente e envolve não só a questão da produtividade biológica (grãos, carne e leite), mas também os serviços ambientais que o solo presta ao planeta Terra e que resultam na melhoria da qualidade da água e do ar e na promoção da saúde dos seres vivos, incluídos plantas e animais (Doran & Parkin, 1994; Garbisu et al., 2011).

A intensificação das atividades na agricultura tem acelerado a degradação dos solos pelo aumento dos processos de erosão, pela perda dos teores de C orgânico e pela diminuição da diversidade e da atividade microbiana, com prejuízos significativos para a produção agrícola e para a sustentabilidade dos agroecossistemas. Por isso, nos últimos anos, os estudos na busca de práticas agrícolas mais sustentáveis e de métodos de estudos ou indicadores que possam predizer a qualidade do solo em resposta a diferentes práticas de manejo têm se intensificado.

Entretanto, a quantificação da qualidade de um solo não é fácil. A multiplicidade de fatores químicos, físicos e biológicos, que interagem simultaneamente no “funcionamento” do solo e que apresentam variações em razão do tempo e espaço, dificulta a capacidade de avaliação dessa qualidade. Dessa forma, a identificação de propriedades que possam servir como indicadores do funcionamento do solo é necessária, pois um indicador individualmente não é capaz de descrever e quantificar todos os aspectos da qualidade do solo.

A qualidade do solo pode ser avaliada por meio de indicadores ou atributos que expressem alterações nos componentes e nas funções do solo, podendo refletir sua condição de sustentabilidade. Os indicadores devem ser identificados e analisados quanto à sua sensibilidade a mudanças e distúrbios causados pelo uso e manejo. Entretanto, existe a necessidade de se estudar um conjunto mínimo de indicadores físicos, químicos e biológicos e analisá-los de maneira integrada (Larson & Pierce, 1994).

A qualidade física do solo está relacionada com variáveis como porosidade, densidade, estabilidade de agregados, textura e compactação. A relação entre essas variáveis expressa a qualidade do solo em termos das condições de aeração e umidade, refletindo a condição de crescimento das raízes, infiltração ou movimento da água no perfil (Dexter, 2004). A qualidade química relaciona as variáveis em termos químicos, sendo reconhecidas três funções principais: formação e decomposição da matéria

orgânica, estocagem e liberação gradual de nutrientes e detoxificação de elementos potencialmente poluentes e tóxicos (Warkentin, 1995). Essas funções regulam o fluxo e transporte de nutrientes na solução do solo, de onde podem ser absorvidos pelas plantas. Já as propriedades microbiológicas possuem maior sensibilidade que as químicas e físicas, podendo detectar mudanças sutis nas propriedades do solo que ocorrem num curto período, após a introdução de diferentes sistemas de manejo agrícola (Nannipieri et al., 1990; Dick et al., 1996; Bandick & Dick, 1999; Stott et al., 2010; Knupp et al., 2010), proporcionando indicação mais dinâmica de alteração. Assim, os atributos microbiológicos e bioquímicos, associados às propriedades físicas e químicas, podem ser utilizados como bioindicadores de estresse no solo ou de sustentabilidade de vários ecossistemas naturais e cultivados (Dinesh et al., 2003; Nogueira et al., 2006).

A atividade enzimática tem potencial para fornecer uma avaliação integrada do estado biológico do solo pela sua relação com a biota, a facilidade de mensuração e o baixo custo, a resposta rápida a mudanças no uso e manejo do solo (Dick, 1994; Dick et al., 1996; Bandick & Dick, 1999; Kandeler et al., 1999; Knupp et al., 2010; Peixoto et al., 2010), refletindo aspectos do funcionamento do ecossistema. Além disso, as atividades enzimáticas possuem distribuição universal, mas com especificidades regionais, cumprindo os critérios propostos por Holloway & Stork (1991) para sua utilização como bons indicadores ecológicos de qualidade do solo.

Entretanto, Nannipieri et al. (1990) salientaram que a utilização isolada da atividade enzimática como indicadora de alterações na atividade microbiana tem algumas restrições porque:

- as enzimas catalisam reações específicas e geralmente são substrato-específicas, não podendo ser relacionadas com a atividade microbiana total do solo, que engloba várias de reações enzimáticas. A síntese de determinada enzima pode ser reprimida por fator específico, enquanto a atividade microbiana total pode não ser influenciada;
- a relação da enzima com a biomassa ou atividade microbiana pode não ser da mesma magnitude em todas as condições de solo, podendo variar em razão das condições específicas do ambiente;
- parte considerável da atividade enzimática é proveniente de enzimas estabilizadas em complexos com coloides orgânicos e inorgânicos do solo. Assim, nem sempre a atividade está relacionada diretamente com a atividade microbiana do solo; e

- as enzimas livres no solo apresentam alta instabilidade, enquanto aquelas estabilizadas nos complexos do solo apresentam alta resistência térmica e proteolítica.

Deve-se ainda ser destacado que as enzimas possuem sensibilidade diferenciada para detectar as mudanças que ocorrem no solo (Bandick & Dick, 1999; Green et al., 2007; Stott et al., 2010), evidenciando a importância de estudos para selecionar os ensaios enzimáticos mais apropriados, levando-se em consideração as diferentes condições edafoclimáticas e a diversidade de agroecossistemas e sistemas de manejo.

Apesar dessas restrições, a atividade enzimática pode ser utilizada como indicadora de alterações na atividade microbiana, principalmente restrita àqueles processos em que as enzimas estão envolvidas como formação e degradação da matéria orgânica ou mineralização do N. Avaliações da atividade enzimática podem complementar estudos sobre a dinâmica dos ciclos biogeoquímicos e da atividade microbiana do solo.

Vários índices de qualidade de solo propostos na literatura incluem a atividade enzimática entre um conjunto mínimo de dados a serem considerados. Algumas equações expressam o equilíbrio entre a matéria orgânica do solo e as propriedades bioquímicas em áreas não perturbadas, sob vegetação clímax (Quadro 2). Embora o uso dessas equações seja considerado adequado e promissor (Trasar-Cepeda et al., 1998), a utilização delas é limitada às áreas para as quais foram elaboradas, existindo críticas com relação ao seu empirismo e sua falta de clareza na escolha dos indicadores que as compõem.

Visando incorporar nas avaliações de qualidade de solo um indicador capaz de refletir o seu funcionamento metabólico, Stott et al. (2010) reportaram o desenvolvimento de uma equação de pontuação para a enzima â-glicosidase, que foi incluída no Programa SMAF (*Soil Management Assessment Framework*), utilizado pelo Serviço de Pesquisa Agrícola dos Estados Unidos (ARS-USDA). Entre os fatores que favoreceram a escolha dessa enzima, destacam-se a sua sensibilidade para refletir mudanças no manejo do solo e sua capacidade de indicar alterações antes que os teores totais de matéria orgânica do solo sejam alterados. Além da â-glicosidase, a ferramenta SMAF também inclui o C microbiano e o N potencialmente mineralizável como indicadores microbiológicos, juntamente com estabilidade de agregados, capacidade de armazenamento de água disponível, densidade do solo, condutividade elétrica, pH, razão de adsorção de Na, teores de P e de C orgânico.



**Quadro 2. Equações que incluem a atividade enzimática do solo para expressar relação com teores de matéria orgânica ou N total do solo e as propriedades bioquímicas em áreas não perturbadas, sob vegetação clímax**

Tipo de vegetação	Local	Equação	Referência
Floresta Atlântica de carvalho	Galícia, Espanha	$N \text{ total} = [(2 \text{ C biomassa microbiana} + 7 \text{ N mineralizável}) + 4 (18 \text{ fosfatase ácida} + 11 \beta\text{-glicosidase} + 2 \text{ urease})]/5$ 300	Trasar-Cepeda et al. (1998)
Florestas de laurissilva, pinus e vegetação xerófila	Ilhas Canárias, Espanha	$C \text{ total} = -2,924 + 0,037 \text{ C solúvel} - 0,096 \text{ celulase} + 0,081 \text{ desidrogenase} + 0,009 \text{ respiração}$	Armas et al. (2007)
Floresta de pinus e azinheira	Dois tipos de solo, Alicante, Espanha	$Molissol\text{-}N = 0,448 \text{ P} + 0,017 \text{ capacidade de retenção de água} + 0,410 \text{ fosfatase} - 0,567 \text{ urease} + 0,001 \text{ C microbiano}$ $Entisol\text{-}SOC = 17,333 + 4,247 \text{ P} + 8,183 \beta\text{-glicosidase} - 7,949 \text{ urease}$	Zornoza et al. (2007)
Floresta de coníferas	Noroeste do Pacífico, Oregon	$\ln(C \text{ total}) = 1,236 + 0,276 \ln(\text{fosfatase ácida}) + 0,289 \ln(\text{C microbiano})$	Chaer et al. (2009)

Um dos grandes problemas relacionados ao uso de atividade enzimática como bioindicador é a ausência de valores de referência que permitam sua interpretação (Trasar-Cepeda et al., 1998; Tótola & Chaer, 2002; Gil-Sotres et al., 2005). A maior parte dos trabalhos com bioindicadores envolve a comparação de diferentes sistemas de manejo de solo ou culturas, usando uma área de referência, que pode ser uma área não perturbada, em equilíbrio, sob vegetação clímax com mínima influência antrópica, ou solos com elevada capacidade produtiva e que minimizem o impacto ao ambiente. Na ausência de áreas de referência, o monitoramento de uma mesma área ao longo do tempo também é forma de superar essas dificuldades de interpretação.

Recentemente, Lopes et al. (2013) propuseram classes de interpretação para atividade das enzimas  $\alpha$ -glicosidase, celulase, fosfatase ácida e arilsulfatase em Latossolos Vermelhos de Cerrado de textura argilosa (Quadro 3). Essas classes foram elaboradas com base nas relações dessas enzimas com o rendimento relativo acumulado de soja e milho e com os teores de matéria orgânica do solo, utilizando os princípios dos ensaios de calibração de nutrientes. Foram selecionados 24 tratamentos em três experimentos de campo de longa duração num Latossolo Vermelho argiloso, com teores



variados de P no solo e nas diferentes produções acumuladas de grãos de soja e milho. Com base em análises de regressão entre os indicadores bioquímicos com o rendimento relativo acumulado ou com o teor de matéria orgânica do solo, determinaram-se as classes baixa, média e adequada desses atributos, sendo a considerada adequada aquela acima da qual se obtém 80 % do rendimento relativo acumulado.

**Quadro 3. Interpretação das classes de atividade enzimática para Latossolos Vermelhos argilosos de Cerrado, na camada de 0-10 cm, com base no rendimento relativo acumulado de grãos de soja e milho e no teor de matéria orgânica do solo**

Enzima <sup>(1)</sup>	Classe de atividade enzimática no solo <sup>(2)</sup>		
	Baixa	Moderada	Adequada
Com base no rendimento relativo acumulado			
β-glicosidase	≤65	66 a 115	> 115
Celulase	≤70	71 a 105	> 105
Fosfatase ácida	≤680	681 a 1160	> 1160
Arilsulfatase	≤40	41 a 90	> 90
Com base no teor de matéria orgânica do solo			
β-glicosidase	≤60	61 a 140	> 140
Celulase	≤70	71 a 115	> 115
Fosfatase ácida	≤640	641 a 1150	> 1150
Arilsulfatase	≤35	36 a 90	> 90

<sup>(1)</sup> Valores de β -glicosidase, fosfatase ácida e arilsulfatase expressos em  $\mu\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$  de *p*-nitrofenol no solo; e celulase em  $\mu\text{g g}^{-1} 24 \text{ h}^{-1}$  de glicose no solo. <sup>(2)</sup> Adaptado de Lopes et al. (2013).

Tendo em vista o interesse crescente da comunidade científica nacional em avaliações de atividade enzimática do solo e a necessidade da expansão da base de dados microbiológicos e bioquímicos dos solos brasileiros, deve-se atentar para a importância da realização de avaliações sistemáticas, com a seleção de algumas enzimas-chave que serviriam como referencial nesses estudos. A preferência deve ser dada àquelas de mais simples determinação analítica, ligadas à ciclagem da matéria orgânica do solo, que não sejam influenciadas pela aplicação de fertilizantes e que envolvam o uso de reagentes baratos e fora da lista de controle do Exército. Além disso, para medir e interpretar atividades enzimáticas do solo que sirvam como

bioindicadores, é preciso padronizar os protocolos de amostragem, passando por estocagem e pré-tratamento das amostras, procedimentos analíticos e apresentação dos resultados.

Em um mundo globalizado em que a preocupação com a valoração dos serviços ambientais tende a aumentar, no século XXI as produções agrícola, pecuária e florestal poderão estar atreladas também a processos de certificação ambiental que levem em conta as preocupações da sociedade com o uso racional dos recursos naturais e com a preservação ambiental. Assim, é possível que o uso de índices de qualidade de solo permita a agregação de valor aos produtos agrícolas oriundos de propriedades rurais e países que sejam capazes de comprovar que as práticas de manejo adotadas em suas lavouras permitem a manutenção e melhoria da qualidade do solo. Nesse cenário, as atividades enzimáticas apresentam grande potencial de adoção em laboratórios comerciais de análises de solo e, por isso, são fortes candidatas a participar de um conjunto mínimo de determinações a serem utilizadas nas avaliações de qualidade de solo.

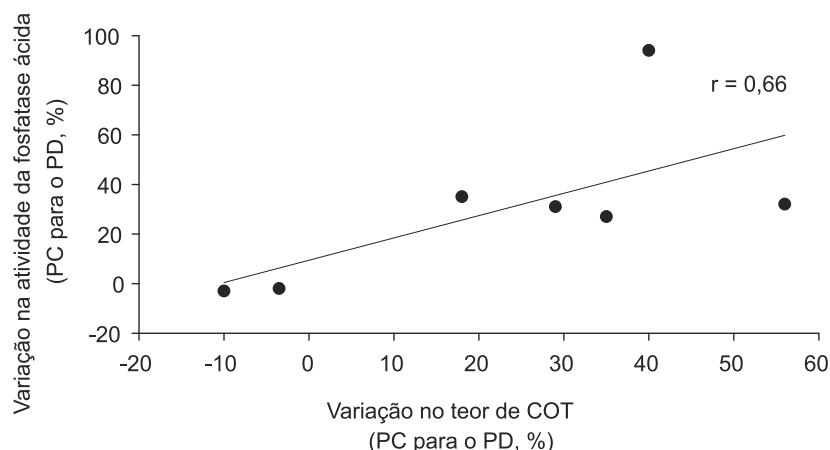
## EFEITO DO USO E MANEJO DO SOLO SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA

As atividades de enzimas extracelulares, além de serem reguladas indiretamente pelo aumento da produção e secreção pelos microrganismos, podem também ser reguladas diretamente pelas condições físico-químicas do ambiente, como teor de C orgânico, N total, P e S disponíveis, força iônica, salinidade, pH e conteúdo hídrico (Aon & Colaneri, 2001; Wallenstein & Weintraub, 2008). Esses fatores, por sua vez, são facilmente alterados pelo manejo do solo e das culturas (Balota et al., 2004, 2011). Sistemas de uso intensivo do solo influenciam a atividade enzimática pela diminuição dos teores de C ou por outros fatores como exposição à radiação solar, acidificação, salinidade, disponibilidade de nutrientes, adição de substâncias xenobiontes etc. Essas alterações podem ser no sentido do aumento ou da diminuição da atividade, dependendo da enzima em questão; por exemplo, enzimas relacionadas a estresses geralmente têm sua atividade aumentada quando expostas a essas condições, enquanto as envolvidas na degradação de determinado substrato terão sua atividade acrescida quando a disponibilidade do respectivo substrato no ambiente também aumenta (Andersson et al., 2004; Wallenstein & Weintraub, 2008). Em alguns casos, atividades enzimáticas podem se elevar em consequência da deficiência ou

da forma (orgânica ou mineral) em que se apresentam determinados nutrientes no solo como o P e S (Tarafdar & Marschner, 1994; Nogueira & Melo, 2003).

Diversos estudos têm evidenciado ampla variação nas atividades enzimáticas, de acordo como os sistemas de uso do solo. Em solos degradados, ocorre diminuição da biomassa microbiana e em sua atividade (Gupta & Germida, 1988), que geralmente é acompanhada pela diminuição das atividades enzimáticas associadas aos ciclos biogeoquímicos. Dick (1984) encontrou maiores atividades enzimáticas em solos sob plantio direto, em comparação ao plantio convencional. Embora haja vários estudos correlacionando as atividades enzimáticas com o uso e manejo do solo, muito pouco se conhece sobre esses efeitos em condições tropicais e subtropicais. Nas condições brasileiras, estudos com esse enfoque foram realizados por Mendes et al. (2003), Balota et al. (2004), Carneiro et al. (2004), Carneiro et al. (2009), Lisboa et al. (2012), Fagotti et al. (2012) e Bini et al. (2013). Resultados obtidos em condições subtropicais (Balota et al., 2004) têm reportado tendências semelhantes às aquelas encontradas em condições temperadas (Dick, 1994), sugerindo que as avaliações de atividade enzimática podem constituir uma medida robusta para estimar a atividade biológica ou dos processos bioquímicos no solo em diferentes ambientes (Nayak et al., 2007).

Vários autores relatam maiores atividades enzimáticas em sistemas conservacionistas frente a cultivos convencionais (Melero et al., 2008; Qin et al., 2010; Peixoto et al., 2010). Balota et al. (2004) observaram aumento na atividade das enzimas amilase, celulase, arilsulfatase e fosfatases em sistema de plantio direto; as rotações de culturas também influenciaram as atividades enzimáticas. De modo geral, as maiores atividades de enzimas como a celulase e amilase estão relacionadas diretamente com o maior teor de C na camada superficial em solo sob plantio direto. Já a atividade das enzimas fosfatases pode ser inibida pela aplicação de fertilizantes fosfatados. Nesse caso, como no sistema de plantio direto, o revolvimento do solo é restrito à linha de semeadura e a faixa de atuação do fertilizante, mais restrita; assim, o efeito na atividade enzimática é menor que no plantio convencional, em que o fertilizante é incorporado em área total (Carneiro et al., 2004; Melero et al., 2008; Peixoto et al., 2010). Entretanto, a atividade da fosfatase também apresenta forte relação com o C orgânico total do solo, quando ocorre conversão do sistema de plantio convencional para o plantio direto (Figura 13).



**Figura 13. Variação da atividade da fosfatase ácida em razão da variação dos teores de carbono orgânico total (COT) do solo, em decorrência da mudança do sistema de manejo do solo do plantio convencional (PC) para o plantio direto (PD), com base nos resultados de Mendes et al. (2003), Balota et al. (2004), Carneiro et al. (2004), Carneiro et al. (2009) e Lisboa et al. (2012).**

Doyle et al. (2006), em experimento utilizando duas fontes de celulose, verificaram que a atividade da celulase variava tanto com a época do ano quanto com a qualidade da fonte de celulose, indicando que a atividade dessa enzima depende da qualidade do substrato sobre o qual atua. Dessa forma, diferentes coberturas vegetais, com resíduos qualitativamente distintos (relação C/N, teor de celulose, teor de lignina, presença de resinas, monoterpenos, taninos etc.), podem influenciar distintamente na atividade de celulasas no solo (Bini et al., 2013). Andersson et al. (2004), avaliando a atividade da celulase na serapilheira, na camada húmica e na camada mineral de um solo sob floresta, encontraram maior atividade na serapilheira, onde há maior quantidade de celulose, observando correlação entre a atividade da celulase e o C da biomassa microbiana, a respiração basal e a relação C/N do substrato. Resultados semelhantes foram encontrados por Bini et al. (2013), que observaram maiores atividades de celulase em áreas sob cultivo de pinus, em comparação com áreas reflorestadas ou fragmentos florestais nativos com *Araucaria*. Entretanto, na área agrícola, mesmo sob plantio direto, a atividade da celulase foi significativamente menor que nas

áreas florestais, o que foi atribuído ao menor aporte de resíduos orgânicos nas áreas agrícolas e à diminuição da atividade e biomassa microbiana.

A atividade da amilase correlacionou-se positivamente com o C microbiano e C orgânico total (Badiane et al., 2001). Maiores atividades foram encontradas em áreas de pousio mais antigas, onde predominavam espécies arbóreas e maior diversidade e aporte de resíduos orgânicos ao solo. Nas áreas há menos tempo sob pousio, com menor atividade enzimática, havia o predomínio de gramíneas, indicando menor aporte e diversidade de resíduos sobre o solo.

Menor atividade de enzimas relacionadas ao ciclo do C foi observada em área agrícola em relação à pastagem (Acosta-Martínez et al., 2007). Já as atividades de desidrogenase e celulase foram maiores quando a cultura do arroz recebeu fertilizante, possivelmente pelo estímulo da adubação à atividade microbiana (Nayak et al., 2007).

Balota et al. (2004) encontraram diferenças nas atividades das enzimas celulase e amilase, influenciadas pelo manejo do solo (plantio convencional e direto), pela profundidade de amostragem e pelo teor de matéria orgânica. A atividade enzimática foi maior na camada mais superficial e apresentou correlações positivas com o teor de C total e a biomassa microbiana. Similarmente, Nogueira & Melo (2003) encontraram correlação positiva entre a atividade da arilsulfatase e os teores de S total do solo, que está em sua maior parte na matéria orgânica. Dessa forma, evidencia-se que a maior atividade enzimática geralmente está relacionada com maiores teores de C orgânico, que por sua vez contém a maior parte dos substratos sobre os quais atuam as enzimas.

manutenção de palhada na superfície do solo sob plantio direto estimula a atividade enzimática, pois ocorre decomposição mais lenta dos resíduos orgânicos, mantendo condições de temperatura e umidade mais adequadas para a comunidade microbiana, em comparação ao plantio convencional. Melero et al. (2008) notaram correlação inversa entre pH e atividade da enzima desidrogenase e correlação direta entre a atividade dessa enzima e o C orgânico do solo. Maior atividade da desidrogenase foi encontrada por Mikanová et al. (2009) em solo sob plantio direto, em comparação ao plantio convencional, na profundidade de 0-10 cm. Dessa forma, sob plantio direto, a manutenção de C no solo estimula a produção de enzimas pela comunidade microbiana (Nayak et al., 2007). A manutenção do sistema radicular das culturas anteriores em razão do não revolvimento do solo, que favorece a biomassa microbiana (Balota et al., 2004), também beneficia a atividade enzimática no plantio direto.

Trabalhos realizados no Brasil enfocando a conversão do sistema de plantio convencional para o sistema de plantio direto indicam que geralmente há aumento das atividades enzimáticas sob plantio direto (Quadro 4). A atividade da  $\alpha$ -glicosidase aumentou entre 95 e 117 % no plantio direto, em relação ao plantio convencional. A celulase foi elevada de 27 a 43 %, a fosfatase ácida variou de -3 a 94 % e a fosfatase alcalina, de 27 e 55 %; o que mais chamou a atenção foi o aumento da atividade da arilsulfatase, que foi superior a 100 % em todos os casos, quando da conversão do plantio convencional para o plantio direto (Quadro 4).

Algumas enzimas como a desidrogenase permitem inferir sobre a atividade microbiana do solo, pois estão relacionadas com a cadeia de transporte de elétrons na cadeia respiratória (Casida et al., 1964). Pascual et al. (2000) avaliaram a atividade da desidrogenase em solos intensamente cultivados e em solos com diferentes períodos de abandono para regeneração da vegetação nativa, encontrando menores atividades em solos abandonados há mais tempo, comparadas às encontradas em solos abandonados há menos de 10 anos. A diminuição da atividade da enzima com o passar do tempo de abandono do solo foi atribuída à sua maior degradação, decorrente da erosão resultante da falta de cobertura vegetal, incapaz de se restabelecer num solo intensamente degradado. No entanto, maior atividade de desidrogenase em solo agrícola comparada a solos florestais mais preservados foi atribuída ao maior estresse metabólico da comunidade microbiana, visto que esse esteve relacionado com o coeficiente metabólico ( $qCO_2$ ), indicando maior fluxo de elétrons por causa da condição estressante aos microrganismos (Bini et al., 2013). Lizarazo et al. (2005) observaram que a adição de húmus ao solo aumentou a atividade da desidrogenase, possivelmente pelo estímulo à comunidade microbiana. Bastida et al. (2006) avaliaram a atividade microbiológica em solos desflorestados e constataram efeito negativo na atividade da desidrogenase quando a vegetação nativa tinha sido removida há 15 anos, comparada ao solo sob vegetação natural.

**Quadro 4. Efeitos da conversão do sistema de manejo do solo do plantio convencional para o plantio direto sobre as atividades de enzimas relacionadas a ciclos do C (â-glicosidase e celulase), do P (fosfatases ácida e alcalina) e do S (arilsulfatase) e teor de C orgânico total**

Uso do solo Plantio direto (PD) x Convencional (PC)	Ciclo do C		Ciclo do P		Ciclo do S	C orgânico total	Referência
	β-glicosidase <sup>(1)</sup>	Celulase <sup>(2)</sup>	F. ácida <sup>(1)</sup>	F. alcalina <sup>(1)</sup>	Arilsulfatase <sup>(1)</sup>		
	μg g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> de PNF	μg g <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> de AR	μg g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> de PNF				
PD 0-5 cm, soja/trigo		150	792	186	18,7	20,6	Balota et al. (2004)
PC 0-5 cm, soja/trigo		118	621	147	8,9	15,3	
Variação ( %) no PD		+27	+27	+27	+110	+35	
PD 5-10 cm, soja/trigo		96	633	160	20,4	17,3	Balota et al. (2004)
PC 5-10 cm, soja/trigo		67	482	103	8,0	13,4	
Variação ( %) no PD		+43	+31	+55	+155	+29	
PD 0-7 cm, rotação de culturas (média de 4 épocas)	123		148		133	23,9	Lisboa et al. (2012)
PC 0-7 cm, rotação de culturas (média de 4 épocas)	63		112		59	15,3	
Variação ( %) no PD	+95		+32		+125	+56	
PD 0-10 cm, soja, milho, sorgo, soja			143			30,6	Carneiro et al. (2009)
PC 0-10 cm, milho, milheto, soja, milheto			147			34,2	
Variação ( %) no PD			-3			-10	
PD 0-5 cm, sem cultura de cobertura no inverno	52		499		48	19,0	Mendes et al. (2003)
PC 0-5 cm, arado de discos e grade niveladora	24		257		16	13,5	
Variação ( %) no PD	+117		+94		+200	+40	
PD 0-5 cm, amostragem em julho			417			16,8	Carneiro et al. (2004)
PC 0-5 cm, amostragem em julho			427			17,4	
Variação ( %) no PD			-2			-3,5	
PD 0-5 cm, amostragem em janeiro			897			19,1	Carneiro et al. (2004)
PC 0-5 cm, amostragem em janeiro			664			16,2	
Variação ( %) no PD			+35			+18	

<sup>(1)</sup> PNF: *p*-nitrofenol, a 37 °C; e <sup>(2)</sup> AR: açúcar redutor, a 50 °C.

Sistemas de manejo que minimizam o revolvimento do solo, que maximizam o aporte de resíduos orgânicos e que se baseiam na rotação de culturas favorecem a qualidade do solo e apresentam maior atividade microbiológica. Isso acaba refletindo numa maior produção de enzimas e, com o tempo, no acúmulo de enzimas protegidas e estabilizadas na matriz do solo (Bandick & Dick, 1999; Balota et al., 2004; Mendes et al., 2003; Peixoto et al., 2010). Vários trabalhos têm reportado a capacidade de as enzimas do solo detectarem mudanças em razão do sistema de manejo antes mesmo que alterações no C ou N microbianos sejam observadas (Kandeler et al., 1999; Knupp et al., 2010; Peixoto et al., 2010). Esse efeito geralmente é atribuído ao fato de que a biomassa microbiana ativa do solo inicialmente tende a aumentar a produção de enzimas por causa do manejo adotado ou do substrato adicionado ao solo, sem que isso se reflita em aumento de biomassa propriamente dita; solos de cerrado sob plantio direto, por exemplo, apresentam baixos teores de C microbiano e elevados níveis de atividade de  $\beta$ -glucosidase, em relação a áreas sob vegetação nativa (Matsuoka et al., 2003; Mendes et al., 2003; Peixoto et al., 2010). Isso pode ser explicado pela qualidade do resíduo vegetal que é aportado ao solo nas duas condições, de maior complexidade nas áreas nativas, reduzindo a atividade da  $\beta$ -glicosidase e de menor complexidade nas áreas cultivadas, aumentando a atividade dessa enzima.

## USO DE ENZIMAS EM BIORREMEDIAÇÃO

Entre os vários processos e estratégias usados para biorremediação de ambientes contaminados, uma alternativa de grande potencial biotecnológico e ambiental é o uso de enzimas livres de células vivas. Por apresentarem alta especificidade e serem de origem proteica ou peptídica, essas enzimas não geram subprodutos tóxicos ou indesejáveis.

Enquanto os microrganismos podem se reproduzir e aumentar sua população, as enzimas extracelulares não podem. Além disso, as enzimas extracelulares não possuem capacidade de se adaptarem a alterações das condições ambientais e podem perder sua atividade depois de interagir com as substâncias poluentes. Entretanto, a utilização de enzimas livres de células tem várias vantagens em relação à utilização de células microbianas (Gianfreda & Rao, 2004).



## Enzimas extracelulares

Para que ocorra a degradação, o poluente precisa interagir com os sistemas enzimáticos dos organismos degradadores. Se as substâncias forem solúveis, podem entrar facilmente nas células; entretanto, se forem insolúveis, devem ser convertidas em formas solúveis para serem disponibilizadas aos organismos. Enzimas extracelulares liberadas no meio iniciam a degradação seguidas por uma variedade de enzimas oxirredutases e hidrolases, que atuam na degradação parcial das substâncias, tornando-as disponíveis para os organismos com maior solubilidade em água e maior degradabilidade, culminando na mineralização.

Para serem utilizadas na biorremediação, as enzimas podem estar em solução aquosa ou imobilizadas em matrizes. Enzimas em solução podem ser adicionadas em um ponto e se espalham por dispersão, difusão e fluxos de águas superficiais e subterrâneas, o que possibilita que a enzima atue em toda área contaminada e se movimente por fluxo por longa distância (Gianfreda & Rao, 2004). A grande desvantagem de utilizar enzimas em solução é que são menos estáveis que as imobilizadas quanto à sua susceptibilidade à temperatura, concentração de substrato e alteração de pH, podendo perder sua atividade mais rapidamente. Outra grande desvantagem é que a solução não pode ser recuperada e reutilizada após o término da remediação (Ruggaber & Talley, 2006).

## Enzimas extracelulares de origem microbiana

Muitas enzimas oxirredutases microbianas têm sido estudadas com relação ao seu efeito na degradação de poluentes. Essas enzimas incluem as oxigenases, mono-oxigenases e dioxigenases, como as enzimas originárias de fungos basidiomicetos, que degradam madeira; suas enzimas extracelulares degradam a lignina, além de produzirem outras não lignolíticas (celobiose dehidrogenase), que têm capacidade de oxidar várias substâncias poluentes (Reddy, 1995; Pointing, 2001). Podem ser citadas como exemplo a lacase, a lignina peroxidase (LiP), a manganês peroxidase (MnP) e a peroxidase versátil (PV), que são efetivas na degradação de poluentes.

A lacase (*p*-difenol:dióxido-redutase) constitui um grupo de enzimas que catalisam a oxidação de grande variedade de substâncias aromáticas e fenólicas com concomitante redução para oxigênio e água (Gianfreda et al., 1999; Mayer & Staples, 2002). As peroxidases são enzimas que catalisam

a oxidação de lignina e outros compostos fenólicos à custa de peróxido de hidrogênio, na presença de um mediador.

Muitas plantas das famílias *Fabaceae*, *Gramineae* e *Solanaceae* também produzem oxirredutases que oxidam alguns poluentes, como solventes clorinados, explosivos e hidrocarbonos de petróleo (Durán & Esposito, 2000).

As hidrolases extracelulares são produzidas por muitos microrganismos e incluem proteases, carbo-hidrolases (celulases, amilase, xilanase etc.), esterases, fosfatases e fitases. As proteases e carbo-hidrolases catalisam a hidrólise de macromoléculas, como proteínas e carboidratos, em moléculas menores para absorção subsequente pelas células. As fosfatases e fitases contribuem para a nutrição de plantas e microrganismos pela hidrólise de compostos orgânicos de P para P inorgânico.

As enzimas hidrolíticas podem clivar ligações químicas importantes em moléculas tóxicas, resultando na redução de sua toxicidade. Esse mecanismo é eficaz na biodegradação em área contaminada com vários poluentes como óleo ou inseticidas organofosforados e carbamatos. Algumas enzimas hidrolíticas extracelulares como hemicelulase, celulase e glucosidade são importantes na degradação da matéria orgânica; citam-se, como exemplos, as enzimas celulases de *Penicillium funiculosum* e *Trichoderma reesei*, utilizadas para degradar resíduos de papel (van Wyk, 1999), e quitinases, na degradação de poluentes no solo. Estudos têm apresentado também que o fungo *Chrysosporium keratinophilum* produz significativa quantidade de enzimas proteolíticas extracelulares que degradam queratina, resíduos decorrentes da criação de animais e subprodutos da indústria de papel (Singh, 2002).

Vários estudos têm isolado e caracterizado microrganismos envolvidos na degradação de poliuretano e seus derivados (Howard, 2002), em que esterases e depolimerases estão envolvidas nessa degradação; uma dessas enzimas foi identificada e purificada de *Comamonas acidovorans* (Nakajima-Kambe et al., 1999). Enzimas ligninolíticas produzidas pelos fungos *Phanerochaete chrysosporium* e *Trametes versicolor* também apresentam capacidade de degradar o náilon, um polímero linear sintético não susceptível à ação de proteases (Deguchi et al., 1997).

A enzima lipase degrada lipídeos derivados de grande variedade de microrganismos, animais e plantas e tem potencial como indicadora da degradação de hidrocarbonetos no solo (Riffaldi et al., 2006).

Vários microrganismos produzem enzimas com capacidade de hidrolisar compostos organofosforados, denominadas organofosforados ácido

anidrases ou fosfotriesterase, paration hidrolase, somanases e paraoxonase (Gianfreda & Bollag, 2002). A paration hidrolase aumenta a degradação do agroquímico em até 1.000 vezes, em relação aos métodos químicos. Existem também hidrolases responsáveis pela degradação de outros agroquímicos como malation, atrazina, simazina, desetilatrazna, carbamato (carbofuran e carbaril) e aldicarb (Gianfreda & Bollag, 2002).

## Enzimas extracelulares de origem vegetal

Uma importante contribuição no processo de degradação de poluentes pode vir de enzimas degradativas liberadas por raízes de plantas. Essas enzimas são normalmente associadas à parede celular e transformam as substâncias na rizosfera, tornando-as disponíveis para as raízes e microrganismos. Várias espécies liberam considerável quantidade de enzimas oxidasas e hidrolases na rizosfera (Gramms et al., 1999).

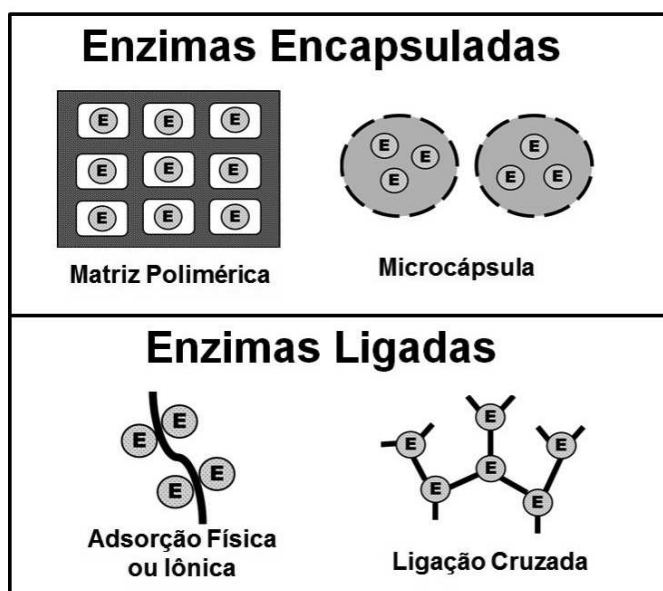
A horseperoxidase (HRP) é uma peroxidase liberada por pelos radiculares de uma espécie de nabo nativo (*Armoracia rusticana*) conhecida como *horseradish* e tem capacidade de catalisar a oxidação de fenóis, anilinas, benzinhas e compostos aromáticos (Durán & Esposito, 2000). Em estudos *in vitro*, a degradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos estava relacionada com peroxidases de várias espécies vegetais, como *Ipometa batatas*, que pode produzir peroxidases com capacidade de transformar vários ácidos hidroxibenzóicos (Gianfreda & Rao, 2004).

## Imobilização de enzimas

As dificuldades na utilização de enzimas livres, bem como sua instabilidade, têm estimulado a busca de alternativas como a imobilização de células microbianas ou de enzimas. A imobilização de enzimas objetiva sua fixação em uma matriz, de modo que sua atividade catalítica não seja significativamente afetada, para posterior aplicação ao solo (Canilha et al., 2006).

A imobilização enzimática oferece algumas vantagens na biorremediação em relação à sua utilização na forma livre (Fernandez-Lafuente et al., 2000). As enzimas imobilizadas apresentam decréscimo na sua atividade e o  $K_m$  aumentado, em relação às enzimas livres. Essas alterações são resultantes de trocas estruturais introduzidas na enzima pela aplicação da matriz, criando um microambiente em que a enzima trabalha.

A imobilização de enzimas pode ser classificada em quatro tipos: separação por membrana, encapsulamento em polímeros, adsorção e ligações covalentes (Vitolo, 2001; Cardoso et al., 2009) (Figura 14). Na separação por membrana, a enzima é fisicamente separada do meio de reação por uma película (membrana) semipermeável. No encapsulamento em polímeros, as enzimas são aprisionadas entre as malhas de um polímero geliforme. Já a adsorção consiste da união entre a molécula enzimática e um suporte inerte, que pode ser orgânico (derivados da celulose, DOWEX) ou inorgânico (celite, bentonita e alumina). Finalmente, na imobilização da enzima pela formação de ligações covalentes ocorre ligação ao suporte inerte estabelecida entre os amino grupos primários e o anel fenólico dos aminoácidos constituintes da enzima com os grupos reativos do suporte, principalmente -CHO.



**Figura 14. Alguns exemplos de métodos de imobilização de enzimas para aplicações biotecnológicas.**

Materiais inertes utilizados na imobilização de enzimas variam de materiais geliformes até superfícies sólidas (lâminas de aço ou pérolas de vidro) recobertas com alguma substância capaz de interagir com a enzima. O método de imobilização e o tipo de suporte dependem das características da enzima e das condições de uso da enzima imobilizada, não existindo

um método geral de imobilização e nem um suporte universal. Alguns exemplos são apresentados no quadro 5.

**Quadro 5. Exemplos de suportes utilizados para a imobilização de enzimas**

Suporte	Microrganismo	Enzima
Eupergit C	<i>Bacillus circulans</i>	Beta-galactosidase
	<i>Aspergillus oryzae</i>	Alfa-galactosidase
	<i>Thermoanaerobacter</i> sp.	Ciclodextrina, glicosiltransferase
	<i>Aspergillus niger</i>	B-glicosidase
	<i>Candida rugosa</i>	Lipase
Alumina	<i>Bacillus</i> sp.	Catalase
	<i>Aspergillus niger</i>	Glucoamilase
	<i>Candida antarctica</i>	Lipase
	<i>Bacillus subtilis</i>	Amilase
Alumina, quitosana, celulose	<i>Aspergillus niger</i>	Catalase
Sílica gel	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Invertase
	<i>Caldariomyces fumago</i>	Cloroperoxidase
Sílica gel e alumina	<i>Candida cylindracea</i>	Lipase

Fonte: Adaptado de Canilha et al. (2006).

A imobilização da enzima causa algum tipo de alteração no seu efeito catalítico relacionada à estrutura da macromolécula. Geralmente a atividade é menor que a da enzima livre, mas apresenta maior estabilidade, podendo atuar numa faixa mais ampla de pH e temperatura, além de menor interferência de inibidores ou ativadores. Além disso, a imobilização de enzimas permite o reaproveitamento do catalisador e o uso da enzima em processo contínuo. Como desvantagens, destacam-se a aleatoriedade da união suporte-enzima, a inexistência de um método geral de imobilização e a enzima a ser imobilizada exige alto grau de pureza.

As enzimas aprisionadas em um suporte sólido dependem da difusão do substrato orgânico presente no solo, podendo ser utilizadas somente se o poluente for solúvel. Entretanto, formulações que permitem liberação lenta de enzimas no solo podem possibilitar que atuem tanto sobre substratos solúveis quanto insolúveis.

Investigando o uso de fosfotriesterase produzida por *Pseudomonas putida*, imobilizada em tritilo agarose para detoxificar pesticidas organofosforados, os parâmetros cinéticos da enzima imobilizada foram comparáveis aos da enzima livre e a hidrólise chegou a 90 %, sendo capaz de hidrolisar também outros agroquímicos como organofosforados, metilparathion, paration etílico e diazinon (Caldwell & Raushel, 1991). O uso da tirosinase imobilizada para a remoção de resíduos fenólicos de águas residuárias também foi eficiente, havendo pouca redução da atividade enzimática mesmo depois de repetidos tratamentos (Wada et al., 1993). Resultados semelhantes foram obtidos com as enzimas lacase e peroxidase, livres ou imobilizadas, para descontaminar diferentes tipos de solos poluídos por 2,4-diclorofenóis. A lacase e peroxidase removeram até 60 % do poluente em solo com baixo teor de matéria orgânica, mas com o aumento do teor de matéria orgânica ocorreu efeito inibitório sobre a atividade das enzimas, tanto livres como imobilizadas (Ruggiero et al., 1989; Gianfreda & Bollag, 1994).

A utilização dessa técnica ainda apresenta problemas econômicos e de eficiência. O processo de produção das enzimas é caro, mas o uso da transgenia para obtenção de microrganismos com expressão gênica maximizada para produção da enzima de interesse pode baratear os custos (Ahuja et al., 2004).

## METAGENÔMICA E ENZIMAS DO SOLO

O solo é considerado a maior fonte de diversidade microbiana de todos os ecossistemas terrestres (Curtis et al., 2002); 1,0 g de solo pode conter até 10 bilhões de microrganismos, com possivelmente milhares de espécies (Amann et al., 1995; Rosseló-Mora & Amann, 2001). Além de abrigar microrganismos com papéis essenciais, o solo também representa a principal fonte da maioria dos biocatalisadores, antibióticos e metabólitos secundários de importância na indústria, medicina e agricultura. É grande o potencial econômico desse mercado e, tomando como exemplo somente o caso das enzimas, a previsão de ganhos no mercado norte-americano em 2014 é de US\$ 2,18 bilhões, com crescimento industrial de 4,8 % ao ano (Silva et al., 2011).

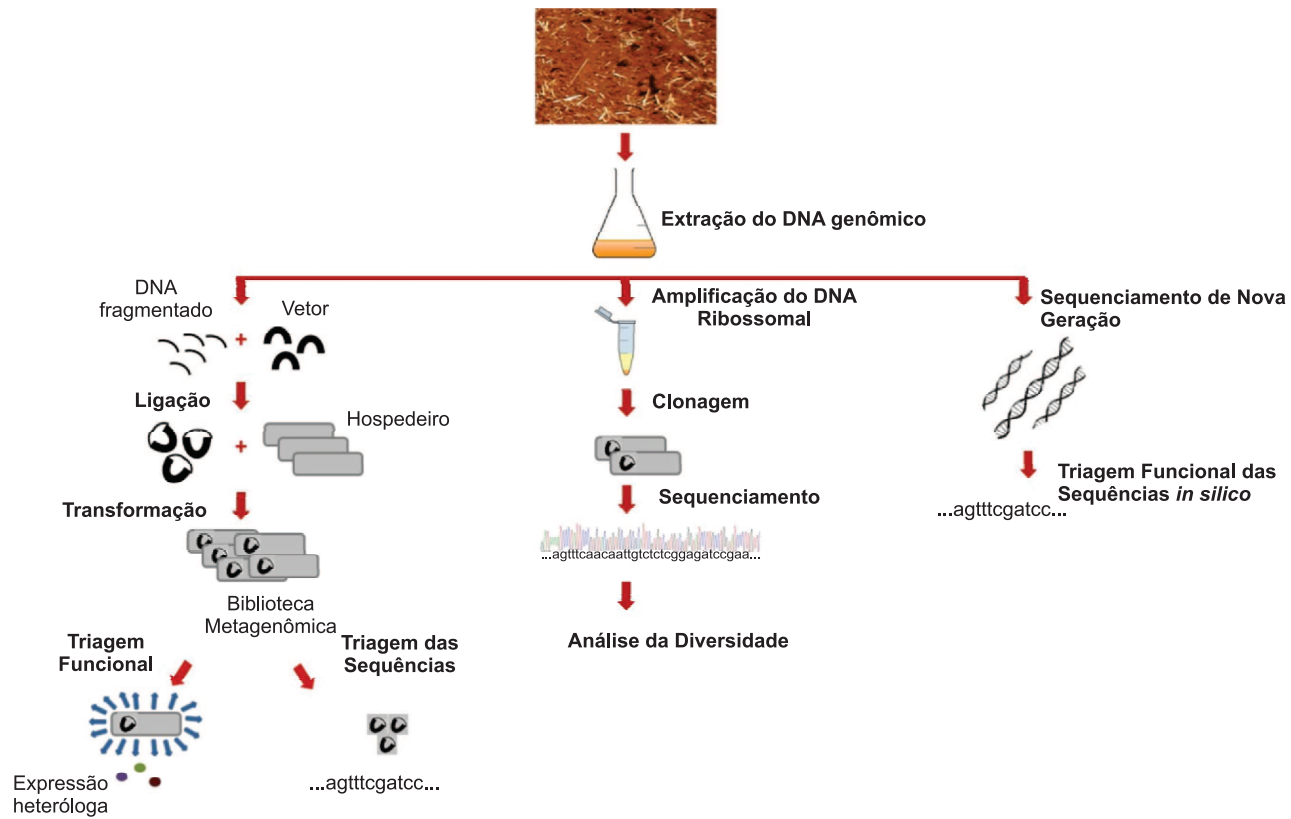
Por muito tempo, a descrição de espécies ou táxons e o isolamento de enzimas e produtos antimicrobianos foram realizados com base em cultivos em meio artificial (Rodríguez-Valera, 2002). Essa técnica, porém, não permite o crescimento da maioria dos microrganismos, estimando-se que somente 0,1 a 1 % dos microrganismos do solo seja cultivável (Torsvik et al., 1990; Amann et al., 1995), indicando que os outros 99 % representem espécies

desconhecidas, ou não identificadas, que poderiam compor novos filos e domínios. Além disso, é possível que muitas espécies do solo tenham sido ou estão sendo perdidas antes mesmo de serem estudadas (Beare et al., 1995). Pelo uso de técnicas tradicionais de cultivos microbianos, é pequena a probabilidade de encontrar novos compostos, pois o uso das mesmas metodologias em geral direciona para o isolamento das mesmas biomoléculas (Handelsman et al., 1998).

Com o desenvolvimento da biologia molecular, novos métodos permitiram maior conhecimento da diversidade microbiana do solo, bem como da prospecção de genes de interesse biotecnológico; uma compilação dos principais métodos moleculares está disponível no livro de Cooper & Rao (2006). Dentre os mais utilizados nas últimas décadas, destacam-se o DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*, eletroforese em gel com gradiente desnaturante) (Kozdrój & van Elsas, 2001; Peixoto et al., 2006; Helgason et al., 2010) e a análise de ácidos graxos (Kozdrój & van Elsas, 2001; Helgason et al., 2010). Contudo, os resultados com o uso desses métodos ainda estão limitados à detecção de apenas parte da diversidade microbiana do solo.

Em 1998, a pesquisadora norte-americana Jo Handelsman usou pela primeira vez o termo metagenômica para identificar o uso de técnicas moleculares independentes de cultivo para a análise do metagenoma total de uma amostra (Handelsman et al., 1998). As primeiras aplicações da metagenômica consistiram na extração do DNA diretamente da amostra, então clonado em um vetor e transformado em uma célula hospedeira, produzindo bibliotecas onde é possível fazer a triagem, que pode ser funcional ou de sequências (Handelsman, 2005). Com a evolução nas tecnologias de sequenciamento, passou a ser possível realizar a metagenômica a partir da extração do DNA total de uma determinada amostra, com posterior emprego de programas de bioinformática para a análise das sequências, podendo ser investigada a diversidade genética e funcional. Na figura 15, pode ser visualizado um esquema com as abordagens mais utilizadas em pesquisas com metagenômica.

Figura 15. Esquema com as abordagens mais utilizadas em pesquisas de metagenômica de solos.





Com a metagenômica tornou-se possível determinar a diversidade e a atividade de comunidades, vias metabólicas, microrganismos ou genes específicos (Steele & Streit, 2005), passando a ser empregada em estudos em ambientes diversos, como o intestino humano e animal (Guan et al., 2007; Qin et al., 2010), águas doces e salgadas (Venter et al., 2004; Cottrell et al., 2005), biofilmes (Schmeisser et al., 2003) e sedimentos (Couto et al., 2010). Outros estudos também foram conduzidos em metagenômica de solos como os de Allen et al. (2009), Yin et al. (2010) e Delmont et al. (2012). Contudo, ainda são escassos os trabalhos incluindo solos brasileiros (Roesch et al., 2007; Souza, 2012). A maioria dos estudos de metagenômica conduzidos até o momento tem por objetivo principal a avaliação de biodiversidade e não a busca por produtos biotecnológicos.

Embora ainda representem a minoria dos estudos de metagenômica, o interesse pela busca de novas biomoléculas vem aumentando. Existe grande interesse na identificação de novos antibióticos (Silva et al., 2011; Torres-Cortés et al., 2011) e também em enzimas, como lipases (Henne et al., 2000; Cieslinski et al., 2009), esterases (Elend et al., 2006; Heath et al., 2009), celulasas (Duan et al., 2009), proteases (Waschkowitz et al., 2009), amilases (Sharma et al., 2010) e quitinases (Hjort et al., 2010), que foram descobertas pela metagenômica. No quadro 6, são apresentados alguns exemplos de enzimas que foram isoladas de trabalhos de metagenômica do solo, evidenciando o esforço necessário para identificar biocatalizadores, com a necessidade de análise de milhares de clones.

**Quadro 6. Exemplos de biocatalisadores isolados de metagenomas do solo**

Enzima	Clone <sup>(1)</sup>	Caracterização	Referência
Lipase/esterase	21.000/1	Massa molecular, faixa de pH e temperatura, atividade enzimática e especificidade de substrato	Fan et al. (2012)
	10.000/1	Massa molecular, ponto isoelétrico, temperatura e pH ótimo e análise filogenética	Hu et al. (2012)
	342.800/37	Especificidade de substrato e análise filogenética	Nacke et al. (2011)
	30.000/1	pH e temperatura ótima e análise filogenética	Jiang et al. (2011)
	142.900/1	pH e temperatura ótima, atividade enzimática e análise filogenética	Lee et al. (2010)
Celulase	364.568/3	Massa molecular, faixa de pH e temperatura	Nacke et al. (2012)
	3.024/1	Faixa de pH e temperatura e atividade enzimática	Liu et al. (2011)
Amilase	76.000/1	pH e temperatura ótima e atividade enzimática	Vidya et al. (2011)
	35.000/1	Massa molecular, atividade enzimática e pH e temperatura ótima	Sharma et al. (2010)
Protease	47.000/2	Massa molecular e pH e temperatura ótima	Neveu et al. (2011)

<sup>(1)</sup> Total de clones/número de clones positivos.

Há muito tempo enzimas são isoladas do cultivo de microrganismos do solo, em razão da rapidez de crescimento desses microrganismos, produtividade e termoestabilidade (Burhan et al., 2003). Contudo, a metagenômica funcional tem expandido esse potencial, possibilitando acessar também os microrganismos não cultiváveis (Schloss & Handelsman, 2003; Daniel, 2005). Com a metagenômica, há perspectivas de encontrar novas enzimas em microrganismos do solo, com melhores propriedades para aplicação industrial, como maior eficiência catalítica, maior estabilidade em temperaturas elevadas e pH e maior tolerância à inibição pelo produto final. Além disso, compreender outros possíveis papéis das enzimas do solo é vital para a qualidade do solo e o manejo da fertilidade nos ecossistemas. Como exemplo, na comparação de um solo sob o sistema de plantio direto com qualidade e outro sob sistema convencional, Souza (2012) identificou que microrganismos da ordem Rhizobiales e do domínio Archaea poderiam ser utilizados como bioindicadores de qualidade do solo. Finalmente, outras ferramentas como a metatranscriptômica (Moran, 2009) e a metaproteômica (Maron et al., 2007) começam a ser utilizadas com maior frequência e deverão contribuir para a descoberta de novas enzimas provenientes de microrganismos do solo nos próximos anos.

## LITERATURA CITADA

- ABDELMAGID, H.M. & TABATABAI, M.A. Nitrate reductase activity of soils. *Soil Biol. Biochem.*, 19:412-427, 1987.
- ACOSTA-MARTINEZ, V. & TABATABAI, M.A. Enzyme activities in a limed agricultural soil. *Biol. Fert. Soils*, 31:85-91, 2000.
- ACOSTA-MARTÍNEZ, V.; CRUZ, L.; SOTOMAYOR-RAMÍREZ, D. & PÉREZ-ALEGRÍA, L. Enzyme activities as affected by soil properties and land use in a tropical watershed. *Appl. Soil Ecol.*, 35:35-45, 2007.
- AHUJA, S.K.; FERREIRA, G.M. & MOREIRA, A.R. Utilization of enzymes for environmental applications. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 24:125-154, 2004.
- ALEF, K. & NANNIPIERI, P. *Methods in applied microbiology and biochemistry*. New York, Academic Press, 1995. 576p.
- ALLEN, H.K.; MOE, L.A.; RODBURNER, J.; GAARDER, A. & HANDELSMAN, J. Functional metagenomics reveals diverse  $\beta$ -lactamases in a remote Alaskan soil. *ISME J.*, 3:243-251, 2009.
- AMANN, R.L.; LUDWIG, W. & SCHLEIFER, K.H. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.*, 59:143-169, 1995.

- ANDERSSON, M.; KJØLLER, A. & STRUWE, S. Microbial enzyme activities in leaf litter, humus and mineral soil layers of European forests. *Soil Biol. Biochem.*, 36:1527-1537, 2004.
- ANDRADE, S.A.L. & SILVEIRA, A.P.D. Biomassa e atividade microbiana do solo sob influência de chumbo e da rizosfera da soja micorrizada. *Pesq. Agropec. Bras.*, 39:1191-1198, 2004.
- AON, M.A. & COLANERI, A.C. II Temporal and spatial evolution of enzymatic activities and physico-chemical properties in an agricultural soil. *Appl. Soil Ecol.*, 18:255-270, 2001.
- ARMAS, C.M.; SANTANA, B.; MORA, J.L.; NOTARIO, J.S.; ARBELO, C.D. & RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, A. A biological quality index for volcanic Andisols and Aridisols (Canary Islands, Spain): Variations related to the ecosystem degradation. *Sci. Total Environ.*, 378:238-244, 2007.
- BADIANE, N.N.Y.; CHOTTE, J.L.; PATE, E.; MASSE, D. & ROULAND, C. Use of soil enzyme activities to monitor soil quality in natural and improved fallows in semi-arid tropical regions. *Appl. Soil Ecol.*, 18:229-238, 2001.
- BALOTA, E.L.; KANASHIRO, M.; COLOZZI FILHO, A.; ANDRADE, D.S. & DICK, R.P. Soil enzyme activities under long-term tillage and crop rotation systems. *Braz. J. Microbiol.*, 35:300-306, 2004.
- BALOTA, E.L.; MACHINESKI, O. & TRUBER, P.V. Soil enzyme activities under pig slurry addition and different tillage systems. *Acta Sci. Agron.*, 33:729-737, 2011.
- BANDICK, A.K. & DICK, R.P. Field management effects on soil enzyme activities. *Soil Biol. Biochem.*, 31:1471-1479, 1999.
- BASTIDA, F.; MORENO, J.L.; HERNÁNDEZ, T. & GARCÍA, C. Microbiological activity in a soil 15 years after its revegetation. *Soil Biol. Biochem.*, 38:2503-2507, 2006.
- BAYER, E.A.; SHIMON, L.J.W.; SHOHAM, Y. & LAMED, R. Cellulosomes - structure and ultrastructure. *J. Struct. Biol.*, 124:221-234, 1998.
- BEARE, M.H.; COLEMAN, D.C.; CROSSLEY JR, D.A.; HENDRIX, P.F. & ODUM, E.P. A hierarchical approach to evaluating the significance of soil biodiversity to biogeochemical cycling. *Plant Soil*, 170:5-22, 1995.
- BECK, T. & POSCHENRIEDER, H. Experiments on the effect of toluene on the soil microflora. *Plant Soil*, 18:346-357, 1963.
- BECK, T. Die messung der katalase aktivität von böden. *Pflanz. Bodenkd*, 130:68-81, 1971.
- BINI, D.; SANTOS, C.A.; CARMO, K.B.; KISHINO, N.; ANDRADE, G.; ZANGARO, W. & NOGUEIRA, M.A. Effects of land use on soil organic carbon and microbial processes associated with soil health in southern Brazil. *Eur. J. Soil Biol.*, 55:117-123, 2013.
- BORGHETTI, C.; IOACHINI, P.G.; MARZADORI, C. & GESSA, C. Activity and stability of urease-hydroxyapatite and urease-hydroxyapatite-humic acid complexes. *Biol. Fert. Soils*, 38:96-101, 2003.
- BRIGGS, M.H. & SEGAL, L. Preparation and properties of a free soil enzyme. *Life Sci.*, 2:69-73, 1963.
- BURHAN, A.; NISA, U.; GOKHAN, C.; OMER, C.; ASHABIL, A. & OSMAN, G. Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase
- Tópicos Ci. Solo*, 8:221-278, 2013

- from an alkaliphilic *Bacillus* sp. Isolate ANT-6. *Process Biochem.*, 38:1397-1403, 2003.
- BURNS, R.G. Enzymes in soil: Some theoretical and practical considerations. In: BURNS, R.G., ed. *Soil enzymes*. New York, Academic Press, 1978. p.295-339.
- BURNS, R.G. Enzyme activity in soil: Location and possible role in microbial ecology. *Soil Biol. Biochem.*, 14:423-427, 1982.
- BURNS, R.G. Interaction of enzymes with soil mineral and organic colloids. In: HUANG, P.M. & SCHNITZER, M., eds. *Interactions of soil minerals with natural organics and microbes*. Madison, Soil Science Society of America, 1986. p.429-452.
- CALDWELL, S.R. & RAUSHEL, F.M. Detoxification of organophosphate pesticides using an immobilized phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta*. *Biotechnol. Bioeng.*, 37:103-109, 1991.
- CARNEIRO, R.G.; MENDES, I.C.; LOVATO, P.E.; CARVALHO, A.M. & VIVALDI, L.J. Indicadores biológicos associados ao ciclo do fósforo em solos de Cerrado sob plantio direto e convencional. *Pesq. Agropec. Bras.*, 39:661-669, 2004.
- CARNEIRO, M.A.C.; SOUZA, E.D.; REIS, E.F.; PEREIRA, H.S. & AZEVEDO, W.R. Atributos físicos, químicos e biológicos de solo de cerrado sob diferentes sistemas de uso e manejo. *R. Bras. Ci. Solo*, 33:147-157, 2009.
- CANILHA, L.; CARVALHO, W. & SILVA, J.B.A. Biocatalizadores imobilizados. *Biotechnol. Ci. Desenvolv.*, 36:48-57, 2006.
- CARDOSO, C.L.; MORAES, M.C. & CASS, Q.B. Imobilização de enzimas em suportes cromatográficos: uma ferramenta na busca por substâncias bioativas. *Química Nova*, 32:175-187, 2009.
- CASIDA Jr., L.E.; KLEIN, D.A. & SANTORO, T. Soil dehydrogenase activity. *Soil Sci.*, 98:371-376, 1964.
- CERVELLI, S.; NANNIPIERI, P. & SEQUI, P. Interactions between agrochemicals and soil enzymes. In: BURNS, R.G., ed. *Soil enzymes*. London, Academic Press, 1978. p.251-293.
- CHAE, 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 Biol. Biochem.*, 41:822-830, 2009.
- CIESLINSKI, H.; BIALKOWSKA, A.; TKACZUK, K.; DLUGOLECKA, A.; KUR, J. & TURKIEWICZ, M. Identification and molecular modeling of a novel lipase from an Antarctic soil metagenomic library. *Polish J. Microbiol.*, 58:199-204, 2009.
- COOPER, J.E. & RAO, J.R. *Molecular approaches to soil, rhizosphere and plant microorganism analysis*. Cambridge, CABI, 2006. 297p.
- COTTRELL, M.T.; WALDNER, L.A.; YU, L. & KIRCHMAN, D.L. Bacterial diversity of metagenomic and PCR libraries from the Delaware River. *Environ. Microbiol.*, 7:1883-1895, 2005.
- COUTO, G.H.; GLOGAUER, A.; FAORO, H.; CHUBATSU, L.S.; SOUZA, E.M. & PEDROSA, F.O. Isolation of a novel lipase from a metagenomic library derived from mangrove sediment from the south Brazilian coast. *Genetics Molec. Res.*, 9:514-523, 2010.

- CURTIS, T.P.; SLOAN, W.T. & SCANNELL, J.W. Estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 99:10494-10499, 2002.
- DALAL, R.C. Effect of toluene on the energy barriers in urease activity of soils. *Soil Sci.*, 120:256-260, 1975.
- DANIEL, R. The metagenomics of soil. *Nature*, 3:470-478, 2005.
- DEGUCHI, T.; KAKEZAWA, M. & NISHIDA, T. Nylon degradation by lignin-degrading fungi. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63:329-331, 1997.
- DELMONT, T.O.; PRESTAT, E.; KEEGAN, K.P.; FAUBLADIER, M.; ROBE, P.; CLARK, I.M.; PELLETIER, E.; HIRSCH, P.R.; MEYER, F.; GILBERT, J.A.; LE PASLIER, D.; SIMONET, P. & VOGEL, T.M. Structure, fluctuation and magnitude of a natural grassland soil metagenome. *ISME J.*, 6:1677-1687, 2012.
- DENG, S.P. & TABATABAI, M.A. Cellulase activity of soils. *Soil Biol. Biochem.*, 26:1347-1354, 1994.
- DEXTER, A.R. Soil physical quality. Part I. Theory, effects of soil texture, density, and organic matter, and effects on root growth. *Geoderma*, 120:201-214, 2004.
- DICK, W.A. Influence of long-term tillage and crop rotation combinations on soil enzyme activities. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 48:569-574, 1984.
- DICK, R.P. & BURNS, R.G. A brief history of soil enzymology research. In: DICK, R.P., ed. *Methods of soil enzymology*. Madison, Soil Science Society of America, 2011. p.1-19. (Book Series, 9)
- DICK, R.P. Soil enzymes activities as indicators of soil quality. In: DORAN, J.W.; COLEMAN, D.C.; BEZDICEK, D.F. & STEWART, B.A., eds. *Defining soil quality for a sustainable environment*. Madison, Soil Science Society of America, 1994. p.107-124. (Special Publication, 35)
- DICK, R.P.; BREAKWELL, D.P.; & TURCO, R. Soil enzyme activities and biodiversity measurements. In: DORAN, J.W. & JONES, A.J., eds. *Methods for assessing soil quality*. Madison, Soil Science Society of America, 1996. p.247-272. (Special Publication, 49)
- DINESH, R.; GHOSHAL CHAUDHURI, S.; GANESHAMURTHY, A.N. & DEY, C. Changes in soil microbial indices and their relationships following deforestation and cultivation in wet tropical forests. *Appl. Soil Ecol.*, 24:17-26, 2003.
- DOMMERGUES, Y. The effect of infrared and solar radiation on the mineral-nitrogen content and some biological characteristics of the soil. *Agron. Trop.*, 15:381-389, 1960.
- DORAN, J.W. & PARKIN, T.B. Defining and assessing soil quality. In: DORAN, J.W.; COLEMAN, D.C.; BEZDICEK, D.F. & STEWART, B.A., eds. *Defining soil quality for a sustainable environment*. Madison, Soil Science Society of America, 1994. p.3-21. (Special Publication, 35)
- DOYLE, J.; PAVEL, R.; BARNES, G. & STEINBER, Y. Cellulase dynamics in a desert soil. *Soil Biol. Biochem.*, 38:371-376, 2006.
- DUAN, C.-J.; XIAN, L.; ZHAO, G.-C.; FENG, Y.; PANG, H.; BAI, J.-L.; TANG, Q.-S. MA & FENG, J.-X. Isolation and partial characterization of novel genes encoding acidic cellulases from metagenomes of buffalo rumens. *J. Appl. Microbiol.*, 107:245-256, 2009.

- DURÁN, N. & ESPOSITO, E. Potential application of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: A review. *Appl. Catalysis B: Environ.*, 28:83-89, 2000.
- DUNN, C.G.; CAMPBELL, W.L.; FRAM, H. & HUTCHINS, A. Biological and photochemical effects of high energy, electrostatically produced roentgen rays and cathode rays. *J. Appl. Phys.*, 19:605-616, 1948.
- EIVAZI, F. & TABATABAI, M.A. Glucosidases and galactosidases in soils. *Soil Biol. Biochem.*, 20:601-606, 1988.
- EIVAZI, F. & TABATABAI, M.A. Phosphatases in soils. *Soil Biol. Biochem.*, 9:167-172, 1977.
- ELEND, C.; SCHMEISSER, C.; LEGGEWIE, C.; BABIAK, P.; CARBALLEIRA, J.D.; STEELE, H.L.; REYMOND, J.-L.; JAEGER, K.-E. & STREIT, W.R. Isolation and biochemical characterization of two novel metagenoma-derived esterases. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72:3637-3645, 2006.
- ERIKSSON, K.E.L.; BLANCHETTE, R.A. & ANDER, P. Microbial and enzymatic degradation of Wood and wood components. Berlin, Springer-Verlag, 1990. 407p.
- FAGOTTI, D.S.L.; MIYAUCHI, M.Y.H.; OLIVEIRA, A.G.; SANTINONI, I.A.; EBERHARDT, D.N.; NIMTZ, A.; RIBEIRO, R.A.; PAULA, A.M.; QUEIROZ, C.A.S.; ANDRADE, G.; ZANGARO, W. & NOGUEIRA, M.A. Gradients in N-cycling attributes along forestry and agricultural land-use systems are indicative of soil capacity for N supply. *Soil Use Manage.*, 28:292-298, 2012.
- FAN, X.; LIU, X.; HUANG, R. & LIU, Y. Identification and characterization of a novel thermostable pyrethroid-hydrolyzing enzyme isolated through metagenomic approach. *Microbiol. Cell Fact.*, 11:1-11, 2012.
- FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUISAN, J.M.; ALI, S. & COWAN, D. Immobilization of functionally unstable catechol-2,3-dioxygenase greatly improves operational stability. *Enzyme Microbiol. Technol.*, 26:568-573, 2000.
- FRANKENBERGER JR, W.T. & JOHANSON, J.B. L-histidine ammonia-lyase activity in soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 46:943-948, 1982.
- FRANKENBERGER JR, W.T. & TABATABAI, M.A. L-asparaginase activity of soils. *Biol. Ferti. Soils*, 11:6-12, 1991.
- GARBISU, C.; ALKORTA, I. & EPELFDE, L. Assessment of soil quality using microbial properties and attributes of ecological relevance. *Appl. Soil Ecol.*, 49:1-4, 2011.
- GARCIA, M.R.L. & NAHAS, E. Biomassa e atividades microbianas em solo sob pastagem com diferentes lotações de ovinos. *R. Bras. Ci. Solo*, 31:269-276, 2007.
- GIANFREDI, L. & BOLLAG, J.M. Effect of soils on the behaviour of immobilized enzymes. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 58:1672-1681, 1994.
- GIANFREDI, L. & BOLLAG, J.-M. Isolated enzymes for the transformation and detoxification of organic pollutants. In: BURNS, R.G. & DICK, R., eds. *Enzymes in the environment: Activity, ecology and applications*. New York, Marcel Dekker, 2002. p.491-538.
- GIANFREDI, L. & RAO, M.A. Potential of extra cellular enzymes in remediation of polluted soils: a review. *Enzyme Microbiol. Technol.*, 35:339-354, 2004.

- GIANFREDI, L.; XU, F. & BOLLAG, J.M. Laccases: A useful group of oxidoreductive enzymes. *Bioremed. J.*, 3:1-25, 1999.
- GIL-SOTRES, F.; TRASAR-CEPEDA, C.; LEIROS, M.C. & SEOANE, S. Different approaches to evaluating soil quality using biochemical properties. *Soil Biol. Biochem.*, 37:877-887, 2005.
- GRAMMS, G.; VOIGT, K.D. & KIRSCH, B. Oxidoreductase enzymes liberated by plant roots and their effects on soil humic material. *Chemosphere*, 38:1481-94, 1999.
- GREEN, V.S.; STOTT, D.E.; CRUZ, J.C. & CURI, N. Tillage impacts on soil biological activity and aggregation in a Brazilian Cerrado Oxisol. *Soil Till. Res.*, 92:114-121, 2007.
- GUAN, C.; JU, J.; BORLEE, B.R.; WILLIAMSON, L.L.; SHEN, B.; RAFFA, K.F. & HANDELSMAN, J. Signal mimics derived from a metagenomic analysis of the gypsy moth gut microbiota. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73:3669-3676, 2007.
- GUPTA, V.V.S.R. & GERMIDA, J.J. Distribution of microbial biomass and its activity in different soil aggregate size classes as affected by cultivation. *Soil Biol. Biochem.*, 20:777-786, 1988.
- HAIG, A.D. Some characteristics of esterase and urease-like activity in soil. Davis, University of California, 1955. (Tese de Doutorado)
- HANDELSMAN, J. Sorting out metagenomes. *Nature Biotechnol.*, 23:38-39, 2005.
- HANDELSMAN, J.; RONDON, M.R.; BRADY, S.F.; CLARDY, J. & GOODMAN, R.M. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: A new frontier for natural products. *Chem. Biol.*, 5:245-249, 1998.
- HARRIS, M. & DODGE, A.D. Effect of paraquat on flax cotyledon leaves. Physiological and biochemical changes. *Planta*, 104:210-219, 1972.
- HEATH, C.; HU, X.P.; CARY, S.C. & COWAN, D. Identification of a novel alkaliphilic esterase active at low temperatures by screening a metagenomic library from Antarctic desert soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75:4657-4659, 2009.
- HELGASON, B.L.; WALLEY, F.L. & GERMIDA, J.J. Long-term no-till management affects microbial biomass but not community composition in Canadian prairie agroecosystems. *Soil Biol. Biochem.*, 42:2192-2202, 2010.
- HENNE, A.; SCHMITZ, R.A.; BOMEKE, M.; GOTTSCHALK, G. & DANIEL, R. Screening of environmental DNA libraries for the presence of genes conferring lipolytic activity on *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66:3113-3116, 2000.
- HJORT, K.; BERGSTROM, M.; ADESINA, M.F.; JANSSEN, J.K.; SMALLA, K. & SJÖLING, S. Chitinase genes revealed and compared in bacterial isolates, DNA extracts and a metagenomic library from a phytopathogen-suppressive soil. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 71:197-207, 2010.
- HOLLOWAY, J.D. & STORK, N.E. The dimension of biodiversity: The use of invertebrates as indicators of human impact. In: HAWKSWORTH, D.L., ed. *The biodiversity of microorganisms and invertebrates: Its role in sustainable agriculture*. Wallington, CABI, 1991. p.37-63.
- HOWARD, G.T. Biodegradation of polyurethane: A review. *Int. Biodeter. Biodegr.*, 49:245-252, 2002.

- HU, X.P.; HEATH, C.; TAYLOR, M.P.; TUFFIN, M. & COWAN, D. A novel, extremely alkaliphilic and cold-active esterase from Antarctic desert soil. *Extremophiles*, 16:79-86, 2012.
- JIANG, C.J.; CHEN, G.; HUANG, J.; HUANG, Q.; JIN, K.; SHEN, P.-H.; LI, J.-F. & WU, B. A novel  $\alpha$ -glucosidase with lipolytic activity from a soil metagenome. *Folia Microbiol.*, 56:563-570, 2011.
- JONSSON, C.M. & AOYAMA, H. Alteração da atividade enzimática em organismos aquáticos por poluentes de origem agrícola: Uma abordagem geral e sobre a suscetibilidade da fosfatase ácida. *Quím. Nova*, 33:920-928, 2010.
- KANDELER, E.; TSCHERKO, D. & SPIEGEL, H. Long-term monitoring of microbial biomass, N mineralization and enzyme activities of a Chernozem under different tillage management. *Biol. Fert. Soils*, 28:343-351, 1999.
- KISS, S. & BOARN, M. Methods for determination of dehydrogenase activity in soil. In: SYMPOSIUM ON METHODS IN SOIL BIOLOGY, Bucharest, 1965. *Proceedings...* Bucharest, 1965. p.137-143.
- KLOSE, S. & TABATABAI, M.A. Arylsulfatase activity of the microbial biomass in soil. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 53:569-574, 1999.
- KNUPP, A.M.; FERREIRA, E.P.B.; GONZAGA, A.C.O. & BARBOSA, F.R. Avaliação de indicadores biológicos de qualidade do solo em unidades piloto de produção integrada de feijoeiro comum. Santo Antônio de Goiás, Embrapa Arroz e Feijão, 2010. 23p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 35)
- KOZDRÓJ, J. & van ELSAS, J.D. Structural diversity of microbial communities in arable soils of a heavily industrialised area determined by PCR-DGGE fingerprinting and FAME profiling. *Appl. Soil Ecol.*, 17:31-42, 2001.
- KULINSKA, D.; CAMARGO V.L.L. & DROSDOWICZ, A. Enzyme-activities in cerrado soils in Brazil. *Pedobiologia*, 24:101-107, 1982.
- LADD, J.N. Origin and range of enzymes in soil. In: BURNS, R.G., ed. *Soil enzymes*. London, Academic Press, 1978. p.51-96.
- LÄHDESMÄKI, P. & PNSPANEN, R. Soil enzymology: role of protective colloid systems in the preservation of exoenzyme activities in soil. *Soil Biol. Biochem.*, 24:1173-1177, 1992.
- LARSON, W.E. & PIERCE, F.J. The dynamics of soil quality as a measure of sustainable management. In: DORAN, J.W.; COLEMAN, D.C.; BEZDICEK, D.F. & STEWARD, B.A., eds. *Defining soil quality for a sustainable environment*. Madison, Soil Science Society of America, 1994. p.37-51.
- LEE, M.H.; HONG, K.S.; MALHOTRA, S.; PARK, J.-H.; HWANG, E.C.; CHOI, H.K.; KIM, Y.S.; TAO, W. & LEE, S.-W. A new esterase EstD2 isolated from plant rhizosphere soil metagenome. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 88:1125-1134, 2010.
- LISBOA, B.B.; VARGAS, L.K.; SILVEIRA, A.O.; MARTINS, A.F. & SELBACH, P.A. Indicadores microbianos de qualidade do solo em diferentes sistemas de manejo. *R. Bras. Ci. Solo*, 36:45-55, 2012.
- LIU, J.; LIU, W.; ZHAO, X.; SHEN, W.; CAO, H. & CUI, Z. Cloning and functional characterization of a novel endo- $\alpha$ -1,4-glucanase gene from a soil-derived metagenomic library. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 89:1083-1092, 2011.



- LIZARAZO, L.M.; JORDÁ, J.D. & JUAREZ, M. Effect of humic amendments on inorganic N, dehydrogenase and alkaline phosphatase activities of a mediterranean soil. *Biol. Fert Soils*, 42:172-177, 2005.
- LONGO, R. & MELO, W.J. Atividade da urease em Latossolos sob influência da cobertura vegetal e da época de amostragem. *R. Bras. Ci. Solo*, 29:645-650, 2005a.
- LONGO, R. & MELO, W.J. Hidrólise da ureia em Latossolos: Efeito da concentração de ureia, temperatura, pH, armazenamento e tempo de incubação. *R. Bras. Ci. Solo*, 29:651-657, 2005b.
- LONGO, R.M.; RIBEIRO, A.I. & MELO, W.J. Recuperação de solos degradados na exploração mineral de cassiterita: Biomassa microbiana e atividade da desidrogenase. *Bragantia*, 70:132-138, 2011.
- LOPES, A.A.C.; SOUSA, D.M.; CHAER, G.M.; REIS-JUNIOR, F.B.; GOEDERT, W.J. & MENDES, I.C. Interpretation of microbial soil indicators as a function of crop yield and organic carbon. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 77:461-472, 2013.
- MARCHIORI JÚNIOR, M. & MELO, W.J. Carbono, carbono da biomassa microbiana e atividade enzimática em um solo sob mata natural, pastagem e cultura do algodoeiro. *R. Bras. Ci. Solo*, 23:257-263, 1999.
- MARON, P.A.; RANJARD, L.; MOUGEL, C. & LAMANCEAU, P. Metaproteomics: A new approach for studying functional microbial ecology. *Microb. Ecol.*, 53:486-493, 2007.
- MA, X.Z.; CHEN, L.J.; CHEN, Z.H.; WU, Z.J.; ZHANG, L.L. & ZHANG, Y.L. Soil glycosidase activities and water soluble organic carbon under different land use types. *R. Ci. Suelo Nutr. Veg.*, 10:93-101, 2010.
- MARGON, A. & FORNASIER, F. Determining soil enzyme location and related kinetics using rapid fumigation and high yield extraction. *Soil Biol. Biochem.*, 40:2178-2181, 2008.
- MARTINS, M.R.; SANTOS, F.; CANDEIAS, P. & CRUZ-MORALIS, J. Efeito da temperatura, pH e vestígios de  $Hg^{2+}$  e  $Pb^{2+}$  na atividade de desidrogenases e urease num solo da região de Évora. *R. Ci. Agrar.*, 33:314-322, 2010.
- 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. *R. Bras. Ci. Solo*, 27:425-433, 2003.
- MAY, P.B. & DOUGLAS, L.A. Assay for soil urease activity. *Plant Soil*, 45:301-305, 1976.
- MAYER, A.M. & STAPLES, R.C. Laccase: New functions for an old enzyme. *Phytochemistry*, 60:551-565, 2002.
- McGILL, W.B. & COLE, C.V. Comparative aspects of cycling of organic C, N, S and P through soil organic matter. *Geoderma*, 26:267-286, 1981.
- MELERO, S.; VANDERLINDEN, K.; RUIZ, J.C. & MADEJON, E. Long-term effect on soil biochemical status of a Vertisol under conservation tillage system in semi-arid Mediterranean conditions. *Eur. J. Soil Biol.*, 44:437-442, 2008.
- MELO, W.J. & PIZAULO-JÚNIOR, J.M. Efeito da adição de resíduos das culturas de sorgo a lab-lab sobre a atividade de hidrolase a amilase de um Latossol Vermelho Escuro - fase arenosa. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 20., Belém, 1985. Resumos... Campinas, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1985. p.69.

- MELO, W.J.; DEMATTE, J.B.I.; PIZAURO-JÚNIOR, J.M. & CASSIANO SOBRINHO, F. Efeito do método de irrigação sobre a atividade de amilase e hidrolase em um Latossolo Roxo cultivado com cenoura. *Científica*, 10:41-48, 1982.
- MELO, W.J.; PIZAURO-JÚNIOR, J.M.; KANESIRO, M.A.B.; CHELLI, R.A. & LEITE, S.A.S. Incorporação da parte aérea de sorgo ou labe-labe e atividade de amilase e sacaridase de um Latossolo Vermelho-Escuro textura média. *R. Bras. Ci. Solo*, 13:21-29, 1989.
- MELO, W.J.; MELO, G.M.P.; ARAÚJO, A.S.F. & MELO, V.P. Avaliação da atividade enzimática em amostras de solo. In: FIGUEIREDO, M.V.B.; BURITY, H.A.; OLIVEIRA, J.P.; SANTOS, C.E.R.S. & STAMFORD, N.P., eds. *Biotechnologia aplicada à agricultura: Texto de apoio e protocolos experimentais*. Brasília, Embrapa Informação Tecnológica/Recife, Instituto Agrônomo de Pernambuco, 2010. p.153-187.
- MELO, W.J.; MELO, G.M.P.; MELO, V.P.; CHELLI, R.A. & LEITE, S.A.S. Urease activity as affected by sampling time, sample handling and storage. In: *WORLD CONGRESS OF SOIL SCIENCE*, 16., Montpellier, 1998. *Proceedings...* Montpellier, International Soil Science Society, 1998. CD ROM.
- MELO, W.J.; PIZAURO-JÚNIOR, J.M.; SARTORI, J.L. & KANESIRO, M.A.B. Amilase em solos do município de Jaboticabal (SP). *R. Bras. Ci. Solo*, 7:213-215, 1983.
- MENDES, I.C.; SOUZA, L.V.; RESCK, D.V.S. & GOMES, A.C. Propriedades biológicas em agregados de um LE sob plantio convencional e direto no Cerrado. *R. Bras. Ci. Solo*, 27:435-443, 2003.
- MIKANOVÀ, O.; JAVUREK, M.; SIMON, T.; FRIEDLOVÀ, M. & VACH, M. The effect of tillage systems on some microbial characteristics. *Soil Till. Res.*, 105:72-76, 2009.
- MOHAMED, T.M.; MOHAMED, M.A.; MOHAMED, S.A. & FAHMY, A.S. Purification of urease from water melon seeds for clinical diagnostic kits. *Biores. Technol.*, 68:215-223, 1999.
- MORAN, M.A. Metatranscriptomics: eavesdropping on complex microbial communities. *Microbe*, 4:329-335, 2009.
- NACKE, H.; ENGELHAUPT, M.; BRADY, S.; FISCHER, C.; TAUTZT, J. & DANIEL, R. Identification and characterization of novel cellulolytic and hemicellulolytic genes and enzymes derived from German grassland soil metagenomes. *Biotechnol. Letters*, 34:663-675, 2012.
- NACKE, H.; WILL, C.; HERZOG, S.; NOWKA, B.; ENGELHAUPT, M. & DANIEL, R. Identification of novel lipolytic genes and gene families by screening of metagenomic libraries derived from soil samples of the German biodiversity exploratories. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 78:188-201, 2011.
- NAYAK, D.R.; BABU, Y.J. & ADHYA, T.K. Long-term application of compost influences microbial biomass and enzyme activities in a tropical Aeris Endoaquept planted to rice under flooded condition. *Soil Biol. Biochem.*, 39:1897-1906, 2007.
- NAKAJIMA-KAMBE, T.; SHIGENO-AKUTSU, Y.; NOMURA, N.; ONUMA, F. & NAKAHARA, T. Microbial degradation of polyurethane, polyester polyurethanes and polyether polyurethanes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 51:134-40, 1999.
- NANNIPIERI, P.; JOHNSON, R.L. & PAUL, E.A. Criteria for measurement of microbial growth and activity in soil. *Soil Biol. Biochem.*, 10:223-229, 1978.

- NANNIPIERI, P.; GRECO, S. & CECCANTI, B. Ecological significance of the biological activity in soil. In: BOLLAG, J.M. & STOTZKY, G., eds. *Soil biochemistry*. New York, Marcel Dekker, 1990. v.6. p.293-355.
- NEVEU, J.; REGEARD, C. & DUBOW, M.S. Isolation and characterization of two serine proteases from metagenomic libraries of the Gobi and Death Valley deserts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 91:635-644, 2011.
- NOGUEIRA, M.A.; ALBINO, U.B.; BRANDÃO-JÚNIOR, O.; BRAUN, G.; CRUZ, M.F.; DIAS, B.A.; DUARTE, R.T.; GIOPOPO, N.M.R.; MENNA, P.; ORLANDI, J.M.; RAIMAM, M.P.; RAMPAZO, L.G.L.; SANTOS, M.A.; SILVA, M.E.Z.; VIEIRA, F.P.; TOREZAN, J.M.D.; HUNGRIA, M. & ANDRADE, G. Promising indicators for assessment of agroecosystems alteration between natural, reforested and agricultural land use in southern Brazil. *Agric. Ecosyst. Environ.*, 115:237-247, 2006.
- NOGUEIRA, M.A. & MELO, W.J. Enxofre disponível para a soja e atividade de arilsulfatase em solo tratado com gesso agrícola. *R. Bras. Ci. Solo*, 27:655-663, 2003.
- OLIVEIRA, L.R. Metais pesados e atividade enzimática em Latossolos tratados com lodo de esgoto e cultivados com milho. Jaboticabal, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2008. 108p. (Tese de Doutorado)
- OSER, B.L. *Hawk's physiological chemistry*. 14.ed. New York, McGraw-Hill, 1965. 1472p.
- PANCHOLY, S.K. & RICE, E.L. Soils enzymes in relation to old field succession: Amylase, cellulase, invertase, dehydrogenase, and urease. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 37:47-50, 1973.
- PASCUAL, J.A.; GARCIA, G.; HERNANDEZ, T.; MORENO, J.L. & ROS, M. Soil microbial activity as a biomarker of degradation and remediation process. *Soil Biol. Biochem.*, 32:1877-1883, 2000.
- PEIXOTO, R.S.; CHAER, G.M.; FRANCO, N.; REIS JÚNIOR, F.B.; MENDES, I.C. & ROSADO, A.S. A decade of land use contributes to changes in the chemistry, biochemistry and bacterial community structures of soils in the Cerrado. *Antonie Leeuwenhoek*, 98: 403-413, 2010.
- PEIXOTO, R.S.; COUTINHO, H.L.C.; MADARI, B.; MACHADO, P.L.O.A.; RUMJANEK, N.G.; van ELSAS, J.D.; SELDIN, L. & ROSADO, A.S. Soil aggregation and bacterial community structure as affected by tillage and cover cropping in the Brazilian Cerrados. *Soil Till. Res.*, 90:16-28, 2006.
- POINTING, S.B. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 57:20-32, 2001.
- QIN, J.; LI, R.; RAES, J.; ARUMUGAM, M.; BURGDORF, K.S.; MANICHANH, C.; NIELSEN, T.; PONS, N.; LEVENEZ, F.; YAMADA, T.; MENDE, D.R.; LI, J.; XU, J.; LI, S.; LI, D.; CAO, J.; WANG, B.; LIANG, H.; ZHENG, H.; XIE, Y.; TAP, J.; LEPAGE, P.; BERTALAN, M.; BATTO, J.-M.; HANSEN, T.; PASLIER, D. L.; LINNEBERG, A.; NIELSEN, H. B.; PELLETIER, E.; RENAULT, P.; SICHERITZ-PONTEN, T.; TURNER, K.; ZHU, H.; YU, C.; LI, S.; JIAN, M.; ZHOU, Y.; LI, Y.; ZHANG, X.; LI, S.; QIN, N.; YANG, H.; WANG, J.; BRUNAK, S.; DORÉ, J.; GUARNER, F.; KRISTIANSEN, K.; PEDERSEN, O.; PARKHILL, J.; WEISSENBACH, J.; METAHIT CONSORTIUM.; BORK, P.; EHRLICH, S.D. & WANG, J. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 464:59-65, 2010.

- REDDY, C.A. The potential for white-rot fungi in the treatment of pollutants. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 6:320-328, 1995.
- RIFFALDI, R.; LEVI-MINZI, R.; CARDELLI, R.; PALUMBO, S. & SAVIOZZI, A. Soil biological activities in monitoring the bioremediation of diesel oil-contaminated soil. *Water Air Soil Poll.*, 170:3-15, 2006.
- RODRÍGUEZ-VALERA, F. Approaches to prokaryotic biodiversity: A population genetics perspective. *Environ. Microbiol.*, 4:628-633, 2002.
- ROESCH, L.F.W.; FULTHORPE, R.R.; RIVA, A.; CASELLA, G.; HADWIN, A.K.M.; KENT, A.D.; DAROUB, S.H.; CAMARGO, F.A.O.; FARMERIE, W.G. & TRIPLETT, E.W. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. *ISME J.*, 1:283-290, 2007.
- ROSSELÓ-MORA, R. & AMANN, R. The species concept of prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.*, 25:39-67, 2001.
- RÖSSNER, H. Bestimmung der chitinase aktivität. In: SCHINNER, F.; ÖHLINGER, R. & KANDELER, E., eds. *Bodenbiologische Arbeitsmethoden*. Berlin, Springer Verlag, 1991. p.66-70.
- ROTINI, O.T. La trasformazioni enzimatica dell-urea nell terreno. *Ann. Labor. Ric. Ferm.*, 3:134-154, 1935.
- RUGGABER, T.P. & TALLEY, J.W. Enhancing bioremediation with enzymatic processes: A review. *Pract. Period. Hazard., Toxic, Radioact. Waste Manage.*, 10:73-85, 2006.
- RUGGIERO, P.; SARKAR, J.M. & BOLLAG, J.M. Detoxification of 2,4-dichlorophenol by a laccase immobilized on soil or clay. *Soil Sci.*, 147:361-370, 1989.
- SCHINNER, F. & von MERSI, W. Xylanase, CM-cellulase and invertase activity in soil: An improved method. *Soil Biol. Biochem.*, 22:511-515, 1990.
- SCHINNER, F.; ÖLLINGER, R. & KANDELER, E. *Bodenbiologische Arbeitsmethoden*. Berlin, Springer Verlag, 1991. 214p.
- SCHLOSS, P.D. & HANDELSMAN, J. Biotechnological prospects from metagenomics. *Cur. Op. Biotechnol.*, 14:303-310, 2003.
- SCHMEISSER, C.; STOCKIGT, C.; RAASCH, C.; WINGENDER, J.; TIMMIS, K.N.; WENDEROTH, D.F.; FLEMMING, H.C.; LIESEGANG, H.; SCHMITZ, R.A.; JAEGER, K.-E. & STREIT, W.R. Metagenome survey of biofilms in drinking-water networks. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69:7298-7309, 2003.
- SCHNÜRER, J. & ROSSWALL, T. Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter. *Appl. Environ. Microbiol.*, 43:1256-1261, 1982.
- SENIOR, E.; BULL, A.T. & SLATER, J.M. Enzyme evolution in a microbial community growing on the herbicide dalapon. *Nature*, 263:476-479, 1976.
- SHARMA, S.; KHAN, F.G. & QAZI, G.N. Molecular cloning and characterization of amylase from soil metagenomic library derived from northwestern Himalayas. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 86:1821-1828, 2010.
- SILVA, E.T. & MELO, W.J. Atividade de protease e nitrogênio em Latossolo Vermelho-Escuro cultivado com citros. *R. Bras. Ci. Solo*, 1999. **Autor, favor verificar citação.**

- SILVA, E.T. & MELO, W.J. Atividade de proteases e disponibilidade de nitrogênio para laranja cultivada em Latossolo Vermelho distrófico. R. Bras. Ci. Solo, 28:833-841, 2004.
- SILVA, M.R.S.S.; BUSTAMANTE, M.; TAVARES, P.; CARVALHO, L.S.; PEIXOTO, J.; SANTOS, D.F.K. & KRÜGER, R.H. Biodiversidade do solo: Inestimada fonte de riqueza ecológica e biotecnológica. Microbiol. Foco, 17:9-17, 2011.
- SINGH, C.J. Optimization of an extra cellular protease of *Chrysosporium keratinophilum* and its potential in bioremediation of keratinic wastes. Mycopathologia, 156:151-156, 2002.
- SKUJINS, J. & McLAREN, A.D. Assay of urease activity using <sup>14</sup>C-geologically preserved urea in stored, geologically preserved, and in irradiated soils. Soil Biol. Biochem., 1:89-95, 1969.
- SKUJINS, J. Enzymes in soil. In: McLAREN, A.D. & PETERSON, G.H., eds. Soil biochemistry. New York, Marcel Dekker, 1967. p.371-414.
- SOUZA, R.C. Metagenômica de um solo sob plantio direto e plantio convencional em rotação e sucessão de culturas no norte do Paraná. Londrina, Universidade Estadual de Londrina, 2012. 88p. (Dissertação de Mestrado)
- SPEIR, T.W. & ROSS, D.J. A comparison of the effects of air-drying and acetone dehydration on soil enzyme activities. Soil Biol. Biochem., 13:225-229, 1981.
- STEELE, H. & STREIT, W.R. Metagenomics: Advances in ecology and biotechnology. FEMS Microbiol. Lett., 247:105-111, 2005.
- STOTT, D.; ANDREWS, S.S.; LIEBIG, M.A.; WIENHOLD, B.J. & KARLEN, D.L. Evaluation of  $\alpha$ -glucosidase activity as a soil quality indicator for the soil management assessment framework. Soil Sci. Soc. Am. J., 74:107-119, 2010.
- SZAJDAK, L.W. & GACA, W. Nitrate reductase activity in soil under shelterbelt and amid adjoining field. Chem. Ecol., 26:123-134, 2010.
- TABATABAI, M.A. & BREMNER, J.M. Arylsulphatase activity in soils. Soil Sci. Soc. Am. Proc., 34:225-229, 1970.
- TABATABAI, M.A. Enzymes. In: WEAVER, R.W.; AUGLE, S.; BOTTOMLEY, P.J.; BEZDICEK, D.; SMITH, S.; TABATABAI, A. & WOLLUM, A., eds. Methods of soil analysis. Madison, Soil Science Society of America, 1994. Part 2. p.775-833. (Microbial and Biochemical Properties, 5)
- TARAFDAR, J.C. & MARSCHNER, H. Phosphatase activity in the rhizosphere and hyphosphere of VA mycorrhizal wheat supplied with inorganic and organic phosphorus. Soil Biol. Biochem., 26:387-295, 1994.
- THALMANN, A. Zur Methodik der Bestimmung der Dehydrogenaseaktivität im Boden mittels tripheniltetrazoliumnchorid (TTC). Landwirtsch Forsch, 21:249-258, 1968.
- TORELLO, W.A. & WEHNER, D.J. Urease activity in a Kentucky bluegrass turf. Agron. J., 75:654-656, 1983.
- TORRES-CORTÉS, G.; MILLÁN, V.; RAMÍREZ-SAAD, H.C.; NISA-MARTÍNEZ, R.; TORO, N. & MARTÍNEZ-ABARCA, F. Characterization of novel antibiotic resistance genes identified by functional metagenomics on soil samples. Environ. Microbiol., 13:1101-1114, 2011.

- TORSVIK, V.; GOKSOYR, J. & DAAE, F.L. High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56:782-787, 1990.
- TÓTOLA, M.R. & CHAER, G.M. Microrganismos e processos microbiológicos como indicadores da qualidade dos solos. In: ALVAREZ V., V.H.; SCHAEFER, C.E.G.R.; BARROS, N.F.; MELLO, J.W.V. & COSTA, L.M., eds. *Tópicos em ciência do solo*. Viçosa, MG, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2002. v.2. p.195-276.
- TRASAR-CEPEDA, C.; LEIRÓS, M.C.; GIL-SOTRES, F. & SEOANE, S. Towards a biochemical quality index for soils: An expression relating several biological and biochemical properties. *Biol. Fert. Soils*, 26:100-106, 1998.
- VALLEJO, V.E.; ROLDAN, F. & DICK, R.P. Soil enzymatic activities and microbial biomass in an integrated agroforestry chronosequence compared to monoculture and a native forest of Colombia. *Biol. Fert. Soils*, 46:577-587, 2010.
- van WYK, J.P.H. Saccharification of paper products by cellulase from *Penicillium funiculosum* and *Trichoderma reesei*. *Biomass Bioeng.*, 16:239-242, 1999.
- VENTER, J.C.; REMINGTON, K.; HEIDELBERG, J.F.; HALPERN, A.L.; RUSCH, D.; EISEN, J.A.; WU, D.; PAULSEN, L.; NELSON, K.E.; NELSON, W.; FOUTS, D.E.; LEVY, S.; KNAP, A.H.; LOMAS, M.W.; NEALSON, K.; WHITE, O.; PETERSON, J.; HOFFMAN, J.; PARSONS, R.; BADEN-TILLSON, H.; PFANNKUCH, C.; ROGERS, Y. & SMITH, H.O. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso sea. *Science*, 304:66-74, 2004.
- VIDYA, J.; SWAROOP, S.; SINGH, S.K.; ALEX, D.; SUKUMARAN, R.K. & PANDEY, A. Isolation and characterization of a novel  $\alpha$ -amylase from a metagenomic library of Western Ghats of Kerala, India. *Biologia*, 66:939-944, 2011.
- VITOLO, M. Imobilização de enzimas. In: AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. & LIMA, U.A., eds. *Biotecnologia industrial*. São Paulo, Edgard Blucher, 2001. v.3. p.391-404.
- WADA, S.; ICHIKAWA, H. & TATSUMI, K. Removal of phenols from wastewater by soluble and immobilized tyrosinase. *Biotechnol. Bioeng.*, 42:854-858, 1993.
- WALLENSTEIN, M.D. & WEINTRAUB, M.N. Emerging tools for measuring and modeling the *in situ* activity of soil extracellular enzymes. *Soil Biol. Biochem.*, 40: 2098-2106, 2008.
- WARKENTIN, B. The changing concept of soil quality. *J. Soil Water Conserv.*, 50:226-228, 1995.
- WASCHKOWITZ, T.; ROCKSTROH, S. & DANIEL, R. Isolation and characterization of metalloproteases with a novel domain structure by construction and screening of metagenomic libraries. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75:2506-2516, 2009.
- YIN, C.; JONES, K.L.; PETERSON, D.E.; GARRETT, K.A.; HULBERT, S.H. & PAULITZ, T.C. Members of soil bacterial communities sensitive to tillage and crop rotation. *Soil Biol. Biochem.*, 42:2111-2118, 2010.
- ZORNOZA, R.; MATAIX-SOLERA, J.; GUERRERO, C.; ARCENEGUI, V.; GARCIA-ORENES, F.; MATAIX-BENEYTO, J. & MORUGAN, A. Evaluation of soil quality using multiple linear regression based on physical, chemical and biochemical properties. *Sci. Total Environ.*, 378:233-237, 2007.