

Capítulo 3. Actividad hidrolítica de enzimas microbianas sobre diacetato de fluoresceína

Natalia Mansilla, Cristina Sotelo,
Natalia Banegas, Andrea Sirio y Emilce Viruel

Durante los últimos años ha aumentado el interés por conocer el tamaño y la actividad de la biomasa microbiana del suelo, en parte debido a la importancia de esta información en el bioecosistema integrado y en los estudios de cambio global. La actividad microbiana total proporciona una medida general del recambio de materia orgánica en hábitats, donde aproximadamente el 90% de la energía del suelo fluye a través de descomponedores microbianos (Green, Stott y Diack, 2006).

Entre los métodos de estudio para conocer la dinámica de la materia orgánica del suelo (MO) y la actividad microbiológica asociada, se encuentra la medición de las actividades enzimáticas, ya que la estabilización o degradación de la MO depende fundamentalmente de procesos biológicos en los que las enzimas cumplen un rol importante (Aguilera *et al.*, 1988; Nannipieri *et al.*, 2003). Las enzimas producidas por la actividad microbiana en el suelo están relacionadas con la fertilidad del mismo, ya que durante la descomposición de la MO los nutrientes pasan a través de la población microbiana y, mediante sus sistemas enzimáticos asociados, los compuestos complejos son degradados a subunidades simples y asimilables por las plantas (Nannipieri y Landi, 2000; Zahir, Ateeq y Arshad, 2001).

Las enzimas del suelo son importantes catalizadoras de procesos metabólicos, incluyendo la descomposición de compuestos orgánicos y xenobióticos. Considerando la capacidad de resiliencia del ecosistema –definiéndolo como un ente vivo y dinámico–, se puede pensar que cualquier cambio medio ambiental podría ser detectado en su inicio por su componente biológico (por ejemplo, enzimas). De ahí que la presencia o deficiencia de enzimas del suelo pueda ser considerada como un bioindicador sensible

ante una posible perturbación ambiental (Ulloa Larrea, 2014). Pueden ser «sensores», ya que entregan información sobre el estado y las condiciones fisicoquímicas del suelo (Aon y Colaneri, 2001; García *et al.*, 2003). De esta forma, los cambios provocados en la actividad de estas no sólo dependen de las variaciones de la expresión génica, sino también de factores ambientales que afectan a la actividad (Nanniperi *et al.*, 2002).

La actividad enzimática en el suelo está asociada a factores bióticos y abióticos. Las enzimas pueden encontrarse intracelularmente en células vivas (proliferantes y latentes), muertas o en descomposición, pero asimismo pueden formar temporalmente complejos enzima-sustrato, ser adsorbidas por arcillas, estar asociadas con compuestos húmicos o bien pasar a la solución del suelo (lisis celular, por ejemplo) pudiendo cambiar su ubicación (Burns, 1982).

La fuente más importante de síntesis de enzimas corresponde a los microorganismos del suelo (Burns, 1978) y se cree además que enzimas como, por ejemplo, las esterases son sintetizadas principalmente por bacterias y hongos. Por lo tanto, si el flujo de energía pasa a través de la microflora y los microorganismos heterótrofos son predominantes, la actividad esterase estaría estrechamente relacionada con la actividad microbiológica total del suelo (Adam y Duncan, 2001; Green, Stott y Diack, 2006).

Las proteasas catalizan las reacciones que degradan proteínas y péptidos (Nanniperi *et al.*, 1994) y están involucradas en el ciclo del nitrógeno, al igual que ureasas y reductasas. Las lipasas son un grupo de enzimas que se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, tanto en animales, en plantas como en microorganismos, y su función es catalizar la hidrólisis de los enlaces ésteres formados entre un ácido y un alcohol (Ro *et al.*, 2004).

El diacetato de fluoresceína (FDA) se puede utilizar para medir la actividad microbiana en suelos (Brunius, 1980; Lundgren, 1981; Schnürer y Rosswall, 1982), pues es degradado por numerosas enzimas, tales como proteasas, lipasas y esterases, generando un producto cuantificable (fluoresceína). Por lo tanto, su hidrólisis se considera como un indicador general o de amplio espectro de la actividad biológica del suelo.

Cuando un suelo es expuesto a procesos degradativos, sus propiedades biológicas son afectadas y disminuye su capacidad productiva (Sánchez *et al.* 2011). Para Dick (1994), existen indicadores del estrés que sufre un ecosistema cuando es sometido a una perturbación y, en ese sentido, el o los indicadores funcionan como sensores que advierten de los disturbios del mismo. Al respecto, las enzimas producidas por los microorganismos pueden funcionar

como indicadores de la calidad de un suelo, ya que integran información sobre el estado de la población microbiana, como también de las condiciones físico-químicas del mismo (Zornoza *et al.*, 2006; Sánchez *et al.* 2011).

Debido a todo ello, la determinación de la actividad enzimática ha sido estudiada como un biomarcador, esto es, un indicador de diferentes condiciones de calidad de suelo (Alef y Nanipieri, 1995; Baležentienė, 2012; Bolton *et al.*, 1985; Carpa, 2009; Ferreras *et al.*, 2009; Gil-Sotres *et al.*, 2005; Trasar, Leirós y Gil, 2003). Al respecto, Hu, Wang y Zeng (2006) señalan que la actividad enzimática puede responder a cambios en el manejo de un bosque más rápidamente que otras variables de suelo, por lo que pueden ser útiles como indicadores tempranos de cambios biológicos. Estos parámetros también se utilizan para caracterizar la actividad microbiana de los suelos y son relativamente fáciles de medir por medio de métodos analíticos, además representan procesos fisiológicos importantes de los microorganismos edáficos (Gajda y Martyniuk, 2005).

3.1. FUNDAMENTO DEL MÉTODO

La determinación de la hidrólisis del diacetato de fluoresceína (FDA) consiste en cuantificar espectrofotométricamente la fluoresceína producida como resultado de la acción de enzimas microbianas presentes en el suelo.

En el suelo, la hidrólisis de la FDA puede ser realizada por diferentes organismos como las bacterias heterotróficas, los hongos, las algas y los protozoos. El resultado de esta conversión enzimática es la obtención de fluoresceína, que puede ser visualizada dentro de las células usando un microscopio de fluorescencia (Lundgren, 1981) y cuantificada a través de la fluorimetría y la espectrofotometría (Swisher y Carroll, 1980; Schnürer y Rosswall, 1982). Los autores nombrados desarrollaron un método simple, rápido y sensible para determinar la actividad microbiana total del suelo por espectrofotometría.

3.2. OBJETIVO DE LA DETERMINACIÓN

El objetivo es la cuantificación de la actividad hidrolítica de enzimas del suelo sobre diacetato de fluoresceína como un indicador microbiológico de calidad de suelos. La aplicación del método es considerado novedoso y relativamente rápido y de fácil aplicación.

3.3. EQUIPAMIENTO Y MATERIALES

A continuación, se detalla la lista de materiales para el desarrollo de la técnica:

- Espectrofotómetro UV-visible (celda de vidrio)
- Agitador orbital
- Balanza de precisión analítica
- Frascos de vidrio con tapa a rosca de 100 ml
- Pipetas automáticas de 10 ml, 5 ml, 1 ml
- Embudos
- Papel de filtro cualitativo
- Tubos de ensayo de 10 ml
- Vaso de precipitado de 50 ml

3.4. REACTIVOS

Los reactivos necesarios para la determinación de FDA son los siguientes:

- Buffer fosfato sódico 60 mM (pH 7.6)
- Solución stock FDA (2 mg ml⁻¹ disuelta en acetona)
- Acetona p.a.
- Fluoresceína sódica (para la curva patrón)

3.5. PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES

Las soluciones necesarias para la marcha son: solución indicadora stock de FDA, buffer fosfato sódico y solución stock de fluoresceína sódica. Se detallará la preparación de cada una a continuación:

a. Solución indicadora de stock de FDA¹ (2 mg ml⁻¹) para agregar a la muestra problema.

En un matraz de 10 ml colocar 0,02 g de fluoresceína diacetato, disolver con acetona y enrasar.

1. Preparar preferentemente en el momento de utilizar en cantidad necesaria. Se puede conservar en freezer a -20 °C (al estar diluido en acetona no se congela).

- b. **Buffer fosfato sódico 60 mm pH 7.6²**. Solución A Fosfato monosódico (NaH_2PO_4 0,2 M): 1,19 g de NaH_2PO_4 en 50 ml. Solución B Fosfato disódico (Na_2HPO_4 0,2 M): 7,1 g de Na_2HPO_4 en 250 ml.

El buffer se obtiene con la siguiente mezcla: 32,5 ml de Solución A + 217,5 ml de Solución B, aforar a 500 ml con agua destilada (controlar que el pH esté a 7,6).

En caso de ser necesario, corregir el pH con hidróxido de sodio (en caso de tener que aumentar) o ácido fosfórico (en caso de que haya que disminuir).

- c. **Solución indicadora de stock de fluoresceína sódica** (*para la curva patrón*). En un matraz aforado de 50 ml, pesar 0,010 g de fluoresceína sódica, colocar 10 ml de acetona y llevar a 50 ml con la solución buffer (0,2 mg ml^{-1} o 602 μM).

3.6. ACONDICIONAMIENTO DEL MATERIAL

Se detallan los pasos a seguir para una correcta limpieza del material a utilizar.

1. Lavar el material de vidrio y plástico con cepillo, cuidando que no queden residuos de ningún tipo.
2. Lavar con una solución de HCl (4 ml de HCl por cada 3 litros de agua).
3. Enjuagar con agua corriente 3 veces.
4. Enjuagar con agua destilada (2 o 3 veces aproximadamente).
5. Separar el material a utilizar para la determinación (en la medida de las posibilidades).

3.7. PROCEDIMIENTO

Los pasos para desarrollar la técnica se detallan a continuación:

3.7.1. Curva patrón

La curva patrón es una curva de referencia construida con cantidades conocidas de una sustancia que se utiliza para determinar la cantidad de esa sustancia presente en una muestra problema.

2. El buffer puede reservarse en heladera por una semana. Cada vez que se prepara el mismo deberá realizarse la correspondiente curva patrón. La cantidad que se pesa de cada droga dependerá del PM de la misma, que puede variar entre las distintas marcas y laboratorios (chequear cantidad necesaria para preparar la solución 0,2 M).

La realización de la misma tiene los siguientes pasos:

1. Utilizar 6 matraces de 50 ml.
2. Realizar las diluciones a partir de la solución de stock de fluoresceína sódica (en los matraces) en las diferentes proporciones, como se indica en la Tabla N° 1.
3. Colocar la alícuota de solución de stock de fluoresceína sódica correspondiente en cada matraz y enrasar con la solución buffer de fosfato sódico 60 mM.
4. Aforar y homogeneizar bien las soluciones.
5. Trasvasar a un vaso de precipitado.
6. Agregar 2,5 ml de acetona.
7. Mezclar bien.
8. Medir absorbancia a 490 nm.

Tabla N° 1. Preparación de las diluciones para la curva

ML DE SOLUCIÓN STOCK DE FLUORESCÉINA SÓDICA	ML DE SOLUCIÓN BUFFER FOSFATO SÓDICO 60 MM	µG DE FLUORESCÉINA (CONCENTRACIÓN DE FLUORESCÉINA)
0,0	50,00	0,00
0,15	49,85	30
0,3	49,70	60
0,5	49,50	100
1,0	49,00	200
1,5	48,50	300
2,5	47,50	500
3,0	47,00	600

3.7.2. Determinación en muestras

La actividad hidrolítica se determina en suelo midiendo la fluoresceína liberada luego de la acción de las enzimas hidrolíticas de la muestra problema sobre el diacetato de fluoresceína agregado. Se detalla la marcha y se indican los pasos a seguir.

1. Pesar 1 g de suelo seco³ (muestra problema). Realizar por triplicado cada muestra.
2. Añadir a cada frasco 10 ml de buffer fosfato sódico 60 mM, pH 7,6.

3. El secado del suelo debe ser a temperatura ambiente.

3. Agregar 0,1 ml de solución indicadora de stock de FDA (2 mgml⁻¹) y mezclar.
4. Es importante realizar un blanco para llevar el espectrofotómetro a 0, consiste en los 10 ml de buffer Na₃PO₄ 60 mM y 0,1 ml de diacetato de fluoresceína (2 mg ml⁻¹), sin suelo.
5. Incubar a 25 °C durante 2 h con agitación (100-120 rpm).
6. Agregar 10 ml de acetona para detener la reacción (al blanco también agregar acetona).
7. Filtrar con papel de filtro cualitativo y reservar el filtrado.
8. Medir la absorbancia a λ 490 nm.



Figura N° 1. Muestras de suelo con diacetato de fluoresceína.

3.8. CÁLCULOS

La reacción de la fluoresceína en el suelo se extrapola a partir de las concentraciones de referencia de la curva patrón.

El cálculo a partir de la curva patrón en la gráfica de la curva: en el eje Y, la absorbancia y en el eje X, la concentración (µg fluoresceína). La regresión lineal ajusta a la ecuación:

$$y = a \cdot x + /- b$$

Entonces, se despeja de la fórmula:

$$\mu\text{g fluoresceína (x)} = (y/a) + /- b$$

Siendo: a: la pendiente, b: la ordenada al origen, y: el valor de absorbancia leída y x: µg.

Los resultados se expresan en µg de fluoresceína gss⁻¹ h⁻¹ (microgramos de fluoresceína producida/gramo de suelo seco/hora)⁴, promediando los resultados de las 3 repeticiones.

Por lo tanto, se debe dividir en 2 (son 2 h de reacción enzimática a 25°). Para ello, se realiza el siguiente cálculo:

$$\mu\text{g fluoresceína gss}^{-1} \text{ h}^{-1} = \mu\text{g fluoresceína}/2$$

En resumen. Esta metodología resulta rápida y sensible a la hora de evaluar un indicador microbiológico de suelos, sus condiciones de uso y el manejo del mismo.



Figura N° 2. Filtrado del suelo.

4. Si se cambia el peso de la muestra problema en la determinación, ajustar la fórmula para 1 g de suelo seco, para mantener la expresión de µg de fluoresceína gss⁻¹h⁻¹.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAM, G. y Duncan, H. (2001). «Development of a sensitive and rapid method for the measurement of total microbial activity using fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils». *Soil Biology and Biochemistry*, 33, 943-951.
- AGUILERA, M., Borie, G., Rokov, P. y Peirano, P. (1988). «Bioquímica de suelos derivados de cenizas volcánicas. VII Determinación de deshidrogenasas». *Agricultura Técnica* (Chile), 48(2), 147-151.
- ALEF, K. y Nannipieri, P. (1995). *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*. EE.UU.: Academic Press Limited.
- AON, M.A., Cabello, M.N., Sarena, D.E., Colaneri, A.C., Franco, M.G., Burgos, J.L. y Cortassa, S.I. (2001). «Spatio-temporal patterns of soil microbial and enzymatic activities in an agricultural soil». *Applied Soil Ecology*, 18, 239-254.
- BALEŽENTIENĖ, L. (2012). «Hydrolases Related to C and N Cycles and Soil Fertility Amendment: Responses to Different Management Styles of Agro-Ecosystems». *Polish Journal of Environmental Studies*, 21(5), 1153-1159.
- BOLTON, J.R., Elliot, L.F., Papendick, R.I. y Bezdicsek, D.F. (1985). «Soil microbial biomass and selected soil enzyme activities: effect of fertilization and cropping practices». *Soil Biology and Biochemistry*, 17, 297-302.
- BRUNIUS, G. (1980). «Technical aspects of the use of 3,6'- diacetyl fluorescein for vital fluorescent staining of bacteria». *Current Microbiology*, 4, 321-323.
- BURNS, R. (1978). *Soil enzymes*. Londres, Reino Unido: Academic Press.
- _____ (1982). «Enzyme activity in soil: location and a possible role in microbial ecology». *Soil Biology and Biochemistry*, 14: 423-427.
- CARPA, R. (2009). «Enzymological research on soils from different environments». *Annals of RSCB*, 16(1), 44-48.
- DICK, A. y Tabatabai M.A. (1992). «Significance and Potential Use of Soil Enzymes». En Meeting, F.J.B. (ed.) *Soil Microbial Ecology: Applications in Agriculture and Environmental Management* (pp. 95-127). Nueva York, EE.UU.: Marcel Dekker.
- DICK, R.P. (1994). «Soil enzyme activities as indicators of soil quality». En Doran, J. W., Coleman, D.C., Bezdicsek, D.F. y Stewart, B.A. (eds.) *Defining Soil Quality for a Sustainable Environment*. Madison, Wisconsin: ASA, Soil Science Society of America.
- FERRERAS, L., Toresani, S., Bonel, B., Fernández, E., Bacigaluppo, S., Faggioli, V. y Beltrán, C. (2009). «Parámetros químicos y biológicos como indicadores de calidad del suelo en diferentes manejos». *Ci. Suelo* (Argentina), 27(1), 103-114.

- GAJDA, A. y Martyniuk, S. (2005). «Microbial Biomass C and N and Activity of Enzymes in Soil under Winter Wheat Grown in Different Crop Management Systems». *Polish Journal of Environmental Studies*, 14(2), 159-163.
- GARCÍA, C., Gil, F., Hernández, T. y Trasar, C. (2003). *Técnicas de análisis de parámetros bioquímicos en suelos. Medida de actividades enzimáticas y biomasa microbiana*. España: Editorial Mundi-prensa.
- GIL-SOTRES, F., Trasar-Cepeda, C., Leirós, M.C. y Seoane, S. (2005). «Different approaches to evaluating soil quality using biochemical properties». *Soil Biology and Biochemistry*, 37(5), 877-887.
- GREEN, V., Stott, D. y Diack, M. (2006). «Assay for fluorescein diacetate hydrolytic activity: Optimization for soil samples». *Soil Biology and Biochemistry*, 38, 693-70.
- HU, Y.L., Wang, S.L. y Zeng, D.H. (2006). «Effects of Single Chinese Fir and Mixed Leaf Litters on Soil Chemical, Microbial Properties and Soil Enzyme Activities». *Plant and Soil*, 282(1-2), 379-386.
- LUNDGREN, B. (1981). «Fluorescein diacetate as a stain of metabolically active bacteria in soil». *Oikos*, 36, 17-22.
- NANNIPIERI, P. (1994). «The potential use of enzymes as indicators of productivity, sustainability and pollution». En Pankhurst, C.E., Doube, B.M., Gupta V.V.S.R y Grace, P.R. (eds.) *Soil Biota- Management in Sustainable Farming Systems* (pp. 238-244). East Melbourne, Australia: CSIRO.
- NANNIPIERI, P. y Landi, L. (2000). «Soil enzymes». En Sumner, M. (ed.) *Handbook soil science* (pp. 129-135). Boca Ratón, EE.UU.: CRC Press.
- NANNIPIERI, P., Ascher, J., Ceccherini, M.T., Landi, L., Pietramellara, G. y Renella, G. (2003). «Microbial Diversity and soil functions». *European Journal of Soil Science*, 54, 655-670.
- NANNIPIERI, P., Kandeler, E. y Ruggiero, P. (2002). «Enzyme activities and microbiological and biochemical processes in soil». En Burns, R. y Dick, R. (eds.) *Enzymes in the environment* (pp. 1-33). Nueva York, EE.UU.: CRC Press.
- RO, H.S., Hong, H.P., Kho, B.H., Kim, S. y Chung, B.H. (2004). «Genome-wide cloning and characterization of microbial esterases». *FEMS Microbiology Letters*, 233, 97-105.
- SÁNCHEZ, C., Musante, C., Benintende, M. y Benintende, S. (2011). «Actividades enzimáticas B-glucosidasa e hidrólisis de diacetato de fluoresceína en suelos de Entre Ríos. Efecto del secado de muestra sobre su determinación». *Revista Científica Agropecuaria*, 15(1-2), 7-16.
- SCHNÜRER, J. y Rosswall, T. (1982). «Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter». *Applied and Environmental Microbiology*, 43, 1256-1261.

- SWISHER, R. y Carroll, G.C. (1980). «Fluorescein diacetate hydrolysis as an estimator of microbial biomass on coniferous needle surfaces». *Microbial Ecology*, 6, 217-226.
- TRASAR, C., Leirós, M. y Gil, F. (2003). «Consideraciones generales sobre la determinación de las actividades enzimáticas del suelo». En García, C., Gil, F., Hernández, T. y Trasar, C. (eds.) *Técnicas de análisis de parámetros bioquímicos en suelos*. España: Mundi-prensa.
- Ulloa Larrea, G.A. (2014). *Hidrólisis de fluoresceína diacetato y actividad de las enzimas proteasa, celulasa, nitrato reductasa y ureasa del suelo en bosque prístino, sur de Chile*. Valdivia, Chile: Universidad Austral de Chile.
- ZAHIR, A., Ateeq, M. y Arshad, M. (2001). «Soil enzymes research: A review». *Journal of biology sciences*, 1(5), 299-307.
- ZORNOZA, R., Guerrero, C., Mataixsolera, J., Arcenegui, V., Garciaorenes, F. y Mataix-Beneyeto, J. (2006). «Assessing air-drying and rewetting pre-treatment effect on some soil enzymes under Mediterranean conditions». *Soil Biology and Biochemistry*, 38, 2125-2134.