

# Determinación de la actividad celulolítica del suelo proveniente de cultivos de *Stevia rebaudiana* Bertoni

Determination of cellulolytic activity of soil from *Stevia rebaudiana* Bertoni crops

Viviana Gutiérrez R.<sup>1</sup>, Ángela Pinzón E.<sup>2</sup>, Jaime Casas<sup>3</sup> y María Mercedes Martínez<sup>4</sup>

## RESUMEN

En el presente estudio se determinó la actividad celulolítica en suelo mediante el uso de una técnica fluorogénica que utiliza 4-metilumbeliferil  $\beta$ -glucosa (MUF) como sustrato, y se comparó con la técnica de Somogyi Nelson (SN). Se manejó sedimento como control positivo del método MUF, ya que esta técnica se estandarizó previamente en esta matriz, y suelo como matriz a evaluar. El muestreo de suelo se realizó en Puerto López, Meta, en cultivos de *Stevia rebaudiana* Bertoni mediante un muestreo aleatorio simple. El sedimento se recolectó en el humedal La Conejera, localidad de Suba, Bogotá. Se realizaron tres tratamientos para ambas matrices: T1: matriz (control); T2: matriz+extracto crudo enzimático (2,34 UC); T3: matriz+*Streptomyces sp.* ( $59 \times 10^3$  conidios/mL). Para la obtención del extracto crudo enzimático utilizado en el T2 se realizó el aislamiento del microorganismo celulolítico con mayor actividad en agar CMC 1% m/v a partir de muestras de suelo, para su posterior fermentación y obtención de extracto enzimático. La incubación de las matrices en los tres tratamientos se realizó a temperatura ambiente, humedad mantenida a 4,6% durante 60 días, con muestreos periódicos cada 15 días para determinar actividad enzimática por métodos planteados (MUF y SN). No se evidenciaron efectos diferenciales en la actividad enzimática con ninguno de los tratamientos planteados, como tampoco se obtuvo correlación estadística entre los métodos (<16%). Es así que se propone la técnica fluorogénica como una metodología viable y fiable de la actividad celulolítica, en virtud de su alta especificidad, mayor rapidez en el montaje, así como por su facilidad de ejecución y apreciable precisión en términos de repetibilidad; sin embargo la técnica de SN no se descarta para futuros estudios.

**Palabras clave:**  $\beta$ -glucosidasa, celulasas, 4-metilumbeliferil  $\beta$ -glucosa, Somogyi Nelson, calidad de suelo.

## ABSTRACT

In this study cellulolytic activity was determined in soil using a fluorogenic technique, which utilizes 4-methylumbelliferil  $\beta$  - glucose (MUF) as substrate, and was compared with the quantitative technique of Somogyi Nelson (SN). Sediment control was handled as a positive method of MUF, as this technique was standardized previously in this matrix. Soil sampling was done in Puerto López, Meta, in *Stevia rebaudiana* Bertoni crops using a simple random sampling. Sediments were collected in La Conejera wetland located in Suba, Bogotá. Three treatments were done to both matrixes: T1: Matrix (control); T2: Matrix + crude enzymatic extract (2.34 UC); T3: Matrix + *Streptomyces sp* ( $59 \times 10^3$  spores/mL). To obtain the crude enzymatic extract used in T2 an isolation of the cellulolytic microorganisms was done with greater activity in carboxymethylcellulose (CMC 1%) from soil samples for its subsequent fermentation and extraction of enzyme extract. Incubation of the matrix in three treatments was done at room temperature during 60 days where tests were performed every 15 days in order to analyze enzymatic activity by the established methods (MUF and SN). Humidity was maintained at 4.6%. No evidence of differential effects in the enzymatic activity with any of the treatments was found. Also, there was no statistical correlation between the methods (<16%). Thus, we propose the fluorogenic technique as a viable and reliable methodology to determinate cellulolytic activity because of its high specificity, faster assembly as well as its easy manipulation, precision and repeatability. Nevertheless the SN technique has not been ruled out for future studies.

**Key words:**  $\beta$ -glucosidase, cellulases, 4-methylumbelliferil  $\beta$ -glucose, Somogyi Nelson, soil quality.

## Introducción

Karlen y colaboradores (2001) definen la calidad de un suelo como la capacidad de un tipo específico de suelo para funcionar, en ecosistemas naturales o controlados,

de tal manera que sustente la productividad animal y vegetal, mantenga o mejore la calidad del agua o del aire y soporte la presencia humana saludable. Está dada tanto por el componente fisicoquímico como por el biológico, que incluye organismos de la micro y mesofauna, por ejemplo

Fecha de recepción: 28 de agosto de 2007. Aceptado para publicación: 5 de noviembre de 2008

<sup>1</sup> Estudiante, Laboratorio de Microbiología Ambiental y de Suelos, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá. gutierrez@javeriana.edu.co

<sup>2</sup> Estudiante, Laboratorio de Química Microbiológica, Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá. angela-pinzon@javeriana.edu.co

<sup>3</sup> Profesor, Departamento de Química, Facultad de Ciencia y Tecnología, Universidad Pedagógica Nacional, Bogotá. jcasas@pedagogica.edu.co

<sup>4</sup> Profesor, Laboratorio de Microbiología Ambiental y de Suelos, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá. mmmartin@javeriana.edu.co

bacterias fosfatosolubilizadoras y fijadoras de nitrógeno, y también por lombrices y actividad enzimática. Los estudios de fertilidad se han basado durante muchos años en el análisis de la microflora presente en el suelo y dejan de lado la participación de las enzimas extracelulares producidas por esta microflora en la degradación de la materia orgánica y en el flujo continuo de los elementos en el suelo (Cerón y Melgarejo, 2005).

Las celulasas, como base de este estudio, desempeñan un papel importante en el ciclo del carbono en el suelo, degradando desechos vegetales que están compuestos en su mayoría de celulosa (Nielsen y Winding, 2002). Esta actividad cobra gran importancia en agroindustrias debido a que la degradación de este polímero se relaciona directamente con la fertilidad y calidad del suelo (Cerón y Melgarejo, 2005).

En el caso de cultivos de *Stevia rebaudiana* Bertoni se observa que el aporte de materia orgánica (MO) es mínimo debido a que se realiza la recolección de hojas y es el tallo lo único que ingresa al ciclo del carbono edáfico, que es de difícil y lenta degradación. Por tanto se espera que el porcentaje de MO presente en los suelos a evaluar sea bajo y de esta manera se pueda evaluar si los métodos utilizados para la determinación de actividad celulolítica (MUF y SN) son suficientemente sensibles para detectar niveles enzimáticos tan bajos.

Actualmente la detección de enzimas extracelulares en suelos tiene mayor relevancia dentro de los parámetros biológicos para la determinación de calidad. Los métodos enzimáticos tradicionales emplean la cuantificación del sustrato con técnicas colorimétricas como Somogyi Nelson, Bradford, DNS, glucosa oxidasa, antrona, azul de prusia o yodo-yoduro, que son dispendiosas, costosas y demoradas. No obstante, existen métodos en que la utilización de fluorógenos como el 4-metilubeliferona, 7-amino-4-metilcumarina, naranja de acridina y ácido sulfónico 8-anilino-1-naftaleno, entre otros, permite desarrollar técnicas altamente específicas, pues consisten en sustratos análogos ligados que son limitados para un grupo de enzimas restringido, superando las limitaciones de las técnicas tradicionales, ya que permiten mayor sensibilidad y precisión y la interpretación de resultados es sencilla y en menor tiempo (Turner *et al.*, 2002; Debosz *et al.*, 1999; Boshker y Cappenberg, 1994; Chernoglazov *et al.*, 1988). Sin embargo, aunque se utilizan indistintamente, no se sabe el grado de correlación entre los métodos tradicionales y los implementados en la actualidad para la determinación de

la actividad enzimática en suelo. Por tanto su evaluación es de gran utilidad para la selección del método más apropiado y así obtener resultados con mayor confiabilidad.

Este trabajo establece la correlación existente entre la técnica de detección de  $\beta$ -glucosidasas en suelo de un cultivo de *Stevia* mediante el uso de 4-metilubeliferil  $\beta$ -glucosa, y el método colorimétrico tradicional de Somogyi Nelson, y de esta manera obtener un indicador biológico importante en la calidad del suelo analizado.

## Materiales y métodos

### Muestreo

El área de estudio se localizó en cultivos de *Stevia rebaudiana* Bertoni ubicados en el municipio de Puerto López, Meta, con temperatura media de 27 °C, contenido de materia orgánica en suelo de 1,77% y pH de 5,4 (Barrera y Brito, 1997). El área de muestreo fue de 126 m<sup>2</sup>, donde se realizó un muestreo aleatorio simple con base en una división del terreno en cuadrantes de 25 cm<sup>2</sup>, a partir de los cuales se tomaron 58 muestras de 500 g cada una, a una profundidad aproximada de 20 cm.

Las muestras de sedimento utilizadas como control positivo (Boschker y Cappenberg, 1994) se recolectaron en el humedal La Conejera, ubicado en la localidad de Suba, Bogotá, teniendo en cuenta únicamente zonas sin tratamiento de recuperación. El contenido de materia orgánica promedio es de 6,14% y pH de 6,9. La toma de muestras de sedimento se realizó a una profundidad de 1 metro bajo el nivel del agua.

### Procesamiento de muestras

Las muestras se tamizaron con tamices # 12 y se dispusieron en microcosmos con 250 gramos de suelo cada una, en condiciones controladas con temperatura media de 18 °C y humedad constante de 4,6%, para realizar muestreos cada 0, 15, 30, 45 y 60 días, a partir de los cuales se determinó la actividad celulolítica tanto cualitativa como cuantitativamente (Turner *et al.*, 2002).

Por su parte, en las muestras de sedimento se removieron las partículas grandes de materia orgánica y se mezclaron con el agua propia del sitio de muestreo hasta anegamiento, después de homogenizarlas mecánicamente y formar una muestra compuesta (Ayala *et al.*, 2001).

Aislamiento y selección de la cepa con mayor actividad celulolítica a partir de suelo

Para la obtención del extracto crudo enzimático utilizado en el T2 y del inóculo microbiano utilizado en el T3 se realizó un *screening* de microorganismos celulolíticos en la matriz suelo. El aislamiento primario se realizó en medio carboximetilcelulosa (CMC) 1% m/v siguiendo el procedimiento descrito por Quintero y colaboradores (2004). Posteriormente las colonias que presentaron algún tipo de actividad celulolítica se sembraron en agar CMC por punción en el centro de la caja. Los halos de hidrólisis revelados con el colorante rojo congo y solución salina se midieron en cm para cada cepa y se analizaron estadísticamente para establecer diferencias significativas.

Las cepas celulolíticas aisladas se conservaron a -20 °C en glicerol al 25% v/v bajo el procedimiento descrito por Poutou *et al.*, 1994.

### Diseño experimental

Las variables independientes manejadas en el estudio incluyen la adición de extracto crudo enzimático al suelo (variable de naturaleza nominal), la adición de microorganismo celulolítico al suelo (variable de naturaleza nominal), el tiempo de incubación de las muestras de suelo (variable de naturaleza ordinal, expresada en días) y finalmente la naturaleza de la matriz empleada (variable de naturaleza nominal). La variable independiente hace referencia a la actividad enzimática (variable de naturaleza continua, expresada en UC/g de suelo).

El sedimento se utilizó como control positivo de la técnica MUF con el fin de verificar que las condiciones bajo las cuales se desarrolló el análisis fluorogénico fueran óptimas para la obtención de resultados satisfactorios (Boschker y Cappenberg, 1994). Como control negativo se utilizó suelo artificial con una composición de 70% arena, 20% arcilla y 10% turba (Porta *et al.*, 2003).

Durante el estudio se realizaron tres tratamientos (tabla 1), evaluando las diferencias de la actividad enzimática durante los 60 días de estudio con análisis periódicos cada 15 días, mediante las dos técnicas utilizadas.

**TABLA 1.** Tratamientos evaluados para la determinación de actividad celulolítica durante el estudio.

Tratamiento	Descripción
Matriz sin tratamiento Suelo artificial	Control negativo
Matriz + extracto crudo enzimático	Actividad celulolítica de 2,34 UC
Matriz + inóculo de <i>Streptomyces sp.</i>	Concentración de 59x10 <sup>3</sup> con/mL

El extracto crudo enzimático se obtuvo a partir del microorganismo con mayor actividad celulolítica (identificado como *Streptomyces sp.*) aislado de las muestras de suelo, al igual que la producción del inoculante utilizado en el T3.

La determinación de la actividad del extracto crudo enzimático se produjo por el procedimiento descrito por Granados y colaboradores (2003). La actividad celulolítica se determinó mediante las técnicas de Somogyi Nelson (SN) y la fluorogénica (MUF), utilizando en esta última la fracción β-glucosa en una concentración de 2 mM (Boschker y Cappenberg, 1994). Cada ensayo se realizó por triplicado.

### Determinación de actividad celulolítica mediante la técnica de Somogyi Nelson

Para la extracción de azúcares de las muestras de suelo y del extracto crudo enzimático utilizado en el T2 se tomaron 5 g ó mL de la muestra y se adicionaron 0,5 mL de tolueno y 20 mL de *buffer* acetato pH 5,5, dejando reposar 20 min a 30 °C. Una vez cumplido este tiempo se centrifugaron las muestras a 8.000 rpm, 20 min a 4 °C (Deng y Tabatabai, 1994).

Del sobrenadante obtenido a partir de la centrifugación se tomaron 200 μL y se mezclaron con 200 μL del reactivo de Somogyi I y 50 μL del reactivo Somogyi II. La mezcla se homogenizó durante 1 min con el uso de un agitador vortex, para posteriormente someterla a 90 °C en baño maría durante 20 min. El enfriamiento se realizó mediante la inmersión de los tubos en agua fría durante 5 min. Finalmente se adicionaron 250 μL del reactivo de Nelson y 700 μL de agua desionizada. La lectura de absorbancia se realizó a 595 nm 24 h después de terminado el procedimiento (Rodríguez, 2000).

### Determinación de actividad celulolítica mediante la técnica fluorogénica

Para la detección de la actividad enzimática extracelular las muestras de suelo se mezclaron en una relación 5:1 con agua desionizada. La técnica se realizó mediante el procedimiento descrito por Boschker y Cappenberg (1994), con una concentración de 4-metilumbeliferil β-glucosa de 2 mM.

La fluorescencia generada se midió en un fluorómetro Perkin-Elmer Coleman 139 UV-VIS, a una longitud de onda de excitación de 360 nm y una longitud de onda de emisión de 455 nm.

La conversión a sustrato hidrolizado se realizó mediante la comparación con la curva patrón, utilizando el fluoró-

geno 4-metilumbeliferona base (MUF). La actividad de  $\beta$ -glucosidasas se define como  $\mu\text{mol}$  MUF liberado por g de suelo y hora.

Para el análisis de los resultados se utilizó el programa estadístico JMP en versión 4.0 para Windows; mediante el test Kruskal Wallis se determinaron diferencias significativas entre los tratamientos evaluados a través del tiempo y, finalmente, se aplicó un índice de correlación de Pearson para establecer la similitud entre los métodos MUF y SN.

## Resultados y discusión

En el aislamiento de cepas con actividad celulolítica realizado a partir de muestras de suelo con el fin de obtener el extracto crudo enzimático para el tratamiento 2 de matriz suelo y matriz sedimento, se logró obtener 16 cepas bacterianas filamentosas cuya actividad celulolítica se evaluó y confirmó en agar CMC al 1% m/v. La actividad se evaluó semicuantitativamente con base en el diámetro de los halos de hidrólisis revelados con rojo congo, resultados que pueden observarse en la tabla 2.

**TABLA 2.** Datos obtenidos de halos de hidrólisis de cada cepa aislada del cultivo modelo, promedio y desviación estándar.

Cepa	Promedio de tamaño de halos (cm) <sup>1</sup>	Desviación estándar
1	1,70	0,42
2	1,08	0,41
3	1,06	0,27
4	1,14	0,21
5	0,98	0,13
6	2,14	0,05
7	1,34	0,34
8	1,38	0,41
9	0,90	0,14
10	0,74	0,30
11	1,70	0,52
12	0,92	0,20
13	1,98	0,11
14	1,58	0,59
15	0,74	0,30
16	1,06	0,05

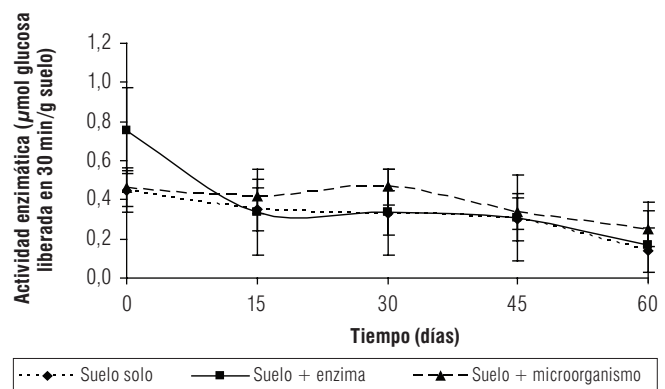
<sup>1</sup> Promedio de 5 réplicas obtenidas en medio CMC 1% m/v.

Los valores máximos de actividad se observaron en las cepas sombreadas en la tabla 2 (cepas 1, 6, 11, 12 y 14), pero mediante el análisis de varianza Anova se estableció que la cepa 6, identificada posteriormente como *Streptomyces*

*sp.*, presentó un mayor tamaño de halo de hidrólisis (2,14 cm) con relación a las demás cepas aisladas, por lo que fue utilizada para la producción del extracto crudo.

Por otro lado, respecto a la cuantificación de glucosa residual mediante la técnica de SN, se comprobó en estudios anteriores que la presencia de metales en la muestra puede llegar a interferir en el desarrollo de color por cambios en la fuerza iónica de la solución que se analiza (Deng y Tabatabai, 1994). Sin embargo, al ser sometida la muestra de suelo a un proceso de decationización, y comparar estadísticamente los datos arrojados con la muestra sin decationizar, no se evidenciaron diferencias significativas en los resultados mediante la técnica, por lo que se hizo innecesaria la aplicación de este paso durante el desarrollo del estudio.

Por otra parte, en la determinación de la actividad celulolítica mediante la técnica de SN en suelo con los tres tratamientos realizados, es evidente una mayor actividad en el tratamiento con adición de microorganismo (figura 1) debido a la deficiencia de materia orgánica presente en la matriz analizada (1,77%). No se obtuvo actividad celulolítica con el control negativo (suelo artificial). En las condiciones de este estudio se esperaría que la actividad enzimática aumentara de manera significativa hasta que el microorganismo iniciara la fase de latencia y/o la materia orgánica fuera un factor limitante, momento en el que la producción de enzimas se detendría.



**FIGURA 1.** Actividad enzimática mediante la técnica de Somogyi Nelson a través del tiempo en los tres tratamientos evaluados en la matriz suelo.

El tratamiento con adición de enzima presenta un comportamiento muy similar al suelo sin tratamiento (figura 1). La disminución drástica de actividad enzimática en el transcurso de los primeros 15 días de incubación se presenta por la composición del suelo (26% arcilla) ya

que las enzimas extracelulares, en este caso celulasas, al ser adicionadas libremente en una muestra determinada, se asocian rápidamente al material particulado, como arcillas, materia orgánica y sustancias húmicas, lo que puede disminuir o inhibir completamente su actividad (Acosta *et al.*, 2007). Este comportamiento responde a varios factores, incluyendo el cambio en la estructura cuaternaria, la capacidad de mantener la integridad del sitio activo, proporción proteína:arcilla de la asociación y los cambios en la disponibilidad de sustrato. En el caso de mantenerse en estado libre pueden ser fácilmente degradadas por proteasas extracelulares presentes en el suelo (Debosz *et al.*, 1999; Tate, 1987).

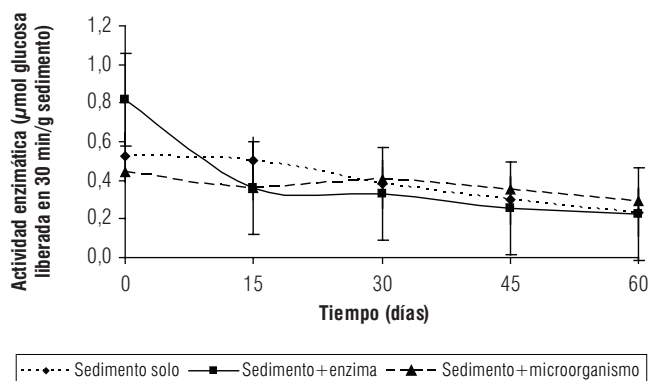
Igualmente, la producción de ácidos orgánicos a partir del metabolismo microbiano logró disminuir el pH del suelo durante los 60 días de estudio hasta llegar a valores cercanos a 4, condiciones bajo las que se dificulta o se reduce la velocidad de degradación de la celulosa, debido a la inestabilidad de la proteína y al número limitado de microorganismos degradadores de celulosa presentes en la matriz. Por esta razón se presenta el descenso de la actividad celulolítica a los 60 días de iniciado el proceso de incubación (Hu-Hu *et al.*, 2004).

La actividad celulolítica se mantiene relativamente estable a partir del día 15 de incubación con una leve disminución a través del tiempo en los tres tratamientos. No obstante, mediante el análisis estadístico (Kruskal Wallis) se evidencian diferencias significativas ( $P=0,0001$ ) en la actividad enzimática durante los 60 días de estudio mediante la técnica de Somogyi Nelson en suelo. Sin embargo, entre tratamientos no se evidenciaron dichas diferencias ( $P=0,3536$ ).

Por su parte, la actividad celulolítica en las muestras de sedimento del humedal muestra un comportamiento similar en los tres tratamientos evaluados (figura 2); se observa que al final del tiempo de incubación los valores de actividad tienden a bajar al mismo nivel (0,228 UC).

En el tiempo 0 del proceso las enzimas celulolíticas muestran la mayor actividad (0,816 UC), la cual disminuye a 0,228 UC a medida que la celulosa sufre el proceso de degradación y es aprovechada por la microflora nativa. Al final del proceso de descomposición la actividad de las enzimas comienza a reflejarse de manera más lenta debido a que los materiales recalcitrantes de las matrices, como la lignina, son la única fuente de carbono disponible (Kourtev *et al.*, 2002).

De otro lado, la tendencia de la actividad enzimática observada en los tratamientos con la adición del microorganismo



**FIGURA 2.** Actividad enzimática en sedimento (control positivo) mediante la técnica de Somogyi Nelson a través del tiempo en los tres tratamientos evaluados.

y el control, es similar a la obtenida en suelo, aunque los valores registrados son mayores, debido posiblemente a que la cantidad de carbono orgánico presente en el sedimento (6,15%) es mayor que en el suelo, pues los restos vegetales constituyen gran proporción de los desechos generados en un humedal, aumentando el potencial celulolítico de la matriz.

Así mismo, en la matriz sedimento el tratamiento con adición de enzima produjo resultados similares a los obtenidos en suelo en el tratamiento 3 (matriz + adición de microorganismo), con la diferencia de que la materia orgánica presente no es un factor limitante. Por el contrario, las condiciones intrínsecas de la matriz, como pH, concentración de oxígeno, humedad, entre otras, probablemente eliminaron por completo su población, debido a que el microorganismo se encontraba adaptado a suelos de mayor oxigenación, menor humedad, mayor temperatura y menor pH.

De esta forma se rechaza la hipótesis nula ( $P=0,0001$ ) ya que se demuestra que los cambios en la actividad enzimática a través del tiempo en sedimento (control positivo) presentan diferencias significativas. No obstante, al igual que en el suelo, se acepta la hipótesis nula de homogeneidad ( $P=0,5782$ ) y se concluye que entre los tratamientos tampoco existen diferencias significativas.

De otra manera, y como parte importante del estudio, la sensibilidad en la determinación de la actividad celulolítica mediante la técnica fluorogénica se evidenció en las dos matrices evaluadas (suelo y sedimento) (figura 3) ya que la obtención de valores tan bajos mediante esta técnica de difícil detección comparados con otras técnicas empleadas para el mismo fin. Debosz *et al.* (1999) indican que la reactividad de los fluorógenos hace que el método sea tanto específico como sensible, ya que depende de la afinidad

sustrato-enzima. Igualmente, Vassalo y colaboradores (2006) afirman que los sustratos fluorogénicos se usan para detectar específicamente enzimas en muestras de origen biológico con actividad baja y con mayor confiabilidad frente a otras técnicas fotométricas y de potenciometría (Boshker y Cappenberg, 1994). Todo esto sustenta la excelente alternativa que se vuelven los sustratos fluorogénicos para la determinación de la actividad enzimática en matrices con insuficiencia de materia orgánica.

Los valores de actividad enzimática tan bajos presentados en suelo (figura 3B) se deben a varios factores: i) la actividad de  $\beta$ -glucosidasas se ve disminuida en suelos destinados a la agricultura, comparados con bosques y pastizales, debido a las pérdidas graduales de materia orgánica; ii) la cantidad de microorganismos, principal fuente de enzimas en suelo, se ve disminuida generalmente en suelos de clima cálido y regiones áridas, comparados con los de clima frío, debido a la poca disponibilidad de agua por baja retención y alta evaporación; iii) la degradación de materia orgánica excede la tasa de síntesis de humus en suelos de regiones cálidas, lo que afecta seriamente a la actividad celulolítica. Igualmente, los suelos agrícolas son terrenos desnudos donde las condiciones ambientales afectan con mayor agresividad a las poblaciones microbianas nativas y su metabolismo, a diferencia de suelos con abundante vegetación como los pastizales, donde hay mayor protección de la fracción biológica por el recubrimiento vegetal (Acosta *et al.*, 2007; Tate, 1987), todas las características en mención, propias del terreno en estudio.

Así mismo, las  $\beta$ -glucosidasas son las más abundantes y fáciles de detectar de los tres grupos de enzimas que intervienen en la degradación de celulosa en suelo. Su actividad es de particular importancia por su rol central en el ciclo de materia orgánica, la cual se considera como un

componente valioso y fundamental de la calidad del suelo (Turner *et al.*, 2002).

Es importante anotar que las actividades enzimáticas tan bajas reflejadas en el sedimento con los tratamientos evaluados pudieron verse disminuidas por la presencia del bioinoculante, que generó competencia con la flora autóctona del sedimento durante los primeros 15 días del estudio. Por esta razón la actividad  $\beta$ -glucosidasa observada a partir del tiempo 30 es menor que la del sedimento sin tratamiento alguno, indicando posiblemente que el microorganismo inoculado fue eliminado por completo, así los valores conseguidos corresponderán posiblemente a la microflora nativa de la matriz (Debosz *et al.*, 1999).

El tratamiento con adición de enzima, a diferencia de los otros tratamientos, mostró un aumento de la actividad  $\beta$ -glucosidasa debido a que la enzima adicionada pudo asociarse a partículas del suelo sin sufrir disminución funcional importante durante los primeros periodos de incubación. Por esta razón permanecieron activas desde el momento de la inoculación, liberando glucosa mediante la intervención de las  $\beta$ -glucosidasas y de algunas  $\beta$ -1,4-glucanasas, a partir de la materia orgánica presente en el suelo y consecuentemente estimulando el crecimiento microbiano (Acosta *et al.*, 2007).

A su vez la microflora, al aumentar su biomasa, aumenta la producción de estas proteínas, cuya actividad se suma a la cantidad de enzima adicionada con anterioridad. Finalmente, su actividad decrece por agotamiento de materia orgánica al igual que en los demás tratamientos.

Aunque la adición de enzima generó un aumento en la actividad enzimática, los valores obtenidos no son muy altos, comparados con los descritos por Debosz *et al.* (1999),

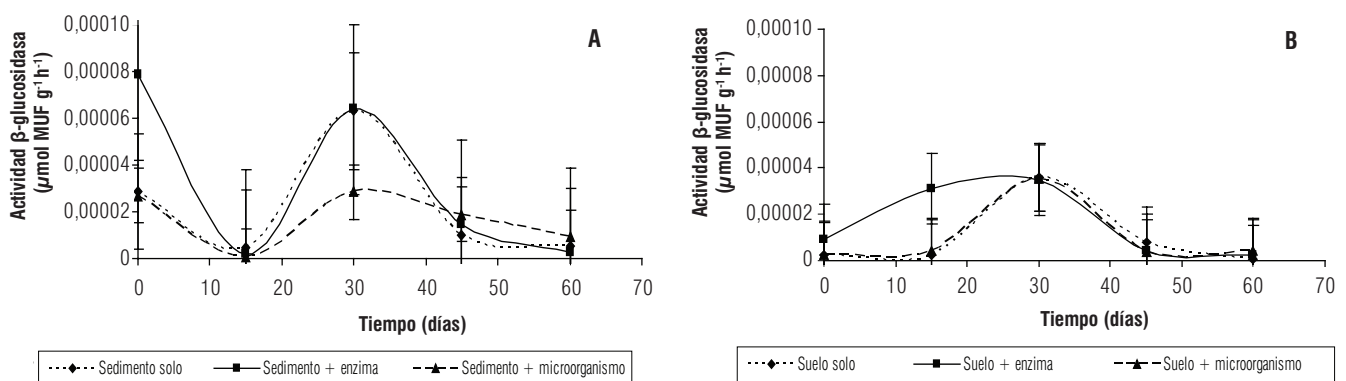


FIGURA 3. Actividad enzimática mediante la técnica fluorogénica a través del tiempo en los tres tratamientos evaluados. A. Sedimento (control positivo). B. Suelo.

debido a que las  $\beta$ -glucosidasas extracelulares inmovilizadas tienen una actividad despreciable, y la degradación de celobiosa en suelos se debe a enzimas liberadas de organismos en crecimiento más que a la fracción de enzimas acumulada (Turner *et al.*, 2002).

La actividad enzimática obtenida a través del tiempo en sedimento de humedal (figura 3A), demostró que las condiciones bajo las cuales se desarrolló la técnica con el uso de 4-metilumbeliferil  $\beta$ -glucosa fueron las indicadas para permitir el desarrollo del máximo porcentaje de fluorescencia de las muestras, pues esta matriz se utilizó como control positivo de la técnica (Boshker y Cappenberg, 1994). Esto indica que el pH, la temperatura y otras variables del procedimiento pueden aplicarse igualmente tanto al suelo como al sedimento.

Finalmente, de acuerdo con el análisis de correlación se expone de manera clara que los métodos comparados no presentan un ajuste lineal ( $r^2 = 0,15$ ) por lo que no pueden ser utilizados indistintamente para la determinación de actividad celulolítica en suelo, debido a que Somogyi Nelson se basa en la cuantificación de producto final liberado (azúcares reductores), mientras que la técnica fluorogénica cuantifica la enzima específica involucrada en la hidrólisis del sustrato. Por tanto, para la cuantificación enzimática la técnica colorimétrica, al ser indirecta, presenta menor especificidad que la técnica fluorogénica, considerada directa (Weder y Kaiser, 1995).

## Conclusiones

El uso de técnicas con baja sensibilidad en estudios de enzimas de suelo aumenta la complejidad y disminuye la confiabilidad de los resultados, debido a que se requeriría mayores tiempos de incubación por la imposibilidad de detectar bajas concentraciones del producto de reacción. Esto hace que la muestra tenga una mayor exposición a condiciones ambientales adversas, evitando que la actividad enzimática presente un desarrollo normal, ya que factores como la humedad, pH, temperatura y oxigenación pueden limitar la cinética enzimática.

Por su parte, los sustratos fluorogénicos poseen varias ventajas frente a las técnicas colorimétricas tradicionales, debido a que requieren menor tiempo de incubación, procedimientos más cortos, menores riesgos en la manipulación, mayor sensibilidad y especificidad. Además los resultados obtenidos en este estudio demuestran que son una buena opción para la determinación de actividad enzimática en suelos agrícolas con bajo contenido de

materia orgánica, baja humedad y altas temperaturas, ya que los valores tienden a ser muy bajos por las condiciones adversas.

Si se pretende utilizar los datos de actividad celulolítica como un parámetro indicador en la calidad de un determinado suelo, la técnica fluorogénica con el uso de 4-metilumbeliferil  $\beta$ -glucosa es la más indicada, debido a que las  $\beta$ -glucosidasas son ampliamente utilizadas para el monitoreo de la calidad del suelo ya que cumplen un papel importante en el ciclaje de la materia orgánica del suelo, pues es el paso limitante en la degradación de celulosa, y son las más abundantes. Además, su detección es relativamente simple mediante esta técnica, y se pueden detectar cambios mínimos en la actividad celulolítica a través del tiempo, debido a la alta sensibilidad de la técnica (Turner *et al.*, 2002; Cerón y Melgarejo, 2005).

Por el contrario, si los datos de actividad celulolítica no van a ser utilizados para este fin, o no se requiere la actividad celulolítica en estricto sentido, no se descarta la posibilidad de utilizar la técnica de Somogyi Nelson, pues la selección del método dependerá del objetivo y del presupuesto del estudio. Los valores obtenidos brindarán al investigador una visión global de las actividades enzimáticas presentes, incluyendo celulasas, xilanasas y amilasas. No obstante, el costo de la técnica aumentará dependiendo de la presencia de metales en la matriz, pues son interferentes en el desarrollo de color en el método, por tanto se requerirá el uso de resina de intercambio catiónico para su remoción y evitar así la obtención de resultados erróneos (Deng y Tabatabai, 1994).

Adicionalmente, a pesar de la especificidad de la técnica fluorogénica, la actividad de  $\beta$ -glucosidasas tiene una correlación estadísticamente significativa con el carbono y el nitrógeno orgánico, lo que también puede brindar una visión global de la materia orgánica disponible y por tanto el potencial de las actividades enzimáticas (Debosz *et al.*, 1999; McLaughlin *et al.*, 2000).

Es importante tener en cuenta que, aunque la técnica fluorogénica con sustratos derivados de la 4-metilumbeliferona (MUF) es aplicable a gran variedad de matrices y enzimas, debido a la diversidad de sustratos disponibles en el mercado para la detección de diferentes enzimas, la concentración máxima de MUF estará dada por la cantidad de materia orgánica disponible. Por esto, la implementación de esta técnica en sustratos como vermicompuesto o compost requerirá mayores concentraciones de fluorógeno que las utilizadas en este estudio.

## Agradecimientos

Al proyecto CCI-FIUC-PUJ en formación de técnicos para el aprovechamiento de materia orgánica en suelos de países en vías de desarrollo.

## Literatura citada

- Acosta, V., L. Cruz, D. Sotomayor y L. Pérez. 2007. Enzyme activities as affected by soil properties and land use in a tropical watershed. *Appl. Soil Ecol.* 35, 35-45.
- Ayala, A., K. Santamaría y M. Martínez. 2001. Evaluación de la remoción de benceno por bacterias aisladas del rizoplaneo del *Limnobium laevigatum* presente en el humedal de la Conejera. *Microbiología industrial*. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá. pp. 25-26.
- Barrera, E. y E. Brito. 1997. Control del saltamontes *Rhammatocerus sclustocercoides* en estado de ninfa: Puerto López, Meta, Colombia. Trabajo de grado. Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá. p. 17.
- Boschker, H. y T. Cappenberg. 1994. A sensitive method using 4-methylumbelliferyl- $\beta$ -cellobiose as a substrate to measure (1,4)- $\beta$ -glucanase activity in sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 3592-3596.
- Cerón, L. y L. Melgarejo. 2005. Enzimas del suelo: indicadores de salud y calidad. *Acta Biológica Colombiana* 10, 5-15.
- Chernoglazov, V., A. Jafarova y A. Klyosov. 1988. Continuous photometric determination of endo-1,4- $\beta$ -D-glucanases (cellulase) activity using 4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-cellobioside as a substrate. *Analytical Biochem.* 179, 186-189.
- Debosz, K., P. Rasmussen y A. Pedersen. 1999. Temporal variations in microbial biomass C and cellulolytic enzyme activity in arable soils: effects of organic matter input. *Appl. Soil Ecol.* 13, 209-218.
- Deng, S.P. y M.A. Tabatabai. 1994. Colorimetric determination of reducing sugars in soils. *Soil Biol. Biochem.* 26, 473-477.
- Granados, L., J. Valderrama y M. Franco. 2003. Evaluación de la actividad proteolítica y amilolítica de actinomicetes termofílicos aislados a partir de pilas de compost. *Microbiología industrial*. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá. p. 27.
- Hu-Hu, Z., G. Wang y H. Yu. 2004. Anaerobic degradation of cellulose by rumen microorganisms at various pH values. *Biochem. Eng. J.* 21, 59-62.
- Karlen, D., S. Sndrews y J. Doran. 2001. Soil quality: current concepts and applications. *Adv. Agron.* 74, 1-22.
- Kourtev, P., J. Ehrenfeld y W. Huang. 2002. Enzyme activities during litter decomposition of two exotic and two native plant species in hardwood forest of New Jersey. *Soil Biol. Biochem.* 34, 1207-1218.
- McLaughlin, J., M. Gale, M. Jurgensen y C. Trettin. 2000. Soil organic matter and nitrogen cycling in response to harvesting, mechanical site preparation, and fertilization in a wetland with a mineral substrate. *Forest Ecol. Mgt.* 129, 7- 23.
- Nielsen, M.N. y A. Winding. 2002. Microorganisms as indicators of soil health. National Environmental Research Institute, Denmark. Technical report No. 388. pp. 13-15, 22, 47-48.
- Porta, J., M. López y C. Roquero. 2003. Edafología: para la agricultura y el medio ambiente. Tercera edición. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid. 322 p.
- Poutou, R., E. Amador y M. Candelario. 1994. Banco de células primario: caracterización y papel en la producción de proteínas recombinantes. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología Aplicada. Sociedad Iberoamericana de Biotecnología 11, 55-59.
- Quintero, M., A. Pedroza y A. Matiz. 2004. Evaluación de un pre-formulado sólido como acelerador de compostaje de residuos orgánicos en el municipio de El Cocuy. Trabajo de grado. Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá. pp. 52-75.
- Rodríguez, M. 2000. Towards identifying biochemical markers for post harvest physiological deterioration in Cassava. Ph.D. thesis. University of Bath, U.K.
- Tate, R. 1987. Soil organic matter: biological and ecological effects. John Wiley and Sons, Nueva York. pp. 70-77.
- Turner, B., D. Hopkins, P. Haygarth y N. Ostle. 2002.  $\beta$  - Glycosidase activity in pasture soils. *Appl. Soil Ecol.* 20, 157-162.
- Vassalo, A., E. Rogana, C. Fátima y D. Ferreira. 1999. The correction of reaction rates in continuous fluorometric assays of enzymes. *Journal of Biochemistry and Biofisiology Methods*. doi: 10.1016/j.jbbm; consulta: 11 de julio de 2007.
- Wader, J. y K. Kaiser. 1995. Fluorogenic substrates for hydrolase detection following electrophoresis. *J. Chromatography* 698, 181-201.