

EFEITO DA SATURAÇÃO POR BASES SOBRE A ATIVIDADE DE FOSFATASES EM UM SOLO DE TABULEIRO COSTEIRO CULTIVADO COM CITROS.

II. CONSTANTES CINÉTICAS DAS ENZIMAS⁽¹⁾

M. F. FERNANDES⁽²⁾, R. P. M. FERNANDES⁽³⁾, J. L. ANJOS⁽⁴⁾, L. F. SOBRAL⁽²⁾, A. S. ARAÚJO⁽⁵⁾

RESUMO

Determinaram-se as constantes cinéticas $K_{m_{app}}$ e $V_{max_{app}}$ de fosfatases de um solo de tabuleiro costeiro com diferentes valores de saturação por bases (32,0; 45,0; 64,0 e 76,6%). As constantes foram determinadas tanto em condições de reação com pH ótimo para atividade das fosfatases alcalinas e ácidas, quanto em valores de pH correspondentes aos de cada nível de saturação por bases. As fosfatases apresentaram cinética michaeliana, independentemente da saturação por bases ou da condição de pH utilizada para determinar a atividade enzimática. A elevação da saturação por bases resultou em redução dos valores de $K_{m_{app}}$ das fosfatases ácidas e alcalinas, avaliadas nos respectivos valores de pH ótimo; ao passo que a $V_{max_{app}}$ foi incrementada para as fosfatases alcalinas e permaneceu aproximadamente constante para as ácidas. Reduções do $K_{m_{app}}$ e incrementos da $V_{max_{app}}$, em função do aumento da saturação por bases, também foram observados para fosfatases avaliadas nos valores de pH equivalentes aos dos tratamentos com saturação por base. As maiores variações nos valores de $K_{m_{app}}$ e $V_{max_{app}}$, em função da saturação por base, ocorreram em resposta às alterações no pH. Outras características do solo alteradas pela saturação por bases também apresentaram efeito sobre as constantes cinéticas das fosfatases, porém em menor intensidade do que o pH.

Termos de indexação: cinética enzimática, enzimas, fosfatases, tabuleiros costeiros, citros, saturação por bases, calagem.

⁽¹⁾ Recebido para publicação em outubro de 1997 e aprovado em maio de 1998.

⁽²⁾ Pesquisador da EMBRAPA - Centro de Pesquisa Agropecuária dos Tabuleiros Costeiros (CPATC). Av. Beira-Mar, 3250, Caixa Postal 44, CEP 49001-970 Aracaju (SE).

⁽³⁾ Professora Assistente do Departamento de Fisiologia, Universidade Federal de Sergipe (UFS). Cidade Universitária José Aloísio Campos, s/n. Rosa Elze, CEP 49100-000 São Cristóvão (SE).

⁽⁴⁾ Pesquisador da EMDAGRO - Empresa de Desenvolvimento Agropecuário de Sergipe e Mestrando em Agronomia. Solos, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Rua D. Manuel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, CEP 52171-900 Recife (PE).

⁽⁵⁾ Estudante de Agronomia do Departamento de Agronomia, UFS. Bolsista EMBRAPA.

SUMMARY: EFFECT OF BASE SATURATION ON PHOSPHATASE ACTIVITIES FROM A COASTAL TABLELAND SOIL CULTIVATED WITH ORANGETREE. II. KINETIC CONSTANTS

The kinetic constants $K_{m_{app}}$ and $V_{max_{app}}$ of phosphatase activity from a coastal tableland soil grown with orange trees, submitted to different base saturation levels (32.0; 45.0; 64.0 and 76.6%), were determined. These determinations were made in optimum pH values for alkaline and acid phosphatases and in the pH values obtained for each base saturation level. Phosphatase activity has followed Michaelis-Menten kinetics, regardless the soil base saturation levels or pH values used for enzymatic activity evaluation. Increases in the soil bases saturation resulted in lower $K_{m_{app}}$ values for both enzymes, while $V_{max_{app}}$ was increased for alkaline phosphatase and did not show significant variation for acid phosphatase. Decreases in $K_{m_{app}}$ and increases in $V_{max_{app}}$ values in response to increasing soil bases saturation were also observed for phosphatases evaluated at pH values found at each soil base saturation level. The most remarkable changes in $K_{m_{app}}$ and $V_{max_{app}}$ in response to soil base saturation were the result of shifts in pH values.

Index terms: enzymatic kinetic, enzyme, phosphatase, coastal tableland, citrus, soil base saturation, liming.

INTRODUÇÃO

As constantes cinéticas de Michaelis-Menten (K_m) e a velocidade máxima (V_{max}) são utilizadas na caracterização enzimática (Lau et al., 1987), para comparar a eficiência catalítica das enzimas (Tabatabai & Bremner, 1971) e para verificar o tipo de inibição causado por diferentes fatores sobre a atividade destas (Juma & Tabatabai, 1978; Lehninger et al., 1993). Os termos K_m aparente ($K_{m_{app}}$) e velocidade máxima aparente ($V_{max_{app}}$) têm sido empregados para descrever as constantes cinéticas de enzimas não purificadas (Brun et al., 1992; Ertan, 1992; Schlee et al., 1994; Miranda, 1997). Valores de $K_{m_{app}}$ e $V_{max_{app}}$ de diferentes enzimas do solo, como urease (Paulson & Kurtz, 1970), fosfatases ácidas e alcalinas (Eivazi & Tabatabai, 1977; Juma & Tabatabai, 1978), fosfodiesterases e fosfatidesterases (Eivazi & Tabatabai, 1977) e arilsulfatases (Tabatabai & Bremner, 1971) já foram relatados na literatura.

A atividade de uma enzima depende de sua conformação tridimensional, podendo esta ser alterada pelo pH, pela temperatura, pela presença de íons ativadores ou inibidores da atividade catalítica, bem como por outros fatores (Juma & Tabatabai, 1978; Goldstein et al., 1988; Lehninger et al., 1993). Dessa forma, práticas agrícolas que alteram essas características do solo possivelmente influenciarão a atividade das enzimas e a eficiência catalítica. De acordo com Juma & Tabatabai (1978), o $K_{m_{app}}$ de fosfatases ácidas e alcalinas é aumentado na presença de fosfato inorgânico solúvel, acarretando uma menor eficiência catalítica dessas enzimas. A calagem também pode influenciar a atividade de fosfatases ácidas e alcalinas, como observado por Fernandes et al. (1998) em solo de tabuleiros costeiros, cultivados com citros. Além disto, as práticas agrícolas podem ter uma ação

indireta sobre a eficiência das enzimas do solo, em consequência da alteração quantitativa ou qualitativa que podem causar na microbiota do solo. Nesse sentido, diferenças na eficiência catalítica de enzimas do mesmo tipo, porém produzidas por organismos distintos, já foram relatadas na literatura (Tarafdar & Chhonkar, 1978; Antibus & Linkins III, 1992).

Os objetivos do presente trabalho foram: (a) determinar, em condições ótimas de pH, as constantes $K_{m_{app}}$ e $V_{max_{app}}$ de fosfatases ácidas e alcalinas produzidas em solo com diferentes saturações de base, (b) determinar $K_{m_{app}}$ e $V_{max_{app}}$ dessas enzimas nos valores de pH obtidos em cada um dos tratamentos com saturação por bases do solo e (c) avaliar as alterações observadas nessas constantes, considerando a saturação por bases do solo.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta e processamento de amostras de solo

Os dados deste estudo foram obtidos utilizando-se amostras de solo provenientes da mesma área experimental citada por Fernandes et al. (1998). Informações sobre delineamento experimental, número de amostras de solo utilizadas, métodos de coleta e processamento dessas amostras também se encontram no referido trabalho.

Obtenção das curvas de resposta de fosfatases ácidas e alcalinas às concentrações de substrato e determinação das constantes cinéticas dessas enzimas, em condições ótimas de pH

Curvas de resposta da atividade enzimática às concentrações de substrato foram obtidas, para cada um dos tratamentos de saturação por bases, em

tampão MUB com pH 6,5, para as fosfatases ácidas, e com pH 11,0, para as alcalinas. Esses valores de pH são indicados por Tabatabai (1982) como sendo ótimos para cada uma dessas fosfatases. Adicionaram-se, a 1 g de solo, 4 mL do tampão MUB adequado, esperando-se 2 horas para estabilização do pH, e mais 1 mL de uma solução de p-nitrofenilfosfato, nas concentrações de 5; 6,65; 10; 20 e 40 mM, obtendo-se, respectivamente, 1; 1,33; 2; 4 e 8 mM desse substrato, em termos de volume final da solução de reação (Juma & Tabatabai, 1978). Após 30 minutos de incubação, à temperatura ambiente, adicionaram-se 1 mL de CaCl_2 (0,5M) e 2 mL de NaOH (1M), com o objetivo de parar as reações. As misturas de reação foram filtradas em papel Whatman nº 2 para retenção do solo. A intensidade de coloração, obtida em função da quantidade de paranitrofenol liberada após incubação, foi determinada no filtrado, por espectrofotometria, em comprimento de onda de 410 nm (Tabatabai, 1982). A quantidade de p-nitrofenol liberada/g de solo/hora (V_0) foi determinada a partir da curva-padrão de p-nitrofenol.

Para determinar os valores de $K_{m_{app}}$ e $V_{max_{app}}$, os resultados de atividade enzimática obtidos foram dispostos em um gráfico de Lineweaver-Burk, plotando-se o inverso da atividade enzimática ($1/V_0$), em função do inverso das concentrações do substrato ($1/S$). As interseções das retas com os eixos y e x correspondem a $(1/V_{max_{app}})$ e $(-1/K_{m_{app}})$, respectivamente.

Todos os resultados são médias de determinações colorimétricas em duplicata.

Obtenção da resposta de fosfatases às concentrações de substrato e determinação das constantes cinéticas dessas enzimas nos valores de pH do solo de cada tratamento com saturação por bases

As reações para determinação da atividade de fosfatases produzidas em solo com saturação por bases de 76,6; 68,0; 54,0 e 32% foram realizadas em tampão MUB, com pH ajustados para 6,2; 5,8; 5,3 e 4,8, respectivamente. Tais valores de pH foram obtidos após análise das amostras de solo provenientes de cada um dos tratamentos com saturação por bases (EMBRAPA, 1997). Os demais procedimentos da análise de atividade foram idênticos aos descritos no item anterior.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeito da saturação por bases do solo sobre as constantes cinéticas de fosfatases ácidas e alcalinas, determinadas em condições ótimas de pH

As atividades de fosfatases ácidas e alcalinas, avaliadas em seus respectivos valores de pH ótimo de 6,5 e 11,0, apresentaram resposta hiperbólica às diferentes concentrações de p-nitrofenilfosfato, independentemente da saturação por bases do solo no qual essas enzimas foram produzidas (Figura 1a,b). Enzimas que apresentam essa resposta seguem a cinética de Michaelis-Menten (Lehninger et al., 1993). Diversos autores já descreveram tal comportamento para fosfatases de diferentes origens

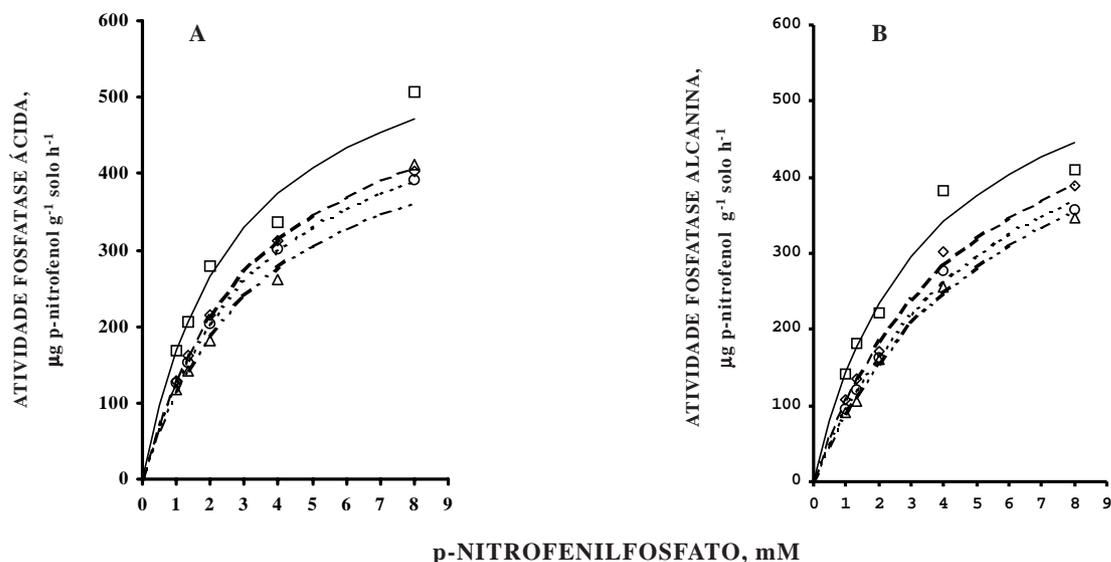


Figura 1. Curvas de saturação pelo substrato das fosfatases ácidas (A) e alcalinas (B), produzidas em solos com saturação por base de 76,6% (—□—), 68,0% (—◇—), 45,0% (---○---) e 32,0% (---Δ---). As curvas para fosfatases ácidas e alcalinas foram obtidas em tampão MUB com valores de pH ótimo para atividade enzimática, de 6,5 e 11,0, respectivamente.

(Juma & Tabatabai, 1978; Dood et al., 1987; Lau et al., 1987).

Independentemente dos tratamentos com saturação por base, os valores de atividade das fosfatases ácidas e alcalinas (V_0), em resposta a concentração de substrato ($[S]$), adequaram-se à transformação linear da equação de Michaelis-Menten, obtida pela plotagem dos inversos de V_0 , em função dos inversos de $[S]$ (Figura 2a,b). De acordo com Tabatabai & Bremner (1971) e Eivazi & Tabatabai (1977), esta é uma condição essencial para validar a utilização desse método para a determinação das constantes cinéticas de uma enzima.

Os valores de $K_{m,app}$ e $V_{max,app}$ de fosfatases ácidas e alcalinas, obtidos no presente trabalho, são similares aos determinados por Tabatabai & Bremner (1971) e Eivazi & Tabatabai (1977), em alguns solos americanos.

A elevação da saturação por bases do solo de 32,0 para 76,6% da CTC resultou em um incremento de 21% na $V_{max,app}$ das fosfatases ácidas e praticamente não alterou essa constante para as fosfatases alcalinas (Quadros 1 e 2).

O valor de $K_{m,app}$ das fosfatases ácidas manteve-se estável entre os três tratamentos com menor saturação por base, apresentando, no entanto, uma redução entre os valores de 68,0 e 76,6% de saturação por bases (Quadro 1). Para as fosfatases alcalinas, observaram-se reduções acentuadas do valor de $K_{m,app}$, em resposta ao incremento na saturação por bases (Quadro 2).

Quadro 1. Valores de $K_{m,app}$ e $V_{max,app}$ das fosfatases ácidas, determinadas em tampão universal modificado (pH 6,5), em amostras de solo com diferentes valores de saturação por bases (números entre parênteses correspondem a valores percentuais)

Saturação por bases do solo	$K_{m,app}$	$V_{max,app}$
%	mM p-nitrofenilfosfato	$\mu\text{g p-nitrofenol g}^{-1} \text{h}^{-1}$
76,6	2,74 (77)	631,8 (121)
68,0	3,52 (99)	588,2 (113)
45,0	3,47 (97)	560,2 (107)
32,0	3,56 (100)	522,7 (100)

De acordo com Dodd et al. (1987), o valor de $K_{m,app}$ mantém uma relação inversa com a afinidade da enzima pelo substrato, e o de $V_{max,app}$, uma relação direta com a velocidade de catálise desse substrato. Lehninger et al. (1993) relataram que o valor de $K_{m,app}$ mantém uma relação inversa com a eficiência catalítica da enzima.

Considerou-se que os efeitos da saturação por bases, relacionados com acidez do solo, sobre a atividade enzimática foram anulados ou minimizados, já que as amostras de solo foram incubadas, por

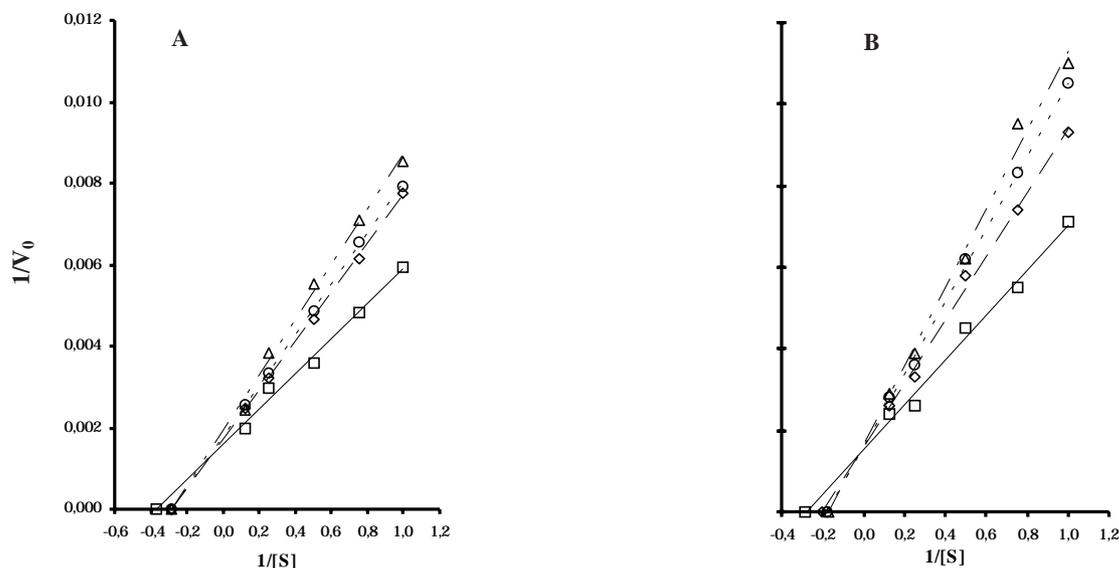


Figura 2. Gráfico de Lineweaver-Burk para as fosfatases ácidas (A) e alcalinas (B), produzidas em solo com os valores de saturação por base: 76,6% (—□—), 68,0% (---◇---), 45,0% (.....○.....) e 32,0% (-..-Δ..-). A concentração do substrato ($[S]$) e a atividade das fosfatases (V_0) estão expressos em mM e $\mu\text{g de p-nitrofenol/g de solo/hora}$, respectivamente.

Quadro 2. Valores de $K_{m,app}$ e $V_{max,app}$ das fosfatases alcalinas, determinadas em tampão universal modificado (pH 11,0), em amostras de solo submetidas a diferentes valores de saturação por bases (números entre parênteses correspondem a valores percentuais)

Saturação por bases do solo	$K_{m,app}$	$V_{max,app}$
%	mM p-nitrofenilfosfato	$\mu\text{g p-nitrofenol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$
76,6	3,47 (57)	638,4 (103)
68,0	4,87 (80)	628,2 (101)
45,0	5,65 (93)	631,8 (102)
32,0	6,05 (100)	621,6 (100)

2 horas, em tampão MUB com pH ótimo, previamente à adição do substrato. Dessa forma, as modificações observadas nos valores de $K_{m,app}$ e $V_{max,app}$, em função da saturação por bases, na condição de pH ótimo, devem ser atribuídas a efeitos da acidez ocorridos previamente à incubação do solo ou a efeitos da saturação por bases não relacionados com o pH. Assim, é possível que as diferentes condições de saturação por bases do solo tenham resultado em modificações qualitativas da microbiota produtora dessas fosfatases, influenciando, assim, os valores das constantes cinéticas das enzimas. Muitas intervenções antrópicas, dentre elas algumas práticas agrícolas, apresentam grande potencial de alteração quantitativa e qualitativa da microbiota do solo (Haynes & Swift, 1988; Cattelan & Vidor, 1990). A elevação do pH de um solo ácido para valores próximos da neutralidade, por exemplo, resulta em incremento da população de bactérias, em detrimento da população fúngica (Viro, 1963).

De acordo com alguns autores, diversas isoformas de determinada enzima, com diferentes valores de constantes cinéticas, podem ser produzidas por organismos diferentes, ou por um mesmo organismo, dependendo das condições ambientes (Paulson & Kurtz, 1970; Tabatabai & Bremner, 1971; Goldstein et al., 1988). Paulson & Kurtz (1970) observaram variações nos valores de K_m da enzima urease, em função de flutuações nas populações microbianas.

Uma segunda hipótese, especialmente válida para as fosfatases alcalinas, advém da observação de que o perfil de resposta dessas fosfatases ao incremento da concentração de substrato (Figura 2b) é característico da ocorrência de inibição enzimática não-competitiva. De acordo com Lehninger et al. (1993), inibidores não-competitivos alteram os valores de $K_{m,app}$ de uma enzima, sem alterar os de $V_{max,app}$.

No presente estudo, tal inibição estaria ocorrendo em conseqüência de um fator cuja disponibilidade no solo correlaciona-se negativamente com a saturação por bases. Abd-Alla et al. (1994) relataram que Zn^{2+} e Fe^{3+} , dentre outros cátions, apresentam alta capacidade inibitória sobre as fosfatases alcalinas e, em menor intensidade, sobre as fosfatases ácidas. Visto que a disponibilidade desses cátions apresenta interação negativa não só com o pH, mas também com a quantidade de $CaCO_3$ (Mengel & Kirkby, 1978), acredita-se que enzimas produzidas em solos com menores doses de calcário possam ter sido inibidas com maior intensidade por esses cátions, apresentando, assim, maiores valores de $K_{m,app}$. Além disto, o Ca^{2+} e o Mg^{2+} são ativadores potentes da capacidade catalítica de fosfatases alcalinas (Abd-Alla et al., 1994). Assim, o incremento desses cátions, em função dos tratamentos com doses crescentes de calcário, também pode ser uma explicação para a maior eficiência das enzimas produzidas. No trabalho anterior (Fernandes et al., 1998), a atividade de fosfatases alcalinas apresentou correlação positiva com os teores de cálcio e magnésio no solo, sendo mais intensa com o segundo cátion.

Efeito da saturação por bases do solo sobre as constantes cinéticas de fosfatases, determinadas em pH correspondentes aos do solo em cada valor de saturação por bases

A resposta hiperbólica ao incremento do substrato e a alta linearidade dos dados, após transformação da equação de Michaelis-Menten, também foram observadas para as enzimas avaliadas no pH do solo (Figura 3).

Observou-se grande aumento da $V_{max,app}$, bem como redução do $K_{m,app}$, das fosfatases, à medida que a saturação por bases foi elevada (Quadro 3). Nessas condições, as alterações de $K_{m,app}$ e $V_{max,app}$ podem ser atribuídas aos efeitos totais da saturação por bases sobre as enzimas, incluindo efeitos diretos e indiretos do pH, bem como aos efeitos não relacionados com acidez.

Visto que nos valores de pH obtidos nos diferentes valores de saturação por bases a atividade de fosfatases ácidas é preponderante sobre as alcalinas, supõe-se que os efeitos da saturação por bases, observados sobre o $K_{m,app}$ e a $V_{max,app}$, ocorreram, essencialmente, em função de alterações na eficiência dessa primeira enzima. Pelo fato de as alterações causadas pela saturação por bases na $V_{max,app}$ e $K_{m,app}$ de fosfatases avaliadas em pH do solo (Quadro 3) terem sido muito maiores do que as observadas nas constantes de fosfatases ácidas em pH ótimo (Quadro 1), concluiu-se que os efeitos do pH sobre tais enzimas são mais relevantes do que os efeitos não relacionados com esse fator.

A alteração na eficiência catalítica está relacionada, possivelmente, com a desnaturação parcial das enzimas em valores de pH abaixo ou

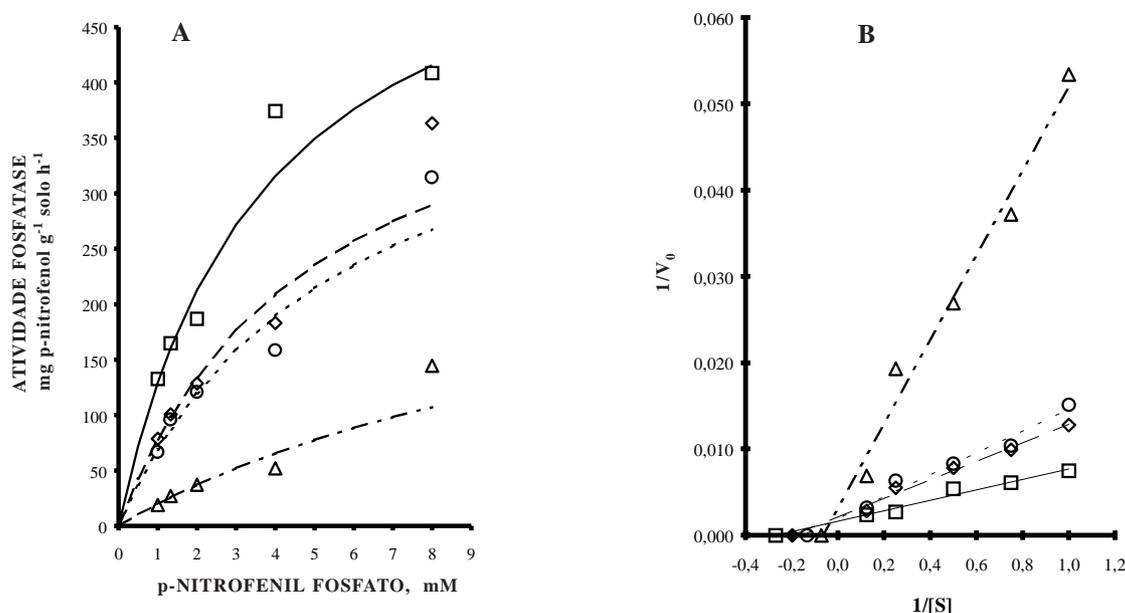


Figura 3. Resposta de fosfatases ao incremento das concentrações de substrato, em solo com saturação por bases de 76,6% (—□—), 68,0% (—◇—), 45,0% (—○—) e 32,0% (—△—), quando avaliadas em tampão com valores de pH correspondentes aos encontrados nestas diferentes porcentagens (A); e respectivas curvas de Lineweaver-Burk (B).

Quadro 3. Valores de $K_{m,app}$ e $V_{max,app}$ das fosfatases, determinadas em tampão universal modificado, ajustados para valores de pH correspondentes aos obtidos no solo submetido aos diferentes valores de saturação por bases (números entre parênteses correspondem a valores percentuais)

Saturação por bases do solo	$K_{m,app}$	$V_{max,app}$
%	mM p-nitrofenilfosfato	$\mu\text{g p-nitrofenol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$
76,6	3,71 (26)	608,4 (207)
68,0	5,06 (36)	473,6 (161)
45,0	5,62 (40)	455,9 (155)
32,0	14,00 (100)	294,5 (100)

acima do valor de pH ótimo de atividade enzimática. Desnaturação da estrutura tridimensional nativa, em função do pH, já foi observada para diversas enzimas (Lehninger et al., 1993). Como relatado anteriormente, efeitos relacionados com a alteração da solubilidade de cátions ativadores e inibidores da atividade catalítica das fosfatases, em diferentes condições de pH, também podem ter ocorrido.

Este resultado discorda dos obtidos por Fernandes et al. (1998), que relataram a ausência de correlação entre pH de amostras desse mesmo solo e atividade de fosfatases ácidas, avaliadas em pH ótimo. Isto se deve à redução dos efeitos do pH sobre a enzima, em condições de pH ótimo. Dessa forma, determinações de $K_{m,app}$ e $V_{max,app}$, em condições de pH ótimo, são adequadas, apenas, para avaliar a eficiência enzimática potencial, e não a eficiência real, já que os efeitos diretos e indiretos do pH sobre as enzimas são reduzidos ou anulados.

Para um mesmo valor de saturação por bases, observou-se que os valores de $K_{m,app}$ foram menores nas análises de fosfatases ácidas em pH 6,5 do que nas análises de fosfatase nos valores de pH obtidos em quaisquer dos tratamentos de saturação por base (Quadros 1 e 3). O inverso foi observado para os valores de $V_{max,app}$. Considerando que a adição de tampão MUB com pH 6,5 apresenta papel análogo ao da calagem, em termos de acidez do solo, conclui-se que a utilização dessa prática agrícola pode aumentar a eficiência de enzimas previamente produzidas no solo. De acordo com Ramirez-Martinez & McLaren (1966), quase a totalidade da atividade de fosfatases detectadas no solo é resultante da atuação de enzimas excretadas e acumuladas no solo, e não da microbiota ativa em dado momento. Dessa forma, a melhoria da atividade de fosfatases pela calagem pode apresentar grande impacto sobre a degradação do P orgânico do solo e sobre a disponibilidade de P para as plantas.

CONCLUSÕES

1. As fosfatases ácidas e alcalinas, com atividades avaliadas em pH ótimo, apresentaram comportamento cinético michaeliano, independentemente do valor de saturação por bases do solo no qual foram produzidas.

2. As fosfatases apresentaram comportamento michaeliano, mesmo quando avaliadas em condições não-ideais de pH.

3. Os incrementos na saturação por bases do solo resultaram em aumentos da $V_{max_{app}}$ das fosfatases ácidas e não alteraram a $V_{max_{app}}$ das alcalinas, ao mesmo tempo que reduziram o valor de $K_{m_{app}}$ de ambas as enzimas.

4. As fosfatases alcalinas apresentaram perfil de inibição não-competitiva, em resposta à redução do valor de saturação por base.

5. O pH foi o principal determinante da resposta das fosfatases à saturação por bases, tendo outros fatores, relacionados com saturação por base, como concentração de cálcio e magnésio, apresentado menor importância nesta resposta.

6. A avaliação das constantes cinéticas de fosfatases em tampão com pH ótimo foi adequada para determinação da eficiência catalítica potencial das enzimas presentes no solo, e não da eficiência real dessas nas condições de saturação por bases nas quais foram produzidas.

LITERATURA CITADA

- ABD-ALLA, M.H. Use of organic phosphorus by *Rhizobium leguminosarum* biovar *viceae* phosphatases. *Biol. Fertil. Soils*, 18:216-218, 1994.
- ANTIBUS, R.K. & LINKINS III, A.E. Effects of liming a red pine forest floor on mycorrhizal numbers and mycorrhizal and soil acid phosphatase activities. *Soil Biol. Biochem.*, 24:479-487, 1992.
- BRUN, A.; CHALOT, M.; BOTTON, B. & MARTIN, F. Purification and characterization of glutamine synthetase and NADH-glutamate dehydrogenase from the ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata*. *Plant Physiol.*, 99:938-944, 1992.
- CATTELAN, A.J. & VIDOR, C. Sistemas de culturas e a população microbiana no solo. *R. Bras. Ci. Solo*, 14:125-132, 1990.
- DODD, J.C.; BURTON, C.C.; BURNS, R.G. & JEFFRIES, P. Phosphatases activity associated with the roots and the rhizosphere of plants infected with vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.*, 107:163-172, 1987.
- EIVAZI, F. & TABATABAI, M.A. Phosphatases in soils. *Soil Biol. Biochem.*, 9:167-172, 1977.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA- EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. Manual de métodos de análise de solo. Rio de Janeiro, 1997. 212p. (EMBRAPA-CNPS. Documentos, 1)
- ERTAN, H. Some properties of glutamate dehydrogenase, glutamine synthetase and glutamate synthase from *Corynebacterium callunae*. *Arch. Microbiol.*, 158:35-41, 1992.
- FERNANDES, M.F.; ANJOS, J.L. dos; SOBRAL, L.F.; FERNANDES, R.P.M.; ARAÚJO, A. da S. Efeito da saturação por bases sobre a atividade de fosfatases em um solo de tabuleiro costeiro cultivado com citros. I. Correlações entre a atividade enzimática e diferentes características do solo alteradas pela calagem. *R. bras. Ci. Solo*, 22:395-401, 1998.
- GOLDSTEIN, A.H.; DANON, A.; BAERTLEIN, D.A. & McDANIEL, R.G. Phosphate starvation inducible metabolism in *Lycopersicon esculentum*. II. Characterization of the phosphate starvation inducible-excreted acid phosphatase. *Plant Physiol.*, 87:716-720, 1988.
- HAYNES, R. J. & SWIFT, R. S. Effects of lime and phosphate additions on changes in enzyme activities, microbial biomass and levels of extractable nitrogen, sulfur and phosphorus in an acid soil. *Biol. Fertil. Soils*, 6:153-158, 1988.
- JUMA, N.G. & TABATABAI, M.A. Distribution of phosphomonoesterases in soils. *Soil Sci.*, 126:101-108, 1978.
- LAU, K.H.W.; FREEMAN, T.K. & BAYLINK, D.J. Purification and characterization of an acid phosphatase that display phosphotyrosil-protein phosphate activity from bovine cortical bone matrix. *J. Biol. Chem.*, 262:1389-1397, 1987.
- LEHNINGER, A.L., NELSON, D.L. & COX, M.M. Principles of biochemistry. New York, Worth Publishers, 1993. 1013p.
- MENGEL, K. & KIRKBY, E.A. Principles of plant nutrition. Bern, International Potash Institute, 1978. 593p.
- MIRANDA, R.P. Purificação parcial e caracterização de poligalacturonases de *Penicillium expansum*. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 1997. 53p. (Tese de Mestrado)
- PAULSON, K.N. & KURTZ, L.T. Michaelis constant of soil urease. *Proc. Soil Sci. Soc. Am.*, 34:70-72, 1970.
- RAMIREZ-MARTINEZ, J.R. & McLAREN, A.D. Some factors influencing the determination of phosphatase activity in native soils and in soils sterilized by irradiation. *Enzymologia*, 31:23-38, 1966.
- SCHLEE, D.; THÖRINGER, C. & TINTEMANN, H. Purification and properties of glutamate dehydrogenase in Scot pine (*Pinus sylvestris*) needles. *Physiol. Plant.*, 92:467-472, 1994.
- TABATABAI, M.A. & BREMNER, M.J. Michaelis constants of soil enzymes. *Soil Biol. Biochem.*, 3:317-323, 1971.
- TABATABAI, M.A. Soil enzymes. In: BLACK, C.A., ed. Methods of soil analysis chemical and microbiological properties, part 2. Madison, American Society of Agronomy, 1982. p.903-947.
- TARAFDAR, J.C. & CHHONKAR, P.K. Status of phosphatases in the root-soil interface of leguminous and non-leguminous crops. *Z. Pflanzen. Bondenk.*, 141:347-351, 1978.
- VIRO, P.Y. Factorial experiments of forest humus decomposition. *Soil Sci.*, 95:24-30, 1963.