

## DISTRIBUCION , CARACTERISTICAS Y CINETICA DE LA ACTIVIDAD UREASA EN UN ARGIUJOL TIPICO

ROSA M. PALMA (1)

Recibido: 18-8-86

Aceptado: 13-1-87

### RESUMEN

En este trabajo se estudia la distribución, efecto sobre el almacenamiento, temperatura de incubación, pH y características cinéticas de la enzima ureasa en el perfil de un Argiudol de la provincia de Buenos Aires.

La actividad ureasa es más elevada en la parte superficial del suelo y está altamente correlacionada con el C orgánico y N total del perfil. Las muestra mantenidas húmedas a 4°C o secas al aire durante un período de 90 días no presentaron alteraciones en los valores de la actividad ureasa. La actividad se afecta cuando la temperatura de incubación sobrepasa los 70°C. El pH óptimo para la ureasa en este perfil se encuentra en un rango de 6,8 a 9,2.

Los valores obtenidos de  $K_m$  y  $V_{máx}$  no manifiestan una tendencia en el perfil.

### DISTRIBUTION, CHARACTERISTICS KINETICS OF UREASE ACTIVITY IN A TÍPIC ARGIUJOL

### SUMMARY

Distribution, storage effect, incubation time, pH and kinetic characteristics of urease were studied in an Argiudol of Buenos aires province.

Urease activity is higher in surface soil and is highly correlated with  $C_o$  and  $N_t$ .

Samples kept moist at 4°C or air-dried didn't present variations on urease activity. Activity is affected when incubation temperature is higher than 70°C. Optimum pH urease in this profile is within a range of 6,8 to 9,2.

A definite trend on the values of  $K_m$  and  $V_{máx}$ , it was not found.

---

(1) Cátedra Edafología - Departamento de Suelos - Fac. de Agronomía. U.B.A.  
Avda. San Martín 4453 , (1417). Buenos Aires. - ARGENTINA -.

## INTRODUCCION

La ureasa (urea amidohidrolasa EC 3.5.1.5.) es una enzima importante del suelo que cataliza la hidrólisis de la urea ya sea la aplicada como fertilizante o la excretada por los animales. El origen, existencia y persistencia de la ureasa en el suelo aún no es bien conocida. Se conoce que esta enzima es secretada por células vivas o liberada de células microbianas porque su función estuvo localizada dentro de la célula; pero mantiene su estabilidad como enzima extracelular ya que se asocia a los coloides del suelo, (arcillas minerales o sustancias húmicas). Por esta inmovilización tiene una vida media prolongada en relación a las que se encuentran en la fase acuosa del suelo (Burns, 1982; Boyd et al., 1985).

En general, esta enzima se encuentra estrechamente relacionada con el C orgánico del suelo (Zantua et al., 1977; Stott et al., 1980; Verstraeten, 1978). La actividad de la ureasa decrece con la profundidad (Tabatabai, 1977), pero esto puede modificarse de acuerdo a las características diferenciales que presentan los horizontes en un perfil: amplias variaciones en el pH, la textura o el potencial redox, entre otros (Myers y Mc Garity, 1968). La temperatura, la humedad, la presencia de mayor o menor concentración de sustratos solubles y la actividad biológica pueden también afectar la distribución en el perfil.

El objetivo de este trabajo es estudiar la distribución, el efecto del almacenamiento, temperatura, pH, concentración del sustrato carbono y los valores de la constante de Michaelis - Menten para la enzima ureasa en un perfil de suelo bajo cultivo clasificado como Argiudol típico.

## MATERIALES Y METODOS

El suelo en estudio es un Argiudol típico, según la clasificación del "Soil Taxonomy", procedente del Partido de Exaltación de la Cruz, localidad Capilla del Señor; los datos analíticos se presentan en el Cuadro N° 1.

En los últimos cinco años el lote del cual se extrajeron las muestras fue cultivado con trigo - lino- girasol - maíz- trigo, siendo fertilizado únicamente con P, y los rastrojos de los cultivos fueron incorporados quedando en barbecho hasta la próxima campaña. Las muestras fueron extraídas en noviembre de 1985 a diferentes profundidades: 0-10, 10-20, 20-30, 30-60, 60-90, 90-120 cm, e inmediatamente colocadas en bolsas plásticas y se mantuvieron refrigeradas hasta el día siguiente. Sobre una submuestra para cada profundidad se realizaron los análisis de laboratorio correspondientes a la determinación de humedad y la actividad de la ureasa. Del resto de la muestra una porción fue secada al aire y el remanente se mantuvo a 4°C.

### Determinaciones

Sobre las muestras correspondientes a cada profundidad se determinaron:

1.-La actividad ureásica usando un método no buffer (Douglas y Bremner, 1971). En un erlenmeyer de 125 ml se pesaron 5 g de suelo húmedo al cual se agregó 0,2 ml de tolueno (para inhibir el crecimiento microbiano y así detener la producción de la enzima). Luego se adicionó 1 ml de solución urea 0,2 M. Se tapó, se agitó rápidamente y se incubó a 37°C durante 5 horas. Luego se agregaron 40 ml de CIK 2 M-PMA (acetato fenil mercúrico equivalente a 4Mg/ml para inhibir la ureasa). Posteriormente se agitó durante 1 hora y se filtró a través de papel Whatman N° 42.

En alícuotas, se determinó el  $\text{NH}_4\text{-N}$  liberado, el mismo se valoró por destilación (Ritcher, 1980), la actividad se expresa en  $\mu\text{g}$  de  $\text{NH}_4\text{-N}$   $\cdot\text{g}^{-1}$  suelo  $\cdot\text{h}^{-1}$ . Simultáneamente se realizó un ensayo en blanco.

2.-Se estableció la relación de la actividad enzimática con los contenidos de C total y N total del suelo determinados por las técnicas de Walkley-Black (Blak, 1965) y de Conti et al., (1976), respectivamente.

3.-La influencia del almacenamiento sobre la actividad ureasa se verificó analizando en muestra húmeda (día 1°) y sobre muestra seca al aire (día 4°) y sucesivas determinaciones en los días 30, 60 y 90.

4.-Se ensayó la sensibilidad térmica de la ureasa del suelo. Se realizó sobre muestras de suelo húmedo con aproximadamente un contenido de humedad del 60% de capacidad de campo, que se colocaron en tubos y se mantuvieron 30' en baño termostatzado variando las temperaturas de 30° a 90°C. Luego de estabilizada la temperatura se realizaron las determinaciones de la actividad de la ureasa en forma inmediata, en cada caso.

5.-El efecto del pH sobre la actividad de la enzima, se estudió en sistemas tamponados a diferentes valores de pH usando como buffer Tris-CIH (Tris: hidroximetil-aminometano, ajustado a pH 9 con CIH) 0,2 M, preparado según Gomorri et al., (1965) y Frankerberger et al., (1982). Los pH se determinaron potenciométricamente (Jackson, 1964).

6.-Cinética enzimática: se determinaron  $V_{\text{máx}}$  y  $K_m$  de la ureasa del suelo, frente a concentraciones crecientes de sustrato: soluciones de urea 0,010 - 0,015 - 0,020 - 0,030 y 0,050 M.

La velocidad de reacción ( $V$ ) fue expresada en  $\mu\text{g}$   $\text{NH}_4\text{-N}$  liberado  $\cdot\text{g}^{-1}$  suelo  $\cdot\text{h}^{-1}$  para cada concentración del sustrato.

Los valores de  $K_m$  y  $V_{\text{máx}}$  fueron obtenidas graficando  $S/V$  en el eje de las abscisas y ( $S$ ) en la ordenada para determinar la intercepción y la pendiente de la transformación lineal de la ecuación de Michaelis-Menten

$$\frac{S}{V} = \frac{K_m}{V_{\text{máx}}} + \frac{1}{V_{\text{máx}}} \cdot (S)$$

$$\frac{S}{V} = \frac{K_m}{V_{\text{máx}}} + \frac{1}{V_{\text{máx}}} \cdot (S) \quad \text{x y la 1968).$$

La composición granulométrica del suelo utilizado fue realizada por el método de Bouyoucos.

Todas las determinaciones se realizaron por duplicado, expresándose los resultados sobre peso de suelo seco a 105°C.

## RESULTADOS Y DISCUSION

Se analizarán o interpretarán los resultados experimentales:

### A.- Distribución de la actividad ureasa en el perfil.

Se indica en Cuadro N° 2.

La actividad ureasa en las muestras estudiadas fue máxima en los 10 cm de profundidad.

La actividad enzimática en el suelo correlacionó en forma altamente significativa con el contenido de C orgánico y N total, en ambos casos se obtuvo un  $r = 0,99$  ( $\alpha \leq 0,001$ ), coincidiendo con los señalados por otros autores (Myers et al., Zantua et al., 1977 y Tabatabai, 1977). Por lo tanto, el contenido de C orgánico podría influir en forma directa sobre la distribución de la actividad ureasa en el perfil.

La mayor actividad enzimática en los primeros 10 cm podría explicarse por la asociación de la enzima con el contenido de materia orgánica durante los procesos de formación de humus. Los poros grandes de la materia orgánica permiten tanto el pasaje del sustrato: urea, como el de las moléculas de los productos de reacción: amoníaco y anhídrido carbónico pero no son lo

Cuadro N° 1. Suelo "Capilla del Señor"

Propiedades	Profundidad (cm)					
	0-10	10-20	20-30	30-60	60-90	90-120
C (%)	2,05	1,70	1,27	0,68	0,42	0,25
N (%)	0,198	0,169	0,110	0,073	0,042	0,022
pH	6,1	6,2	6,3	6,9	7,2	7,2
arcilla (%)	22,4	23,3	31,3	46,4	38,2	29,5
limo 2-50 $\mu$ (%)	60,5	59,8	53,4	40,8	47,5	52,0
arena (%)	17,1	16,9	15,3	12,8	14,3	18,5

Cuadro N° 2. Distribución de ureasa en el perfil y su relación con el contenido de C y N total.

Profundidad (cm)	C (%)	N (%)	Actividad ureasa $\mu$ g $\text{NH}_4\text{-N}$ liberada $\text{g}^{-1}$ suelo $\text{h}^{-1}$
0-10	2,05	0,200	58,64
10-20	1,70	0,169	45,78
20-30	1,70	0,169	32,40
30-60	0,68	0,070	20,42
60-90	0,42	0,042	12,00
90-120	0,25	0,022	7,28

suficientemente grandes para permitir la entrada de enzimas proteolíticas o la fuga de ureasa (Burns et al., 1972). Por este efecto la enzima queda protegida y una acción similar se produce con las arcillas minerales (Boyd y Mortland, 1985). Además, como la población microbiana decrece con la profundidad (Alexander, 1961) y es la fuente de producción de la enzima, resulta dable esperar que también la ureasa disminuya con la profundidad (Bremner y Mulvaney, 1978).

#### B.-Efecto del almacenamiento de las muestras sobre la actividad ureasa

Los tratamientos realizados sobre las muestras almacenadas no produjeron

cambios sobre la actividad enzimática como puede observarse en el Cuadro N°3.

La alta reproducibilidad de los resultados obtenidos, con el método ensayado para la determinación de la actividad ureasa, demuestran que la actividad de esta enzima no se altera en las condiciones experimentadas.

Los datos fueron concordantes con los de Zantua y Bremner (1977) y Dalal (1984).

#### C.-Efecto de la temperatura de incubación sobre la actividad ureasa

En la Figura 1 se evidencia que la actividad ureasa no se afecta cuando las muestras son tratadas entre 30° y

**Cuadro N° 3. Efecto de diferentes tratamientos realizados a las muestra y su relación con la actividad ureasa.**

Profundidad (cm)	Actividad ureasa (+)				
	Suelo				
	0-10	10-20	20-30	30-60	60-90
Testigo	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Tratamiento muestra seca al aire					
día 4	98,5	99,7	100,0	98,8	100,0
día 30	99,5	100,0	99,2	100,0	100,5
día 60	99,0	100,0	100,0	99,9	100,0
día 90	100,0	99,4	98,9	100,0	100,1
Muestra húmeda 4°C					
día 1	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
día 30	100,2	98,8	99,7	99,9	99,5
día 60	98,9	100,1	100,3	99,6	99,8
día 90	100,0	99,1	99,5	99,8	100,0

(+) La actividad ureasa se expresa como porcentual de la actividad de la muestra determinada a las 24 horas de su extracción y mantenida a 4°C hasta su determinación (testigo, considerado 100%).

70°C, mientras que cuando la temperatura sobrepasa los 80°C la enzima se inactiva.

Los valores hallados coinciden con los de bibliografía pues la mayoría de las enzimas del suelo son inactivadas a temperaturas entre 60° y 70°C. La temperatura necesaria para inactivar una enzima en el suelo es alrededor de 10°C superior de la requerida para inactivarla en ausencia del suelo (Galstyan, 1965; Skujins, 1967). La desnaturalización de la ureasa comienza por encima de 70°C y es completa a los 90°C, coincidiéndose con otros autores (Tabatabai y Bremner, 1972; Zantua y Bremner, 1977).

En este estudio el método usado para determinar la actividad ureasa difirió del realizado por otros investigadores que emplearon una sustancia buffer: (Zantua y Bremner, 1975). Es-

tos autores obtienen valores de actividad enzimática más altos que los del presente trabajo. Los mismos investigadores concluyen que los resultados de los distintos tratamientos son similares, independientemente del método usado.

La alta estabilidad de la ureasa en el suelo puede atribuirse a su absorción en las arcillas coloidales (Pink et al., 1954) o a su asociación al complejo coloidal orgánico.

La temperatura de incubación para la determinación de la actividad ureasa fue de 37°C, aconsejada por Frankerberger y Tabatabai (1982).

#### D.- Efecto del pH sobre la actividad ureasa

El efecto del pH sobre la actividad de la enzima ureasa, fue estudiado so-

bre muestras hasta 30 cm de profundidad y usando soluciones buffer o reguladoras a diferentes pH. En todos los casos la actividad de la enzima se incrementó cuando el pH se elevó hasta pH = 8,0 y decreció a partir de pH 9,20. El óptimo se estableció en un rango de 6,8 - 9,2 para este suelo (Figura 2).

El rango de pH óptimo para esta enzima varía según los investigadores:

pH	Bibliografía
8,8 - 10,0	Tabatabai y Bremner (1972)
7,0 - 7,5	Bremner y Mulvaney (1978)
8,0 - 12,0	Frankerberger y Johanson (1982)

Los valores del pH óptimo no fueron coincidentes por los diferentes buffers empleados, por las condiciones del ensayo y por los tipos de suelo utilizados.

Al incrementar el pH del suelo usando un buffer se pueden producir cambios en el estado de ionización de los sitios activos de la ureasa o del complejo urea - ureasa. El microambiente del suelo puede producir variaciones, por ejemplo en la asociación enzima - materia orgánica, afectando así la difusión de la enzima, del sustrato o del producto. Los sitios activos de la ureasa son  $Ni^{+2}$  y los grupos -SH (Dixon et al., 1975). El valor de pK para el grupo -SH de la proteína enzimática a 25°C está en un rango de pH de 8,3 a 8,6 (Dixon y Webb, 1964), por lo cual el pH óptimo para la ureasa en el suelo podría estar en ese rango. Sin embargo, el

complejo urea - ureasa presenta dos valores de pK: 6,1 y 9,2 (Webb y Laidler, 1953; Laidler, 1955). La medición de la actividad ureasa es función de la formación y/o disociación del complejo urea - ureasa e influye en la misma la naturaleza de la asociación ureasa - coloide del suelo (posiblemente humus) y variando según los tipos de suelos, por lo cual pueden esperarse diferentes valores para el pH óptimo (Nannipieri et al., 1978).

#### E.-Determinación de los valores $V_{m\acute{a}x}$ y $K_m$ para la enzima ureasa

Las mediciones cuantitativas de la actividad de las enzimas en el suelo son necesarias para comprender su función biológica y para poder determinar un valor de la actividad en las muestras de suelo. Si se asume que sólo está presente el sustrato, la reacción se produce en una sola dirección y se puede estimar la velocidad máxima ( $V_{m\acute{a}x}$ ) de reacción como la concentración del sustrato necesaria para alcanzar la semi-velocidad máxima, quedando así determinada la constante de Michaelis ( $K_m$ ) de la enzima, representada por la siguiente ecuación:

$$v = V_{m\acute{a}x} (S) / K_m + (S)$$

siendo:

v: la velocidad de reacción inicial

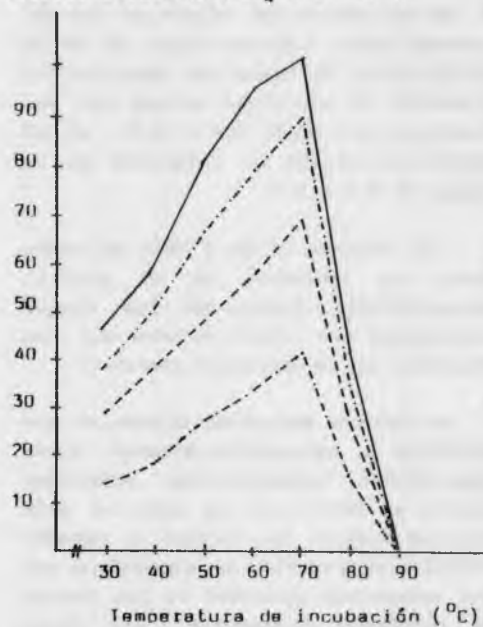
$V_{m\acute{a}x}$ : la velocidad máxima de la reacción y,

S: la concentración del sustrato expresado en moles  $l^{-1}$ .

Cuadro N° 4. Valores  $K_m$  y  $V_{m\acute{a}x}$  de ureasa en el perfil de un Argiudol

Profundidad (cm)	$K_m$ mM	$V_{m\acute{a}x}$ $g NH_4 -N g^{-1} h^{-1}$
0-10	10,7	138
10-20	17,2	123
20-30	8,6	185
30-60	7,2	168
60-90	5,8	153

Activ. ureasa ( $\mu\text{g NH}_4\text{-N g}^{-1} \text{h}^{-1}$ )



Referencias

Profundidad del perfil (cm)

- 0 - 10
- - - 10 - 20
- · - · 20 - 30
- · · · 30 - 60

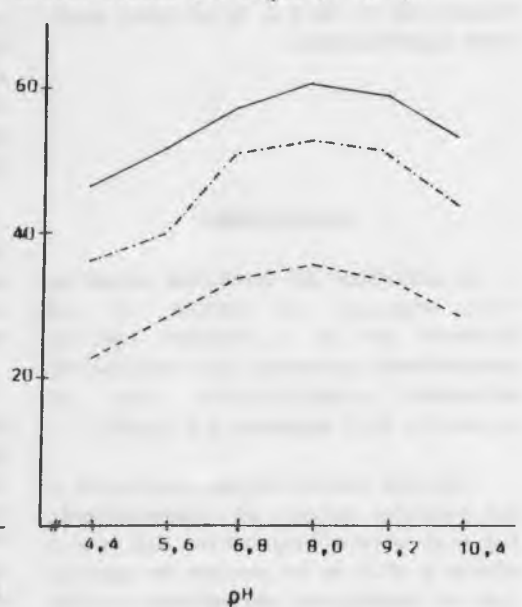
Figura 1. Sensibilidad térmica de la enzima ureasa.

Los valores  $K_m$  y  $V_{m\acute{a}x}$  son constantes para la enzima, pero pueden variar independientemente uno de otro cuando son determinados en condiciones diferentes. La constante de Michaelis es independiente de la concentración de la enzima, y puede utilizarse para cuantificar la afinidad de la enzima por el sustrato:

$$A = \frac{1}{K_m}$$

Los valores de  $K_m$  y  $V_{m\acute{a}x}$  de la ureasa en el perfil de este Argiudol se presentan en el Cuadro N° 4.

Activ. ureasa ( $\mu\text{g NH}_4\text{-N g}^{-1} \text{h}^{-1}$ )



Referencias

Profundidad del perfil (cm)

- 0 - 10
- - - 10 - 20
- · - · 20 - 30

Figura 2: Efecto del pH en la determinación de la actividad ureasa.

Los valores de  $K_m$  y  $V_{m\acute{a}x}$  de la ureasa en el perfil de este Argiudol se presentan en el Cuadro N° 4.

Los valores de  $K_m$  a través del perfil del suelo no muestran una tendencia neta. Para Bremner y Mulvaney (1978), los valores de  $K_m$  oscilan de 1,1 a 213 mM. Los datos no son comparables y las discrepancias pueden deberse al tipo de suelo, a diferencias en el manipuleo de las muestras, al método de determinación, a variaciones de pH y a las temperaturas de incubación usadas. En cambio, el valor de  $K_m$  de la muestra superficial es comparable con la obtenida por Douglas

y Bremner, 1971, quienes establecen valores de Km de 9 a 18 mM para muestras superficiales.

### CONCLUSIONES

La actividad de la enzima ureasa en este Argiudol es máxima en los primeros 10 cm y decrece con la profundidad; presenta una correlación altamente significativa con el contenido de C orgánico y N total.

Los dos tratamientos efectuados a las muestras durante el almacenamiento (seca al aire a temperatura ambiente y húmeda a 4°C) en un período de noventa días no produjeron variaciones en los valores de la actividad de la ureasa.

La actividad enzimática no se afecta por temperaturas de incubación de 30° a 70°C. La inactivación se inicia desde los 70°C y se completa a los 90°C. La termoestabilidad se debería a la protección ejercida por los coloides del suelo, fundamentalmente la materia orgánica.

La influencia del efecto pH fue observado sobre muestras hasta 30 cm de profundidad. En todos los casos se incrementa la actividad ureasa por aumentos de pH desde 3,4 a 9,2, el pH óptimo de acción se encuentra en un rango de 6,8 a 9,2.

Los valores de Km y V<sub>máx</sub> no muestran una tendencia en el perfil; encontrándose dentro de los rangos calculados por otros autores que han empleado una metodología similar.

La elevada actividad ureasa en superficie y subsuperficialmente tiene importantes consecuencias prácticas cuando se fertiliza con urea en este tipo de suelos. La elevada o intensa hidrólisis producida se acompañará con las consabidas pérdidas de las formas de nitrógeno disponible por lixiviación y por volatilización, no siendo aprovechado éste por los cultivos.

### AGRADECIMIENTOS

La autora agradece la valiosa colaboración en la faz analítica de los señores Eduardo Vella y Alejandro Constantini.

### BIBLIOGRAFIA

- 1) ALEXANDER, M.; 1961. Introduction to Soil Microbiology. Ed. Wiley, New York U.S.A.
- 2) BLACK, C.A.; 1965. Methods of soil analysis. American Society of Agronomy. Ed. Inc. Madison, Wisconsin.
- 3) BOYD, S.A. and M.M. MORTLAND; 1985. Urease activity on a Clay - Organic Complex. *Soil Sc. Soc. Am.*, 49:619-622.
- 4) BRENNER, J.M. and S. MULVANEY; 1978. Urease activity in soils. *Soil Enzymes*. Ed. R.G. Burns. Academic Press: London
- 5) BURNS, R.G.; A.H. PUKITE and A.D. Mc LAREN; 1972. Concerning the location and persistence of soil urease. *Soil Sc. Soc. Am. Proc.*, 36:308-311.
- 6) BURNS, R.G.; 1982. Enzyme activity in soil: location and a possible role in microbial ecology. *Soil Biol. Biochem.*, 14:423-427.
- 7) CONTI, M.E.; M. RICHTER, y L. GIUFFRÉ; 1976. Método de determinación rápida de nitrógeno en suelo. *IDIA - N° 343-348.*



- 8) DALAL, R.C.; 1984. Distribution, salinity, kinetic and thermodynamic characteristics of urease activity in a Vertisol profile. *Australian J. Soil Res.*, 22:303-317.
- 9) DIXON, M. and E.C. WEBB; 1964. *Enzymes*. Ed. Longmans: London.
- 10) DOUGLAS, L.A. and J.M. BRENNER; 1971. A rapid method of evaluating different compounds as inhibitors of urease activity in soils.
- 11) FRANKENBERGER, W.T. Jr. and J.B. JOHANSON; 1982. Effect of pH on enzyme stability in soils. *Soil Biol. Biochem.*, 14:433-437.
- 12) FRANKENBERGER, W.T. and M.A. TABATABAI; 1982. Amidase and urease activities in plants. *Plant Soil*, 64:153-166.
- 13) GOMORRI, C.; 1965. *Methods in Enzymology*. Ed. S.P. Colowick & M.P. Kaplan. Academic Press Inc. New York.
- 14) JACKSON, M.L.; 1964. *Análisis Químico de Suelos*. Ed. Omega. Barcelona.
- 15) MYERS, M.G. and J.E. Mc GARTHY; 1968. The urease activity in profiles of five great soil groups from northern New South Wales. *Plant Soil.*, 28: 25-37.
- 16) NANNIPIERI, P.; S. CERVELLI and P. SEGUI; 1978. Stability and kinetic properties of humus - urease complexes. *Soil Biol. Biochem.*, 10:143-147.
- 17) RICHTER, M.; 1980. Mejoras en la determinación de amonio por destilación. *Rev. Fac. de Agronomía.*, 1(2):1-9.
- 18) SKUJINS, J.J.; 1967. *Enzymes in soils*. Ed. A.D. Mc Laren and G.H. Peterson. Soil Biochemistry - Marcel Dekker, New York.
- 19) STOTT, D.E. and C. HAGEDORN; 1980. Interrelations between selected soil characteristics and arylsulfatase and urease activities. *Soil Sc. Plant Anal.*, 11 (10):935-955.
- 20) TABATABAI, M.A. and J.M. BRENNER; 1972. Assay of urease activity in soils. *Soil Biol. Biochem.*, 4:479-487.
- 21) TABATABAI, M.A.; 1977. Effects of trace elements on urease activity in soils. *Soil Biol. Biochem.*, 4:479-487.
- 22) VERSTRAETEN, L.M.J.; 1978. Interaction between urease activity and soil characteristics. *Agrochimica*, 22:5-6.
- 23) ZANTUA, M.J. and J.M. BRENNER; 1975. Comparison of methods of assaying urease activity in soils. *Soil Biol. Biochem.*, 7:291-295.
- 24) ZANTUA, M.J. and J.M. BRENNER; 1977. Stability of urease in soils. *Soil Biol. Biochem.*, 9:135-140.
- 25) ZANTUA, M.J.; L.C. DUMENIL and J.M. BRENNER; 1977. Relationships between soil urease activity and other soil properties. *Soil Sc. Soc. Am. J.*, 41:350-352.