UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA

Facultad de Ingeniería, Ciencias y Administración
Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales
Instituto de Agroindustria

"EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL MANGANESO SOBRE PARÁMETROS BIOQUÍMICOS DE LA PLANTA Y DEL SUELO EN SISTEMAS MODELO"

TESIS PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO DE DOCTOR EN CIENCIAS DE RECURSOS NATURALES

ANALI ROSAS GAJARDO

TEMUCO – CHILE
2006

“EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL MANGANESO SOBRE PARÁMETROS BIOQUÍMICOS DE LA PLANTA Y DEL SUELO EN SISTEMAS MODELO”

Esta Tesis fue realizada bajo la supervisión de la Directora de Tesis, Dra. MARÍA DE LA LUZ MORA GIL, del Departamento de Ciencias Químicas y ha sido aprobada por los miembros de la comisión examinadora.

ANALI ESTELA ROSAS GAJARDO

DIRECTOR PROGRAMA DE POSTGRADO EN CIENCIAS DE RECURSOS NATURALES

Dra. MARÍA DE LA LUZ MORA G.

Dr. FERNANDO BORIE B.

DIRECCIÓN DE POSTGRADO UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA

Dra. MARYSOL ALVEAR Z.

Dr. IVAN VIDAL P.

Dr. GERARDO GALINDO G.

Dr. GUSTAVO ZUÑIGA N.

A mi madre y a mi esposo.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dra. María de la Luz Mora, por haberme dado la oportunidad de realizar este doctorado, así como por ser mi directora de tesis y haber contribuido de manera significativa a mi formación profesional y científica.

Al cuerpo docente del Programa de Postgrado en Ciencias de Recursos Naturales, que me entregó las herramientas necesarias para mi formación como Doctora.

Al personal científico, técnico y administrativo del Laboratorio de Análisis de Suelos y Plantas de la Universidad de La Frontera, en forma particular a la Sra. Noelia Sepúlveda, Sra. Fresia Cantero, Sra. Lorena Leal y a la Dra. Alejandra Jara, así como a mis compañeras Roxana López y Mara Cea.

A las Dras. Liliana Gianfreda y Maria Rao con quienes realice mi pasantía de investigación en la Universidad Federico II de Italia, por su valiosa contribución tanto en enseñarme metodologías como en la elaboración de las publicaciones resultantes de estas investigaciones.

Al Proyecto FONDECYT 1020934 por el financiamiento otorgado para el desarrollo de esta investigación, al Proyecto de la Fundación Andes 13755 C-28 por brindarme los recursos económicos para poder realizar mi pasantía de investigación en la Universidad Federico II en Italia y al proyecto MECESUP FRO 0309 por el financiamiento para asistencia y presentación de trabajos en congresos nacionales e internacionales. También, deseo agradecer a la Universidad de La Frontera por haberme otorgado las becas de arancel y mantención durante los años de mi formación en el Programa de Doctorado en Ciencias de Recursos Naturales.

Finalmente, agradezco a mi familia y en forma especial a mi esposo y a mi madre que, en esto, como en todo, han sido mi más importante y querida ayuda.

RESUMEN

El manganeso (Mn) es un micronutriente que, dependiendo de su contenido, en suelos ácidos puede alcanzar concentraciones tóxicas para las plantas. Las respuestas bioquímicas de las plantas a niveles tóxicos de metales incluyen mecanismos como exudación de ácidos orgánicos y aumento de la actividad peroxidasa. Además, un exceso de metales pesados como el Mn puede afectar los parámetros cinéticos de enzimas como la fosfatasa ácida, que tiene un rol muy importante en la biodisponibilidad de P en el suelo.

Considerando estos antecedentes, el objetivo general planteado en esta investigación fue estudiar el efecto del Mn sobre el desarrollo de plantas de ballica perenne y trébol blanco en solución nutritiva, así como también, determinar su efecto sobre la actividad fosfatasa ácida en un sistema modelo de suelo.

En un primer ensayo en solución nutritiva se evaluó el efecto de diferentes niveles de Mn y de pH sobre el desarrollo de plantas de ballica perenne y trébol blanco. Un aumento en los niveles de Mn y una disminución en el pH en las soluciones de nutrientes causaron una significativa disminución en el peso seco de las plantas cuando éstas alcanzaron las concentraciones críticas de toxicidad de 421 mg kg^{-1} para ballica perenne y de 283 mg kg^{-1} para trébol blanco. Estos resultados indican que trébol blanco es más sensible a la presencia de niveles elevados de Mn en solución que la ballica perenne. Las plantas respondieron a la toxicidad por Mn con un significativo aumento en la exudación de ácidos orgánicos y actividad peroxidasa. En un segundo ensayo en solución de nutrientes se demostró que un aumento en la concentración P en plantas con severa toxicidad por Mn contribuyó a aumentar el peso seco de las plantas en más de un 28 %, lo que indica que el P contribuye a atenuar los efectos de la toxicidad por Mn. Tanto la deficiencia de P, como el aumento de Mn en solución incrementaron la exudación de ácidos orgánicos, especialmente ácidos oxálico y cítrico.

Con el objeto de evaluar el efecto del Mn sobre la fosfatasa ácida que regula la disponibilidad de P en suelos ácidos se determinó la actividad y cinética de la enzima, libre e inmovilizada, en presencia de concentraciones crecientes de Mn, dentro del rango de Mn disponible en Andisoles del sur de Chile. La fosfatasa ácida fue inmovilizada en materia orgánica (ácido tánico) y arcilla extraída de un Andisol, ambos soportes empleados como fracciones modelo de suelos. Los resultados indicaron una significativa disminución de la velocidad de reacción para la enzima libre en presencia de Mn. Cuando se inmovilizó la fosfatasa ácida con una matriz orgánica como el ácido tánico se recuperó sólo un 51% de la

actividad enzimática inicial y se observó una reducción de la eficiencia catalítica. La presencia de Mn en el proceso de inmovilización en ácido tánico causó una disminución la actividad de la enzima inmovilizada, con aumento de la afinidad por el sustrato pero con una gran disminución de la velocidad de reacción. La enzima inmovilizada en ácido tánico mostró una buena estabilidad térmica pero la presencia de Mn causa una significativa disminución de su estabilidad.

La fosfatasa ácida inmovilizada en arcilla mostró un aumento significativo de la actividad y eficiencia catalítica en comparación con la enzima libre. Sin embargo, el orden de adición de Mn y fosfatasa sobre la arcilla fue determinante para la actividad de la enzima. La aplicación de Mn antes de inmovilizar la enzima en arcilla generó una disminución de su actividad y una reducción de la velocidad de reacción. Mientras que, cuando el Mn fue aplicado después de haber inmovilizado la enzima en arcilla, no afectó significativamente su actividad, lo que implica que la inmovilización protege a la enzima de los efectos negativos del Mn sobre su comportamiento catalítico. De acuerdo a estos estudios es posible inferir que la presencia de altas concentraciones de Mn en los suelos ácidos podría disminuir la biodisponibilidad de P en los Andisoles del sur de Chile.

Altas concentraciones de Mn en el suelo afectarán la producción de las especies pratenses, tanto debido al efecto tóxico en las plantas, como también, a una disminución de la nutrición fosfatada. Por esta razón, se hace necesario aumentar el pH del suelo para regular la concentración de este micronutriente que es esencial para el desarrollo de las plantas y los procesos metabólicos de la microbiota del suelo.

SUMMARY

The manganese (Mn) is a micronutrient that, depending on their content, in acid soils can reach toxic concentrations for the plants. The biochemical responses of higher plants to toxic levels of metals include mechanisms like exudation of organic acids and increase of peroxidase activity. Also, an excess of heavy metals as the Mn can affect the kinetic parameters of enzymes like acid phosphatase, which has a very important role in the bioavailability of P in the soil.

Considering these antecedents, the general objective of this investigation was to study the effect of the Mn on plant growth of perennial ryegrass and white clover in nutrient solution, as well as, to determine its effect on the activity of acid phosphatase in a soil model system.

In a first assay in nutrient solution the effect of different levels of Mn and pH on plants growth of perennial ryegrass and white clover was evaluated. The increase in Mn supply and decrease in pH in the nutrient solutions caused a significant reduction in dry weight due to severe Mn toxicity. The critical toxicity concentration of Mn in shoots was 421 mg kg^{-1} for ryegrass and 283 mg kg^{-1} for white clover. These results indicate that white clover is more sensitive to the presence of high levels of Mn in solution that perennial ryegrass. For both plant species, an increase in Mn supply levels stimulated the exudation of carboxylates and the activity of peroxidase, which was related to stress conditions. In a second assay in nutrient solution was demonstrated that an increase in the concentration P in plants with severe toxicity for Mn contributed to increase the dry weight of the plants in more than 28%, what indicates that the P contributes to attenuate the effects of the Mn toxicity. So much the deficiency of P, as the increase of Mn in solution, increased the exudation of organic acids, especially oxalic and citric acids.

In order to evaluating the effect of the Mn on acid phosphatase, that regulates the availability of P in acid soil, it was determined the activity and kinetics of the enzyme, free and immobilized, in presence of Mn at similar levels to those found in Andisols of southern Chile. The acid phosphatase was immobilized in organic matter (tannic acid) and clay extracted of an Andisol, both supports employees as fractions model of soil. The results showed a significant decrease of the reaction velocity for the free enzyme in presence of Mn. When acid phosphatase was immobilized in an organic matrix such as tannic acid, a recovery of 51% of the initial enzymatic activity was detected and was observed a decrease of catalytic efficiency. The presence of Mn in the immobilization

process in this supports caused a decrease of the activity of the immobilized enzyme, with increase of affinity for the substrate but with a great decrease of the reaction velocity.

The acid phosphatase immobilized in clay showed a significant increase of activity and catalytic efficiency. However, the order of addition of Mn and phosphatase on the clay were decisive for the activity of the enzyme. The application of Mn before immobilizing the enzyme in clay caused a decrease of activity and a reduction of the reaction velocity.

While, when the Mn was applied after of immobilization of the enzyme in clay, it did not affect its activity significantly, this can indicate that the immobilization protects to the enzyme of the negative effects of the Mn on its catalytic behavior. According to these studies it is possible to infer that the presence of high concentrations of Mn in acid soils could diminish the bioavailability of P in the Andisols of the southern Chile.

High concentrations of Mn in the soil will affect the production of the forage species, so much due to the toxic effect in the plants, as well as, to a decrease of the P nutrition. For this reason, it becomes necessary to increase the soil pH to regulate the concentration of this micronutrient that is essential for the growth of the plants and the metabolic processes of the soil microorganism.

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCION GENERAL 1

1.1 Hipótesis de Trabajo 3

1.2 Objetivo General 3

1.3 Objetivos Específicos 4

CAPITULO I:

Estudio del efecto del Mn sobre el desarrollo de plantas de *Lolium perenne* y *Trifolium repens* en solución nutritiva. 5

1. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS 6

1.1 Disponibilidad de Mn en el suelo 6

1.2 Solución de nutrientes como modelo de suelo 7

1.3 Mn en las plantas 8

1.3.1 Relación entre la concentración de Mn y el crecimiento de las plantas. 8

1.3.2 Efecto de la toxicidad de Mn en plantas. 9

1.3.3. Efectos de la toxicidad por Mn sobre la actividad peroxidasa. 10

1.3.4. Interacción Mn-Fe. 10

1.3.5.Interacción P-Mn. 11

1.4. Mecanismos de tolerancia a exceso de metales. 12

1.4.1. Restricción de la absorción o transporte. 12

1.4.2 Mecanismos de tolerancia interna. 13

2. MATERIALES Y MÉTODOS 14

2.1 Ensayos en Solución Nutritiva 14

2.1.1 Cultivo de las plantas. 15

2.1.2 Peso seco y análisis químico de las plantas. 16

2.1.3 Obtención y análisis de los exudados de raíces. 16

2.1.4 Determinación de actividad guayacol peroxidasa. 17

2.1.5 Especiación del Mn en las soluciones nutritivas. 17

2.1.6 Diseño experimental y análisis estadístico. 18

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 17
3.1 Estudios en solución de nutrientes con diferentes niveles de Mn y pH. 18
3.1.1 Efecto del pH y Mn en la concentración de P, Mn y Fe y desarrollo de las plantas. 18
3.1.2 Efecto de Mn y pH sobre la cantidad y tipo de ácidos orgánicos exudados. 29
3.1.3 Efecto del Mn y pH sobre la actividad guayacol peroxidasa. 34
3.2. Estudios en solución nutritiva con diferentes niveles de P y Mn. 38
3.2.4 Efecto del P y Mn en la concentración de P, Mn, Fe y el desarrollo de las plantas. 38
3.2.5 Efecto del P y Mn en la exudación de ácidos orgánicos. 43
4. CONCLUSIONES 46

CAPITULO II:
Efecto del Mn sobre la actividad y parámetros cinéticos de la fosfatasa ácida libre e inmovilizada en materia orgánica y arcilla. 47
1. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS 48
1.1 Introducción 48
1.1.1Objetivos específicos 49
1.2 Características de la fosfatasa ácida y antecedentes respecto al efecto del Mn sobre su actividad. 50
1.2.1 Antecedentes respecto del efecto del Mn sobre la actividad fosfatasa ácida. 52
1.2.2 Efecto de iones de la serie Hofmeister sobre las enzimas. 52
1.3 Características de la arcilla. 53
1.4 Características de la actividad enzimática del suelo. 54
1.5 Inmovilización de enzimas. 55
1.6 Inmovilización de enzimas extracelulares sobre arcillas. 57
1.7 Inmovilización de las enzimas sobre materia orgánica. 60
2. MATERIALES Y METODOS 61
2.1. Metodologías para determinar actividad fosfatasa ácida y determinación de 62

propiedades de dos fosfatasas de origen comercial en presencia de Mn.
2.1.1 Evaluación de métodos para determinación de la actividad enzimática. 62
2.1.2 Determinación de la proteína 63
2.1.3 Test de cinética. 63
2.1.4 Estudios de inhibición. 63
2.1.5 Electroforesis. 63
2.1.6 Análisis estadístico. 65
2.2 Inmovilización de fosfatasa ácida en ácido tánico y arcilla. 65
2.2.1. Inmovilización de la fosfatasa ácida en ácido tánico. 65
2.2.2 Inmovilización de la fosfatasa ácida en arcilla. 67
2.2.3 Determinaciones de actividad y parámetros cinéticos de las fracciones sobrenadantes y complejos. 68
2.2.4 Determinación de la concentración de Mn en las fracciones sobrenadantes y complejos. 69
2.2.5 Determinación del contenido de proteína en las fracciones sobrenadantes y complejos. 69
2.2.6 Determinación del punto isoeléctrico de los complejos
2.2.7 Espectroscopía IR 69
2.2.8 Estudio de estabilidad térmica de la fosfatasa inmovilizada en ácido tánico. 70
3. RESULTADOS Y DISCUSION 70
3.1. Comportamiento catalítico de dos fosfatasas ácidas en presencia de Mn. 70
3.1.1 Evaluación de métodos para determinación de la actividad fosfatasa ácida 70
3.1.2 Propiedades de las dos preparaciones enzimáticas. 72
3.1.3 Efecto del Mn sobre la actividad y cinética de las fosfatasas 76
3.2 Efecto del Mn sobre la fosfatasa ácida inmovilizada en ácido tánico. 78
3.3 Efecto del Mn sobre la fosfatasa ácida inmovilizada en arcilla. 82
4.CONCLUSIONES 88
PROYECCIONES DE LOS ESTUDIOS 89
REFERENCIAS 90

INTRODUCCION GENERAL

La mayor parte de los Andisoles del sur de Chile se destina a la producción animal con cerca de 864.000 hectáreas de praderas sembradas que se caracterizan por presentar asociaciones de *Trifolium repens* y *Lolium perenne.* La principal limitante para pasturas establecidas en estos suelos es la acidez que los caracteriza (Mora et al., 1999; Mora et al., 2002, Mora et al., 2004, Mora et al., 2005; Mora et al., 2006). La acidez del suelo aumenta la disponibilidad de cationes metálicos como manganeso (Mn) y aluminio (Al), que a niveles altos son considerados tóxicos para la mayoría de los cultivos. De acuerdo a información del Laboratorio de Suelo y Planta de la Universidad de La Frontera, los Andisoles de la IX Región de Chile exhiben niveles de Mn de 1 a 70 mg kg^{-1}, mientras que la concentración de Mn en la parte aérea de las plantas en praderas del sur de Chile fluctúa entre 50 a 800 mg kg^{-1}; dichas concentraciones son potencialmente tóxicas para las plantas, ya que de acuerdo a lo indicado en la literatura las concentraciones adecuadas de Mn foliar fluctúan entre 20-60 mg kg^{-1} para ballica perenne y entre 25 a 100 mg kg^{-1} para trébol blanco. Sin embargo, existe muy poca información sobre concentraciones críticas de micronutrientes en praderas. La información generada en Chile respecto a los niveles de Mn en suelos y en especies pratenses es muy reducida debido a que todos los estudios se han centrado en la problemática de Al. Además, la aplicación de fosfato tiene influencia sobre la disponibilidad de los micronutrientes y su absorción por la planta, sin embargo, no hay información definida de cual es el efecto del P en la tolerancia a toxicidad por Mn en plantas.

Las respuestas bioquímicas de las plantas a niveles tóxicos de metales son muy complejas y se han sugerido varias estrategias para responder a este tipo de estrés. Estas incluyen, entre otras, restricción de la absorción, complejación de iones metálicos dentro de la célula y aumento de la producción de antioxidantes que detoxifican especies reactivas del oxígeno producidas en respuesta a toxicidad por metales (Van Assche y Clisters, 1990; Radotić et al., 2000; Schützendübel y Polle, 2002). El Mn participa tanto en la producción de radicales de oxígeno, como catalizador de reacciones en la fotosíntesis, como en la detoxificación de los radicales de oxígeno ya que forma parte de la enzima superóxido dismutasa formando H_2O_2, que puede ser transformado por la enzima peroxidasa a O_2 y H_2O. La actividad

peroxidasa se ha usado como un indicador fisiológico de la respuesta de las plantas a diferentes tipos de estrés y particularmente a metales. Por lo tanto, esta actividad enzimática puede ser usada como un sistema de detección del estrés generado por desbalances en los contenidos de Mn de las plantas de ballica perenne y trébol.

La restricción en la absorción de metales puede ocurrir en la rizósfera por complejación del metal con ácidos orgánicos exudados por las raíces de las plantas, generando una disminución de la toxicidad por exclusión desde la raíz de las plantas. Sin embargo, no hay información respecto al efecto de la toxicidad por Mn sobre la excreción de ácidos orgánicos por las raíces de ballica y trébol blanco bajo condiciones de pH ácido. Por lo tanto, es de interés investigar la relación entre la concentración de Mn disponible y la exudación de ácidos orgánicos, considerando si la exudación es activada sólo por Mn o por una deficiencia de P. El rol de los exudados radicales en la adaptación de las plantas a condiciones químicas adversas del suelo implica aspectos prácticos asociados con la necesidad de desarrollar sistemas agrícolas sustentables, requiriéndose por lo tanto, mayor información sobre los efectos de exudados radicales sobre la movilidad y disponibilidad de compuestos fitotóxicos. Sin embargo, en suelos ácidos, el efecto detrimental de elevadas concentraciones de Al disponible normalmente enmascara la toxicidad de Mn, razón por la cual los estudios en solución nutritiva son una alternativa eficaz para estudiar el efecto de los micronutrientes en las plantas.

Otro de los mecanismos que influencian la eficiencia en la adquisición de nutrientes por las plantas es la exudación de enzimas tanto por parte de las plantas como de los microorganismos del suelo. Las actividades enzimáticas son fundamentales para la solubilización, movilización y disponibilidad de los nutrientes. Los Andisoles presentan una alta retención de fosfato en su fracción arcilla y el 50% del P total de estos se encuentra bajo formas orgánicas (Borie, 1993). Por lo tanto en estos suelos la enzima fosfatasa ácida tiene un importante rol en la biodisponibilidad de P ya que esta enzima hidroliza formas de P orgánico, como los ésteres fosfatos a P inorgánico que es la forma disponible para las plantas. Sin embargo, las enzimas en el suelo se encuentran principalmente inmovilizadas en sus constituyentes orgánicos e inorgánicos. La actividad fosfatasa también puede ser afectada por la presencia de iones metálicos como el Mn en el suelo. Una estrategia comúnmente utilizada para estudiar el efecto de determinados factores

sobre las enzimas del suelo es el uso de modelos sintéticos o fracciones de suelos en condiciones controladas, los cuales representan los procesos que ocurren en el suelo. Estos sistemas modelo de suelo consisten en la inmovilización de la enzima en constituyentes del suelo como arcilla y materia orgánica. La principal ventaja que estos modelos tienen en comparación con un estudio en suelos es que la composición del medio puede ser definida, manipulada y controlada con un alto nivel de precisión, lo cual es clave al investigar la toxicidad de metales.

Con estos antecedentes el trabajo de investigación que sustenta esta tesis de doctorado se basa en las hipótesis que a continuación se describen.

Hipótesis de Trabajo

Considerando la condición natural de acidez de los Andisoles, la baja disponibilidad de P y alta concentración de Mn disponible se espera que:

1- Un aumento de la concentración de Mn en solución genere un incremento en la concentración Mn en las plantas alcancanzando niveles tóxicos especialmente a pH ácido, siendo más sensible a toxicidad por Mn el trébol blanco que la ballica perenne. Por lo tanto, el aumento en los niveles de Mn y la disminución de pH en la solución causarán una disminución en el desarrollo de ambas especies de plantas. No obstante, un aumento en los niveles de P en la solución, en condiciones de toxicidad por Mn, contribuirá a disminuir el efecto de este elemento en las plantas.

2- Las plantas respondán a deficiencia y toxicidad por Mn con un aumento en la exudación de ácidos orgánicos y de la actividad peroxidasa. Se espera también, que la cantidad de ácidos orgánicos exudados sea mas alta a pHs ácidos. Una disminución en los niveles de P en solución causará deficiencia de P, que asociada a toxicidad por Mn en las plantas, generarán las mayores tasas de exudación de ácidos orgánicos.

3- Un nivel de pH ácido y altos niveles de Mn disponible afecten negativamente la actividad y parámetros cinéticos de la enzima fosfatasa ácida.

Objetivo general

El objetivo general de esta investigación fue estudiar el efecto del Mn sobre el desarrollo de plantas de *Lolium perenne* y *Trifolium repens* en solución nutritiva, así como determinar su efecto sobre la actividad fosfatasa ácida, en un sistema modelo de suelo.

Para la mejor compresión y orden del texto, esta Tesis se dividirá en dos capítulos. El capítulo I se referirá a los estudios del efecto del Mn sobre plantas de ballica perenne y trébol blanco desarrolladas en solución nutritiva, mientras que en el capítulo II se abordará el estudio del efecto del Mn sobre la actividad fosfatasa ácida en un sistema modelo de suelo, para lo cual la enzima será inmovilizada en materia orgánica y arcilla. A continuación se describen los objetivos específicos del capítulo I.

Objetivos específicos

Determinar las concentraciones críticas de toxicidad de Mn en plantas de ballica perenne y trébol blanco, en estudios en solución nutritiva.

Identificar y cuantificar los ácidos orgánicos exudados por las especies pratenses en estudio y la actividad peroxidasa asociada a cambios en la concentración de Mn en solución nutritiva a distintos pH.

Evaluar el rol del fosfato en la detoxificación de Mn en ballica perenne y trébol blanco en solución nutritiva.

CAPITULO I

Estudio del Efecto del Mn sobre el Desarrollo de Plantas de *Lolium perenne* y *Trifolium repens* en Solución Nutritiva

1. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

1.1 Disponibilidad de Mn en el suelo.

La condición natural de acidez de los suelos derivados de cenizas volcánicas de la zona sur del país genera limitaciones para la persistencia, producción y calidad de las pasturas (Demanet et al., 1999; Mora et al., 1999). Además, estos suelos presentan una alta capacidad de adsorción de P, que también resulta en una limitante para la producción de las praderas. Todo lo cual hace necesaria la aplicación de enmiendas calcáreas y fertilización fosfatada. La acidez del suelo genera un aumento en la disponibilidad de Mn, de modo que la concentración de este elemento en la solución del suelo puede llegar a ser tóxica para las plantas (Brady, 1990).

El Mn es un micronutriente que, dependiendo de su contenido en el suelo y factores que regulan su disponibilidad (pH, potencial redox) puede alcanzar niveles tóxicos para las plantas especialmente en suelos ácidos (Rengel, 2000). La disponibilidad de Mn incrementa cuando el pH del suelo disminuye, así, cuando el pH disminuye a valores cercanos a 5,5, la toxicidad por Mn puede ser evidente, mientras que a pH superior a 6,5 es más probable que existan deficiencias (Ducic y Polle, 2005). Así, Bromfield et al. (1983) indicaron que para un pH 6,1 el Mn intercambiable fue 4,6 mg kg^{-1}, mientras que a pH 4,8 el contenido de Mn intercambiable fue de 46,1 mg kg^{-1} en una pradera de *Trifolium subterraneum*. En Chile no se han reportado estudios sistemáticos del efecto que tiene el Mn en las especies pratenses de mayor importancia y que podría estar siendo encubierto por la toxicidad de Al. Estudios de Sadzawka et al. (1976) indicaron que en la década del 70 los niveles de Mn en suelos volcánicos eran bajos para generar problemas de toxicidad. Estudios posteriores realizados por Ciudad (1990) y Sadzawka (1987) mostraron que en lentejas en la Octava Región se observó toxicidad por Mn, mientras que Rodríguez (1993) estableció que en Andisoles de la IX Región, sobre el 45% de los casos presentan tenores medios a altos de disponibilidad de Mn.

En la Tabla 1 se presenta parte de la información actual respecto del contenido de Mn en Andisoles generada por proyecto Fondecyt Nº 1020934 en el Laboratorio de Suelos y

Plantas de la Universidad de La Frontera, donde se muestran valores que van desde 4,5 mg kg^{-1} hasta 60,5 mg kg^{-1} de Mn en suelos provenientes de praderas de la IX y X Regiones.

Tabla 1. Valores promedio (n=100) de P, pH, Al y Mn en suelos provenientes de praderas de IX y X Regiones, primavera 2002.

Serie	Región	P (mg/kg)	pH (en agua)	Saturación de Al (%)	Mn DTPA (mg kg^{-1})	Mn KCl (mg kg^{-1})
Perquenco	IX	15	5,5	0,56	51,8	17,5
Temuco	IX	16	5,3	6,54	60,5	83,9
Pemehue	IX	13	5,4	4,49	9,1	20,0
Freire	IX	12	5,8	0,56	11,4	13,3
Vilcún	IX	14	5,6	0,88	12,5	14,7
Los Prados	IX	6	5,5	3,11	9,7	19,6
Caburga	IX	11	5,5	1,69	8,2	12,0
Barros Arana	IX	10	5,2	10,93	4,5	21,0
Lanco	IX	11	5,4	4,36	3,7	10,9
Los Lagos	X	10	5,6	3,18	10,2	16,8
Osorno	X	32	4,9	21,11	9,6	10,1
Corte Alto	X	21	5,1	16,42	13,8	38,5

Fuente: Laboratorio de Análisis de Suelos y Plantas – Universidad de La Frontera (2004),

1.2 Solución de nutrientes como modelo de suelo.

Un buen modelo es una simplificación de un sistema natural que puede simular los principales factores de ese sistema. Así, las soluciones de nutrientes pueden ser consideradas como modelos del sistema suelo, específicamente de la solución del suelo. La principal ventaja que el cultivo en solución de nutrientes tiene, sobre el cultivo en suelos, es que la composición del medio puede ser definida, manipulada y controlada con un alto nivel de precisión, lo cual es clave al investigar la fitotoxicidad de metales (Rorison y

Robinson, 1986).

Aunque el estudio en solución de nutrientes es un método relativamente bueno de aproximación a la solución del suelo (Asher y Edwards, 1978; Sparks, 1984; Parker y Norvell, 1999) es sólo una simplificación del sistema suelo. La principal diferencia entre el cultivo en solución de nutrientes y el suelo es que en la solución de nutrientes las raíces están en un medio acuoso con aireación continua, mientras que en suelo las raíces deben explorar continuamente el suelo para obtener agua y nutrientes.

1.3. Mn en plantas.

El Mn participa en muchos de los procesos bioquímicos de las plantas, actuando como un activador de más de 35 enzimas, las cuales catalizan reacciones como fosforilación, descarboxilación, hidrólisis y oxidaciones-reducciones (Burnell, 1988). Por lo tanto el Mn afecta procesos tales como respiración, síntesis de aminoácidos, biosíntesis de lignina y nivel de hormonas en las plantas. Así, el Mn activa las oxidasas del ácido indol acético (AIA) (Burnell, 1988). Entre las funciones más importantes de Mn, Jones et al. (1991) indican que participa en procesos de óxido-reducción del sistema de transporte de electrones en la fotosíntesis. Además el Mn forma parte de la estructura de las enzimas superóxido dismutasas, que son esenciales en la protección de los radicales libres de oxígeno en los tejidos de las plantas (Burnell, 1988).

1.3.1 Relación entre la concentración de Mn y el crecimiento de las plantas.

Para diagnosticar la toxicidad de un metal en plantas se considera la concentración crítica del metal en los tejidos, que está relacionada con el comienzo de una significativa disminución del crecimiento como resultado de la toxicidad. El método usado generalmente para definir esta concentración crítica es la concentración en el tejido que causa una reducción del 10% en la producción de materia seca (Andrew y Hegarty, 1969).

Las concentraciones foliares adecuadas o normales de Mn difieren considerablemente entre especies; de acuerdo a Clarkson (1988) estos valores fluctúan entre 30–500 mg kg^{-1} de materia seca.En praderas las concentraciones de Mn presentan un amplio rango de variación, con valores de entre 5 y 1200 mg kg^{-1} en diferentes regiones (Whitehead, 2000).

Mientras que McNaugth (1970) indica que en praderas mixtas el nivel crítico deficiencia de Mn es de 30 mg kg^{-1}. Así también, las concentraciones críticas que causan toxicidad pueden variar dentro de un amplio rango, dependiendo de la especie de planta y el genotipo dentro de la especie, así como de condiciones ambientales tales como temperatura y pH (Sparrow y Uren, 1987). Así, la literatura indica diferentes valores de concentraciones adecuadas y críticas de Mn para ballica perenne y trébol blanco (Tabla 2).

Tabla 2. Concentraciones críticas y adecuadas de Mn foliar para ballica perenne y trébol blanco.

Especie	Concentración de Mn (mg kg^{-1})				
	Bajo	Adecuado	Alto	Tóxico	Referencia
Ballica perenne	< 40	40 - 60	>60		Jones et al. (1990)
				1110	Smith et al. (1983)
				500	MacNicol y Beckett (1985)
Trébol blanco	< 25	25 - 100	>100		Jones et al. (1990)
				570	Smith et al. (1983)
				650	Andrew y Hegarty, 1969

En praderas de IX y X Regiones en la temporada 2002-2003 se informaron concentraciones de Mn que fluctuaron entre 50 a 800 mg kg^{-1} (Base de Datos Laboratorio de Análisis de Suelo y Planta de la Universidad de La Frontera), lo que implica que posiblemente la planta se encuentre con niveles tóxicos para su normal desarrollo, que pudieron ser ignorados por el efecto detrimental de Al en el desarrollo radical**.**

1.3.2 Efecto de la toxicidad de Mn en plantas.

Un exceso de Mn genera una serie de efectos negativos como i) producción de especies reactivas de oxígeno ii)intercambio de iones metálicos del sitio activo de las enzimas, iii) unión a grupos funcionales (Elstner et al., 1988). Así, puede producirse una alteración en la síntesis de compuestos orgánicos generando síntomas visibles (Marschner, 1995).

Los síntomas de toxicidad por Mn son diversos, y en muchos casos la toxicidad se

manifiesta como clorosis y necrosis en las hojas e inhibición del crecimiento (Horiguchi, 1988) y aunque la clorosis se parece a los síntomas de deficiencia de Fe, se debe a que el Mn tiene un importante rol en la biosíntesis de clorofila (Burnell, 1988).

La toxicidad por Mn induce la formación de un exceso de radicales libres y especies reactivas de oxígeno, lo que resulta en estrés oxidativo (González et al., 1998; Shi et al., 2005; Yu y Rengel, 1999). Los radicales libres se forman generalmente como productos de las reacciones biológicas normales y su difusión en el espacio celular es controlada por el sistema antioxidante de las células, que incluye a los sistemas enzimáticos tales como superóxido dismutasa, catalasa y peroxidasas (Shi et al., 2005).

1.3.3. Efectos de la toxicidad por Mn sobre la actividad peroxidasa.

La actividad peroxidasa, que permite en la remoción del exceso de H_2O_2 producido por la superóxido dismutasa (Castillo, 1986), tiene una función importante en la respuesta antioxidativa de las plantas a diferentes tipos de estrés y particularmente a metales (Van Gronsveld y Clijters, 1994). Así, Leidi et al. (1986) mostraron que tanto la deficiencia como la toxicidad por Mn causaron un aumento en la actividad de esta enzima en hojas de soya y Fetch- Christoffers et al. (2003) observaron aumento en la actividad peroxidasa de *Vigna unguiculata* expuesta a altos niveles de Mn. Similares resultados fueron obtenidos por Horiguchi (1988) en plantas de arroz, quien considera que la alta actividad peroxidasa estaba asociada con síntomas de necrosis en plantas afectadas por toxicidad por Mn. Esta actividad también ha sido utilizada como indicador biológico para diagnosticar desbalances en los contenidos de nutrientes, por ejemplo, para detectar niveles adecuados de Fe y Mn en hortalizas (Valenzuela et al., 1993). Además de su función en la transformación del peróxido de hidrógeno, Horiguchi (1987) mostró que en condiciones de toxicidad por Mn, la oxidación de este metal por peroxidasas en la pared celular de las raíces, permite la acumulación del exceso de Mn en forma metabólicamente inactiva, lo que puede ser importante en la tolerancia a este estrés.

1.3.4. Interacción Mn-Fe.

Diferentes investigaciones han demostrado que la toxicidad por Mn causa deficiencia de Fe. Por ejemplo, Crawford et al. (1989), reportaron que los niveles de Fe, en plantas de

pepino cultivadas en solución de nutrientes que presentaban toxicidad por Mn, fueron inferiores a los de plantas normales. Nazrul (1986) determinó que el Mn reduce la absorción de Fe en sorgo desarrollado en solución de nutrientes. Ohki (1975) reportó que en algodón, niveles de Mn de 4 a 247 mg kg^{-1} están asociados a concentraciones de 51 a 270 mg kg^{-1} de Fe. Sin embargo, Moroni et al. (2003) no encontraron deficiencia de Fe en genotipos de raps por efecto de la toxicidad por Mn; además, Horst (1983) no observó diferencias en la absorción de Fe entre genotipos de *Vigna unguiculata* que presentaron una respuesta diferencial a altos niveles de Mn.

1.3.5. Interacción P-Mn.

Diferentes investigaciones han demostrado que la toxicidad por Mn afecta la absorción de otros nutrientes como P (Crawford et al., 1989).Sin embargo, no hay una respuesta clara del efecto del P en la concentración de Mn en plantas. Jones et al. (1991), indicaron que aumentando los niveles de P hay respuestas positivas, neutras o negativas a las concentraciones de Mn en plantas de algodón, dependiendo de las relaciones Ca/P en solución. La aplicación de fosfato tiene influencia sobre la disponibilidad de los micronutriente y su absorción por la planta; así, se ha encontrado que a pH superiores a 6,5, incrementando el fosfato en solución disminuye la absorción de Mn en leguminosas, mientras que a bajo pH se produce un incremento de su absorción (Haynes, 1984**).** Estudios *in Vitro*, con plantas de papa, mostraron que la adición de P tuvo un efecto beneficioso en controlar la severidad y progresión de los síntomas de toxicidad por Mn aunque el aumento en los niveles de P causó un incremento en la absorción de Mn. Es posible que la adición de P pueda reducir la toxicidad por Mn debido a su inactivación por formación de complejos de baja solubilidad con el P, tanto dentro de las células de la planta, segregando al Mn de centros metabólicos importantes como en la solución del suelo (Mukhopadhyay y Sharma 1991; Cardoso, 1996; Foy, 1984; Jones y Fox, 1978; Murphy et al., 1981). Los iones fosfato son ligantes importante en la solución del suelo y por lo tanto, tienen una fuerte tendencia a formar complejos con varios cationes principalmente con Ca, Mg, Fe y Al (Lindsay, 1979). Así, un aumento en la concentración de fosfato en la solución de nutrientes mostró ser un buen detoxificante de Al en plantas de ballica (Mora et al., 2005) y maíz (Pellet et al., 1995) debido a la precipitación del metal en forma de Al-PO_4 dentro de

la raíz y la formación de complejos en solución de nutrientes. Mientras que en suelo, Habte y Soedarjo (1996) reportaron la formación de productos de baja solubilidad como el $Mn_3(PO_4)_2$.

1.4. Mecanismos de tolerancia a exceso de metales.

Hay varias estrategias de adaptación de las plantas para responder a niveles tóxicos de metales. Estas pueden ser clasificadas en dos categorías principales: i) restricción de la absorción y transporte, ii) mecanismos de tolerancia interna.

1.4.1. Restricción de la absorción o transporte.

En este tipo de mecanismo el metal es excluido de la célula, especialmente del simplasma del meristema de la raíz (Rengel, 1997). Muchas investigaciones han encontrado evidencia directa de exclusión de metales por las plantas (Reichman, 2002). El mecanismo de exclusión más estudiado es la exudación de ácidos orgánicos, los cuales podrían complejar los metales en la rizósfera (Prasad, 1998). La exclusión también puede ocurrir por precipitación debido al incremento del pH en la rizósfera o por excreción de aniones orgánicos (Pellet et al., 1995).

Algunos cultivares tolerantes a metales, como Al, exudan mayor cantidad de ácidos orgánicos (Delhaize et al., 1993; Jones, 1998; Miyasaka et al., 1991; Zheng et al., 1998; Ma et al., 2001) y enzimas como fosfatasa ácida (Duff et al., 1994), lo que les permite absorber mayor cantidad de P que los cultivares sensibles lo cual contribuye a aumentar su tolerancia al exceso de metal, en condiciones de baja disponibilidad de este nutriente.

El mecanismo de exclusión más difundido es la exudación de ácidos orgánicos (Reichman, 2002). Los ácidos orgánicos son moléculas de bajo peso molecular que dependiendo de sus propiedades de disociación y número de grupos carboxílicos, pueden presentar carga negativa, y complejar cationes metálicos en solución, así como, desplazar aniones desde la matriz del suelo (Jones, 1998). Por estas razones, se ha propuesto que los ácidos orgánicos como ácido oxálico, cítrico y málico participan en muchos procesos que operan en la rizósfera, incluyendo adquisición de nutrientes y detoxificación de metales (Marschner, 1995). Varios estudios han demostrado que en presencia de agentes

complejantes, la absorción de metales por la planta se correlaciona principalmente con la actividad del metal libre en solución, por lo tanto la complejación del metal por aniones orgánicos disminuye su disponibilidad (Greger, 1986; Kochian, 1993; McLaughlin et al., 1998; Wallace, 1980; Welch et al., 1993). La exudación de ácidos orgánicos como mecanismo de tolerancia a metales ha sido demostrada en varias especies vegetales (Rengel, 1997). Muchos de estos trabajos se han realizado con Al y se ha demostrado que genotipos tolerantes a este metal producen más malato y citrato que los genotipos sensibles (Delhaize et al., 1993; Miyasaka et al., 1991; Zheng et al., 1998; Ma et al., 2001). Respecto a Mn sólo se ha reportado un estudio en que se observó un aumento en la exudación de ácidos orgánicos en respuesta a deficiencia de Mn por plantas de alfalfa (Gherardi y Rengel, 2004). Sin embargo, no hay información reportada respecto a la exudación de ácidos orgánicos en respuesta a toxicidad por Mn. Pero, de acuerdo a Hoffland et al. (2004), se ha observado que oxalato y citrato tiene una gran tendencia a complejar cationes metálicos como Mn disminuyendo la actividad del catión libre en la solución del suelo.

1.4.2 Mecanismos de tolerancia interna.

Estos mecanismos se producen cuando el metal entra al protoplasto y es inmovilizado o convertido en formas inocuas a través de complejación y compartimentalización. La complejación ocurre principalmente dentro de la vacuola, evitando la reacción del metal con sustancias celulares metabólicamente activas (Hall, 2002; Prasad, 1998). La compartimentalización implica que las plantas pueden minimizar los efectos de un exceso de metal a través de una translocación y distribución diferencial del metal entre los tejidos de la raíz y la parte aérea (Prasad 1998; Smith et al., 1983). Es así como, que en condiciones de toxicidad por metales se ha encontrado una mayor acumulación de éstos en la raíz comparado con la parte aérea (Whitehead, 2000; Wheeler y Power, 1995; Zhang et al., 1998).

Se ha indicado que complejación de metales puede ser llevada a cabo por proteínas como metalotioninas o fitoquelatinas (Rengel, 1997; Steffens, 1990; Zenk, 1996), sin embargo, aún no hay evidencia suficiente para concluir que tienen un rol importante en la adaptación de las plantas a exceso de metales (Reichman, 2002).Otros agentes complejantes de metales dentro de la célula pueden ser los ácidos orgánicos, sin embargo, existen evidencias

contradictorias respecto a si los ácidos orgánicos contribuyen a la tolerancia a metales en las plantas (Reichman, 2002). Las estrategias por las cuales las plantas toleran exceso de Mn no son bien conocidas pero se han propuesto mecanismos como una compartimentalización del exceso de Mn en la vacuola (Foy, 1984; González y Lynch, 1999; Horst, 1988) y precipitación de formas oxidadas de Mn en la pared celular (Horiguchi, 1987;Wissemeier y Horst, 1992). Horst et al. (1999) indican que el Mn puede ser detoxificado por complejación preferencialmente por aniones orgánicos tales como citrato y oxalato que forman fuertes complejos con metales pesados, habiendo demostrado en *Vigna unguiculata* que la complejación por citrato y oxalato en el apoplasto contribuye a la tolerancia a Mn. Por otra parte, Memon y Yatazawa (1984) reportaron que en plantas acumuladoras de Mn, una gran proporción del Mn está formando complejos principalemente con oxalato. Tales mecanismos de detoxificación han sido propuestos para Zn y Cd (Krotz et al., 1989; Wang et al., 1992; Godbold et al., 1983). También Yang et al. (1997) y Kersten et al. (1980) proponen que la tolerancia a exceso de Ni está relacionada con la acumulación de ácidos orgánicos en la raíz. Este mecanismo ha sido demostrado en diferentes especies, como mecanismo de tolerancia a Al (Jones, 1998; Ma et al., 2001).

Aunque la detoxificación de metales por ácidos orgánicos parece probable, se requieren más investigaciones estudiando la prevalencia de este mecanismo en diferentes especies y con varios metales (Reichman, 2002). También se ha reportado que la complejación de metales puede ocurrir con ligandos inorgánicos como fosfato, y se ha propuesto que la formación de complejos de baja solubilidad entre el P y el Mn en la vacuola contribuye a tolerar concentraciones tóxicas de Mn (Cardoso, 1996; Foy, 1984; Jones y Fox, 1978; Murphy et al., 1981).

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 Ensayos en Solución Nutritiva.

Se realizaron dos ensayos en solución de nutrientes con plantas de ballica perenne cv. Nui (*Lolium perenne* L.) y trébol blanco cv. Huia (*Trifolium repens* L.). En el primer ensayo se

evaluó el efecto de 6 niveles de Mn (0; 2,4; 24; 59; 178 y 355 µM para ballica, 0; 5,3; 24; 59; 178 y 355 µM para trébol blanco) aplicado como $MnSO_4$ en interacción con 2 niveles de pH (4,8 y 6,0) y tuvo una duración de 40 días. En el segundo ensayo se evaluó el efecto de 3 niveles de Mn 0, 2,4 y 355 µM de Mn para ballica y 0, 5,3 y 355 µM para trébol blanco) en interacción con 2 niveles de P (44 y 96 µM para ballica y 123 y 250 µM para trébol blanco). Los ensayos tuvieron una duración de 40 días y todos los tratamientos fueron realizados con 4 repeticiones.

2.1.1. Cultivo de las plantas.

Semillas de ballica perenne y trébol blanco previamente desinfectadas con hipoclorito de sodio al 2%, se pusieron a germinar durante 5 días.Después de 5 días de desarrollo, se seleccionaron 16 plántulas con tamaño uniforme y fueron puestas en vasos de 1 L con solución de nutrientes. Las soluciones de nutrientes usadas tuvieron una composición diferente debido a que se buscó una solución de nutrientes que haya sido usada en especies gramíneas y una solución que haya sido usada para leguminosas. Para ballica perenne se escogió la solución propuesta por Taylor y Foy (1985), ya que ha sido usada en estudios de tolerancia Al en trigo, en la cual se propone como nivel normal de Mn es 2,4 µM. Para trébol blanco, se utilizó la solución propuesta por Lee et al. (1984) porque ha sido usada específicamente para esta especie en estudios relacionados con Al, en la cual el nivel normal de Mn es 5,3 µM. En el ensayo en que se evaluó el efecto de la interacción de P con Mn, se escogieron como niveles adecuados de P, aquellos propuestos por Taylor y Foy (1985) y Lee et al. (1984) en sus respectivas soluciones nutritivas, que permiten alcanzar concentraciones normales de P en las dos especies de planta, mientras que, para alcanzar plantas con deficiencia de P, se aplicó la mitad de los niveles propuestos en las soluciones nutritivas.

La solución de nutrientes para ballica tuvo la siguiente composición (µM): 1270 Ca, 750 K, 270 Mg, 120 S, 100 P, 300 NH_4-, 3710 NO_3; 17.9 Fe (EDTA), B 6.6, Zn 3.6, Cu 2.5, Mo 0.09. Mientras que la composición de la solución de nutrientes para trébol blanco fue la siguiente (µM): 1360 Ca, 1592 K, 250 Mg, 752 S, 1030 NH_3, 3570 NO_3^-,100 Fe (EDTA), 22 B, 4,2 Zn, 2,4 Cu, 0.08 Mo, 58.5 Cl, 53.9 Na.

Las plantas crecieron con aireación continua de la solución de nutrientes, permaneciendo a

una temperatura de 20ºC y con un fotoperíodo de 16 horas luz. Estas soluciones fueron reemplazadas cada 3 o 4 días y el pH fue ajustado diariamente con HCl o NaOH diluídos. Después de 40 días, se determinaron parámetros de desarrollo como el largo y peso seco de la parte aérea y raíz. También se determinaron las concentraciones de P, Mn y Fe en la parte aérea y raíz.

2.1.2 Peso seco y análisis químico de las plantas.

La parte aérea y raíces de las plantas fueron secadas en estufa con aire forzado durante 2 días a 65°C. Después de determinar el peso seco, las muestras se calcinaron en mufla a 500°C por 8 h, luego fueron digeridas con HCl 2 M. Las concentraciones de Mn y Fe se determinaron por espectrofotometría de absorción atómica de acuerdo a método propuesto por Sadzawka et al. (2004) y el P fue determinado por el método molibdo-vanadato (A.O.A.C., 1975).

2.1.3 Obtención y análisis de los exudados de raíces.

Los exudados fueron colectados de plantas desarrollas con los diferentes tratamientos de Mn, pH y P, de acuerdo al método propuesto por Neumann y Römheld (1999; 2000). El sistema radical fue sumergido durante 2 h, en 10 mL de agua desionizada con aireación constante. La obtención de los exudados se realizó durante 2 h debido a que diferentes investigaciones han mostrado que los ácidos orgánicos son degradados por los microorganismos sólo después de 2 horas (Dinkelaker et al., 1997; Jones y Darrah, 1994; Jones et al., 1996; Shepherd y Davies, 1994). La solución con los exudados radicales fue congelada y luego liofilizada, el residuo fue resuspendido en 300-500 µL para ser analizado por HPLC.

Para determinar la concentración de ácidos orgánicos (ácido oxálico, cítrico, málico y succínico) se utilizó HPLC con detector UV con arreglo de diodo. El sistema HPLC consistió de una bomba Merck Hitachi modelo L-7100; un detector UV con arreglo de diodo Merck Hitachi modelo L-7455. Se usó una columna de fase reversa (Merck, LiChrospher 100 RP-18, 5 µM). Se utilizó como fase móvil ácido fosfórico 200 mM, pH 2,1. Se trabajó a temperatura ambiente y todas las soluciones se filtraron y sonicaron antes de usar. La detección de ácidos orgánicos se realizó a 210 nm. El flujo fue de 1 mL min^{-1}y

el volumen de inyección fue de 20 µL. Se prepararon soluciones estándar de cada uno de los ácidos orgánicos y mezclas de ellos para la identificación de los ácidos orgánicos presentes en los exudados, la que fue realizada comparando los tiempos de retención con estos estándares. Además, con estos estándares se determinó el porcentaje de recuperación de los ácidos orgánicos el que fue de 98%.

2.1.4 Determinación de la actividad guayacol- peroxidasa.

Se determinó actividad guayacol-peroxidasa (que en adelante se denominrá sólo peroxidasa) a las plantas de 15 días de desarrollo, provenientes del ensayo con dos niveles de pH y 6 niveles de Mn. La determinación de la actividad peroxidasa se realizó de acuerdo al método propuesto por Adorada et al. (2000). Muestras de raíz y de parte aérea de plantas fueron molidas y homogeneizadas con mortero en buffer Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM de DTT (ditiotreitol), en proporción 1:19 peso: volumen. Esta mezcla se centrifugó a 1500 g por 15 min. Luego se extrajo el sobrenadante, se agregó buffer para completar 10 mL y se usó inmediatamente o se almacenó a –20ºC. Previo a la determinación de peroxidasa, los extractos de plantas fueron preincubados con Triton X-100, 0.65%, por 1 min (Del Río et al., 1978). Todas las actividades se llevaron a cabo a 4ºC. Para la determinación de la actividad peroxidasa, se adicionaron 100 µL del extracto conteniendo la enzima a 3 mL de un buffer acetato 50 mM, pH 5,0 que contenía guayacol (10 mM) y H_2O_2 (10 mM) como sustratos. Los cambios de absorbancia debidos a la formación de tetraguayacol (ε 26.6 mM^{-1} cm^{-1}) fueron seguidos en espectrofotómetro a 470 nm. La actividad enzimática fue expresada como unidad (U) por gramo de peso fresco, donde una U equivale a la cantidad de sustrato (µmol) transformada por la enzima en un minuto.

2.1.5 Especiación de Mn en las soluciones nutritivas.

Se usó el programa GEOCHEM (Parker et al.,1987), version 2,0 para evaluar la especiación de Mn en solución y la formación de complejos entre los ácidos orgánicos y el Mn en las soluciones de nutrientes, para lo cual se consideraron las cantidades totales de ácidos orgánicos exudados por las 16 plantas en 1 L de solución de nutrientes.

2.1.6 Diseño experimental y análisis estadístico.

El diseño experimental fue totalmente al azar con 4 repeticiones. Debido que los datos no cumplen los supuestos de homogeneidad de varianza de pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Levene fueron logarítmicamente transformados y posteriormente se realizó el análisis de varianza. Los promedios fueron comparados por medio de la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

3. RESULTADOS Y DISCUSION

3.1. Estudios en solución de nutrientes con diferentes niveles de Mn y pH.

3.1.1. Efecto del pH y Mn en la concentración de P, Mn y Fe y desarrollo de las plantas.

La concentración de Mn en ballica perenne y trébol blanco se correlacionó positivamente con la actividad del Mn^{+2} libre en solución de nutrientes (Tablas 3, 4 y 7). En ambas especies de plantas, no se presentaron diferencias significativas en la concentración de Mn en la parte aérea por efecto del pH, mientras que en las raíces hubo mayor acumulación de Mn a pH 6,0 que a pH 4,8. Mientras que los contenidos de P y Fe fueron significativamente mayores a pH 6,0 que a pH 4,8 tanto en las raíces como en la parte aérea de las dos especies de plantas (Tablas 3 y 4).El aumento en los niveles de Mn en la solución de nutrientes y consecuentemente en las plantas causó un leve aumento en las concentraciones Fe y P en ambas especies pratenses. Sin embargo, los distintos niveles de Mn no causaron deficiencia de Fe en las plantas como se ha descrito en otros estudios (Alam et al., 2000; Crawford et al., 1990; Nazrul, 1986).

Tabla 3. Concentración de Mn, P y Fe (mg kg^{-1}) en la parte aérea y raíces de ballica perenne desarrollada en solución de nutrientes con distintos niveles de Mn y pH.

Tratamiento		**Parte aérea**			**Raíz**		
pH	**Mn**	**P**	**Mn**	**Fe**	**P**	**Mn**	**Fe**
	(µM)	**g kg^{-1}**	**mg kg^{-1}**	**mg kg^{-1}**	**g kg^{-1}**	**mg kg^{-1}**	**mg kg^{-1}**
	0	5,2b	68h	108a	3,6cd	22g	410e
	2,4	3,5d	148g	71d	2,2e	39g	373f
6,0	**24**	3,7d	954e	72d	2,4e	1006f	513c
	59	3,6d	1355d	74d	3,0de	3297bc	560b
	178	6,0a	2851ab	80c	4,8a	5447b	1016a
	355	5,5b	2238c	69e	4,9a	6302a	1030a
	0	4,8b	31i	97ab	4,0c	106g	564b
	2,4	4,3c	180g	98ab	3,3d	177g	423de
4,8	**24**	4,9b	723f	87bc	3,8cd	1115f	339fg
	59	5,2ab	1277d	91b	4,3b	1561e	326g
	178	4,8b	3148a	92b	4,4b	3244c	476d
	355	5,0b	2357bc	88bc	4,7ab	2408d	1027a

Promedios con letras diferentes en la columna denotan diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre tratamientos de acuerdo a la prueba de comparación múltiple de promedios de Tukey.

Las concentraciones de Fe (Tablas 3 y 4) están dentro del rango considerado normal para ballica perenne y trébol blanco de acuerdo a Jones et al. (1991), quienes indicaron que concentraciones menores a 50 mg kg^{-1} causan deficiencia de Fe, concentraciones superiores a 500 mg kg^{-1} causan toxicidad. Estos resultados están de acuerdo con lo reportado anteriormente por Moroni et al. (2003) quienes no encontraron deficiencia de Fe en plantas de raps, que presentaban toxicidad por Mn. Además, resultados obtenidos por Horst (1983) mostraron que no habían diferencias en la absorción de Fe en genotipos de *Vigna unguiculata* (L.) pero que sí expresaron una respuesta diferencial a altos niveles de Mn. Las concentraciones de P también se encuentran dentro de los rangos considerados normales para estas especies que, de acuerdo a Whitehead (2000), los valores fluctúan entre 2,0 y 6,0 g kg^{-1}.

Tabla 4. Concentración de Mn, P y Fe (mg kg^{-1}) en la parte aérea y raíces de trébol blanco desarrollada en solución de nutrientes con distintos niveles de Mn y pH.

Tratamiento		**Parte aérea**			**Raíz**		
pH	**Mn**	**P**	**Mn**	**Fe**	**P**	**Mn**	**Fe**
	(µM)	**g kg^{-1}**	**mg kg^{-1}**	**mg kg^{-1}**	**g kg^{-1}**	**mg kg^{-1}**	**mg kg^{-1}**
	0	4,4e	59h	216a	6,0bc	77j	3826fg
	5,3	5,0c	163g	180b	5,8c	198i	3976f
6,0	**24**	4,1f	378e	145e	5,9c	1197f	3766g
	59	4,5d	723c	149e	7,0ab	1665e	4222e
	178	6,0a	1521b	147e	7,5a	3225c	4620d
	355	5,9a	2120a	168c	6,5b	6164b	5716b
	0	4,6d	53h	187b	7,8a	151h	4004f
	5,3	4,5d	187f	157d	7,0ab	417g	3575h
4,8	**24**	5,3b	475d	160d	5,6c	1270f	4893c
	59	5,6ab	742c	158d	5,7c	2781d	5696b
	178	5,7ab	1653b	159d	5,9c	6044b	7037a
	355	5,0c	2050a	177b	6,7b	7481a	5797b

Promedios con letras diferentes en la columna denotan diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre tratamientos de acuerdo a la prueba de comparación múltiple de promedios de Tukey.

Las plantas mostraron diferencias visibles en su crecimiento después de los primeros 15 días sometidas a tratamientos con Mn y estas diferencias se intensificaron gradualmente en el tiempo, presentando síntomas que variaron de deficiencia a severa toxicidad, dependiendo de los niveles de Mn aplicados a las soluciones de nutrientes.

Las plantas desarrolladas con el nivel mas alto de Mn correspondiente a 355 µM en la solución de nutrientes presentaron un escaso desarrollo, con hojas necróticas y raíces cortas (Figura 1). Además, los síntomas de toxicidad se manifestaron como clorosis en ballica y bordes rojizos en las hojas de trébol blanco ((Figura 2.).

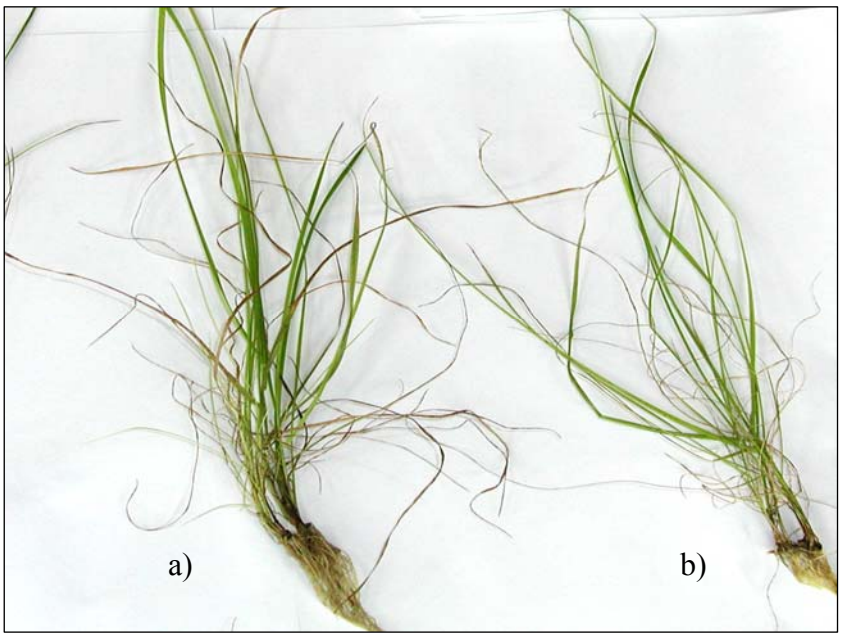

Figura 1. Síntomas de toxicidad por Mn en ballica perenne desarrollada en solución de nutrientes con: a) 178 µM de Mn y b) 355µ M de Mn, a pH 4,8.

Figura 2. Síntomas de toxicidad por Mn en trébol blanco desarrollado en solución de nutrientes con: a) 59 µM de Mn y b) 355µ M de Mn, a pH 4,8.

El largo de raíces y parte aérea de las plantas (Tablas 5 y 6) y, por lo tanto, el peso seco de las plantas disminuyó significativamente con el incremento en los niveles de Mn desde 24 a 355 µM en las solución de nutrientes (Figuras 3 y 4). El efecto negativo del incremento en los niveles de Mn en la solución de nutrientes sobre el peso seco de las plantas fue más significativo a pH 4,8 que a pH 6,0 (Figuras 3 y 4). Se observó una disminución del peso seco cercana al 70 % debido a la interacción entre el aumento en los niveles de Mn y disminución del pH desde 6,0 a 4,8 (Figuras 3 y 4).

Tabla 5. Efecto de la interacción Mn y pH sobre el largo de parte aérea y raíz de ballica perenne.

Tratamiento		Ballica perenne	
pH	**Mn**	Largo (cm)	
	(µM)	**Raíz**	**Parte aérea**
	0	18,5b	40,3 a
	2,4	23,0a	45,5a
6,0	**24**	21,8ab	42,3a
	59	20,5ab	34,3b
	178	19,3b	31,8b
	355	18,8b	30,5bc
	0	6,5e	27,0b
	2,4	16,3c	32,0b
4,8	**24**	12,7d	27,7c
	59	13,8d	27,5c
	178	12,0d	26,3c
	355	6,5e	22,3d

Promedios con letras diferentes en la columna denotan diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre tratamientos de acuerdo a la prueba de comparación múltiple de promedios de Tukey.

Tabla 6. Efecto de la interacción Mn y pH sobre el largo de parte aérea y raíz de trébol blanco.

Tratamiento		**Trébol blanco**	
pH	**Mn**	**Largo (cm)**	
	(µM)	**Raíz**	**Parte aéra**
	0	17,3b	12,4b
	5,3	22,0a	14,8a
6,0	**24**	20,0ab	13,4ab
	59	16,0b	12,6b
	178	16,0b	10,8c
	355	15,0bc	9,3d
	0	11,7c	9,5d
	5,3	20,3ab	12,3b
4,8	**24**	20,5ab	11,4bc
	59	16,4b	10,9c
	178	12,0c	11,0c
	355	13,4c	9,3d

Promedios con letras diferentes en la columna denotan diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre tratamientos de acuerdo a la prueba de comparación múltiple de promedios de Tukey.

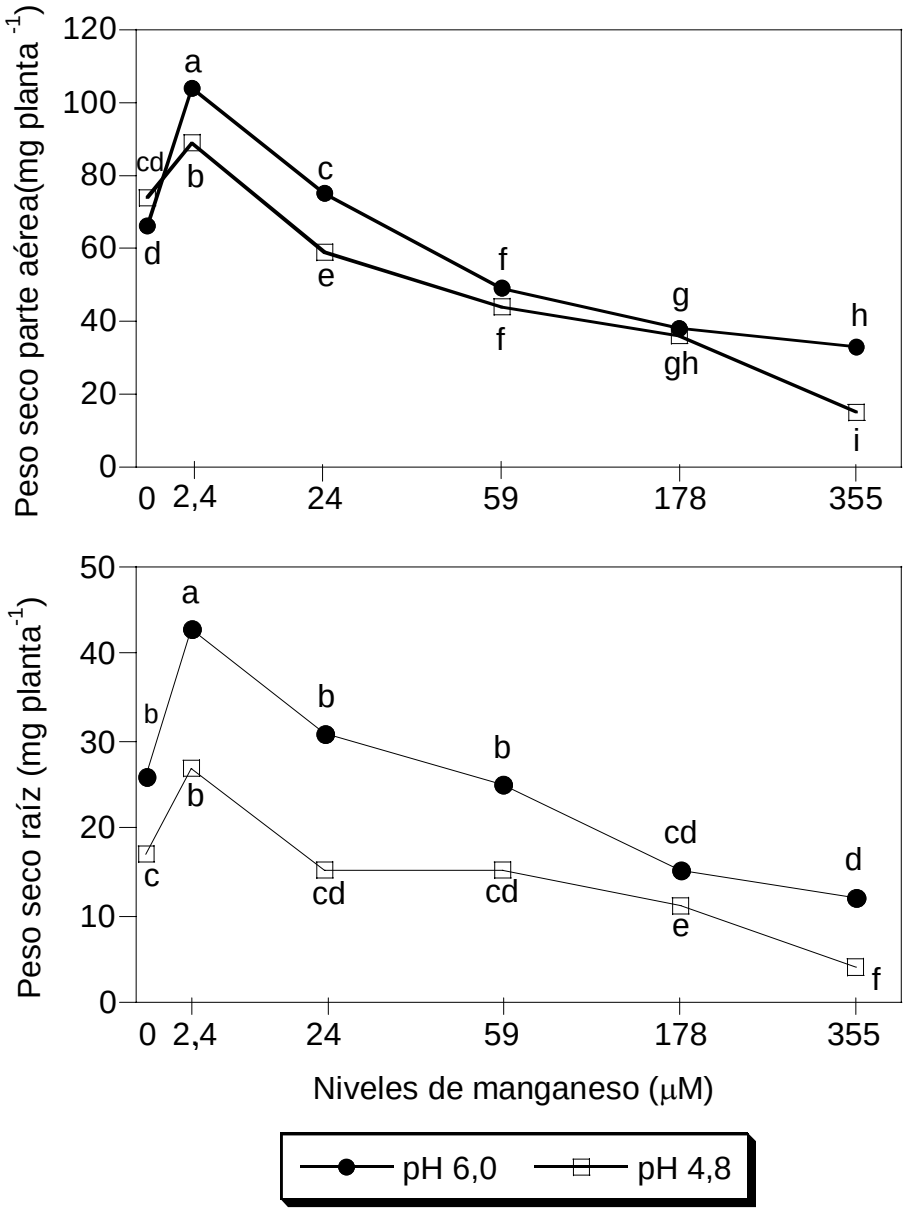

Figura 3. Efecto de diferentes niveles de Mn en interacción con dos niveles de pH sobre el peso seco de plantas de ballica perenne desarrolladas en solución de nutrientes. Promedios con letras diferentes denotan diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre tratamientos, debido a la interacción Mn x pH, de acuerdo a la prueba de comparación múltiple de promedios de Tukey.

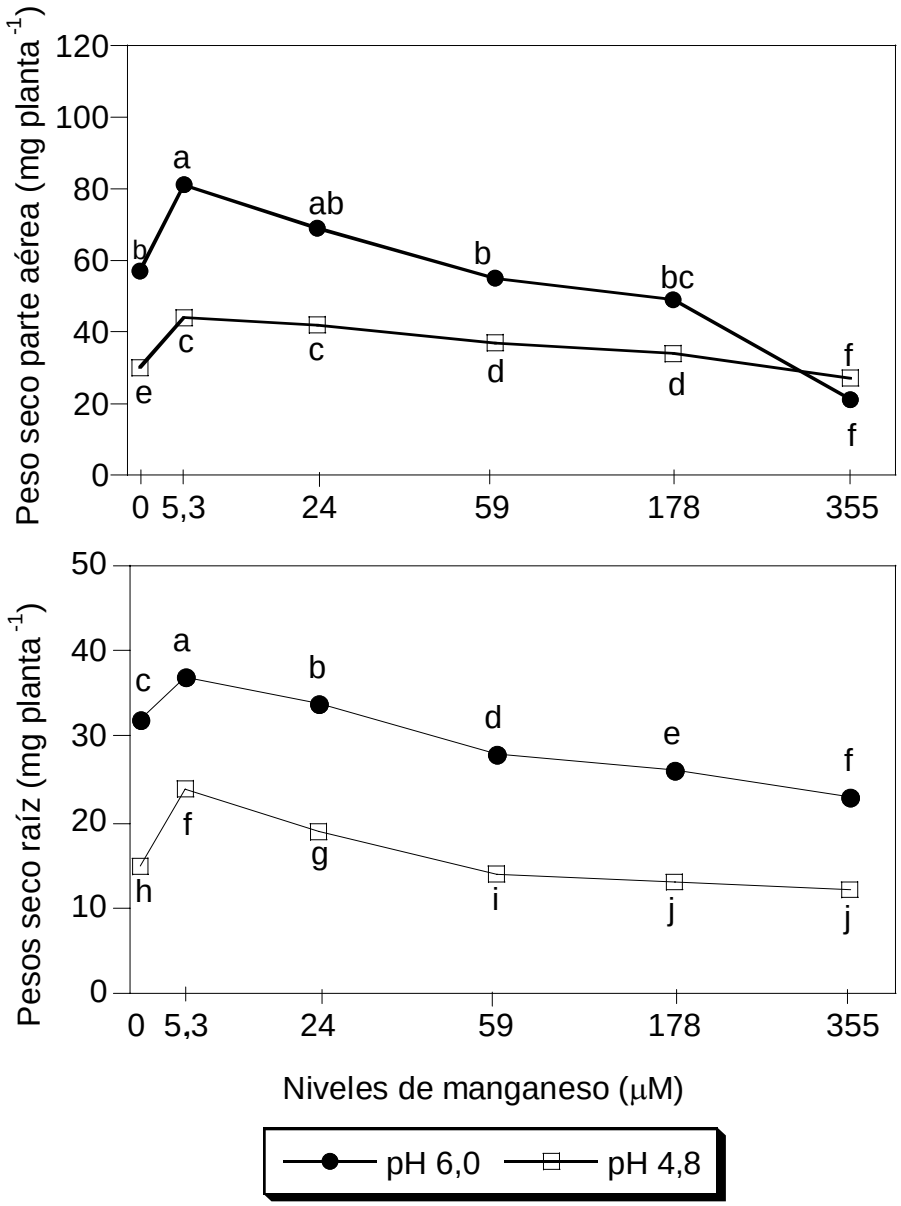

Figura 4. Efecto de diferentes niveles de Mn en interacción con dos niveles de pH sobre el pesos seco de plantas de trébol blanco desarrolladas en solución de nutrientes. Promedios con letras diferentes denotan diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre tratamientos, debido a la interacción Mn x pH, de acuerdo a la prueba de comparación múltiple de promedios de Tukey.

La concentración crítica de toxicidad de Mn (definida como la concentración de Mn asociada a una disminución superior al 10% en el peso seco comparado con la concentración de Mn asociada al peso seco más alto) fue de 421 mg de Mn kg^{-1} para ballica perenne y 283 mg de Mn kg^{-1} para trébol blanco (Figura 5). MacNicol y Beckett (1985) reportaron que la concentración crítica de toxicidad de Mn para ballica corresponde a 500 mg kg^{-1}, el cual es un umbral cercano al obtenido en este experimento. Sin embargo, Smith et al. (1983) obtuvieron concentraciones críticas de 670 mg de Mn kg^{-1} para ballica perenne y 1110 mg de Mn kg^{-1} para trébol blanco, lo cual puede ser atribuido a las diferencias en los niveles más bajos de Mn considerados para calcular estos umbrales y a los diferentes cultivares estudiados en ambos experimentos.

El requerimiento interno de Mn, es decir, la concentración de Mn en los tejidos necesaria para alcanzar el 95 % del máximo peso seco, fue de 136 mg kg^{-1} para ballica perenne y de 145 mg kg^{-1} para trébol blanco. Jones et al. (1991) indicaron que la ballica perenne requiere entre 20 a 60 mg de Mn kg^{-1} y trébol blanco requiere entre 25 a 100 mg kg^{-1}. Sin embargo, se puede inferir que la disminución de peso seco de las plantas desarrolladas sin Mn (Figuras 3 y 4) se produjo como una consecuencia de una deficiencia de Mn, ya que la concentración de Mn en la parte aérea de las plantas sólo alcanzó el 50 % y 40 % del requerimiento interno de Mn calculado para ballica perenne y trébol blanco, respectivamente (Figura 5).

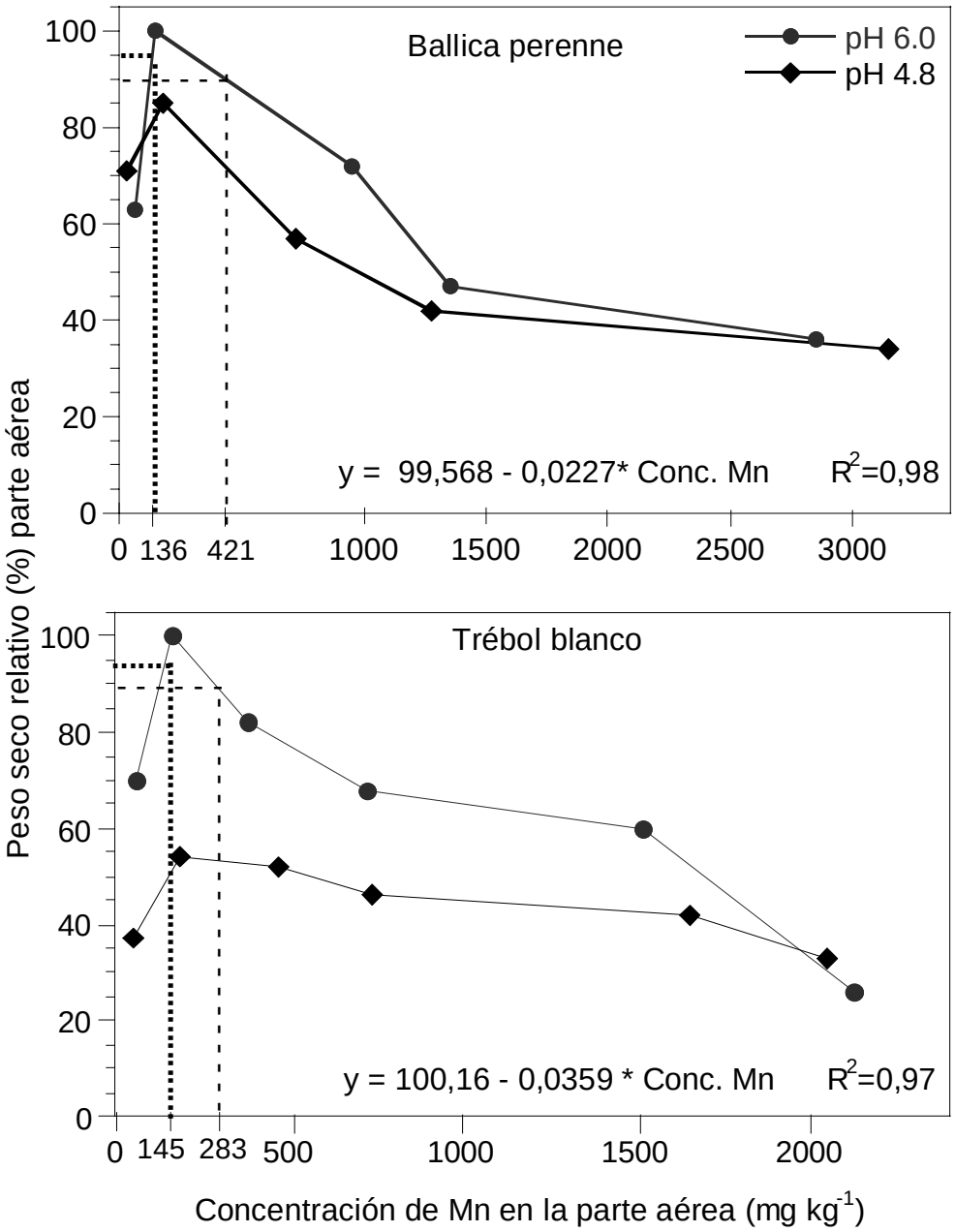

Figura 5. Relación entre la concentración de Mn en la parte aérea y el peso seco de plantas de ballica perenne y trébol blanco desarrolladas en solución de nutrientes con distintos niveles de Mn y pH. Las ecuaciones mostradas se usaron para calcular la concentración crítica de toxicidad de Mn, que corresponden a 421 mg kg^{-1} para ballica perenne y a 283 mg kg^{-1} para trébol blanco.

La influencia del pH sobre el desarrollo de las plantas puede ser parcialmente explicada por las diferencias en la especiación del Mn en las dos soluciones de nutrientes (Tabla 7). No hubo una marcada diferencia en el porcentaje de Mn libre entre los dos pHs estudiados en la solución de nutrientes usada para ballica perenne y se observaron menores diferencias en el peso seco de esta especie por efecto del pH en comparación con trébol blanco (Figuras 2 y 4). Por el contrario, para trébol blanco hubo una marcada diferencia en porcentaje de Mn libre a pH 6,0 comparado con el pH 4,8 que estuvo asociado a una marcada diferencia en peso seco de las plantas por efecto del pH (Figura 4). La menor disponibilidad de Mn a pH 6,0 en comparación con pH 4,8 en la solución de nutrientes para trébol blanco se debe principalmente a que un mayor porcentaje de Mn fue complejado con EDTA a pH 6,0 (Tabla 7).

Tabla 7. Porcentaje de distribución de especies de Mn en las soluciones de nutrientes para ballica perenne y trébol blanco con diferentes niveles de Mn y pH, calculadas por GEOCHEM.

	pH 4,8					**pH 6,0**				
	Niveles de Mn (µM)									
	2,4	**24**	**59**	**178**	**355**	**2,4**	**24**	**59**	**178**	**355**
	Solución de nutrientes para ballica perenne									
Mn^{+2}	89,4	88,9	88,5	87,9	88,8	87,6	87,8	86,9	88,8	88,5
$Mn\text{-}SO_4$	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,5
Mn-Cl	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Mn-EDTA	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	1,2	1,0	1,1	0,8	0,6
Mn-carboxilatos	8,8	9,3	9,6	9,9	8,8	9,6	10,1	10,2	9,5	9,2
	Solución de nutrientes para trébol blanco									
Mn^{2+}	84,5	83,9	82,7	83,4	85,12	73,8	72,2	76,1	76,4	76,2
$Mn\text{-}SO_4$	8,2	8,2	8,1	8,1	7,6	7,3	7,2	7,5	7,5	7,3
Mn-Cl	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Mn-EDTA	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	7,6	7,4	7,5	6,7	5,7
Mn-carboxilatos	7,1	7,6	8,9	8,3	7,0	11,1	13,2	8,8	15,2	10,8

Las diferencias en la especiación entre las dos soluciones de nutrientes puede ser atribuida a un mayor porcentaje de complejos Mn-SO_4 y Mn-EDTA en la solución de nutrientes para trébol blanco debido a la mayor concentración de SO_4^{-2} y EDTA en esta solución de nutrientes comparada con la solución para ballica perenne.

Además, el efecto del pH sobre el desarrollo de las plantas no se explica sólo por su efecto en la disponibilidad y absorción de Mn sino que afectó también la absorción de otros nutrientes, así, se observaron mayores contenidos de P y Fe en las plantas desarrolladas a pH 6,0 lo que podría contribuir a explicar el mayor peso seco de estas plantas en comparación con aquellas que se desarrollaron a pH 4,8.

3.1.2 Efecto de Mn y pH sobre la cantidad y tipo de ácidos orgánicos exudados.

Las Figuras 6 y 7 muestran que el acido oxálico fue exudado en mayor cantidad por las dos especies de plantas, con cantidades que fluctuaron entre 0,37 y 3,3 $\mu mol\ g^{-1}\ h^{-1}$.

En ballica, las raíces exudaron mayor cantidad de ácidos orgánicos a pH 4,8 que a pH 6,0 (Figura 6). A pH 4,8 se observó una tendencia al aumento en la exudación de todos ácidos cuando aumentaron las concentraciones de Mn en la solución de nutrientes desde 2,4 a 355 µM. Así, con el nivel más alto de Mn (355 µM y pH 4,8) hubo un incremento de aproximadamente 2, 3, 4 y 7 veces en la exudación de ácido succínico, cítrico, oxálico y málico, respectivamente, comparado con el tratamiento 2,4 µM de Mn. Mientras que a pH 6,0 hubo un incremento en la exudación de oxalato, citrato y succinato en respuesta al aumento en los niveles de Mn en la solución de nutrientes (Figura 6) y la exudación aumentó al doble cuando se aplicaron 355 µM en comparación con el tratamiento 2,4 µM de Mn.

El trébol blanco exudó mayor cantidad de ácido oxálico y cítrico a pH 4,8, mientras que a pH 6,0 las plantas exudaron mayor cantidad de ácidos málico y succínico (Figura 7). Cuando se incrementaron los niveles de Mn desde 5,3 hasta 355 µM se observó una tendencia al aumento en la exudación de todos los ácidos orgánicos. La aplicación de 355 µM de Mn a pH 4,8 produjo un aumento de 1, 2 y 4 veces en la exudación de ácido oxálico, cítrico y málico, respectivamente, mientras que a pH 6,0 la exudación de ácidos orgánicos aumentó al doble cuando se aplicó el nivel más alto de Mn.

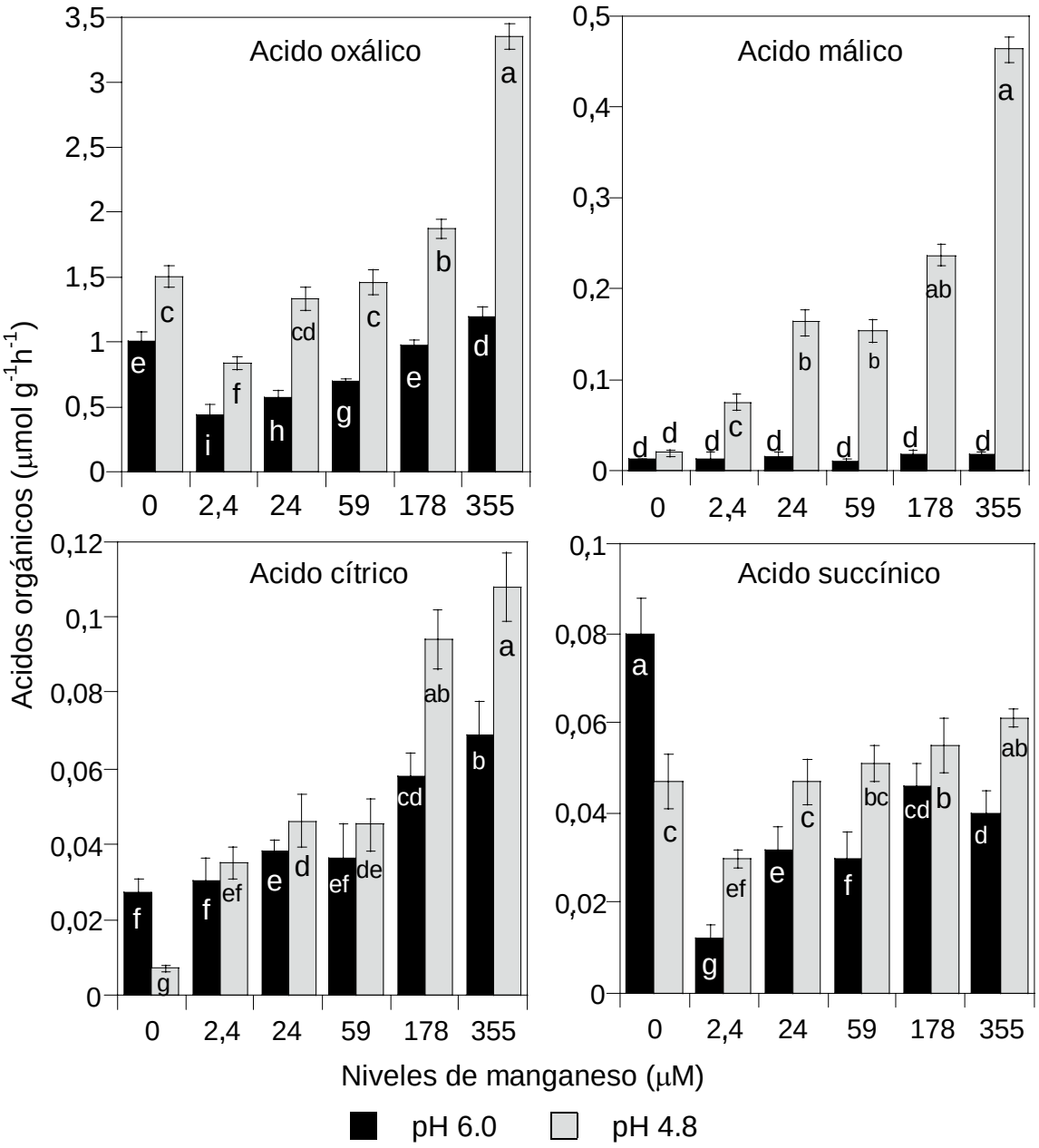

Figura 6. Ácidos orgánicos exudados por las raíces de ballica perenne desarrollada en solución de nutrientes con distintos niveles de Mn y pH. Promedios con letras diferentes denotan diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre tratamientos, debido a la interacción Mn x pH, de acuerdo a la prueba de comparación múltiple de promedios de Tukey.

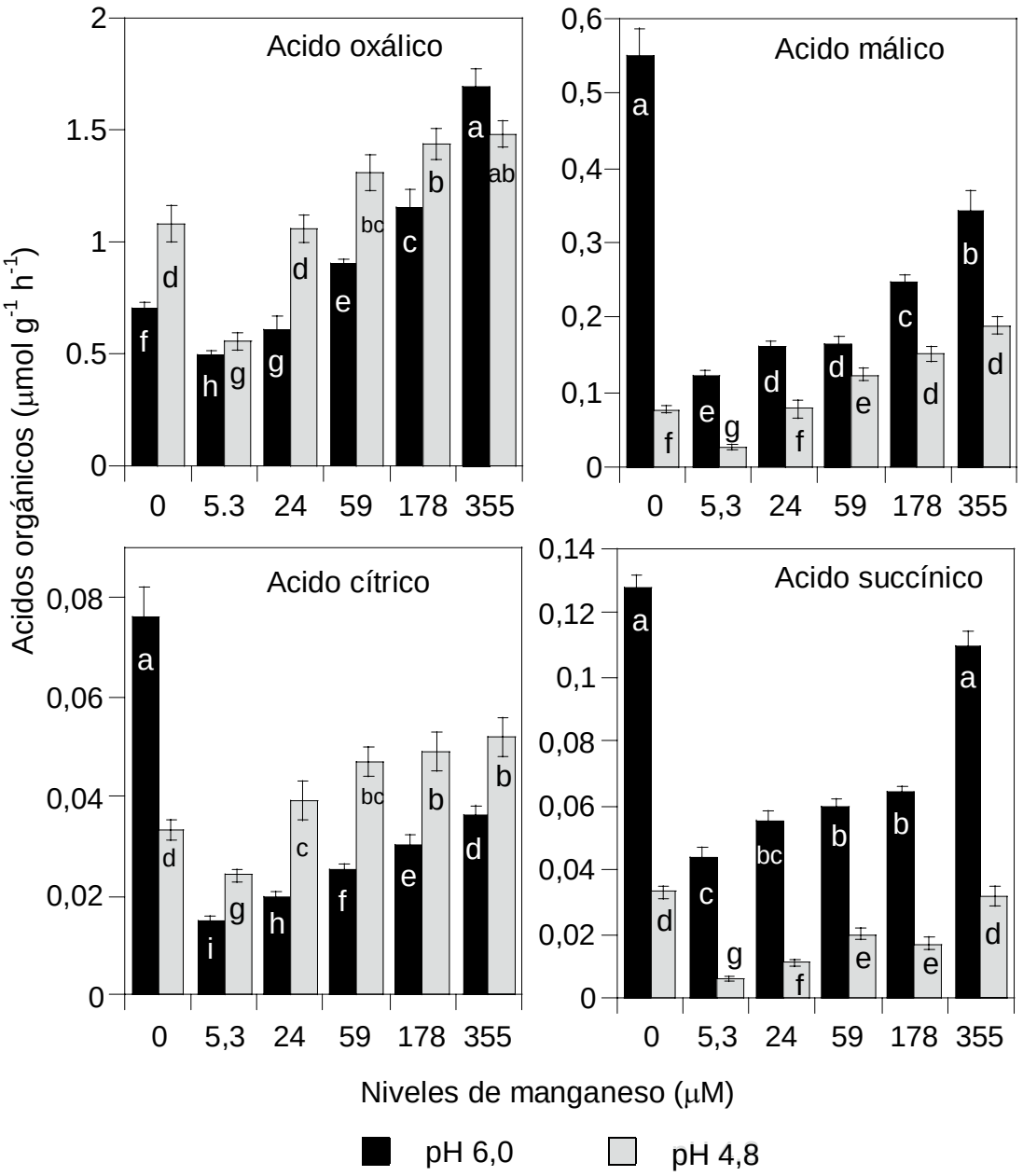

Figura 7. Ácidos orgánicos exudados por las raíces de trébol blanco desarrollada en solución de nutrientes con distintos niveles de Mn y pH. Promedios con letras diferentes denotan diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre tratamientos, debido a la interacción Mn x pH, de acuerdo a la prueba de comparación múltiple de promedios de Tukey.

Ambas especies de plantas exudaron mucho mayor cantidad de acido oxálico en comparación con los otros ácidos orgánicos evaluados. Esta respuesta de las plantas podría

estar relacionada con resultados obtenidos por Memon y Yatazawa (1984), quienes reportaron que el oxalato compleja una gran proporción del Mn a través de quelación y, además, establecieron que este es un mecanismo interno de detoxificación del exceso de Mn en plantas hiperacumuladoras de Mn.

El incremento en la exudación de ácidos orgánicos, especialmente ácido cítrico y oxálico, ha sido reportada previamente en condiciones de toxicidad por Al en diferentes genotipos y especies de plantas y se ha demostrado que la exudación de ácidos orgánicos es un mecanismo de tolerancia a Al (Delhaize et al., 1993; Miyasaka et al., 1991; Zheng et al., 1998; Ma et al., 2001). Se ha sugerido que estos ácidos orgánicos son sustancias quelantes (Reichman, 2002) que forman fuertes complejos con metales pesados (Horst et al., 1999). En este estudio se observó un aumento en el porcentaje de complejos carboxilato-Mn como consecuencia de una mayor exudación de ácidos orgánicos en respuesta a un aumento en la concentración de Mn en las soluciones de nutrientes (Tabla 8). De acuerdo a la especiación química (GEOCHEM) de los ácidos orgánicos, en la solución de nutrientes para ballica perenne, hubo un incremento de alrededor de 100 y 140 veces en el porcentaje de complejos oxalato-Mn y citrato-Mn, respectivamente, en solución cuando los niveles de Mn se incrementaron desde 2,4 hasta 355 μM de Mn (Tabla 8). Mientras que, cuando los niveles de Mn se incrementaron desde 5,3 hasta 355 μM de Mn en la solución de nutrientes para trébol blanco, se observó un aumento de 17 y 140 veces en el porcentaje de complejos oxalato-Mn y citrato-Mn, respectivamente (Tabla 8).

Tabla 8. Porcentaje de carboxilatos libres y complejados con Mn y Ca, calculado por GEOCHEM, en las soluciones de nutrientes para ballica perenne y trébol blanco con diferentes niveles de pH y Mn.

	pH 4,8					**pH 6,0**				
	Solución de nutriente para ballica perenne									
	Niveles de Mn (µM)									
Complejos	**2,4**	**24**	**59**	**178**	**355**	**2,4**	**24**	**59**	**178**	**355**
Citrato-Mn	0,12	1,15	2,76	8,05	14,75	0,20	1,93	4,59	17,61	20,60
Oxalato-Mn	0,08	0,72	1,99	5,68	10,41	0,09	0,96	2,25	7,99	12,95
Succinato-Mn	0	0,05	0,13	0,39	0,78	0,02	0,19	0,45	1,38	2,71
Malato-Mn	0,03	0,32	0,79	2,34	4,61	0,07	0,72	1,75	5,15	9,79
Citrato-Ca	47,2	46,2	46,3	44,4	40,7	69,3	66,0	65,9	56,1	49,5
Oxalato-Ca *	90,4	90,1	87,7	84,6	80,7	90,4	88,7	87,8	80,0	77,7
Succinato libre	98,0	98,0	97,9	97,6	97,3	92,7	93,0	92,2	91,2	90,1
Malato libre	88,4	88,2	87,7	86,4	84,4	77,0	76,3	75,7	72,5	69,2
	Solución de nutrientes para trébol blanco									
	Niveles de Mn (µM)									
Complejos	**5,3**	**24**	**59**	**178**	**355**	**5,3**	**24**	**59**	**178**	**355**
Citrato-Mn	0,21	1,00	2,57	7,02	11,33	0,18	1,88	4,71	12,94	22,25
Oxalato-Mn	0,26	1,06	1,62	4,98	4,34	0,11	0,65	1,47	4,46	10,43
Succinato-Mn	0,01	0,05	0,12	0,37	0,74	0,02	0,16	0,40	1,20	2,36
Malato-Mn	0,07	0,31	0,74	2,23	4,25	0,06	0,62	1,58	4,62	8,74
Citrate-Ca	46.6	42,1	41.0	37,4	44,14	72,0	69,2	67,3	61,5	55,2
Oxalato-Ca *	83,5	84,7	89,5	85,8	91,8	86,8	91,3	91,5	88,5	81,3
Succinato libre	98,0	98,0	98,1	97,8	96,67	93,1	93,3	93,2	92,4	91,1
Malato libre	88,4	88,4	88,7	87,2	81,7	78,1	79,0	78,1	75,6	71,8

*Complejado y sólido

Aunque en este experimento se observó un incremento en el porcentaje de complejos carboxilato-Mn en respuesta a un incremento en la concentración de Mn en la solución de nutrientes, sólo un 7 a 13 % del Mn está complejado con los aniones de los ácidos

orgánicos y no se observa un importante efecto de estos carboxilatos en la complejación del Mn^{+2} (Tabla 7). Estos resultados pueden ser atribuidos a que el oxalato y citrato se encuentran principalmente complejados con Ca (77 -92 % del oxalato y 37-72 % del citrato) ya que, aunque las constantes de estabilidad de los complejos son similares (oxalato- Mn: $\log K_{Ox}^{Mn} = 3.9$; oxalato-Ca: $\log K_{Ox}^{Ca} = 3.0$; citrato-Mn: $\log K_{Cit}^{Mn} = 3.2$; citrato-Ca: $\log K_{Cit}^{Ca} = 3.5$), las soluciones de nutrientes tienen mucho mayor concentración de Ca que de Mn. Además, los acido succínico y málico se encuentran principalmente en forma libre y protonados en las soluciones de nutrientes (Tabla 8). Sin embargo, en ensayos realizados en suelo, Hoffland et al. (2004) y Nogueira et al. (2004) demostraron que el oxalato y citrato forman complejos con Mn que disminuyen significativamente la actividad del Mn libre en la solución del suelo y su absorción por las plantas. Por lo tanto, se requieren estudios en el sistema suelo-planta con diferentes genotipos para saber si la exudación de ácidos orgánicos es realmente una estrategia de las plantas para tolerar la toxicidad por Mn.

Por otra parte, cuando no se adicionó Mn a las soluciones de nutrientes se observó un significativo aumento en la exudación de ácido oxálico y succínico en ballica perenne y de todos los ácidos orgánicos en trébol blanco en comparación con los tratamientos 2,4 y 5,3 µM de Mn, especialmente a pH 6,0 (Figuras 6 y 7).Similares resultados fueron obtenidos por Gherardi y Rengel (2004) con plantas de alfalfa. En condiciones de deficiencia de Mn, especialmente en suelos con pHs neutros y alcalinos, se ha reportado que los ácidos orgánicos incrementan la disponibilidad de Mn en la rizósfera (Godo y Reisenauer, 1980), y podrían ser exudados para tolerar condiciones de baja disponibilidad de Mn (Gherardi y Rengel, 2004).

3.1.3 Efecto del Mn y pH sobre la actividad guayacol peroxidasa

Se observó un incremento en la actividad peroxidasa de hojas y raíces de ballica perenne y trébol blanco en respuesta a concentraciones de Mn muy altas o muy bajas, tanto a pH 6,0 como a pH 4,8 (Figuras 8 y 9). La actividad de esta enzima fue mayor en la parte aérea que en la raíz de ambas especies de plantas. Similares resultados han sido obtenidos en soya (Leidi et al., 1986) y arroz (Horiguchi, 1988).

Varios estudios han demostrado que en condiciones de deficiencia o toxicidad por Mn aumenta la formación de radicales libres y se produce un estrés oxidativo (Tanaka et al., 1995; Yu y Rengel, 1999). La actividad peroxidasa se correlacionó negativamente con el peso seco de las plantas (ballica perenne: $r = -0,97$ $p < 0,01$ a pH 6,0 y $r = -0,96$ $p < 0,01$ a pH 4,8; trébol blanco: $r = -0,92$ $p < 0,01$ a pH 6,0 y $r = -0,78$ $p < 0,01$ a pH 4,8) indicando que tanto la deficiencia como la toxicidad por Mn causan una significativa disminución del desarrollo de las plantas como consecuencia de estrés oxidativo como ha sido previamente reportado (González et al., 1998).

La detoxificación de los radicales libres de oxígeno es realizada por la actividad superóxido dismutasa, formando como producto H_2O_2, el cual a su vez es transformado por la enzima peroxidasa. Así, Van Gronsveld y Clijters (1994) indican que la actividad peroxidasa tiene un importante rol en la repuesta antioxidativa de las células a diferentes tipos de estrés y especialmente a toxicidad por metales. Por lo tanto, el aumento en la actividad peroxidasa en los tratamientos 0 y sobre 24 µM de Mn, podría estar relacionado con una respuesta de las plantas para tolerar el estrés oxidativo causado por la deficiencia o la toxicidad por Mn en los tejidos. La actividad peroxidasa fue más baja en ballica perenne que en trébol blanco, lo que podría estar relacionado con una menor sensibilidad a la toxicidad por Mn en esta especie, lo cual fue confirmado por un mayor crecimiento de ballica en comparación con trébol blanco cuando se desarrollan en similares condiciones de toxicidad por Mn (Figuras 3 y 4).

Además, el aumento en la actividad peroxidasa en condiciones de deficiencia o toxicidad por Mn podría demostrar que el incremento en la exudación de ácidos orgánicos es una respuesta de las plantas a condiciones de estrés causada por la deficiencia y la toxicidad de un micronutriente como el Mn.

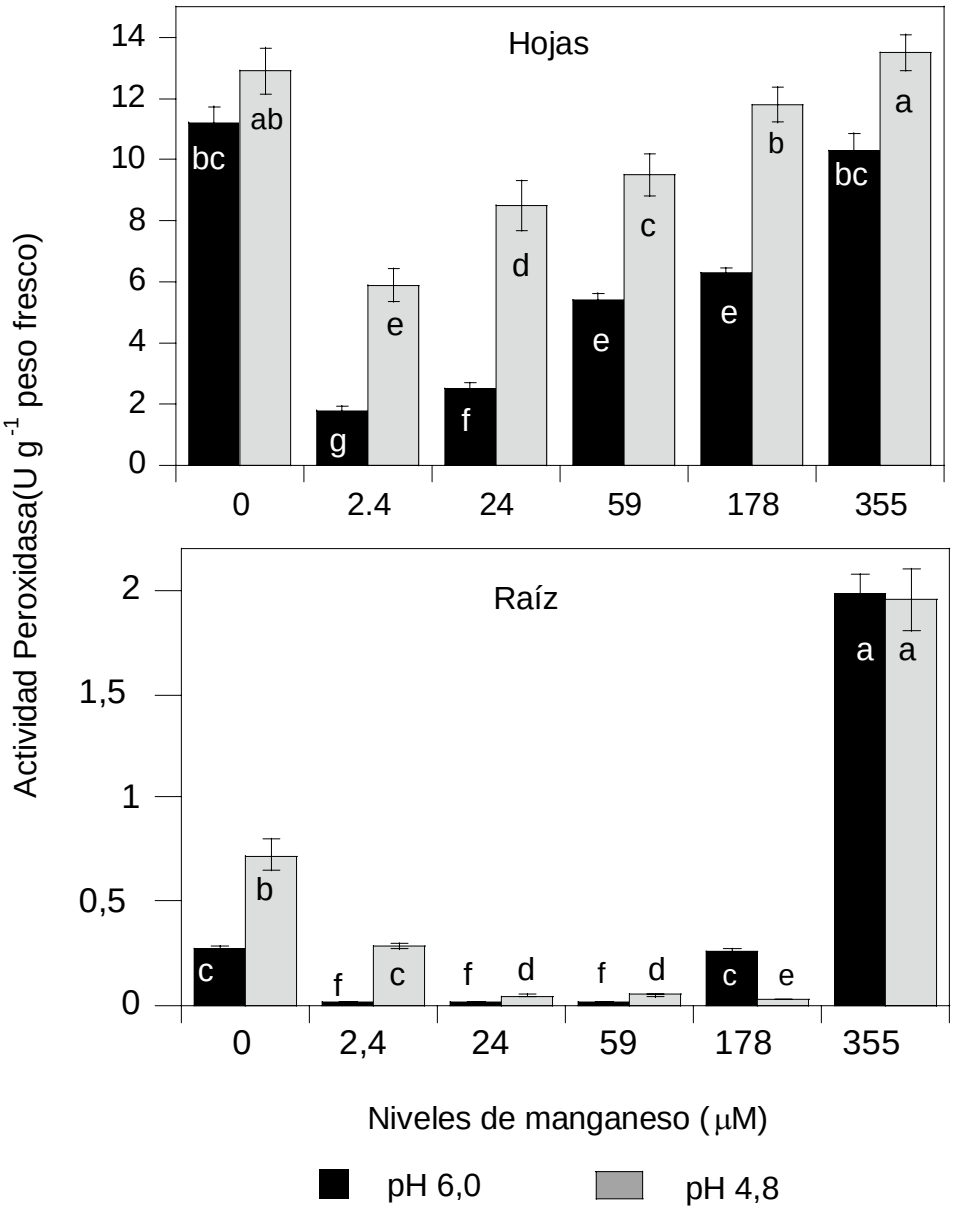

Figura 8. Actividad peroxidasa de hojas y raíz de ballica perenne desarrollada en solución de nutrientes con diferentes niveles de Mn y pH. Promedios con letras diferentes denotan diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre tratamientos, debido a la interacción Mn x pH, de acuerdo a la prueba de comparación múltiple de promedios de Tukey.

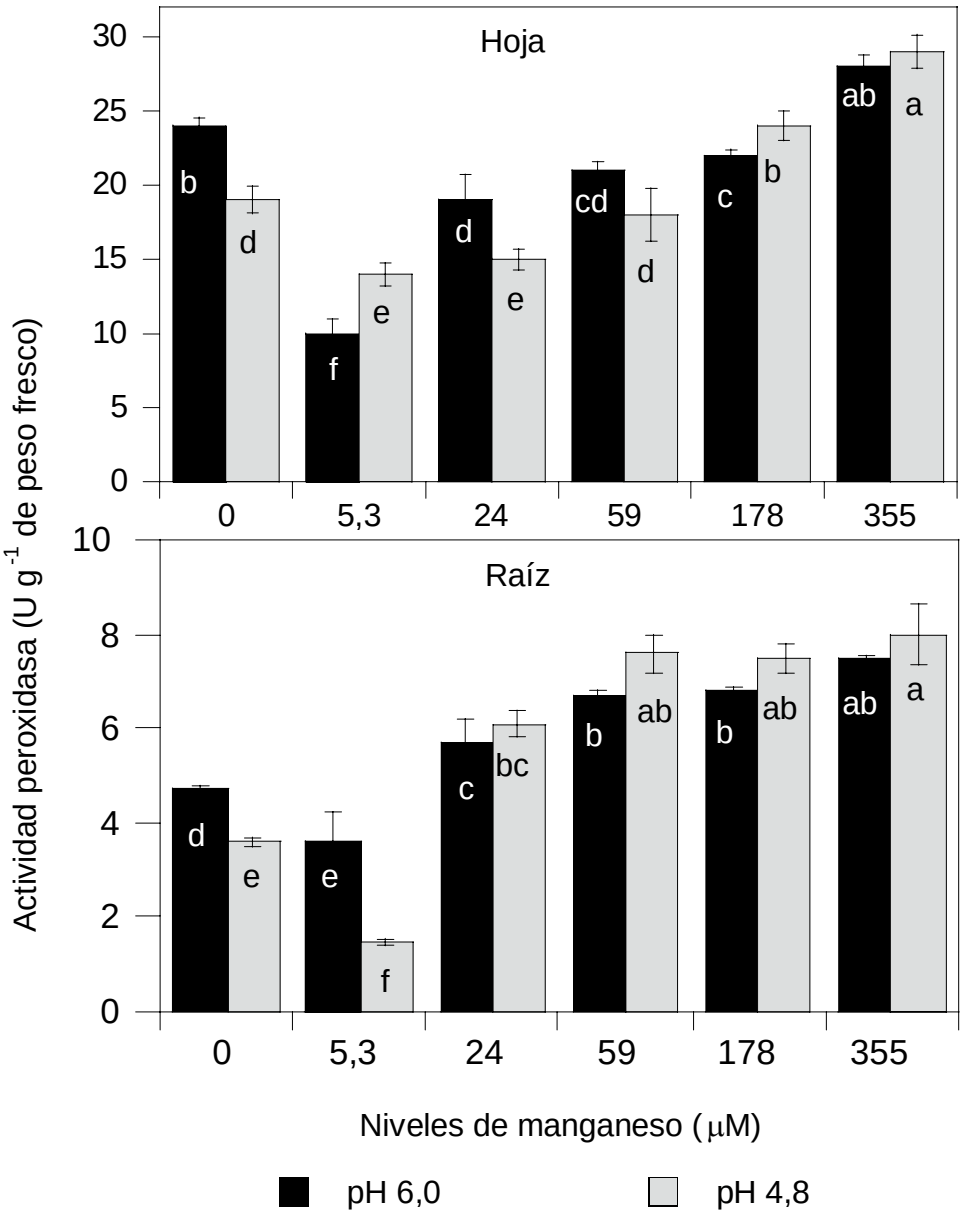

Figura 9. Actividad peroxidasa de hojas y raíz de trébol blanco desarrollado en solución de nutrientes con diferentes niveles de Mn y pH. Promedios con letras diferentes denotan diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre tratamientos, debido a la interacción Mn x pH, de acuerdo a la prueba de comparación múltiple de promedios de Tukey.

3.2. Estudios en solución nutritiva con diferentes niveles de P y Mn.

3.2.1. Efecto del P y Mn en la concentración de P, Mn, Fe y el desarrollo de las plantas.

Las plantas de ballica perenne alcanzaron el mayor peso seco con concentraciones de 4,3 g kg^{-1} de P, 172 mg kg^{-1} de Mn y 99 mg kg^{-1} de Fe en la parte aérea (Tablas 9 y 11), las cuales corresponden a los tratamientos donde se aplicó 96 μM de P en interacción con 2,4 μM Mn. Mientras que para trébol blanco el mayor desarrollo de las plantas se alcanzó con concentraciones en la parte aérea de 4,4 g kg^{-1} de P, 163 mg kg^{-1} de Mn y 160 mg kg^{-1} de Fe (Tablas 10 y 12), correspondientes al tratamiento 250 μM P en interacción con 5,3 μM de Mn.

Las plantas desarrolladas con los tratamientos 44 μM de P para ballica perenne y 123 μM de P para trébol blanco mostraron una significativa disminución en el peso seco en comparación con las plantas desarrolladas con niveles de 96 μM de P para ballica y 250 μM de P para trébol blanco (Tablas 9 y 10). El menor desarrollo de estas plantas puede deberse a que sólo alcanzaron concentraciones de P que fluctuaron entre 2,2 a 3,1 mg kg^{-1} en ballica perenne y 1,7 a 2,6 mg kg^{-1} en trébol blanco, las cuales son consideradas deficientes de acuerdo a Jones et al. (1991), quienes proponen que ballica perenne requiere entre 3,6 a 4,5 mg kg^{-1} de P, mientras que en trébol blanco las concentraciones adecuadas de P fluctúan entre 3,5 a 4,0 mg kg^{-1}.

En comparación con las plantas desarrolladas con niveles de Mn de 2,4 μM para ballica perenne y 5,3 μM para trébol blanco, se observó un disminución de más de 50 % de peso seco debido a la aplicación 355 μM de Mn en las soluciones de nutrientes (Tablas 9 y 10). Independiente de los niveles de P aplicados, la reducción en el desarrollo de estas plantas se debe a una severa toxicidad por Mn ya que alcanzaron concentraciones de Mn en la parte aérea superiores a 1500 mg kg^{-1} (Tablas 11 y 12), las cuales son muy superiores a los niveles críticos de toxicidad de Mn que corresponden a 421 mg de Mn kg^{-1} para ballica perenne y 283 mg de Mn kg^{-1} para trébol blanco.

El presente estudio demostró claramente que la toxicidad por Mn en interacción con deficiencia de P causa una significativa reducción del peso seco de las plantas. Se observó una disminución de alrededor de 70% en el peso seco de la parte aérea de ambas especies de plantas debido a la interacción entre un incremento del Mn y una disminución en los

niveles de P, desde 96 a 44 μM para ballica y desde 250 a 123 μM para trébol blanco. Esta significativa disminución en el peso seco de las plantas estuvo asociada a una disminución del peso seco de la raíz cercana al 90 % para ballica y 70 % para trébol blanco (Tabla 9 y 10).

La concentración de Mn en las plantas fue significativamente afectada por la concentración de P. Tanto en ballica perenne como en trébol blanco, un incremento en la concentración de Mn en la solución de nutrientes estuvo asociada a un aumento en la concentración de P en comparación con los tratamientos 2,4 μM de Mn para ballica perenne y 5,3 μM de Mn para trébol blanco (Tablas 1 y 12) y en las raíces de ambas especies de plantas la concentración de P aumentó cuando las plantas estaban en condiciones de severa toxicidad por Mn. El aumento en la absorción de Mn al aumentar los niveles de P, que también ha sido reportado por Marsh et al. (1987), puede deberse al mayor desarrollo y evapotranspiración de las plantas con niveles normales de P, sus tejidos tienen vacuolas bien desarrolladas y por lo tanto tienen mayor capacidad para acumular Mn (Marsh et al., 1987).

A pesar de la mayor acumulación de Mn en las plantas con mayores niveles de P, en plantas expuestas a severa toxicidad por Mn, un aumento en los niveles de P en las soluciones de nutrientes y por lo tanto en la concentración de P en las plantas causó un incremento en el peso seco cercano al 67 % para ballica perenne y 29% para trébol blanco (Tablas 9 a 12), lo que indica que el mejoramiento en la nutrición con P en las plantas contribuyó a atenuar la toxicidad por Mn. Similares resultados han sido informados por Sarkar et al., (2004), quienes demostraron, en estudios *in vitro*, que el P contribuye a controlar la progresión de los síntomas de toxicidad por Mn en plántulas de papa y que este fue más marcado a pH 4,0 que pH 5,8. De acuerdo a lo reportado por Mukhopadhyay et al. (1991), es posible que la adición de P pueda reducir la toxicidad por Mn causando su inactivación dentro de la planta. Sin embargo, no está claro si esta inactivación ocurre por precipitación del Mn dentro en los tejidos de la planta (Heintze, 1968; Le Mare, 1977), mayor acumulación del Mn en la vacuola (Horst, 1988; Horst y Marchner, 1978) o por un aumento en la compartimentalización como mecanismo de protección para segregar el Mn de los centros metabólicos (Memon et al., 1980). La precipitación del Mn dentro de los tejidos podría deberse a la formación de complejos de baja solubilidad entre el fosfato y el Mn, lo que causaría una disminución del Mn fisiológicamente activo en la célula (Cardoso,

1996; Foy, 1984; Jones y Fox, 1978; Murphy et al., 1981). También es posible que el aumento en los niveles de P contribuya a favorecer la compartimentalización del Mn, lo que implica su mayor acumulación en la raíz disminuyendo su translocación hacia la parte aérea de las plantas. Así, en ballica perenne se observó que en condiciones de deficiencia de P se acumuló más del 70 % del Mn en la parte aérea y menos del 30% en la raíz de la planta, mientras que el aumento en los niveles de P generó una mejor distribución del Mn, disminuyendo la acumulación de Mn en la parte aérea en un 50 % (Tabla 11).

Sin embargo, aunque la adición de P disminuyó los efectos de la toxicidad por Mn, debido a la restricción en la absorción y acumulación de P en las plantas con severa toxicidad por Mn (355 μM de Mn), no fue posible mejorar el desarrollo de estas plantas en comparación con las plantas tratadas con 2,4 μM de Mn para ballica perenne y 5,3 μM de Mn para trébol blanco (Tablas 9 y 10).

En los tratamientos con 2,4 μM de Mn para ballica y 5,3 μM de Mn para trébol blanco, el aumento en los niveles de P causó un incremento en la concentración de Mn pero a niveles normales para estas especies (Tablas 11 y 12).

En los tratamientos en que no se aplicó Mn en interacción con el tratamiento 44 μM de P se observó una reducción del 65% en el peso seco de las plantas de ballica, mientras que para trébol blanco el tratamiento 123 μM de P en interacción con el tratamiento 0 Mn generaron una disminución de 37% en el peso seco de las plantas (Tablas 9 y 10). Así también, cuando no se aplicó Mn, un aumento en los niveles de P generó un aumento en el peso seco de plantas (Tablas 9 y 10), como era de esperar.

En general, la concentración de Fe fue mayor en los tratamientos con concentraciones adecuadas de P en comparación las plantas con deficiencia de P (Tablas 11 y 12).Tanto en ballica como en trébol blanco, hubo un leve incremento en la concentración de Fe cuando las plantas se encontraban en condiciones de toxicidad por Mn, excepto para las plantas de ballica perenne desarrolladas con 96 μM de P, que no presentaron diferencias significativas en la concentración de Fe. La concentración de Fe considerada deficiente es de 50 mg kg^{-1} tanto para ballica perenne como para trébol blanco y la concentración adecuada es de 100-200 mg kg^{-1} para ballica perenne y de 50-100 mg kg^{-1} para trébol blanco, mientras que concentraciones por sobre los 500 mg kg^{-1} para ballica y 200 mg kg^{-1} para trébol blanco son consideradas tóxicas de acuerdo a Jones et al. (1991).

Tabla 9. Efecto de la interacción de 2 niveles de P y 3 niveles de Mn sobre el peso seco de ballica perenne desarrollada en solución de nutrientes.

P (µM)	Mn (µM)	Parte aérea	Raíz
	0	30,2c	10,2c
44	**2,4**	32,1c	11,7c
	355	9,6e	2,3d
	0	72,1b	16,1b
96	**2,4**	87,3a	25,1a
	355	16,1d	4,2d

Promedios con letras diferentes, en la columna, denotan diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre tratamientos de acuerdo a la prueba de comparación múltiple de promedios de Tukey.

Tabla 10. Efecto de la interacción de 2 niveles de P y 3 niveles de Mn sobre el peso seco de trébol blanco desarrollada en solución de nutrientes.

P (µM)	Mn (µM)	Parte aérea	Raíz
	0	32,3d	12,5c
123	**5,3**	47,8b	19,0b
	355	16,3f	7,5d
	0	40,6c	13,5c
250	**5,3**	59,1a	27,4a
	355	21,0e	13,8c

Promedios con letras diferentes en la columna denotan diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre tratamientos de acuerdo a la prueba de comparación múltiple de promedios de Tukey.

Así, no se observó un disminución en la concentración de Fe, ni deficiencia de Fe en las plantas que presentaron toxicidad por Mn como ha sido informado previamente (Foy et al., 1978; Lee, 1972). Resultados similares han sido obtenidos por Moroni et al. (2003) en genotipos de raps. Además Horst (1983) indica que en genotipos de *Vigna unguiculata*, que expresaron respuesta diferenciada a altas concentraciones de Mn, no se observaron diferencias significativas en la absorción de Fe.

Tabla 11. Concentración de Mn, P y Fe (mg kg^{-1}) en la parte aérea y raíces de ballica desarrollada en solución de nutrientes con distintos niveles de P y Mn.

Tratamiento		**Parte aérea**			**Raíz**		
P (µM)	**Mn (µM)**	**P g kg^{-1}**	**Mn mg kg^{-1}**	**Fe mg kg^{-1}**	**P g kg^{-1}**	**Mn mg kg^{-1}**	**Fe mg kg^{-1}**
	0	2,2 e	31e	49c	2,6e	45f	415e
44	**2,4**	2,4 e	66d	50c	3,1d	79e	522d
	355	3,1 d	2733a	141a	3,1d	1109b	673b
	0	4,5 b	32e	97b	3,3c	156d	573c
96	**2,4**	4,3 c	172c	99b	3,9b	183c	428e
	355	4,9 a	2493b	95b	4,7a	2409a	1003a

Promedios con letras diferentes, en la columna, denotan diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre tratamientos de acuerdo a la prueba de comparación múltiple de promedios de Tukey.

Tabla 12. Concentración de Mn, P y Fe (mg kg^{-1}) en la parte aérea y raíces de trébol blanco desarrollada en solución de nutrientes con distintos niveles de P y Mn.

Tratamiento		**Parte aérea**			**Raíz**		
P (µM)	**Mn (µM)**	**P g kg^{-1}**	**Mn mg kg^{-1}**	**Fe mg kg^{-1}**	**P g kg^{-1}**	**Mn mg kg^{-1}**	**Fe mg kg^{-1}**
	0	2,6d	28e	125c	2,5e	122e	1342e
123	**5,3**	1,7f	106d	129c	2,8d	450d	1099f
	355	2,2e	1560b	132c	3,2c	4549b	2108d
	0	4,6b	50e	182a	6,5b	751c	3937b
250	**5,3**	4,4c	163c	160b	7,0a	419d	3444c
	355	4,9a	1904a	183a	6,9a	7539a	5516a

Promedios con letras diferentes, en la columna, denotan diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre tratamientos de acuerdo a la prueba de comparación múltiple de promedios de Tukey.

3.2.2. Efecto del P y Mn en la exudación de ácidos orgánicos.

La disminución en los niveles de P en las soluciones de nutrientes que generaron deficiencia de P en las plantas causaron un significativo aumento en la exudación de ácidos orgánicos por las raíces de ballica perenne y trébol blanco (Figuras 10 y 11). En ballica perenne hubo un aumento en la exudación de más del 80% para ácido oxálico, 89% para ácido málico, 27% para ácido cítrico, 33% para ácido succínico en comparación con las cantidades exudadas por las plantas con concentraciones adecuadas de P y Mn. Mientras que en trébol blanco cantidades exudadas incrementaron en 69 % para ácido oxálico, 200% para ácido málico, 1800 % para ácido cítrico y 330 % para ácido succínico.

Además, ambas especies de plantas exudaron las mayores cantidades de ácidos orgánicos en condiciones de deficiencia de P en interacción con toxicidad por Mn. Así, para trébol blanco la exudación aumentó en mas de 3 veces para ácido oxálico y en más de 150 veces para ácido cítrico, mientras que, para ballica perenne la exudación de ácido oxálico y málico fue 7 veces más alta que en plantas con niveles adecuados de P y Mn.

Estos resultados concuerdan con diferentes investigaciones que han demostrado que la exudación de ácidos orgánicos aumenta significativamente en condiciones de estrés por deficiencia de P en muchas especies de plantas (Dinkelaker et al., 1997; Hoffland et al., 1992; Johnson y Loeppert, 2006; Lipton et al., 1987; Neumann y Römheld, 1999; Zhang et al., 1998) y con los resultados obtenidos previamente en el ensayo en que se evaluaron 6 niveles de Mn en donde la toxicidad por Mn causó un significativo incremento en la exudación de ácidos orgánicos.

Entre los ácidos orgánicos evaluados, los ácidos cítrico y oxálico fueron exudados en mayor cantidad (Figuras 10 y 11), lo que podría estar relacionado con las funciones que estos aniones orgánicos cumplirían en la rizósfera, ya que diferentes estudios han que demostrado que los ácidos cítrico y oxálico son los más eficientes para solubilizar P del suelo (Bolan et al., 1994; Staunton y Leprince, 1996; Jones, 1998), debido a la mayor estabilidad de los complejos que forman con Al (Bolan et al. 1994; Lan et al. 1995) y su mayor afinidad por los adsorbentes del suelo en comparación con los otros aniones orgánicos (Jones y Brassington, 1998; Jara et al, 2006). La gran exudación de ácido cítrico en trébol blanco (Figura 11) en condiciones de deficiencia de P también podría estar contribuyendo a la compartimentalización del Mn. Como se observa en la Tabla 12, en las

plantas con deficiencia de P, la distribución del Mn entre la parte aérea (26 %) y la raíz (74 %) es similar a la distribución de las plantas con concentraciones adecuadas de P (20 % del Mn en la parte aérea y un 80 % en la raíz). Así, en las plantas con deficiencia de P, el Mn podría estar siendo complejado con el citrato en la raíz impidiendo su transporte hacia la parte aérea de la planta.

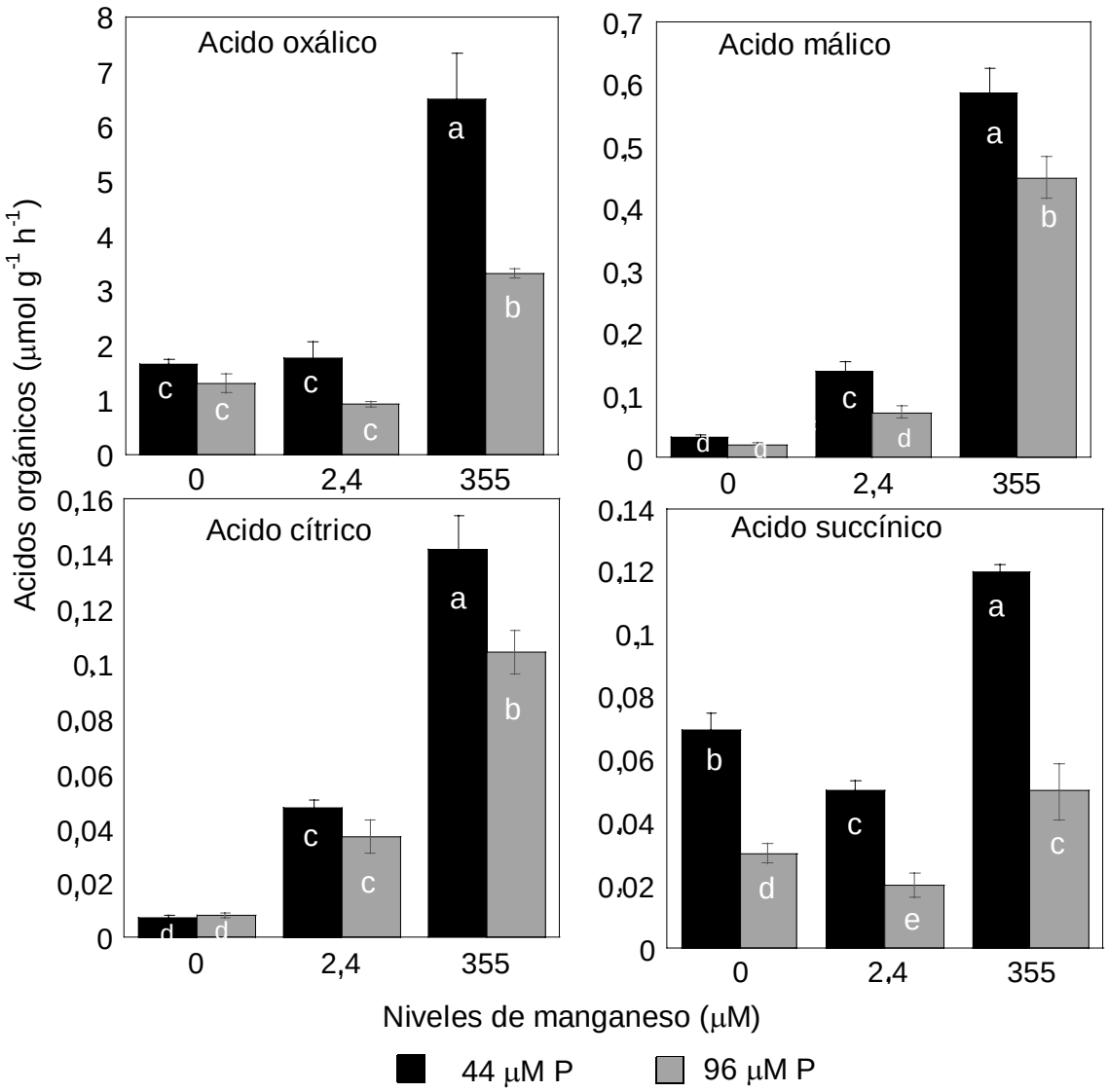

Figura 10. Efecto de la interacción de 2 niveles de P y 3 niveles de Mn sobre la exudación de ácidos orgánicos por raíces de ballica perenne en solución de nutrientes. Promedios con letras diferentes denotan diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre tratamientos, debido a la interacción Mn x pH, de acuerdo a la prueba de comparación múltiple de promedios de Tukey.

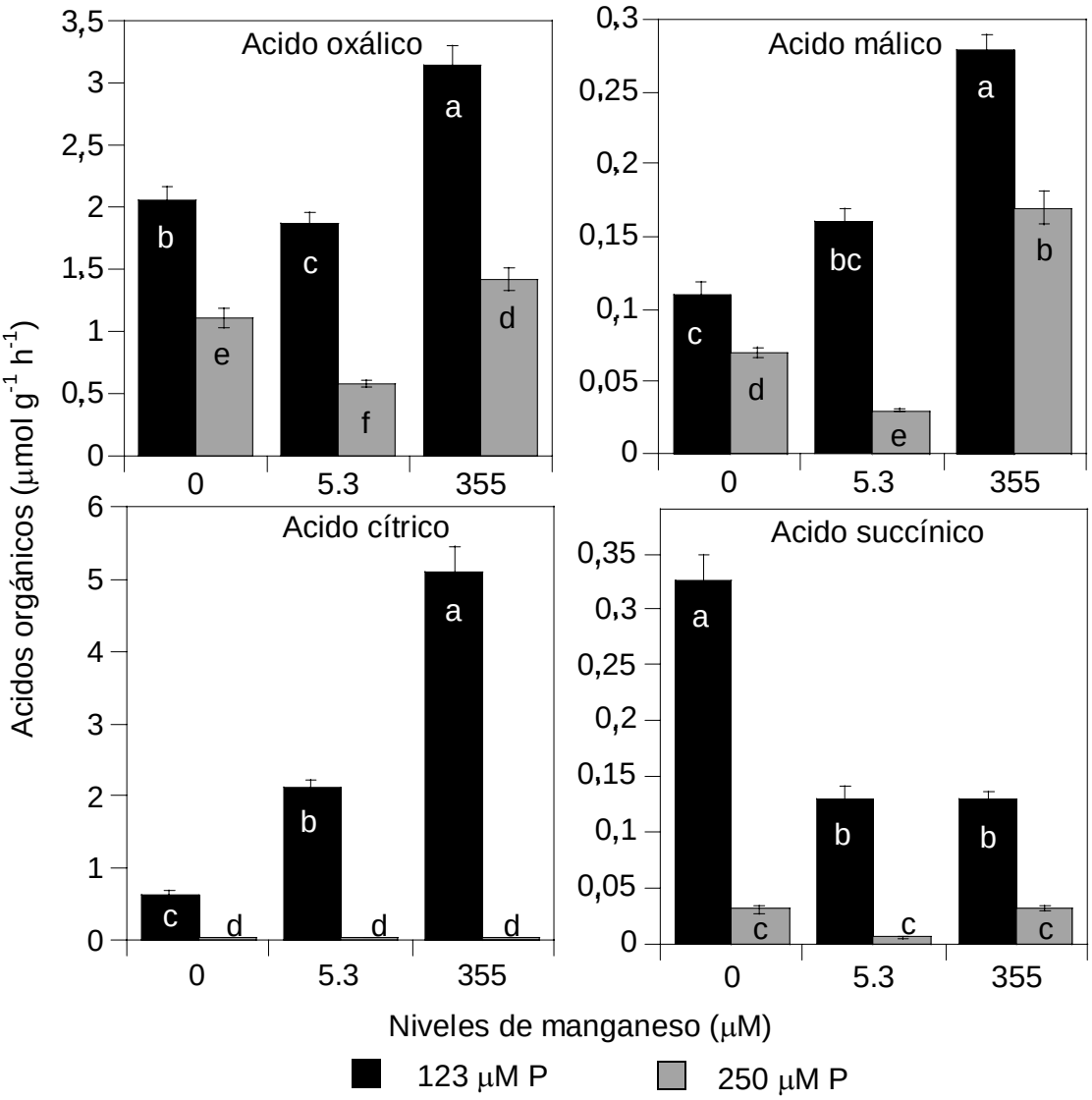

Figura 11. Efecto de la interacción de 2 niveles de P y 3 niveles de Mn sobre la exudación de ácidos orgánicos por raíces de trébol blanco en solución de nutrientes. Promedios con letras diferentes denotan diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre tratamientos, debido a la interacción Mn x pH, de acuerdo a la prueba de comparación múltiple de promedios de Tukey.

4. CONCLUSIONES

- Un incremento en los niveles de Mn en la soluciones de nutrientes causó un aumento en la concentración de Mn en las plantas, con concentraciones críticas de toxicidad de 421 mg kg^{-1} para ballica perenne y 283 mg kg^{-1} trébol blanco. Concentraciones de Mn superiores a éstas, causaron una significativa reducción del peso seco de las plantas debido a toxicidad por Mn, especialmente a pH 4,8.

- Ambas especies de plantas respondieron al estrés generado por la toxicidad por Mn con un aumento en la actividad peroxidasa y una tendencia al aumento en la exudación de ácidos orgánicos, principalmente de ácido oxálico. Además, las plantas exudaron las mayores cantidades de ácidos orgánicos a pH 4,8 y cuando se encontraban en condiciones de deficiencia de P, en comparación con las plantas desarrolladas a pH 6,0 y con concentraciones normales de P.

- La toxicidad por Mn en interacción con la deficiencia de P causó una significativa reducción del peso seco de las plantas de ballica perenne y de trébol blanco. La adición de P para alcanzar las concentraciones normales en las plantas, causó un incremento superior al 28 % en el peso seco de trébol blanco y ballica perenne, lo que indica que el P tuvo un efecto beneficioso atenuando los efectos de una severa toxicidad por Mn.

CAPITULO II

Efecto del Mn sobre la Activiadad y Parámetros Cinéticos de la Fosfatasa Acida Libre e Inmovilizada en Materia Orgánica y Arcilla

1. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

1.1. Introducción

Las fosfatasas ácidas son un grupo de enzimas que catalizan la mineralización de P orgánico a inorgánico, que es la forma disponible para las plantas. Gran parte del fósforo del suelo (30 a 70 %) se presenta bajo formas orgánicas (Anderson, 1980), así, en los Andisoles la fracción orgánica de P constituye sobre el 50% del total P, con contenido que fluctúan entre 1200 – 1600 mg kg^{-1} (Borie y Zunino, 1993). Además, los Andisoles se caracterizan por presentar alta retención de fosfato en la fracción arcilla lo que implica una baja disponibilidad de P para las plantas; además, debido a su pH ácido pueden presentar altos niveles de Al y Mn. En suelos ácidos el Mn puede alcanzar concentraciones suficientemente altas como para causar toxicidad en plantas a través de la alteración de sus actividades enzimáticas. Un exceso de metales pesados como el Mn afectan las propiedades de las enzimas a través de un intercambio de iones metálicos del sitio activo de las enzimas y a través de su unión a los grupos funcionales de estas proteínas (Elstner et al., 1988). Aunque la fosfatasa ácida tiene un rol muy importante, existe un limitado número de estudios con respecto al efecto que metales pesados, como el Mn, pueden tener sobre esta actividad enzimática. Además, esos estudios no entregan información concluyente respecto del efecto de determinados metales sobre la enzima y sus propiedades catalíticas ya que han sido realizados con diferentes metodologías y con fosfatasas de diversos orígenes.

En el suelo, las enzimas se encuentran principalmente inmovilizadas en los componentes orgánicos y minerales, formando complejos. La persistencia y estabilidad de las proteínas en el suelo, incluyendo las enzimas, es atribuído generalmente a estas asociaciones. Debido a la naturaleza compleja del suelo y a la asociación de las arcillas con el humus, resulta difícil estudiar en forma aislada los complejos que se forman naturalmente. Una estrategia comúnmente utilizada para entender la relación existente entre las actividades enzimáticas del suelo, los componentes del suelo y su respuesta a la aplicación de un determinado factor es el uso de modelos que simulen las condiciones que posiblemente ocurren en el suelo (Gianfreda et al., 2002). Es así como se han realizado algunos estudios en condiciones de laboratorio, inmovilizando preparaciones comerciales de enzimas en arcillas y en

precursores de ácidos húmicos, en los que se han estudiado algunas de estas interacciones (Rao et al., 1996; Huang y Shindo, 2000; Rao et al., 2000; Kelleher et al., 2004). Sin embargo, estos estudios no han considerado la amplia variación existente entre las propiedades de las preparaciones enzimáticas comerciales que dependen de su origen (plantas, microorganismos), los distintos niveles de pureza, presencia de otras proteínas y contenido de isoenzimas así como el tipo de formulación comercial (liofilizada o suspensión). Todos estos factores pueden hacer difícil la interpretación de los resultados obtenidos, llevando a conclusiones contrastantes o erróneas. Por lo tanto se hace necesario, realizar estudios preliminares en que se evalúen las propiedades de la enzima en estudio, así como también la metodología a emplear. Además, al construir los sistemas modelo es necesario considerar que las condiciones en el suelo varían constantemente; debido a esto los distintos componentes que forman parte de la inmovilización enzimática pueden presentarse en distinto orden, lo que podría alterar la actividad enzimática y sus propiedades catalíticas.

El estudio de los sistemas enzimáticos inmovilizados, que simulan a aquellos presentes en la naturaleza, puede contribuir a aclarar el complejo comportamiento que las enzimas inmovilizadas tienen en ambientes naturales como el suelo.

Para estudiar el efecto del Mn sobre la fosfatasa ácida en un suelo modelo se realizó un estudio con los objetivos específicos que se describen a continuación.

Objetivos específicos

Determinar el efecto del Mn sobre los parámetros cinéticos de fosfatasas ácidas de distinto origen.

Evaluar el proceso de inmovilización de una fosfatasa ácida en materia orgánica (ácido tánico) y arcilla, determinando el efecto del Mn en su actividad y parámetros cinéticos.

1.2 Características de la fosfatasa ácida y antecedentes del efecto del Mn sobre su activiad.

Las fosfatasas pertenecen a un grupo de enzimas denominado fosfomonoesterasas, dentro de las cuáles existen tres categorías, fosfatasas ácida, neutra y alcalina, predominando ennn suelos ácidos las fosfatasas ácidas (Alef et al., 1995). El rango de pH óptimo de fosfatasa ácida se encuentra entre 4,0 y 6,5 (Skujins, 1978) y de acuerdo a investigaciones realizadas por Tso y Chen (1997) la fosfatasa ácida extraída desde plantas de arroz tiene un punto isoléctrico de 5,5 mientras que Sugiura et al. (1981) y Durmus et al. (1999) demostraron que las fosfatasas de papa tienen un punto isoléctrico cercano a 5, 2. Cuando el pH del medio es inferior al punto isoléctrico, estas enzimas presentan carga neta positiva. En la Figura 1 se observa el potencial electrostático de una fosfatasa ácida que muestra extensas áreas cargada positivamente. Resultados similares han sido obtenidos por Peters et al. (2000) al determinar que el campo electrostático del sitio activo y de la superficie de una fosfatasa ácida era predominantemente positivo, lo cual favorecía la difusión del sustrato (cargado negativamente) hacia el sitio activo de la enzima.

Esta enzima puede presentar un sitio activo que contiene Fe y Mn (Figura 2), lo que ha sido confirmado a través del estudio de estructura de la fosfatasa ácida de papa dulce (Schenk et al., 2005; Sugiura et al, 1981). Estos investigadores indican que se ha especulado que esta enzima utiliza el ion Mn (III) para inducir una unión efectiva con el fosfato y para la estabilidad estructural de la enzima en ambientes ácidos. Investigaciones realizadas por Sträter et al., (1995) respecto a estructura tridimensional de esta enzima, demostraron que son metaloenzimas con un sitio activo dinuclear con peso molecular de aproximadamente 110 kDa con dimensiones de 40 Å por 60 Å por 75 Å. El Fe del sitio activo es coordinado por los aminoácidos tirosina, histidina y asparagina (Sträter et al. 1995).

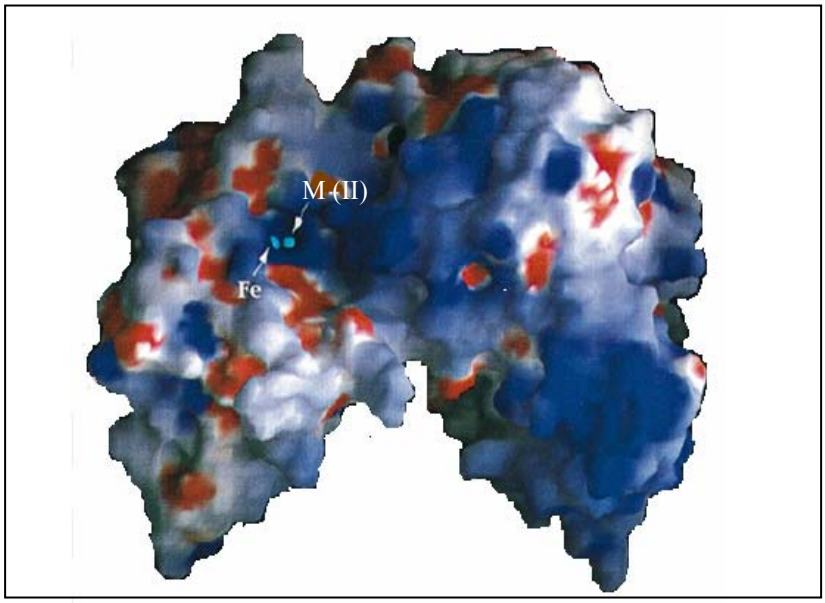

Figura 1. Representación de la superficie molecular de una fosfatasa ácida de *Phaselus vulgaris*, mostrando la superficie electrostática potencial y la posición de los metales de sitio activo. Las áreas de color rojo indican un potencial negativo y las áreas azules indican potencial positivo, M(II) indica el segundo metal (Fe o Mn) del suitio activo de las fosfatasas. **Adoptado de**: Klabunde et al. (1996).

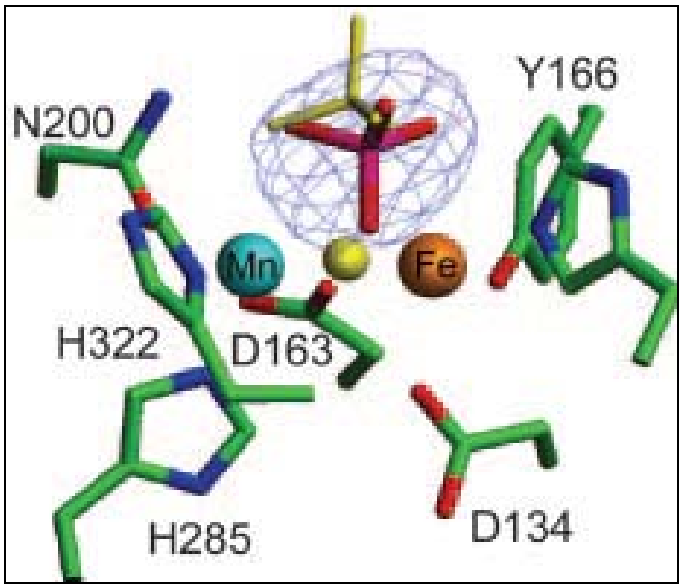

Figura 2. Diagrama del centro metálico dinuclear de fosfatasa ácida de papa dulce. **Adoptado de**: Schenk et al., 2005.

1.2.1 *Antecedentes respecto del efecto del Mn sobre la actividad fosfatasa ácida.*

Respecto del efecto del Mn sobre la fosfatasa ácida libre se ha informado que la actividad de esta enzima es inhibida por este metal (Sugiura et al., 1981; Bozzo et al., 2002) mientras que otras investigaciones indican que es activada por Mn (Bozzo et al., 2002; Tso y Chen, 1997).

No hay estudios que entreguen información concluyente respecto del efecto del Mn sobre la fosfatasa en suelos ácidos, donde las concentraciones de Mn pueden llegar a ser tóxicas incluso para las plantas. Estudiando el efecto de metales pesados producto de la aplicación de lodos estabilizados sobre las actividades enzimáticas del suelo, Kandeler et al. (2000) observaron una disminución significativa de la actividad enzimática cercana al nivel crítico, incluso utilizando niveles de metales similares a los límites recomendados por la Unión Europea. En otros estudios, en que se evaluaron aplicaciones de Cu, a bajas concentraciones, sobre las actividades proteasa, lipasa y fosfatasa en un suelo con alto nivel de materia orgánica, se observó que en todos los casos las actividades enzimáticas fueron reducidas en presencia de Cu (Mathur et al., 1980).

1.2.2. Efecto de iones de la serie Hofmeister sobre las enzimas.

La serie de Hofmeister, origina de la clasificación jerárquica de varios iones de acuerdo a su habilidad de precipitar proteínas.Esta precipitación de la proteína puede explicarse por la magnitud con que los iones se unen al agua. Adicionando estos iones a una solución con la proteína, disminuye la tensión superfical del agua y aumenta la concentración de la proteína, la cual al quedar “libre” agua precipita (salting-out). Si se agrega agua, disminuye concentración, entonces la proteína se redisuelve.

La serie de Hofmeister también indica la habilidad de los iones de estabilizar la estructura de proteínas. Lo iones que tienen el menor efecto sobre la actividad del agua (tienen interacciones débiles con el agua) son conocidos como caotrópicos, mientras que iones que tienen el efecto opuesto se conocen como cosmotrópicos (tienen interacciones fuertes con las moléculas de agua). Los iones fuertemente hidratados son más estabilizantes, mientras que los iones débilmente hidratados son desestabilizantes de la estructura nativa de las proteínas.

El siguiente esquema muestra el ordenamiento de los iones en la llamada serie de Hofmeister y su relación con la conservación de estructura de las proteínas.

Más estabilizante	**Mas desestabilizante**
Aniones fuertemente hidratados	Aniones débilmente hidratados
Citrato >(SO4) $^{2-}$**> HPO4**$^{-2}$ **>F**$^{-}$ **>Cl**$^{-}$**> Br** $^{-}$ **> I**$^{-}$ **>NO**$_3$ $^{-}$**> ClO**$_4$ $^{-}$**> SCN**$^{-}$	
N(CH$_3$**)**$_4$$^{+}$ **>NH**$_4$$^{+}$**> Cs**$^{+}$ **>Rb**$^{+}$ **>K**$^{+}$**> Na**$^{+}$ **> H**$^{+}$ **>Ca**$^{+2}$**> Mg**$^{+2}$**> Al**$^{+3}$	
Cationes débilmente hidratados	Cationes fuertemente hidratados

Así por ejemplo, el sulfato de amonio es una sal cosmotrópica, y como es discutido por Collins (1997), debido aque las sales cosmotrópicas tienen una fuerte interacción con el agua, incrementando su tensión superficial, a altas concentraciones estabilizan la conformación nativa de las enzimas protegiéndolas de la denaturación.También Gianfreda y Scarfi (1991) indican que este tipo de sales pueden estabilizar proteínas en solución frente a una variedad de perturbaciones tales como el desdoblamiento inducido por la temperatura y la disociación inducida por el pH.

1.3 Características de la arcilla.

Los Andisoles se caracterizan por presentar una fracción arcilla en que el constituyente mayoritario es alofán. El alofán forma parte de un grupo de arcillas minerales con un ordenamiento de rango corto en su estructura, con predominio de enlaces Si-O-Al (Wada, 1985; Parfitt, 1990). Este mineral es un aluminosilicato de bajo grado de cristalinidad, amorfo a rayos X; estos aluminosilicatos son importantes en muchas reacciones del suelo debido a su gran área superficial y alta reactividad química.

La morfología del alofán consiste en esferas huecas de de 3, 5 a 5,0 nm (35 a 50 Å) agrupadas entre sí (Figura 4) para formar agregados regulares (Wada, 1985). Se ha calculado que el área superficial del alofán es alrededor de 1000 m^2g^{-1}, mientras que con el método del ester monoetílico de etilen glicol (EGME) se han determinado valores que fluctúan entre 700-900 m^2g^{-1} (Wada, 1989). Debido a su tamaño, actualmente, el alófan es

considerado como un nanomaterial natural de origen pedológico y geológico (Shenhar et al., 2005; Yuang, 2004).

1.4 Características de la actividad enzimática del suelo.

Las enzimas del suelo son activamente secretadas por microorganismos y raíces de plantas o liberados, después de la muerte de parte de la biota del suelo, por lisis celular. Las enzimas en el suelo se encuentran principalmente inmovilizadas (Figura 3) debido a que este proceso ocurre rápidamente, así, cerca de un 90% de la enzima está inmovilizada después de 2 a 3 minutos.

La formación de complejos entre las enzimas y partículas minerales y orgánicas puede restringir su movilidad y afectar su actividad (Nannipieri et al., 1996; Gianfreda y Bollag, 1996; Gianfreda et al., 2002). Las enzimas pueden ser adsorbidas, inmovilizadas o atrapadas en estas matrices dando lugar a las llamadas "enzimas inmovilizadas naturalmente" (Gianfreda y Bollag, 1996). También se puede producir inactivación o degradación de las moléculas enzimáticas. Como consecuencia de lo anterior, se pueden producir cambios en su cinética y estabilidad (Gianfreda y Bollag, 1996). Gianfreda y Rao (2004) indican que la inmovilización de las enzimas sobre los componentes del suelo afecta su respuesta frente a la presencia de sustancias extrañas a los sustratos de reacción. Los autores consideran que estos resultados se deben a: i) el "estado" de la enzima, es decir, si está libre o inmovilizada sobre los componentes del suelo, ii) la naturaleza de la interacción entre la enzima y el soporte, iii) los cambios conformacionales que alcanza la enzima después de la inmovilización, iv) la influencia del microambiente creado por el soporte alrededor de la proteína.

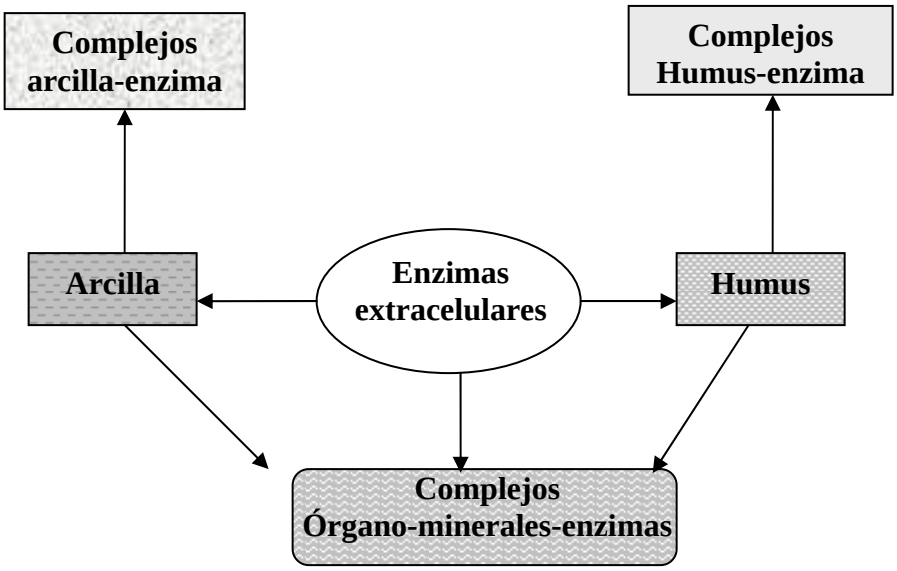

Figura 3. Enzimas unidas a los componentes del suelo.

1.5 Inmovilización de enzimas.

La inmovilización se define como el proceso por el cual el movimiento de las enzimas en el espacio se ve restringido total o parcialmente, dando lugar a una forma de enzima que generalmente es insoluble en agua (Kennedy y White, 1991).

Los métodos de inmovilización utilizados en bioquímica aplicada incluyen: unión química o retención física (Gianfreda y Scarfì, 1991).

La retención física consiste en la inmovilización de la enzima a través de atrapamiento en fibras, o inclusión por microencapsulación en membranas o en el interior de un retículo polimérico. El atrapamiento consiste en la retención física de la enzima en las cavidades interiores de una matriz sólida porosa que puede ser gel o fibra donde la enzima no sufre ninguna alteración en su estructura.

Los métodos de inmovilización por unión química pueden lograrse por: i) la unión de la enzima a soportes, ii) entrecruzamiento (cross-linking). La unión de la enzima a soportes se realiza a través de adsorción (por interacciones iónicas, fuerzas de Van der Waals o puentes de hidrógeno) o por unión covalente. El método del entrecruzamiento consiste el uso de reactivos bifuncionales que originan uniones intermoleculares entre las moléculas de enzima.

La catálisis de enzimas inmovilizadas es generalmente diferente a las enzimas libres. La tasa de transformación de la enzima inmovilizada es influenciada por la difusión de reactantes, entre éstos, disponibilidad del sustrato. De acuerdoa Ladd y Butler (1975), el proceso enzimático global involucra 5 pasos distintos:

1) Difusión del sustrato desde el volumen de la solución hacia la enzima inmovilizada al otro lado de una capa del límite de agua.

2) Difusión del sustrato al interior de la enzima inmovilizada en la partícula (transporte del sustrato desde la superficie del soporte al sitio activo)

3) Conversión enzimática del sustrato a producto

4) Transporte del producto a la superficie externa de la partícula inmovilizada

5) Difusión del producto hacia el volumen de la solución.

Los principales cambios que presentan las enzimas inmovilizadas son: 1) incremento en la estabilidad física, química y biológica hacia los agentes desnaturalizantes debido a la prevención o minimización a los cambios conformacionales, y 2) alteración del comportamiento catalítico (Gianfreda y Bollag, 2002). Uno de los efectos involucrados en la alteración del comportamiento catalítico debido a la inmovilización enzimática es la reducción de la actividad, lo cual puede ser debido a un posible cambio conformacional que se presenta dentro de la estructura terciaria de la proteína después de la inmovilización. El modo de enlace puede involucrar grupos que son parte del sitio activo o puede alterar los enlaces entre varias subunidades de la enzima (Martinek y Mozhaev, 1985). Además, el sitio activo puede quedar parcial o totalmente inaccesible al sustrato debido a restricción el movimiento del sustrato hacia el sitio activo y a limitaciones en la penetración del sustrato dentro del sitio activo de la enzima, lo cual es afectado por la orientación de la enzima en relación a la superficie del soporte.

La mayoría de los estudios sobre inmovilizacón enzimática como sistema modelo de suelo se han realizado con silicatos cristalinos y materia orgánica, a pesar de que en el suelo, estas superficies minerales se encuentran parcial o completamente cubiertas con especies poliméricas no cristalinas de óxidos de Fe y Al. Además los mecanismos por los cuales las

enzimas se unen a estos minerales aún no están bien determinados (Gianfreda y Bollag, 2002).

En el caso de minerales no cristalinos, como el alofán que es particularmente importante en los Andisoles del sur de Chile, no existen claras evidencias en literatura en cuanto al comportamiento de enzimas inmovilizadas y los factores que afectan su actividad catalítica.

1.6 Inmovilización de enzimas extracelulares sobre arcillas.

Las arcillas, por su capacidad adsortiva, ejercen una gran influencia en los procesos biológicos y antropogénicos (Kelleher et al., 2004). Los coloides inorgánicos que juegan un rol importante en la interacción de las enzimas en el suelo son los minerales de arcillas (esmectita, ilita, caolinita y alofán) y los polihidróxidos de Fe y Al. Las interacciones enzima-arcilla son procesos muy complejos y de acuerdo a las investigaciones hasta ahora realizadas, las enzimas se encuentran inmovilizadas en el suelo a través de adsorción. Se ha demostrado que minerales de la arcilla como montmorillonita, ilita y caolinita adsorben enzimas en el suelo (Burns, 1986; Boyd y Mortland, 1990; Violante y Gianfreda, 2000). La adsorción de las proteínas depende de factores tales como las características de los minerales de arcilla, características de las proteínas, pH y fuerza iónica del medio. las características más importantes de los minerales de arcilla son el área superficial, la capacidad de intercambio catiónico, la hidratación y el punto isoeléctrico. También las características de la enzima tales como la solubilidad, el peso molecular, el punto isoeléctrico y los grupos funcionales ionizables y polares (C=O; O – H; NH_2; COOH) tienen gran influencia en la inmovilización (Boyd y Mortland, 1990; Burns, 1986; Theng, 1979; Violante et al., 1995).

Las moléculas de las enzimas pueden ser adsorbidas sobre las superficies minerales a través de interacciones electrostáticas (Quiquampoix, 2002), interacciones hidrofóbicas (Boyd y Mortland, 1990; Staunton y Quiquampoix, 1994) intercambio de ligandos (Naidja et al., 1997), uniones por puentes de hidrogeno (Boyd y Mortland, 1990; Nannipieri et al., 1996) y fuerzas de van der Waals (Nannipieri et al., 1996). Minerales de arcillas como la montmorillonita adsorben las enzimas principalmente debido asus cargas positivas

(Aomine y Kobayashi, 1964). Mientras que las enzimas, pueden ser adsorbidas sobre la superficie de los minerales de arcilla por medio de sus grupos funcionales polares (OH y C=O) e ionizables (NH_2 y COOH).

Cuando la molécula de proteína es adsorbida sobre la superficie del mineral arcilloso puede presentar alteraciones más o menos marcadas de su conformación (Quiquampoix, 2002), y se supone que la consecuencia más evidente es la pérdida total o parcial de su actividad enzimática (Burns, 1986). Además de un cambio en la actividad, la unión de enzimas a la superficie de los minerales de la arcilla puede afectar significativamente otras características de la enzima, tales como los parámetros cinéticos (Km y Vmax), el pH óptimo y la estabilidad. Al respecto, se ha observado una disminución de la velocidad máxima (Vmax) y una disminución de la afinidad por el sustrato (incremento en Km), como consecuencia de la adsorción de la enzima en la arcilla. La inmovilización de una α-amilasa y una proteasa en alofán y montmorillonita ambas presentaron una disminución de su actividad en comparación con la enzima libre (Kobayashi y Aomine, 1967). Probablemente estos resultados dependen de la modificación de la carga neta de la enzima después de unirse al mineral de arcilla, del cambio conformacional de la estructura de la enzima y de la difusión del sustrato cuando se aproxima al complejo arcilla-enzima (Theng, 1979). Quiquampoix et al., (1993) evaluaron el efecto del pH sobre la adsorción de enzimas en minerales de arcilla como montmorillonita, caolinita, goetita. En estos estudios se observó una reducción en la actividad catalítica de las enzimas y se planteó que las interacciones entre la enzima y la superficie de los minerales de arcilla eran interacciones electrostáticas e hidrofóbicas; además, se postuló un cambio conformacional en la proteína adsorbida. Este estudio también demostró que:

1) Bajo el punto isoeléctrico, la proteína se desdobla sobre la superficie del mineral de arcilla en respuesta a la interacción atractiva electrostática, un fenómeno que inhibe la actividad enzimática.

2) Cerca del punto isoeléctrico las proteínas son adsorbidas con pequeñas modificaciones conformacionales por lo que la enzima conserva sus propiedades catalíticas.

3) Por sobre el punto isoeléctrico la adsorción disminuye debido a la repulsión electrostática, permitiendo la difusión de las enzimas en la fase líquida del suelo.

Como se ha informado, las enzimas inmovilizadas, pueden seguir la cinética de Michaelis-Menten, y presentan un comportamiento diferente a la enzima libre. Sin embargo, no siempre las enzimas adsorbidas sobre los minerales de las arcillas presentan una menor actividad y una menor afinidad. De hecho, Gianfreda et al., (1992) demostraron que la ureasa adsorbida sobre montmorillonita presentaba una disminución del 30% de su actividad enzimática, pero tenía mayor afinidad por el sustrato, lo que los autores atribuyeron a una ligera modificación estérica de la enzima adsorbida.

Actualmente en bioquímica aplicada se busca inmovilizar las enzimas por retención física, lo cual se realiza en nanomateriales, entre los cuales están aquellos llamados sol-gel, que tienen características similares a los agregados de alofán (Figura 4), con área superficial cercana a 1000 m^2g^{-1} y tamaño de microporo de entre 2 y 12 nm.

a) **b)**

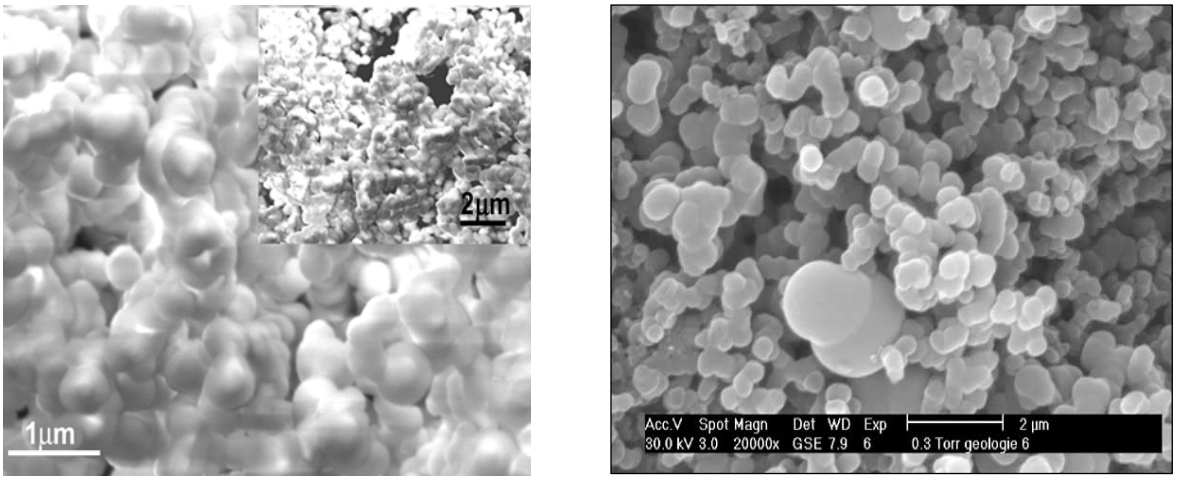

Figura 4. a) Microscopía electrónica de nanoesferas de sílice conteniendo a una enzima inmovilizada. **Adoptado de:** Luckarift et al., 2004. b) Imágen del alofán obtenido por micrografía electrónica. **Adoptado de:** Goemaere., 2004.

Los resultados obtenidos en este tipo de soportes muestran que la enzima tiene una actividad y eficiencia superior a la enzima libre y además tiene muy buena estabilidad (Gill y Ballesteros 1998; Gill, 2001; Mozzarelli y Bettati, 2001; Jin y Brennan, 2002; Bettati et al, 2004; Pioselli et al., 2004)

Luckarift et al., 2004, indicaron que sustancias tales como enzimas y proteínas pueden "atraparse" físicamente en nanomateriales, entre los que se incluye el alofán (Ohashi et al, 2002), en lugar de inmovilizarse sobre la matriz a través de uniones covalentes. Este tipo de inmovilización es denominada "bioencapsulación"(Glad et al, 1985; Podbielska y Ulatowska-Jar˙Za, 2005). Gottfried et al. (1999) indicaron que las proteínas no están unidas covalentemente a la matriz, pero que estos namateriales impiden significativamente la libertad de rotación de la proteína. Mientras que las moléculas de soluto pueden difundir por los poros interconectados de la matriz de sílice, las grandes moléculas de proteína quedan confinadas entre las nanoesferas. Glad et al. (1985) y Podbielska y Ulatowska-Jar˙Za (2005) también indican que en comparación con los métodos tradicionales de inmovilización, en que las proteinas se unen por enlace covalente a la matriz, la bioencapsulación permitiría una adecuada difusión del sustrato hacia la enzima inmovilizada. Eggers y Valentine (2001) investigaron el efecto de la encapsulación, en un nanomaterial de sílice, sobre la estructura y estabilidad de varias proteínas y encontraron que este sistema de inmovilización no alteró la estructura nativa de las proteínas. Estos autores sugieren que las propiedades del agua confinadas en los microporos de la matriz tiene gran importancia en la conservación de la conformación y estructura de la proteína.

1.7 Inmovilización de las enzimas sobre materia orgánica.

Se ha observado desde hace mucho tiempo que las enzimas extracelulares estables que se encuentran en el suelo están normalmente enlazadas a los ácidos húmicos en forma covalente (Busto y Perez-Mateos, 1995; Nannipieri et al., 1985). Así como en el caso de las enzimas adsorbidas en minerales de arcillas, los parámetros cinéticos de las enzimas son alterados debido a la oclusión del sitio activo de la enzima por las moléculas de ácidos húmicos o por alteraciones conformacionales en la estructura de la enzima inducido por el enlace covalente entre las dos macromoléculas (Tate, 2002).

Se han propuesto algunos mecanismos para la formación de los complejos humus- enzimas entre los que se incluyen entrampamiento físico en humus o partículas arcilla-humus, uniones puente hidrógeno, enlace iónico y enlace covalente de las enzimas a las sustancias húmicas del suelo. Boyd y Mortland (1990) presentaron la hipótesis de que las enzimas pueden unirse a la materia orgánica mediante interacciones no polares. Además, los

residuos hidrofóbicos de las enzimas pueden interactuar con regiones similares presentes en la materia orgánica.

En los últimos años los investigadores se han interesado por el estudio del posible rol de los coloides orgánicos en la estabilización de las enzimas del suelo debido a que la enzima inmovilizada en este tipo de soportes puede presentar una mayor estabilidad frente a la desnaturalización térmica y proteolítica (Burns, 1986). Es así que se han preparado una serie de compuestos modelos que simulan las posibles asociaciones que existen en el suelo (Sarkar y Burns, 1984; Nannipieri et al., 1996; Grego et al., 1990). Se han sugerido dos distintos tipos de preparaciones para los complejos enzima-ácidos húmicos: adsorción de enzimas en ácidos húmicos extractados del suelo y entrampamiento dentro de ácidos húmicos sintéticos derivados de acoplamiento oxidativo de fenoles y quinonas. Otros estudios previos han demostrado que es posible producir complejos enzimáticos activos entre la fosfatasa ácida y un precursor de ácidos húmicos como es el ácido tánico (Rao et al., 1996). El ácido tánico representa a los taninos, que son precursores de las sustancias húmicas. El ácido tánico presenta una afinidad particular por las sustancias proteicas; de hecho, puede interactuar directamente con la molécula proteica o englobarla después de un proceso de polimerización, favoreciendo la formación de complejos proteicos solubles e insolubles. Se ha establecido que las interacciones entre los taninos y la molécula de proteína son principalmente uniones por puente de hidrógeno.

2. MATERIALES Y METODOS

Para estudiar el efecto del Mn sobre la fosfatasa ácida en el suelo se debe inmovilizar la enzima en materia orgánica y arcilla, conformando así los modelos que simulen las condiciones que posiblemente ocurren en el suelo. Sin embargo, fue necesario realizar estudios preliminares en que se evaluaron dos metodologías para determinar la actividad fosfatasa ácida y se determinaron las propiedades de dos fosfatasas ácidas de origen comercial en presencia de Mn.

2.1. Metodologías para determinar actividad fosfatasa ácida y determinación de actividad y parámetros cinéticos de dos fosfatasas de origen comercial en presencia de Mn.

En estos estudios preliminares se utilizaron dos preparaciones comerciales de fosfatasa ácida (E.C 3.1.3.2) de papa (*Solanun tuberosum*) (0,8 unidades/mg de polvo liofilizado, Sigma P-3752) y de papa dulce (*Ipomoea batatas*) (57 mg de proteína mL^{-1}, suspensión en $(NH_4)SO_4$ 1,8 M + $MgCl_2$ 10 mM pH 5,3) que fueron adquiridas de Sigma Aldrich. Para evaluar el efecto del Mn sobre la actividad fosfatasa se usó $MnCl_2{\cdot}4H_2O$. Todas las soluciones fueron preparadas con agua grado HPLC.

2.1.1 Evaluación de métodos para determinación de la actividad enzimática.

La actividad de ambas enzimas fue ensayada mediante dos metodologías usualmente descritas en la literatura. El método de Uehara et al. (1974) recomendado por las compañías químicas como un test de control de actividad de la fosfatasa ácida. La metodología de Neil y Horner (1964), con algunas modificaciones, es usada frecuentemente para la determinación de la actividad fosfatasa ácida y utiliza como buffer acetato de Na (Sugiura et al., 1981; Rao et al., 1996; Huang y Shindo, 2000; Rao et al., 2000; Kelleher et al., 2004).

a) Método de Uehara et al. (1974): Las enzimas fueron mezcladas con 0,5 mL de buffer citrato-Na (90 mM; pH 4,8) y 0,5 mL de ρ-nitrofenilfosfato (ρNPP) 15,2 mM. Después de la incubación por 10 minutos a 37 ºC, se adicionaron 4 mL de NaOH 0,1 M y se determinó la concentración de ρ-nitrofenol (ρNP) por espectrofotometría a 405 nm.

b) Método de Neil y Horner (1964): La actividad de las enzimas liofilizada y en suspensión fue ensayada con 1 mL de ρ-nitrofenol (pNP) 6 mM en buffer acetato de Na pH 5,0, incubando a 30 °C por 20 min. Después de la incubación se adicionó NaOH 1 M y la concentración de ρ-nitrofenol (ρNP) fue determinada como se indicó anteriormente. También se realizaron experimentos variando la temperatura y el tiempo de incubación de la mezcla enzima-sustrato a 37 °C por 10 min.

Los ensayos para ambos métodos, fueron realizados con dos cantidades de enzima correspondientes a 0,011 y 0,025 unidades mL^{-1} en el volumen de reacción. Ambas enzimas fueron ensayadas con concentraciones saturantes de *p*NPP. Como fue definido por el proveedor, una unidad es la cantidad de enzima que puede hidrolizar 1,0 µmol de *p*-nitrofenilfosfato por minuto a pH 4,8 y 37 °C. Como control se utilizaron mezclas de reacción sin enzima.

2.1.2 Determinación de la proteína.

La concentración de la proteína fue determinada por el método de Bradford (1976) utilizando un reactivo preparado (Bio-Rad) y albúmina de bovino como estándar.

2.1.3 Test de cinética

La cinética de ambas preparaciones de fosfatasa se realizó mediante la determinación de la actividad con el método de Neil y Horner (1964), variando las concentraciones de *p*NPP en un rango de 0 a 6 mM. La Vmax y el valor de Km se calcularon a partir de la ecuación de Michaelis–Menten ajustada a una ecuación no linear de cuadrados mínimos con un programa computacional.

2.1.4 Estudios de inhibición

El efecto del Mn sobre la actividad y cinética de la fosfatasa ácida se determinó de acuerdo al método de Neil y Horner (1964), en presencia de 0,58 y 1,17 mM de Mn.

2.1.5 Electroforesis

Las proteínas se separaron en un gel desnaturalizante de poliacrilamida – dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) usando el sistema discontinuo propuesto por Laemmli (1970). El gel de separación contenía Tris-HCl 1,5 M (pH 8,8), SDS al 0,1% y acrilamida al 12%. El gel concentrador contenía Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8), SDS al 0,01% y acrilamida al 4%. Los geles se polimerizaron con tetrametiletilendiamino (TEMED) al 0,06 % y persulfato de amonio (PSA) al 0,03%. Antes de la corrida electroforética, las muestras y un estándar de peso molecular fueron preincubadas por 3 min a 100 ºC con el buffer de carga que contenía Tris-HCl 90 mM, ditiotreitol (DTT) 600 mM, SDS al 10%, azul de bromofenol al

0,012% y glicerol al 10%. El buffer de corrida contenía Tris-HCl 0,125 M, glicina 0,959 M y SDS al 0,5%. La corrida electroforética se realizó a 155 volts durante 1 hora y 15 minutos.

Una vez finalizada la corrida electroforética, las proteínas se fijaron al gel con una solución de metanol: agua: ácido acético (5:13:2 en volumen) durante 30 min, luego se realizó la tinción durante 90 min con una solución que contenía Azul de Coomassie R-250 al 0,2%, metanol al 30%, ácido acético al 6% y agua al 60%. A continuación, los geles fueron lavados con agua destilada y se trataron con la solución de desteñido (metanol, ácido acético glacial, agua 6:1:14 en volumen) hasta obtener un contraste nítido y se procedió a fotografiar y a analizar el fraccionamiento electroforético con el programa Kodak Digital Science DC 120.

Para la estimación de la masa molecular de las proteínas se compararon las bandas un marcador de masa molecular que tenía las siguientes proteínas estándar: β-galactosidasa (116 kDa), albumina de bovino (66 kDa), ovalbúmina (45 kDa), lactato dehidrogenasa (35 kDa), endonucleasa de restricción (25 kDa), β-lactoglobulina (18 kDa) y lisozima (14,4 kDa).

También se realizó una electroforesis nativa en que se sometió a las proteínas a migración sin desnaturalización en un gel no desnaturalizante de poliacrilamida (PAGE) a 4ºC usando el sistema discontinuo de Davies (1964). El gel de separación fue hecho con poliacrilamida al 8 % y buffer Tris/HCl 1,5 M (pH 8,8) y el gel concentrador contenía acrilamida al 2,5% con buffer Tris 0,5 M (pH 6,8). Estos geles se polimerizaron con TEMED al 0,06 % y PSA al 0,03%. Antes de cargar las muestras, los geles se precorrieron a 150 V por 30 min con buffer Tris/HCl 250 mM (pH 8,8). Luego se cargaron las muestras más el buffer de carga que contenía Tris-HCl 90 mM, DTT 6 M, azul de bromofenol al 0,012% y glicerol al 30%.

La corrida electroforética se realizó a 120 V por 2 horas con buffer Tris 25 mM/Glicina 190 mM como buffer de corrida, manteniendo la temperatura a 4 ºC durante toda la electroforesis. Posteriormente uno de geles fue tratado para detectar actividad fosfatasa ácida y otro fue teñido con azul de Coomassie para detectar las bandas de proteína de la enzima. Para detectar la actividad fosfatasa ácida se procedió de acuerdo al método descrito por Gellatly et al. (1994), el gel fue equilibrado por 15 min a 24ºC en buffer acetato de Na

100 mM (pH 5,0) que contenía $CaCl_2$ 20 mM. Luego este gel se incubó durante 15 min a temperatura ambiente en el mismo buffer pero conteniendo además 0,02 % (p/v) de sal Fast Garnet como colorante y, como sustrato de la reacción enzimática, α-naftil fosfato 0,02 % (p/v).

2.1.6 Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza considerando el origen de la fosfatasa ácida (de papa y papa dulce) como factor y las comparaciones entre promedios se realizaron por medio de la prueba de comparación múltiple de promedios de Tukey a un nivel de significancia del 5%.

2.2 Inmovilización de fosfatasa ácida en ácido tánico y arcilla.

De acuerdo a los resultados obtenidos con ambas fosfatasas, se seleccionó la fosfatasa ácida de papa dulce (F) para los estudios de inmovilización de la enzima en componentes orgánicos e inorgánicos del suelo. Para conformar el sistema modelo de suelo se realizaron procesos de inmovilización de la enzima en arcilla y materia orgánica en presencia de concentraciones de Mn que están dentro del rango de Mn disponible en Andisoles. La arcilla (A) fue extraída de un Andisol de la Serie Pemehue que presenta un PCZ (punto de carga cero) de 8,4 regulada por los óxidos de Fe y Al; además, está compuesta por aluminosilicatos amorfos a los rayos X. Esta arcilla fue saturada con KCl y lavada hasta la eliminación de cloruros.

Como materia orgánica se usó ácido tánico (T) adquirido de Fluka A.G. y que tiene un peso molecular de 1701,23 g mol^{-1}, este es un compuesto orgánico muy similar a los precursores de ácidos húmicos.

2.2.1. Inmovilización de la fosfatasa ácida en ácido tánico

La inmovilización de la fosfatasa en ácido tánico se llevó a cabo de acuerdo al proceso mostrado en la Figura5. La formación de complejos se inició mezclando, al mismo tiempo, fosfatasa ácida (0,56 U correspondientes a 0,04 mg de proteína mL^{-1}) con ácido tánico (0,8 mg mL^{-1}) (complejo T-F) en una relación T/F de 20 (p:p) en buffer acetato de Na 0,1 M (pH 5,0), este complejo también fue formado adicionando Mn en concentraciones de 0,58

mM (complejo T-F-Mn 0,58) y 1,17 mM (complejo T-F-Mn 1,17). Estas mezclas se incubaron a 30 ºC por 1 h y luego se centrifugaron a 12.000 g por 35 min, obteniéndose un precipitado (CI, complejo insoluble) y una fracción sobrenadante (SN). La solución sobrenadante se separó para determinar posteriormente su actividad fosfatasa, el complejo insoluble se resuspendió en buffer acetato de Na y se centrifugó nuevamente a 12.000 g por 35 min, después de lo cual se separó la nueva fracción sobrenadante llamada agua de lavado (AL) y el complejo insoluble se suspendió otra vez en el buffer acetato de Na. Como control se utilizó una enzima libre que siguió todo el proceso de formación de los complejos. Los complejos obtenidos fueron: ácido tánico con fosfatasa ácida (T-F); ácido tánico con fosfatasa ácida y Mn 0,58 mM (T-F-Mn 0,58); ácido tánico con fosfatasa ácida y Mn 1,17 mM (T-F-Mn 1,17). Las fracciones SN, AL y CI fueron se conservadas a 4º C para su posterior análisis.

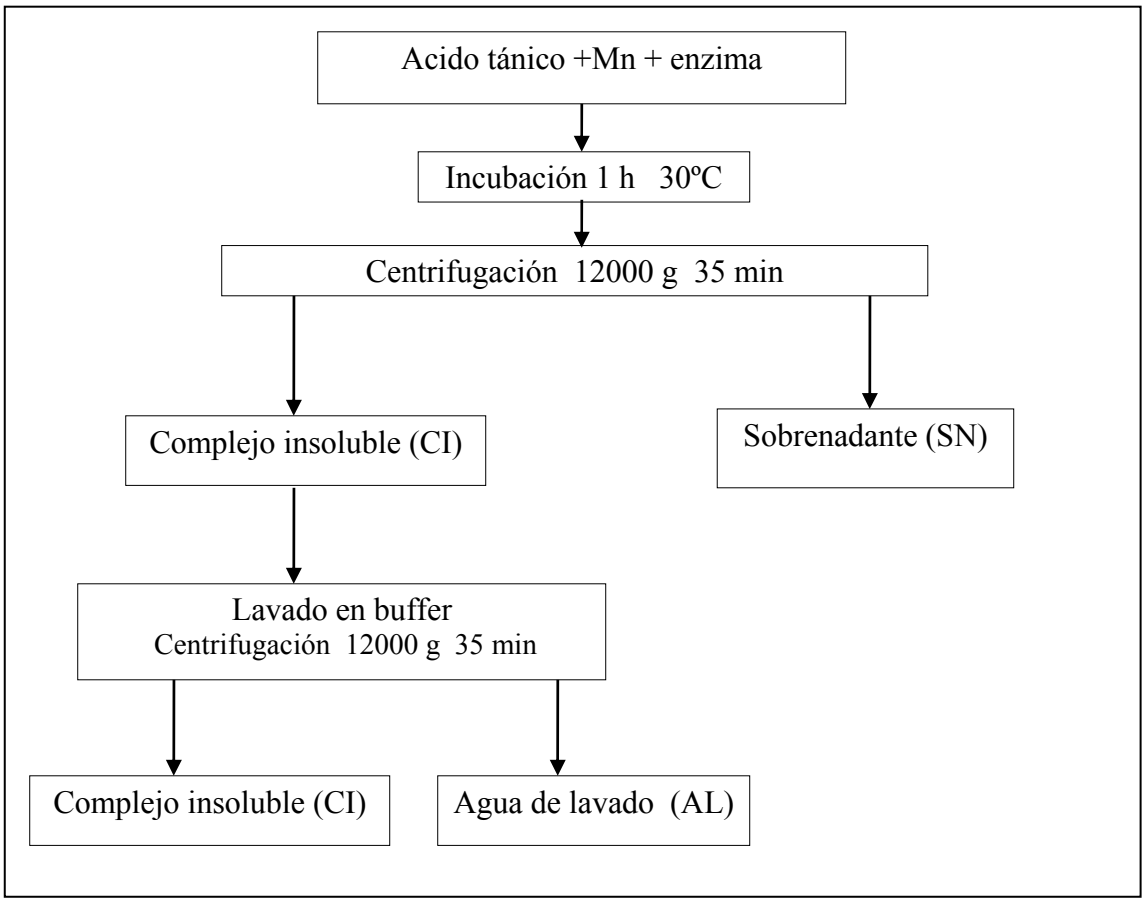

Figura 5. Esquema general del proceso de inmovilización de la fosfatasa ácida en ácido tánico en presencia de Mn.

2.2.2. Inmovilización de la fosfatasa ácida en arcilla.

El proceso de inmovilización de la fosfatasa en arcilla se presenta en la Figura 6. Se hicieron dos tipos complejos de fosfatasa ácida con arcilla (A-F), cambiando el orden de adición de los componentes con el objetivo de simular las situaciones que frecuentemente se presentan en la naturaleza. Considerando esto, el Mn se adicionó antes y después de la inmovilización. El primer complejo se formó mezclando, al mismo tiempo, la arcilla (40 mg mL^{-1}) con la enzima y Mn (0,58 y 1,17 mM). Se siguió el mismo proceso de formación de los complejos mencionados anteriormente, pero la centrifugación se realizó a 15.000g por 40 min, obteniendo las mismas fracciones de SN, AL y CI. Los complejos obtenidos en este proceso fueron: arcilla con fosfatasa ácida (A-F); arcilla con fosfatasa y Mn 0,58 mM (A-F-Mn 0,58), arcilla con fosfatasa y Mn 1,17 mM (A-F-Mn 1,17).

El segundo tipo de complejos fue obtenido inmovilizando la enzima en la arcilla como se describió anteriormente pero el metal fue aplicado después y la mezcla fue centrifugada nuevamente, obteniendo el complejo insoluble y un segundo sobrenadante, a los cuales se le realizaron todas las determinaciones. Los complejos obtenidos en este proceso fueron: arcilla con fosfatasa más Mn 0,58 mM (A-F+Mn 0,58), arcilla con fosfatasa más Mn 1,17 mM (A-F+Mn 1,17). Estas fracciones SN, AL y CI también fueron conservadas a 4 ºC para su posterior análisis.

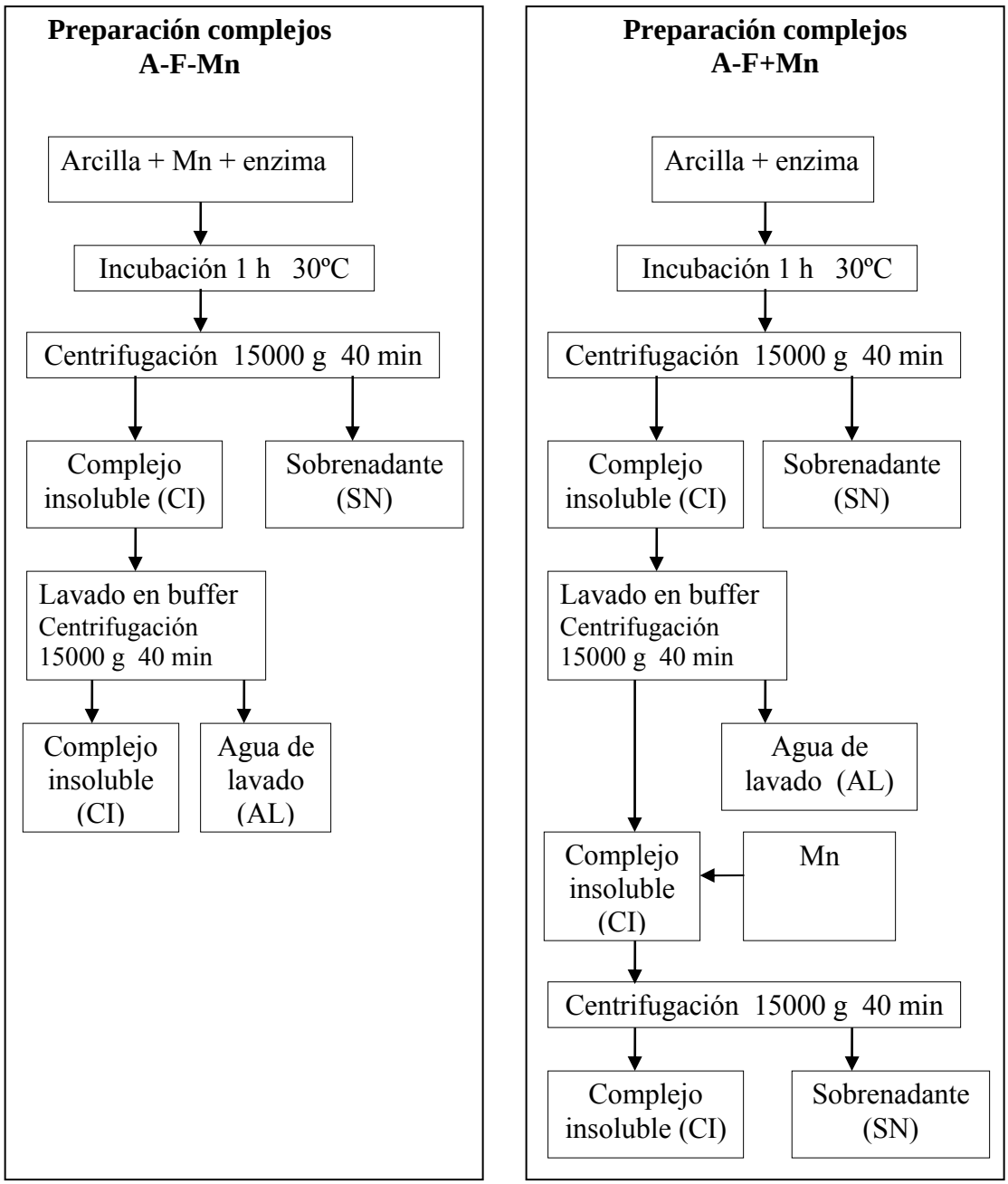

Figura 6. Esquema general del proceso de inmovilización de la fosfatasa ácida en arcilla en presencia de Mn.

2.2.3 Determinaciones de actividad y parámetros cinéticos de las fracciones sobrenadantes y complejos.

A las fracciones SN, AL y CI obtenidas en el proceso de inmovilización de la fosfatasa en ácido tánico y en arcilla se les determinó actividad fosfatasa de acuerdo al método de Neil y

Horner (1964) y se les realizaron los test de cinética de acuerdo al procedimiento descrito anteriormente, sin embargo, debido a que el SN y AL de los complejos de arcilla con fosfatasa no presentaron actividad fosfatasa ácida, se realizaron los test de cinética sólo al complejo insoluble.

2.2.4 Determinación de la concentración de Mn en las fracciones sobrenadantes y complejos.

Después de la formación de los complejos se determinó la concentración de Mn en las fracciones de SN y AL y, por diferencia entre el total de Mn adicionado y la suma del contenido en las fracciones de SN y AL, se estimó la concentración de Mn en el complejo insoluble. La concentración de Mn se determinó por espectrofotometría de absorción atómica.

2.2.5 Determinación del contenido de proteína en las fracciones sobrenadantes y complejos.

También se determinó la concentración de la proteína en las fracciones de SN y AL por el método de Bradford (1976) utilizando un reactivo preparado (Bio-Rad) y albúmina de bovino como estándar. La concentración de proteína en el CI fue calculada por diferencia entre el total de proteína adicionada y la suma de los contenidos de proteína de las fracciones de SN y AL.

2.2.6 Determinación del punto isoeléctrico de los complejos

A los complejos insolubles se les determinó el punto isoeléctrico por migración electroforética con un equipo Zeta Meter ZM-77. Para la medición se emplearon alrededor de 10 mg de muestra en 10 mL de KCl 0,001 M. Las movilidades electroforéticas fueron promediadas y se calculó el potencial zeta (PZ) con la ecuación de Helmholtz-Smoluchiwski (Hunter, 1981). A partir de un gráfico PZ v/s pH se calculó el PIE usando ecuaciones matemáticas.

2.2.7 Espectroscopía IR

Se realizó un análisis de espectroscopia FTIR a los complejos insolubles. Las muestras fueron secadas a 40ºC por 24 h y las pastillas fueron preparadas mezclando 250 mg de KBr grado espectral con 1 mg de muestra y fueron analizadas en un espectrofotómetro Brucker Modelo Tensor 27. Cada espectro fue registrado con una resolución de 2 cm^{-1}.

Todos los experimentos fueron realizados con tres repeticiones, a las cuales se le hicieron las determinaciones con tres réplicas.

2.2.8 Estudio de estabilidad térmica de la fosfatasa inmovilizada en ácido tánico

La estabilidad térmica fue determinada por incubación de la muestra a 60°C por un período de 4 h. A intervalos de tiempo determinados se tomaron muestras de un volumen de 100 µL, a las cuales se determinó la actividad fosfatasa. Para este estudio se utilizaron los complejos insolubles T-F, T-F-Mn 0,58 y T-F-Mn 0,58, considerando como testigo la fosfatasa libre (F libre).

3. RESULTADOS Y DISCUSION

3.1. Comportamiento catalítico de dos fosfatasas ácidas en presencia de Mn.

3.1.1 Evaluación de métodos para determinación de la activad fosfatasa ácida.

Considerando que las diferencias en actividad y respuesta a la presencia de Mn entre las enzimas de papa y papa dulce puede estar condicionada por la metodología usada, se evaluó la actividad de las ambas enzimas con dos métodos. Estos métodos se diferencian principalmente por el buffer utilizado, el método de Uehara et al. (1974) indica el uso buffer citrato mientras que el método de Neil y Horner (1964) propone el uso de buffer acetato.

Los datos de la Tabla 1 indican claramente que:

1) Cuando la actividad de ambas enzimas fue ensayada con las mismas unidades enzimáticas, ambas preparaciones presentaron diferente actividad, la actividad de la enzima proveniente de papa dulce fue mayor que la actividad de la enzima proveniente de papa;

2) Independientemente del origen o formulación de la enzima, en presencia de buffer citrato, la actividad enzimática no se incrementó al doble cuando se le adicionó el doble de las unidades enzimáticas, por el contrario, con 0,025 U mL^{-1} de enzima, la actividad de ambas preparaciones enzimáticas disminuyó en 70% para la enzima proveniente de papa dulce y en 80% para la fosfatasa de papa en comparación con la actividad obtenida con buffer acetato.

El efecto inhibitorio del citrato es mas evidente si se comparan los resultados obtenidos con 0,025 U mL^{-1} de fosfatasa para ambos buffer a la misma temperatura (37°C) y tiempo de incubación (10 min), bajo estas condiciones la actividad con buffer acetato se incrementa en 4 veces para la enzima de papa y en 8 veces para la fosfatasa de papa dulce.

Tabla 1. Comparación entre la actividad de la enzima de papa dulce y papa utilizando los metodos Uehara et al. (1974) y Neil y Horner (1964). Para ambos métodos se utilizaron 0,011 y 0,025 U mL-1 (unidades de enzima en el volumen de reacción).

Método(buffer)	**Actividad (μmol mL^{-1} min^{-1}) 0,011 U de enzima mL^{-1}**	**Actividad (μmol mL^{-1} min^{-1}) 0,025 de enzima U mL^{-1}**
Uehara (citrato)		
Papa dulce	0,269	0,203
Papa	0,245	0,276
Neil y Horner (acetato)		
Papa dulce		
Papa	0,501	1,017 (1,600)*
	0,420	0,995 (1,150)*

*Actividad obtenida a 37° C y 10 minutos de incubación.

Estos resultados están de acuerdo con lo reportado por Marzadori et al. (1998) quienes observaron un 40% menos de actividad de una fosfatasa ácida liofilizada proveniente de papa dulce determinada con buffer citrato-Na_2 mM en comparación con la actividad determinada con buffer acetato-Na y maleato-Na. Además, Guo y Roux (1996) y Guo et al. (1998) mostraron que fosfatasas de una fracción citosólica de plúmulas de arveja (*Pisum sativum* L. cv Alaska) y de una fracción del núcleo de las plúmulas, fueron inhibidas por el citrato, mientras que no se observó un efecto de otros ácidos orgánicos como tartrato. El efecto inhibitorio del citrato sobre la fosfatasa ácida podría deberse a que el ácido cítrico es un ácido tricarboxílico que presenta cuatro grupos OH (Strobel, 2001), que pueden estar disociados a pH ácido, y enlazarse a los metales presentes en el sitio activo de la enzima inhibiendo su actividad, en contraste, con el ácido acético es un ácido monocarboxílico con un solo grupo OH.

3.1.2 Propiedades de las dos preparaciones enzimáticas

Considerando los resultados previos, se determinó la actividad de la fosfatasa ácida con el método de Neil y Horner (1964).

En la Tabla 2 se presentan los parámetros cinéticos (Km y Vmax) de las fosfatasas ácidas provenientes de papa y papa dulce. La eficiencia catalítica de fosfatasa de papa dulce fue 8 veces mayor que la eficiencia de la fosfatasa de papa. Los parámetros de cinética indican claramente que la preparación enzimática proveniente de papa dulce presenta mayor actividad y afinidad por el sustrato que la enzima proveniente de papa.

La gran diferencia en los parámetros cinéticos de las dos preparaciones enzimáticas investigadas, especialmente con relación a los valores de la Km, pueden ser explicados por que ambas enzimas provienen de diferentes especies de papa. De acuerdo a lo reportado en la literatura, existe una amplia variación en la actividad y propiedades de las isoenzimas entre especies (Baes y Van Cutasem, 199; Alves et al., 1994; Duff et al., 1994). Incluso dentro de una especie de planta, pueden existir diferencias dependiendo del material genético empleado (Helal, 1990; Fernándes y Ascencio, 1994). Además, estudios realizados con fosfatasa ácida proveniente de papa indican que esta enzima puede estar

presente en más de seis isoformas localizadas en el citoplasma y compartimentos de la pared celular (Sugawara et al., 1981).

Tabla 2. Parámetros de cinética [velocidad máxima (*V*max) y constante de Michaelis (*K*m)] de la fosfatasa ácida de papa y papa dulce en presencia de Mn (0,58 mM y 1,17 mM).

Fosfatasa ácida	Mn (mM)	Km mM	Vmax µmol mL^{-1} min^{-1}	Eficiencia catalítica*	R2
Papa	0	0,364 (0,073)	0,426 (0,016)	1,2	0,995
	0,58	0,235 (0,033)	0,439 (0,009)	1,9	0,998
	1,17	0,237 (0,033)	0,437 (0,009)	1,8	0,998
Papa dulce	0	0,057 (0,014)	0,495 (0,066)	8,7	0,999
	0,58	0,081 (0,012)	0,368 (0,004)	4,5	0,999
	1,17	0,039 (0,004)	0,361 (0,001)	9,3	0,999

*V max/Km ; números entre paréntesis indican el error estadistico.

La heterogeneidad de las dos preparaciones enzimáticas fue confirmada por los estudios de electroforesis realizados bajo condiciones desnaturalizantes y no desnaturalizantes. Los resultados reportados en la Figura 8 demostraron claramente que las dos preparaciones enzimáticas contenían diferentes números de sub-unidades proteicas con diferente actividad enzimática. Efectivamente, la fosfatasa ácida proveniente de papa presenta 4 bandas entre los 18 a 32 kD mientras que la enzima proveniente de papa dulce presenta 8 bandas de proteína entre los 18 a 67 kD (Figura 7).

Además la enzima proveniente de papa dulce presentó una banda más activa y homogénea en contraste con la enzima de papa que presentó una banda heterogénea menos activa (Figura 8). La diferencia en reactividad fue más evidente cuando se adicionaron iguales cantidades de enzimas como de proteína. (Figura 8).

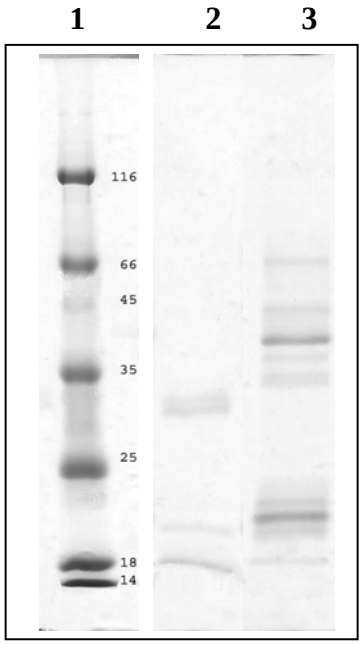

Figura 7. Electroforesis de proteínas en SDS-PAGE. 1) Carril con el marcador de masa molecular, 2) Carril con fosfatasa ácida de papa , 3) Carril con fosfatasa ácida de papa dulce.

Las diferencias entre las dos fosfatasas también puede deberse al tipo de formulación con que estas enzimas son comercializadas, la fosfatasa de papa está liofilizada mientras que la fosfatasa de papa dulce está en suspensión $(NH_4)SO_4 + MgCl_2$. La liofilización implica un proceso de secado en frío, en que se remueve el agua desde una muestra congelada por sublimación y desorción. Por lo tanto, durante la liofilización hay una serie condiciones desestabilizantes para la enzima como las temperaturas bajo cero, el estrés osmótico durante la formación de hielo y las alteraciones en la solución de pH (Ru et al., 2000). Cuando el proceso es aplicado a las proteínas, el secado resulta en una disminución del contenido de hélice-alfa con un incremento simultáneo de estructuras aleatorias y estructuras de la lámina beta (Gupta y Roy 2004), además, se ha observado que el mayor factor de estrés que contribuye desnaturalización de las proteínas es la pérdida de la estructura terciaria (Ru et al., 2000). Se ha establecido que los cambios estructurales producidos durante el proceso de liofilización son responsables de la baja actividad de los

polvos deshidratados por congelación en medios casi anhídridos, por lo tanto, se concluido que la liofilización no es un proceso inocuo (Gupta y Roy 2004).

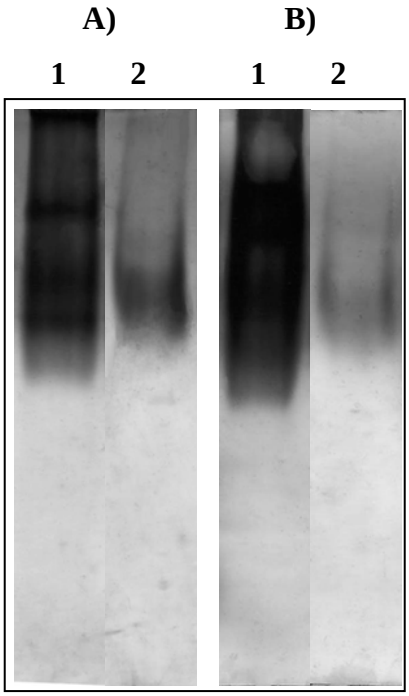

Figura 8. Gel nativo de poliacrilamida teñido por actividad de fosfatasa ácida.

A) Gel con las iguales unidades de enzima. A**1**) carril en que se cargaron 0,5 μg de proteína equivalentes a 0,0077 U de fosfatasa de papa dulce; A **2**) carril correspondiente a la fosfatasa de papa en que se cargaron 3 μg de proteína equivalentes a 0,0077 U de enzima.

B) Gel Nativo con el mismo contenido de proteína (0,5 μg) para cada enzima. B**1**)carril con fosfatasa de papa dulce; B**2**) carril con fosfatasa de papa.

Es posible que, como resultado de la liofilización, se haya perdido parcialmente la integridad de la estructura de la fosfatasa ácida proveniente de papa (liofilizada), causando una menor actividad y afinidad por el sustrato en comparación con la enzima de papa dulce (suspensión).

Por otro lado la fosfatasa ácida proveniente de papa dulce está suspendida en $(NH_4)SO_4$ 1,8 M en mezcla con $MgCl_2$ 10 mM. El sulfato de amonio es una sal cosmotrópica, y como es discutido por Collins (1997), las sales cosmotrópicas tienen una fuerte interacción con el agua, incrementando su tensión superficial, y a altas concentraciones estabilizan la conformación nativa de las proteína protegiéndolas de la denaturación. Gianfreda y Scarfi (1991) señalan que aditivos, incluyendo sales, pueden estabilizar proteínas en solución frente a una variedad de perturbaciones tales como el desdoblamiento inducido por la temperatura y la disociación inducida por el pH.

Además, la fosfatasa en suspensión utilizada en este estudio contiene $MgCl_2$ a una concentración de 10 mM y el Mg es un activador enzimático. Bozzo et al. (2002) indicaron que isoenzimas de fosfatasa ácida extraídas de tomate fueron activadas en aproximadamente 135% y 180% en presencia de una concentración saturante de $MgCl_2$ (5mM), mientras Gellatly et al. (1994) mostraron que la fosfatasa ácida proveniente de papa fue activada en un 40% con Mg^{2+} (4 mM).

3.1.3 Efecto del Mn sobre la actividad y cinética de las fosfatasas.

La presencia de Mn en concentraciones de 0,58 y 1,17 mM causó una disminución de 27 y 29 % de la actividad de la enzima de papa dulce en comparición con la actividad de la enzima sin Mn. Por el contrario, no se observaron efectos significativos sobre la fosfatasa de papa (Figura 9).

La diferencia en respuesta a la presencia de Mn fue más evidente cuando se realizaron los estudios de cinética (Tabla 2). La fosfatasa ácida de papa dulce presentó una disminución cercana al 26 % de su velocidad de reacción en presencia de Mn, así como también, una disminución en la afinidad por el sustrato con 0,58 mM de Mn y un leve aumento de este parámetro en presencia de la concentración más alta de Mn. Por el contrario, en la fosfatasa de papa no se observó una marcada diferencia en la V_{max} en presencia de Mn, y se observó un aumento en el valor de la K_m en presencia de 0,58 mM de Mn, que no cambió cuando la concentración de Mn se aumentó al doble.

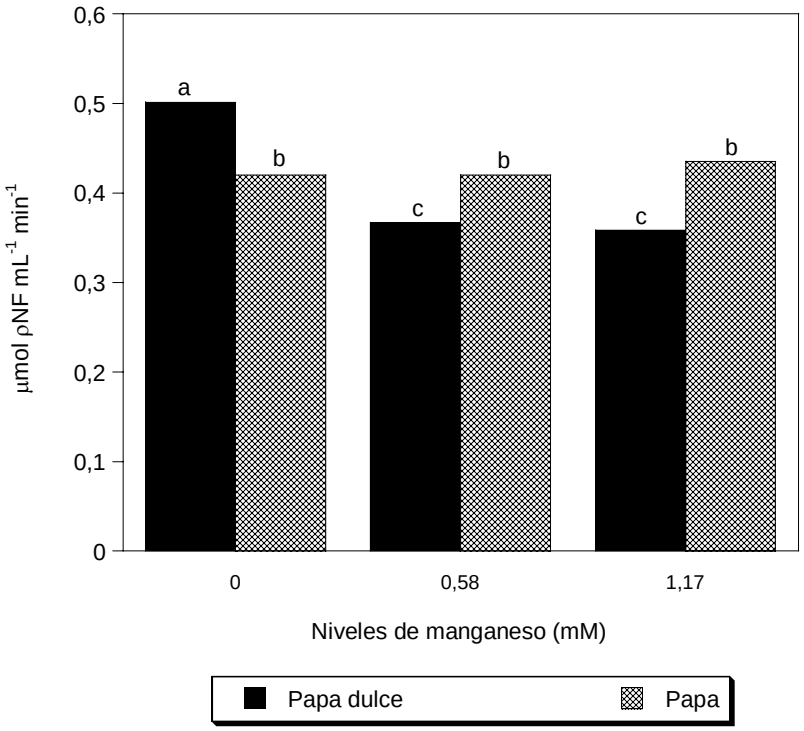

Figura 9. Efecto de dos niveles de Mn sobre la actividad de fosfatasa ácida de papa y papa dulce. Promedios con letras diferentes denotan diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre tratamientos de acuerdo a la prueba de comparación múltiple de promedios de Tukey.

En literatura se informan diferentes resultados con respecto al efecto del Mn sobre las propiedades de fosfatasa ácida. Gellatly et al. (1994) mostró que una fosfatasa ácida de papa fue activada en aproximadamente 30% en presencia de 4 mM de Mn, mientras que Sugiura et al. (1981) indican que una fosfatasa aislada de papa dulce presentó una disminución de 19 % de su actividad en presencia de Mn. Por el contrario, Tso y Chen (1997) no encontraron efectos significativos del Mn (0,5 mM de $MnSO_4$) sobre una fosfatasa extraída de plántulas de arroz.

Las respuestas variables de las fosfatasas a la presencia de Mn también pueden deberse a las diferentes interacciones del Mn con los grupos funcionales y/o con los otros iones metálicos presentes en el sitio activo de estas enzimas. Sugiura et al. (1981) demostró que la fosfatasa ácida de papa dulce contiene Mn en sus estructura y que tiene un alto contenido de aminoácidos aspártico y glutámico, los cuales son parte del centro catalítico de las enzimas, participando en la catálisis enzimática (Olczak et al., 2003). Estos aminoácidos

participan en la transferencia de protones y en la fijación a cationes (Horton, 1993). Por lo tanto, es posible que el Mn se fije en estos aminoácidos, afectando así la catálisis, con una consecuente disminución de la actividad enzimática. La fosfatasa de papa dulce se caracteriza por presentar un centro dimetálico en que uno de los métales es Fe^{+3} y el otro ion puede ser Mn^{+2} (Zambonelli y Roberts, 2003). De acuerdo al modelo de acción de estas enzimas, el ion de este centro dimetalico está involucrado en la unión al sustrato y en la catálisis. Por lo tanto, es posible que la disminución en la Vmax de la fosfatasa de papa dulce en presencia de 0,58 y 1,17 mM de Mn se deba a que el Mnen alta concentración, reemplazó al Fe del sitio activo de la enzima, como ha sido propuesto por Zambonelli y Roberts (2003). Estos autores señalan que el Mn es capaz de sustituir al Fe en los sitios activos y consecuentemente disminuye de la actividad de la fosfatasa.

Estos resultados sugieren que dependiendo de la especie de planta y de las condiciones experimentales bajo las cuales la actividad de la enzima es determinada, se puedan obtener resultados contradictorios respecto al comportamiento catalítico de las fosfatasas ácidas. Estudios realizados con una sola enzima, sin considerar diferentes orígenes y formulaciones pueden derivar en conclusiones erróneas respecto del efecto de un factor determinado. Es necesario considerar que en el suelo generalmente hay mezclas de enzimas de diferentes orígenes y con diferentes propiedades catalíticas. Por lo tanto, el origen y la formulación de las enzimas debe ser considerado cuando se utilizan como compuestos modelos para simular condiciones ambientales

3.2 Efecto del Mn sobre la fosfatasa ácida inmovilizada en ácido tánico.

Cuando se realizó el proceso de inmovilización de la fosfatasa ácida y el ácido tánico se recuperó un 51% de la actividad enzimática inicial en el complejo insoluble (Tabla 3). Estos resultados concuerdan con los resultados obtenidos por Gianfreda et al. (1995), quienes indican que la inmovilización de enzimas en ácido tánico es, en general, baja. Ellos evaluaron la inmovilización de ureasa en ácido tánico obteniendo una actividad residual de 38% en la fracción de SN, 22% en el AL y sólo 19% en el CI. Los estudios realizados con fosfatasa ácida inmovilizada en ácido tánico han evidenciado un mayor porcentaje de

enzima inmovilizada en este soporte. Rao y Gianfreda (2000) inmovilizaron una fosfatasa ácida proveniente de papa en ácido tánico (razón [p/p] de 10 ácido tánico/fosfatasa) y observaron actividades residuales de 33% en la fracción SN , 51% en el CI y no encontraron actividad en la fracción AL.

En este estudio, la relación molar T/F fue de 20, entonces la actividad relativa alcanzada en el complejo insoluble puede estar indicando que un mayor número de moléculas de enzima libre fueron inmovilizadas en el ácido tánico. Sin embargo, se observó que un 45 % de la actividad se presentó en las fracciones sobrenadantes obtenidas después de la centrifugación. Es posible que debido a las repetidas centrifugaciones y lavados, algunas moléculas de enzima pudieron ser liberadas desde el complejo, o también se pudo presentar una suspensión de algunas partículas coloidales formadas en el proceso de centrifugación (Rao et al., 1996), especialmente en la fracción SN que presentó color rojizo.

Tabla 3. Actividad residual (como porcentaje respecto a la actividad total de la enzima libre) de las fracciones de sobrenadante (SN), agua de lavado (AL) y complejo insoluble (CI) obtenidos en el proceso de formación del complejo insoluble entre la fosfatasa ácida y el ácido tánico (T-F) en presencia de dos concentraciones de Mn (mM). Los datos son el promedio (n=6).

Tratamiento	SN	AL	CI
T-F	29 ± 2	16 ± 1	51 ± 2
T-F-Mn 0,58	39 ± 3	9 ± 1	34±1
T-F-Mn 1,17	39 ± 3	8 ± 2	30 ± 2

La enzima inmovilizada en ácido tánico presentó una reducción de la *V*max y un incremento de la *K*m en comparación con los parámetros de cinética de la enzima libre (Tabla 4). Resultados similares fueron obtenidos por de Rao y Gianfreda (2000) con una fosfatasa ácida de papa inmovilizada en ácido tánico. El cambio en la Vmax con respecto a la enzima libre sugiere que en este caso se presentó un pequeño cambio conformacional de la estructura enzimática, además, el incremento en la *K*m indica que la accesibilidad del sustrato al sitio activo de la enzima fue alterado.

Cuando la inmovilización de la fosfatas ácida en ácido tánico se realizó en presencia de 0,58 mM y 1.17 mM de Mn la actividad residual disminuyó en 33 % y 41 %, respectivamente, en comparación con la actividad del complejo T-F. Además, la Vmax disminuyó en alrededor de 32 % en presencia de los dos niveles de Mn. Sin embargo, se observó una disminución de la Km de 29 % y 60 % en presencia de 0,58 y 1,17 mM de Mn respectivamente, lo que indica que la presencia de Mn causó un aumento de la afinidad por el sustrato.

Tabla 4. Parámetros cinéticos de la fosfatasa ácida libre (F) y en el sobrenadante y complejo obtenidos en el proceso de inmovilización de la enzima en ácido tánico (T-F) formado en presencia de dos concentraciones de Mn (mM).

Tratamiento	Sobrenadante			Complejo		
	Km (mM)	V max (μmol $min^{-1}ml^{-1}$)	Vmax/Km	Km (mM)	V max (μmol $min^{-1}ml^{-1}$)	Vmax/Km
F libre	0,197	0,147	0,75	-	-	-
T-F	0,140	0,064	0,46	0,198	0,124	0,63
T-F-Mn 0,58	0,138	0,088	0,64	0,140	0,084	0,60
T-F-Mn 1,17	0,202	0,093	0,46	0,080	0,086	1,01

La distribución del Mn en las diferentes fracciones del proceso de inmovilización de la fosfatasa en ácido tánico se presenta en la Tabla 5, donde se puede observar que todo el Mn se presenta en las fracciones sobrenadantes y no está presente en el complejo insoluble, de modo que este metal alcanzó a ejercer su efecto sobre la enzima durante el proceso de incubación. De acuerdo a estos resultados es posible señalar que cuando la enzima todavía no está inmovilizada, el Mn causa una disminución de su actividad y velocidad de reacción y un aumento en la afinidad por el sustrato similar al efecto causado sobre la enzima libre (Tabla 2, Figura 9).

Tabla 5. Concentración de Mn en las fracciones sobrenadante (SN), Agua de lavado (AL) y complejo (CI) obtenidas en el proceso de inmovilización de la fosfatas ácida en ácido tánico (T-F) en presencia de Mn (mM).

Tratamiento	SN		AL		CI	
	Mn (mM)	%	Mn (mM)	%	Mn (mM)	%
T-F- Mn 0,58	0,546	94	0,036	6	0	0
T-F- Mn 1,17	1,110	96	0,055	5	0	0

Los estudios de estabilidad térmica mostraron que aunque la estabilidad de la enzima inmovilizada fue considerablemente reducida, esta presentó una mayor termo estabilidad que la enzima libre (Figura 10).

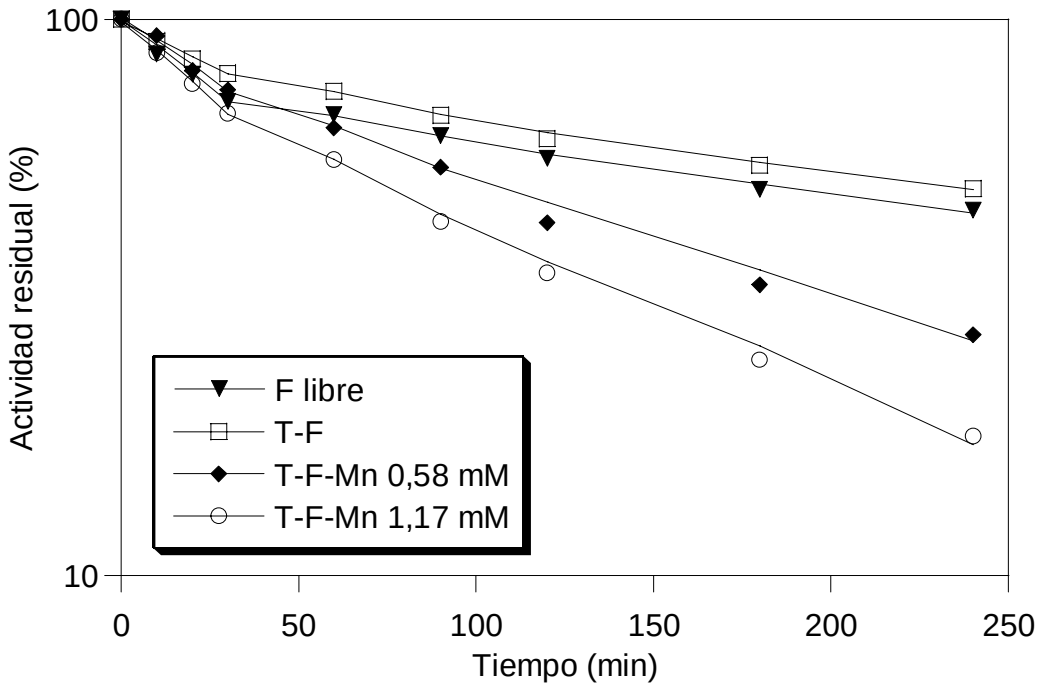

Figura 10. Estabilidad térmica (60 °C por 4 h) de la fosfatasa ácida libre e inmovilizada en ácido tánico en presencia de dos niveles de Mn (mM).

Por otra parte, la presencia de Mn causó una gran disminución de la estabilidad térmica de la fosfatasa ácida.

La disminución de la velocidad de reacción y de la estabilidad de la fosfatasa debido a la presencia de Mn en concentraciones de 0,58 y 1,17 mM durante el proceso de inmovilización de la enzima en ácido tánico sugiere que el Mn, a estas concentraciones, podría estar causando pequeño un cambio conformacional de la estructura enzimática.

3.3 Efecto del Mn sobre la fosfatasa ácida inmovilizada en arcilla.

En el proceso de formación de los complejos entre la fosfatasa ácida y la arcilla se observó que las fracciones sobrenadante y agua de lavado no presentaron actividad fosfatasa, así como tampoco se detectó proteína en estas fracciones. Además, la actividad de la fosfatasa en el complejo insoluble fue mayor que la actividad de la enzima libre (Figura 11), lo que estaría indicando que la mayoría de la enzima adicionada fue inmovilizada en la arcilla y que la enzima inmovilizada en este soporte presentó una activación de un 33%.

También se observó un incremento en la *V*max y una disminución de la Km para la fosfatasa inmovilizada en arcilla en comparación con los parámetros cinéticos de la enzima libre (Tabla 6).

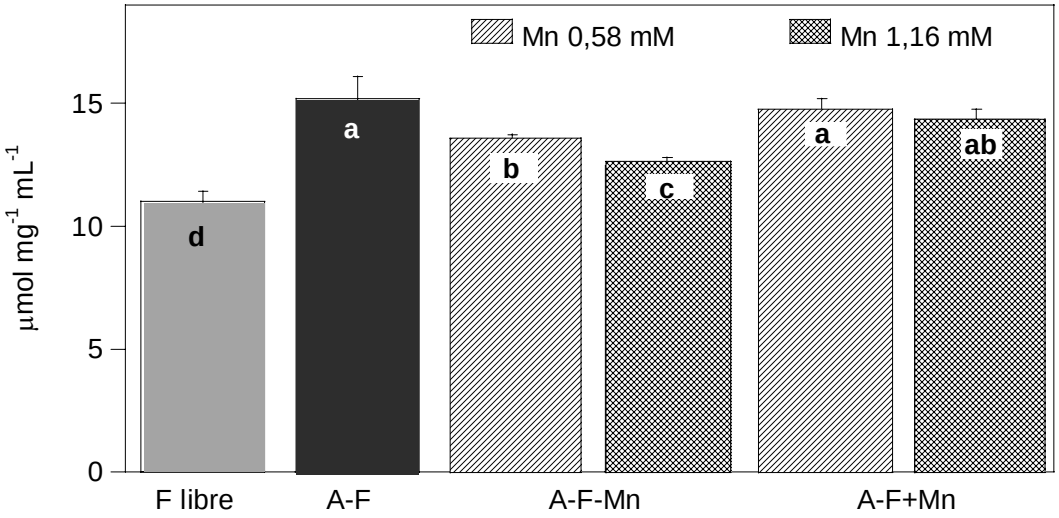

Figura 11. Actividad específica de la fosfatasa ácida libre (F Libre) e inmovilizada en arcilla (A-F) en presencia de dos niveles de Mn (mM). A- F- Mn= complejo obtenido mezclando al mismo tiempo la arcilla, la enzima y el metal; A-F+Mn= complejo obtenido adicionado el metal después de haber inmovilizado la enzima en la arcilla.

Tabla 6. Parámetros cinéticos de la fosfatasa ácida libre (F Libre) e inmovilizada en arcilla (A-F) en presencia de dos niveles de Mn (mM). A- F- Mn= complejo obtenido mezclando al mismo tiempo la arcilla, la enzima y el metal; A-F+Mn= complejo obtenido adicionado el metal después de haber inmovilizado la enzima en la arcilla

Tratamiento	Km (mM)	Vmax (µmol mL^{-1} min^{-1})	Eficiencia catalítica Vmax/Km	R^2
F libre	0,085	0,312	3,7	0,999
A-F	0,073	0,443	6,1	0,999
A-F+Mn 0,58	0,064	0,408	6,3	0,998
A-F-Mn 0,58	0,066	0,379	5,7	0,999
A-F+Mn 1,17 mM	0,065	0,431	6,6	0,999
C-F-Mn 1,17 mM	0,060	0,369	6,2	0,998

En la Tabla 8 se presentan los valores de punto isoeléctrico de la arcilla y de los complejos con fosfatasa, los cuales indican que cuando se realizó la inmovilización de la enzima a pH 5,0, la arcilla y aún la arcilla con buffer acetato se encontraban con una carga neta positiva. El aumento en el punto isoeléctrico desde 6,64 para el complejo arcilla-fosfatasa a 8,82 para este mismo complejo en presencia de Mn, indica que hubo una neutralización de cargas negativas tanto en la arcilla como en la proteína. Entonces, es posible que, como se discutió anteriormente, el Mn se haya unido a aminoácidos como al ácido aspártico y glutámico, que forman parte del centro catalítico de la enzima, y/o que haya reemplazado el Fe del sitio activo de la enzima, con una consecuente disminución de la actividad y velocidad de la reacción de la enzima.

Tabla 8. Punto isoeléctrico de la arcilla, arcilla con buffer acetato y de los complejos formados entre la arcilla y fosfatasa ácida (A-F) en presencia de dos niveles de Mn (mM).

Tratamiento	**PIE**
Arcilla	8,35
Arcilla- buffer acetato	7,10
Arcilla-Fosfatasa	6,64
Arcilla-Fosfatasa-Mn	8,82

En la Figura 12 se presentan espectros IR de la arcilla y de la fosfatasa inmovilizada en arcilla en presencia de Mn. El espectro de la arcilla muestras bandas características del alofan (Wada y Wada, 1989). En el espectro se observa un máximo de transmitancia a 3400 cm^{-1} correspondiente al estiramiento O-H, a 1600 cm^{-1} aparece la vibración Si-O-Al y alrededor de 1000 cm^{-1} se presentan las bandas de las vibraciones del O-Al-OH y Si-O-, además del asimétrico de Si-O-Si. Además, en la arcilla con buffer acetato y en todos los complejos arcilla-fosfatasa se observa una banda alrededor de 1600 cm^{-1} correspondiente al estiramiento simétrico del C-O de los carboxilatos de la enzima y del acetato, así como, una banda alrededor de 1460 cm^{-1} correspondiente al estiramiento simétrico del C- O de las muestras que tienen carboxilatos. La aparición de estas nuevas bandas indican que parte del acetato se adsorbió sobre la arcilla. Sin embargo, al adicionar la fosfatasa ácida, no se

observaron nuevas señales, lo que indica que no se formaron nuevos enlaces, por lo tanto es posible suponer que la fosfatasa no se adsorbe químicamente sobre este tipo de arcillas y tampoco se observan nuevos enlaces debido a la presencia de Mn en los complejos. Sin embargo, debido a toda la enzima esta presente en el complejo insoluble se puede suponer que debe haber algún mecanismo que permite la inmovilización de la enzima en este soporte.

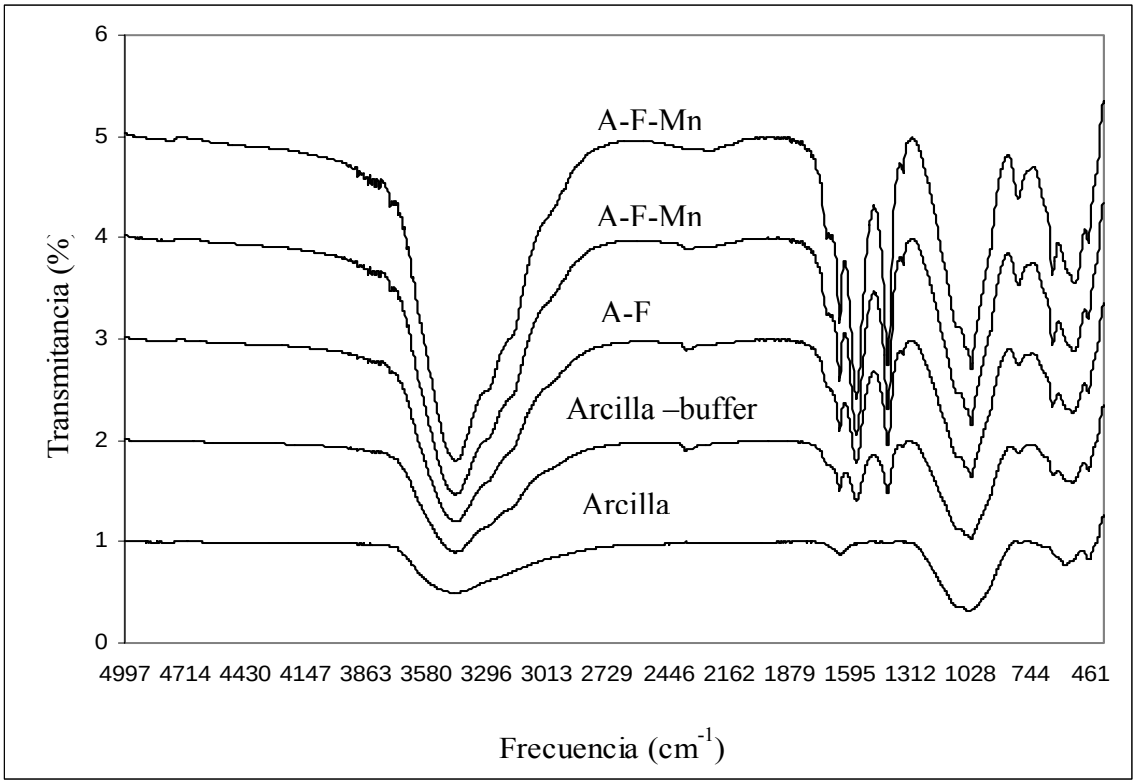

Figura 12. Espectros IR de la arcilla, arcilla con buffer acetato y de los complejos formados entre la arcilla y fosfatasa ácida (A-F) en presencia de dos niveles de Mn (mM).

El comportamiento de la fosfatasa inmovilizada en arcilla difiere considerablemente de los resultados obtenidos con distintas enzimas en otros tipos de minerales de la arcilla como montmorillonita, ilita y caolinita, en los que se ha observado una disminución de la Vmax y un incremento de la Km (Fusi et al., 1990; Quiquampoix et al., 1993). Aunque en la literatura también se informan resultados variables con respecto al efecto de la inmovilización sobre la fosfatasa, indicando que normalmente la V_{max} diminuye (Gianfreda y Bollag, 1994; Huang et al., 1995) y que los efectos sobre la Km son variables

(Rao y Gianfreda, 2000). Las investigaciones realizadas con minerales de arcillas cristalinas indican que la inmovilización de las enzimas en estos soportes se realiza por intercambio de ligandos (Naidja et al., 1997) o por adsorción (Quiquampoix et al, 2002). De acuerdo a los resultados obtenidos en el análisis de IR no hay intercambio de ligandos, ni ningún tipo de adsorción química entre la enzima y el alofán. Otro posible mecanismo, que podría explicar la inmovilización de la fosfatasa en alofán es la presencia de interacciones electrostáticas entre la arcilla con carga neta positiva, el acetato que está en alta concentración y que a pH 5,0 se encuentra principalmente como anión y la enzima que presentaría carga neta positiva a este pH. Sin embargo, este tipo de unión no explica la activación y la alta eficiencia catalítica de la enzima inmovilizada en comparación con la enzima libre.

Por otra parte, los resultados obtenidos con la fosfatasa inmovilizada en alofán concuerdan con estudios de inmovilización de varias enzimas en nanomateriales llamados sol-gel, los cuales tienen características similares a los agregados de alofán, que han mostrado que la enzima inmovilizada conserva su actividad y parámetros cinéticos o es activada y que además incrementa su estabilidad. Así, estudios en que se inmovilizó una peroxidasa por intercalación de la enzima en un filosilicato demostraron que la enzima inmovilizada tenía una actividad similar o mayor que la enzima libre, que sus parámetros cinéticos no fueron afectados por la inmovilización y además presentó una buena estabilidad térmica (Shen y Tu, 1999). Estas investigaciones han revelado que la enzima no se inmoviliza por enlaces covalentes sino por un tipo de retención física en que la enzima es atrapada entre las nanopartículas, lo que se denomina bioencapsulación (Luckarift et al., 2004; Glad et al, 1985; Podbielska y Ulatowska-Jar˙Za, 2005). Se ha demostrado que la conservación de la actividad y la gran estabilidad de estas enzimas se debe a que bioencapsulación permite una adecuada difusión del sustrato hacia la enzima inmovilizada y que este sistema de inmovilización no altera la estructura nativa de las proteínas (Eggers y Valentine, 2001). Entonces, se postula que a través de las centrifugaciones a alta velocidad, la enzima es atrapada entre los microagregados del alofán siendo inmovilizada por una bioencapsulación que le permite conservar su estructura nativa y un buen acceso del sustrato al sitio activo de la enzima, lo cual explicaría su alta eficiencia catalítica.

La aplicación de Mn antes de inmovilizar la enzima en arcilla generó una disminución de 11% y 18 % de la actividad (Figura 11) y 14 y 16 % de la V_{max} (Tabla 6) en presencia de 0,58 y 1,17 mM de Mn, respectivamente, aunque sólo un 20 % y un 15 % del Mn adicionado quedó en el complejo insoluble (Tabla 7). Mientras que, cuando el Mn fue aplicado después de haber inmovilizado la enzima, no afectó significativamente su actividad (Figura 12) y afectó levemente la velocidad de reacción (Tabla 6), a pesar de que un 59 y un 48 % del Mn aplicado quedó en el complejo insoluble (Tabla 7).Estos resultados indican que la inmovilización en la arcilla protege a la enzima de los efectos negativos que el Mn ejerce sobre la actividad y velocidad de reacción de la enzima libre. En general, se observó un aumento en la afinidad por el sustrato debido a la presencia de Mn antes y después de inmovilizar la enzima, similar comportamiento se observó en la enzima libre en presencia 1,17 mM de Mn.

Tabla 7. Concentración de Mn en las fracciones sobrenadante (Sn), agua de lavado (AL) y complejo (CI) obtenidas en el proceso de inmovilización de la fosfatas ácida en arcilla (A-F) en presencia de Mn (mM).

Tratamiento	SN		AL		CI	
	Mn (mM)	%	Mn (mM)	%	Mn (mM)	%
A-F- Mn 0,58	0,426	73	0,036	6	0,127	20
A-F - Mn 1,17	0,928	80	0,055	5	0,182	15
A-F+ Mn 0,58	0,241	41	-	-	0,339	59
A-F+ Mn 1,17	0,600	52	-	-	0,560	48

La fosfatasa ácida inmovilizada en una matriz orgánica como el ácido tánico presentó menor eficiencia catalítica que la enzima inmovilizada en arcilla, mientras que la interacción de la fosfatasa ácida con ácido tánico y con arcilla fue afectada en diferente extensión por la presencia de Mn. El Mn, en concentraciones que están dentro del rango de Mn disponible en Andisoles, afectó en mayor extensión la actividad y velocidad de reacción de enzima inmovilizada en ácido tánico que a la enzima inmovilizada en arcilla.

4. CONCLUSIONES

- Las dos fosfatasas estudiadas presentaron diferencias significativas en sus propiedades catalíticas y comportamiento en respuesta a la presencia de Mn, lo que puede ser explicado por la heterogeneidad y diferente nivel de pureza de ambas preparaciones comerciales, como lo demostraron los estudios de electroforesis. Estos resultados demuestran claramente que estas diferencias deben ser consideradas en la realización de sistemas modelos para simular el comportamiento de las fosfatasas ácidas en sistemas naturales como el suelo.

- La fosfatasa ácida inmovilizada en ácido tánico presentó un 50% de la actividad enzimática inicial y una disminución en la velocidad de reacción, lográndose inmovilizar sólo la mitad de enzima en este soporte orgánico. Mientras que, cuando se realizó el proceso de inmovilización en una arcilla proveniente de un Andisol, se inmovilizó prácticamente toda la proteína en este soporte, observándose un aumento de la actividad y eficiencia catalitica de la fosfatasa en comparación con la enzima libre.

- Niveles de Mn similares a los presentes en suelos Andisoles, causaron una disminución cercana al 30 % en la actividad y velocidad de reacción de la fosfatasa ácida libre e inmovilizada en ácido tánico. Cuando el Mn se adicionó antes de inmovilizar esta enzima en arcilla, se observó una pequeña disminución de la actividad y velocidad de reacción, mientras que no se observaron efectos significativos cuando el metal fue adicionado después de haber inmovilizado la enzima en este soporte.

PROYECCIONES DE LOS ESTUDIOS

En los ensayos en solución de nutrientes se observó una clara tendencia al aumento en la exudación de ácidos orgánicos en ballica perenne y trébol blanco en respuesta a la toxicidad por Mn, que podría estar indicando que este es un mecanismo utilizado por estas especies de planta no sólo para tolerar toxicidad por Al sino también la toxicidad por Mn en suelos ácidos. Sin embargo, se requieren más estudios en que se evalúe la exudación de ácidos orgánicos con distintos cultivares y especies, validando los resultados obtenidos con ensayos en campo, para determinar si la exudación de ácidos orgánicos es un mecanismo de tolerancia a toxicidad por Mn.

Los estudios de inmovilización de la fosfatasa ácida en arcilla extraída de un Andisol demostraron que se logró inmovilizar toda la enzima en este tipo de soporte y que además la eficiencia catalítica de la enzima aumentó significativamente. En biotecnología se han elaborado distintos nanomateriales como soportes para inmovilización, y se han desarrollado muchas metodologías buscando resultados como los que en este estudio se han obtenido. Sin embargo, considerando posibles aplicaciones biotecnológicas, se requiere determinar la estabilidad de la enzima inmovilizada en el tiempo, así como también, evaluar el efecto de otros factores ambientales que forman parte de sistemas en donde la enzima inmovilizada puede ser aplicada.

Por otra parte, la arcilla tiene la ventaja de ser un soporte natural, lo cual tiene gran importancia debido a que actualmente la nanotecnología se enfrenta a cuestionamientos por sus posibles efectos en el medio ambiente. Además este soporte podría resultar de bajo costo en comparación con los nanomateriales sintéticos. Por lo tanto resulta de interés continuar estudios con alofán como nanomaterial para la inmovilización de biomoléculas de interés biotecnológico.

REFERENCIAS

A.O.A.C. 1975. *Official Methods of Analysis*.12th Edn. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC.

Aomine, S.A. and Kobayashi, L. 1964. Effect of allophone on the activity of some enzymes. 8th Internac. Congr. Soil Sci. Bucarest. 3, 697-702.

Adorada, D., Biles, C., Liddell, C., Fernández-Pavía, S., Waugh, K. and Waugh, M. 2000. Disease development and enhanced susceptibility of wounded pepper roots to *Phytophthora capsici*. Plant Pathology 49, 719-726.

Alam, S., Kamei, S. and Kawai, S. 2000. Phytosiderophore release from manganese-induced iron deficiency in barley. Journal of Plant Nutrition 23,1193-1207.

Alef, K., Nannipieri, P. and Trazar-cepeda, C. 1995. Phosphatasa activithy. In: Alef, K., Nannipieri, P. (Eds). Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry. Academic Press, Londres, Inglaterra, pp. 335-338.

Alves, J,M., Siachakr ,C.D., Allot, M., Tizroutine. S., Mussio, I. and Servaes, A. 1994. Isozyme modifications and plant regeneration through somatic embryogenesis in sweet potato (*Ipomea batata* (L.) Lam.). Plant Cell Reports 13, 437-441.

Anderson, G. 1980. Assessing organic phosphorus in soils. In: Khasawneh, F. Sanepla, E., Kamprath, E. (Ed.). The Role of Phosphorus in Agriculture, America Society of Agronomy. Madison, pp. 411-431.

Andrew, C. S. and Hegarty M. P. 1969. Comparative responses to manganese excess of eight tropical and four temperate pasture legume species. Australian Journal of Agricultural Research 20, 687-696.

Asher, C.J. and Edwards, D.G. 1978. Relevance of dilute solution culture studies to problems of low fertility tropical soils. In Andrew C.S., Kamprath E.J. (Eds), Mineral Nutrition of Legumes in Tropical and Subtropical Soils, CSIRO, Brisbane, p. 131-152.

Baes, P.G. and Van Cutasem, P.J. 1993. Isozyme polymorphism in the three gene pools of cultivated chicory (*Cichorium intybus* L.). Euphytica 71, 43-150.

Bettati, S., Pioselli, B., Campanini, B., Viappiani, S., and Mozzarelli, A. 2004. Protein-doped nanoporous silica gels. In H.S. Nalwa (Ed.), Encyclopedia of nanoscience and nanotechnology, American Scientific Publishers, Stevenson Ranch, CA, p.81-103.

Bolan, N.S., Naidu, R.., Mahimairaja, S. and S. Baskaran. 1994. Influence of low-molecular-weight organic acids on the solubilization of phosphates. Biology and Fertility of Soils 18, 311-319.

Borie, F. and Zunino, H.1983. Organic matter P associations as a sink in P-fixation processes in allophanic soils of Chile. Soil Biology and Biochemistry 15, 599-603.

Boyd, S.A. and Mortland, M.M. 1990. Enzyme interactions with clays and clay-organic matter complexes. In: Bollag, M. and Stotzky, G. (Eds) Soil Biochemistry 6, 1-28. Marcel Dekker, New York.

Bozzo G., Raghothama K., and Plaxton W. 2002. Purification and characterization of two secreted purple acid phosphatase isozymes from phosphate-starved tomato (*Lycopersicon esculentum*) cell cultures. European Journal of Biochemistry 269, 6278-6286.

Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72, 248-254.

Brady, N. 1990. The Nature and Properties of Soils. Macmillan Publishing Company, New York. 621 pp.

Bromfield, S., Cumming, R., David, D. and Williams, C. 1983. Change in soil pH, manganese and aluminium under subterraneum clover pasture. Australian J. Exp. Agric. Anim. Husb. 23, 181-191.

Burnell, JN. 1988. The biochemistry of manganese in plants. In: Graham, RD., Hannam, RJ., Uren, NC., (Eds.), Manganese in Soils and Plants,Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands, p. 125-137.

Burns, R.G. 1986. Interactions of enzymes with soil mineral and organic colloids. In: Huang, P.M., Schnitzer, M. (Eds), Interactions of minerals with natural organics and microbes, Special publication N°17, Soil Science Society of America, Madison Wis., p. 429-451.

Busto, M.D. and Perez-Mateos, M. 1995. Extraction of humic-β-glucosidase fraction from soil. Biology and Fertility of Soils 20, 77-82.

Cardoso, E.J.B.N. 1996. Interaction of mycorrhiza, phosphate and manganese in soybean. In: Azcón-Aguilar, C., Barea J.M. (Eds.), Mycorrhizas in Integrated Sistems: Form Genes to Plant Development, European Symposium on Mycorrhizas, European Comisión Report, Luxemburg, 304-306.

Castillo, F. J. 1986. Extracellular peroxidases as markers of stress? In: Grepin, H., Penel, C., Gaspar T. (Eds.), Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidase, University of Geneva, Geneva, p. 419-426.

Ciudad, C. 1990. Efecto del calcio y el pH, en cultivos hidropónicos de lenteja (*Lens culinaris*) var. Araucana–Inia, sobre los niveles foliares de hierro y manganeso. Agricultura Técnica (Chile) 50, 120-124.

Clarkson, D.T. 1988. The uptake and translocation of manganese by plant roots. In: Graham, R.D., Hannam, R.J., Uren N.C. (Eds.), Manganese in soils and plants, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p.101-111.

Collins, KD. 1997. Charge density-dependent strength of hydration and biological structure. Biophys. J. 72, 656-676.

Crawford, T.W., Kuehl, R.O and Stroehlein, J.L.1990. Net fluxe of mineral nutrients, water and carbohydrate influenced by manganese in root and shoot of *Cucumis sativus* L. Journal of Plant Nutrition 13, 759-786.

Crawford, T.W., Stroehlein, J.L. and Kuehl, R.O. 1989. Manganese and rates of growth and mineral accumulation in cucumber. Journal of the American Society for Horticultural Science 114, 300-306.

Davis, B. 1964. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum protein. Annals of the NewYork Academy Science 121, 407-427.

Del Río, L .A., Gomez, M. Yañez, J., Leal, A. and Lopez, J. 1978. Iron deficiency in pea plants: Effect on catalase, peroxidase, chlorophyll and proteins of leaves. Plant and Soil 49, 343-353.

Delhaize, E., Ryan, P. R. and Randall, P. J. 1993. Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). II. Aluminum stimulated excretion of malic acid from root apices. Plant Physiology, 103, 695-702.

Demanet, R, Schnettler, B., and Mora M. L. 1999. Efecto del encalado y su relación con los nutrientes sobre la produción de pasturas en suelos ácidos. Frontera Agrícola (Temuco, Chile)5, 95- 110.

Dinkelaker, B. Hengeler, C. Neumann G., Eltrop, L. and Marschner, H. 1997. Root exudates and mobilization of nutrients. In: Rennenberg, H., Eschrich, W. and Ziegler,

H. (Eds.),Trees -Contributions to modern tree physiology, Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands, p. 441-453.

Ducic, T. and Polle, A. 2005. Transport and detoxification of manganese and copper in plants. Brazilian Journal of Plant Physiology 17, 103-112.

Duff, S.M., Sarat, G. and Plaxton, W. 1994. The role of acid phosphatase in plant phosphorus metabolism. Physiologia Plantarum 90, 791-800.

Duff, S.M., Sarat, G., & Plaxton, W. 1994. The role of acid phosphatase in plant phosphorus metabolism. Physiologia Plantarum 90, 791-800.

Durmus, A., Eicken, C., Sift, B., Kratel, A., Kappl, R., Ergen, J., Hüttermann, H., and Krebs, B. 1999. The active site of purple acid phosphatase from sweet potatoes (*Ipomoea batatas*): Metal content and spectroscopic characterization. European Journal of Biochemistry 260, 709-716.

Eggers, D. and Valentine, S. 2001. Molecular confinement influences protein structure and enhances thermal protein stability. Protein Science 10, 250-261.

Elstner E.F, Wagner G.A and Schütz W.1988. Activated oxygen in green plants in relation to stress situation. Curr. Top. Plant Biochem. Physiol. 7, 159–187.

Fecht-Christoffers, M.M., Maier, P., Horst, W.J. 2003. Apoplastic peroxidases and ascorbate are involved in manganese toxicity and tolerance of *Vigna unguiculata*. Physologia Plantarum 117, 237-244.

Fernández, D.S., and Ascencio, J. 1994. Acid phosphatase activity in bean and cowpea plants grown under phosphorus stress. Journal of Plant Nutrition 17, 229-241.

Foy, C. D. 1984. Physiological effects of hydrogen, aluminum and manganese toxicities in acid soil. In: Adams, F.(Ed.) Soil acidity and Liming, American Society of Agronomy, Madison, WI, p.57-97.

Foy, C.D., Chaney, R.L., White, M.C. 1978. The physiology of metal toxicity in plants, Annu. Rev. Plant Physiol. 29, 511–565.

Fusi, P., Ristori G.G, Calamai L. and Stotzky, G. 1989. Adsorption and binding of protein on clean and dirty montmorillonit, illite and kaolinite. Soil Biology and Biochemistry 21, 911-920.

Gellatly, K.S., Moorhead, G.B., Duff, S.M., Lefebvre, D.D., and Plaxton, W.C. 1994. Purification and characterization of potato tuber acid phosphatase having significant phosphotyrosine phosphatase activity. Plant Physiology 106, 223-232.

Gherardi, M.J. and Rengel, Z. 2004. The effect of manganese supply on exudation of carboxylates by roots of lucerne (*Medicago sativa*). Plant and Soil 260, 271-282.

Gianfreda, L. and Bollag, J.M. 1996. Influence of natural and anthropogenic factors on enzyme activity in soil. In: Stotzky G, Bollag J-M, eds. Soil Biochemistry, vol. 9. New York, Marcel Dekker, p. 123-94.

Gianfreda, L., Rao, M.A, and Violante, A.1992. Adsorption, activity and kinetics properties of urease on montmorillonite, aluminium hydroxide and $Al(OH)_x$-montmorillonite complexes. Soil Biology and Biochemistry 24, 51-58.

Gianfreda, L., Rao, M.A, and Violante, A. 1995. Formation and activity of urease-tannate complexes affected by aluminium, iron, and manganese. Soil Science Society of American Journal 59, 805-810.

Gianfreda, L. and Bollag, J.M. 2002. Isolated enzymes for the transformation and detoxification of organic pollutants. In: R.G Burns, Dick, R.(Eds), Enzymes in the environment: activity, ecology and applications, Marcel Dekker, New York, p. 491-538.

Gianfreda, L. and Rao, M. A. 2004. Potential of extra cellular enzymes in remediation of polluted soils: a review. Enzyme and Microbial Technology 35, 339-354.

Gianfreda, L., Rao, M.A., Saccomandi, F., Sannino, F. and Violante, A. 2002. Enzymes in soil: properties, behavior and potential applications. In Violante, A., Huang, P.M., Bollag, J.M., Gianfreda, L. (Eds), Soil mineral-organic matter-microorganism interactions and ecosystem health, Development in Soil Science 28B, London, Elsevier, p. 301-328.

Gianfreda, L. and Scarfì, M. R. 1991. Enzyme stabilization: state of the art. Molecular Cellular Biochemistry 199, 97-128.

Gianfreda, L. and Bollag, J.M. 1994. Effect of soils on the behavior of immobilized enzymes. Soil Science Society of America Journal 58, 1672– 1681.

Gill I. 2001. Bio-doped nanocomposite polymers: sol-gel bioencapsulates. Chemistry of. Materials. 13, 3404-3421.

Gill, I. and Ballesteros, A. 1998. Encapsulation of biologicals within silicate, siloxane, and hybrid sol-gel polymers: An efficient and generic approach. Journal of American Chemistry Society 120, 8587–8598.

Glad, M., Norrloew, O., Sellergren, B., Siegbahn, N. and Mosbach, K. 1985. Use of silane monomers for molecular imprinting and enzyme entrapment in polysiloxane-coated porous silica. Journal of Chromatography 347, 11-23.

Godo, G. H. and Reisenauer, H. M.1980. Plant effects on soil manganese availability. Soil Science Society of American Journal 44, 993-995.

Goemaere, E. 2004. Hydrobasaluminite: a new occurrence in belgium. Geologica Belgica 7, 1-2

Goldbold, D. L., Horst, W. J., Marschner, H., Collins, J. C. and Thuman, D. A. 1983. Root growth and zinc uptake by two ecotypes of *Deschampsia caespitosa* as affected by high Zn concentrations. Z. Pflanzenphysiol. 112, 315-324

Gonzáles, A. and Lynch, J. P. 1999. Subcelullar Mn compartmentation in bean leaves under Mn toxicity stress. Australian Journal Plant Physiology 26, 811-822.

González, A., Steffen, K.L., Lynch, J.P., 1998. Light and excess manganese -implications for oxidative stress in common bean. Plant Physiology 118, 493-504.

Gottfried, D.S., Kagan, A., Hoffman, B.M., and Friedman, J.M. 1999. Impeded rotation of a protein in a sol-gel matrix. Journal Physical Chemical B 103, 2803–2807.

Grace, N. D. 1983. The mineral requirements of grazing ruminants. New Zealand Society of Animal Production Occasional Publication 9, 80-83.

Greger, M. and Lindberg, S. 1986. Effects of Cd^{2+} and EDTA on young sugar beets (*Beta vulgaris*). I. Cd^{2+} uptake and sugar accumulation. Physiologia Plantarum 66, 69-74.

Grego S, D'Annibale A, Luna M, Badalucco L y Nannipieri P.1990. Multiple forms of synthetic pronase-phenolic copolymers. Soil Biology and Biochemistry 22, 721-724.

Guo, Y., and Roux, S.J. 1996. Partial purification and characterization of a type 1 protein phosphatase in purified nuclei of pea plumules. Biochemical Journal, 319, 985-991.

Guo, Y., Terry, M.E., and Roux, S.J. 1998. Characterization of a cytosolic phosphatase from pea plumules having significant protein tyrosine phosphatase activity. Plant Physiology of Biochemistry 36, 269-278.

Gupta, M.N. and Roy, I. 2004. Enzymes in organic media forms, functions and applications. European Journal of Biochemistry 271, 2575–2583.

Habte, M. and Soedarjo, M. 1996. Response of Acacia mangium to vesicular- arbuscular mycorrhizal inoculation, soil pH, and soil P concentration in an oxisol. Canadian Journal of Botany 74, 155-161.

Hall, J.L. 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. Journal of Experimental Botany 53, 1-11.

Haynes, R.J. 1984. Lime and phosphate in the soil–plant system. Advances in Agronomy 37, 249–315.

Heintze, J.G. 1968. Manganese phosphate reactions in aqueous systems and the effect of application of monocalcium phosphate on the availability of manganese to oats in alkaline fan soil. Plant Soil 24, 407–423.

Helal HM.1990.Varietal differences in root phosphatase activity as related to the utilization of organic phosphates. Plant and Soil 123, 161-163.

Hoffland, E., Kuyper, T. W., Wallander, H., Plassard, C. and Gorbushina, A. A. 2004. The role of fungi in weathering. Frontiers in Ecology and Environment. 2, 258-264.

Hoffland, E., Van Den Boogaard, R., Nelemans, J. and Findenegg, G. 1992.Biosynthesis and root exudation of citric and malic acids in phosphate-starved rape plants. New Phytology 122, 675–680.

Horiguchi, T. 1987. Mechanism of manganese toxicity and tolerance of plants. II deposition of oxidized manganese in plant tissue. Soil Science and Plant Nutrition 33, 595-606.

Horiguchi, T. 1988. Mechanism of manganese toxicity and tolerance of plants. IV. Effects of silicon on alleviation of manganese toxicity of rice plants. Soil Science and Plant Nutrition. 34, 65-73.

Horst W. J. 1988. The physiology of Mn toxicity. In: Webb, M. J., Nable, R. O., Graham R. D. (Eds.), Manganese in soil and plant, Annam., Kluwer Academic publishers, Dordrecht, The Netherlands, p. 175-188.

Horst, W. J., and Marchner H. 1978. Effect of silicon on manganese tolerance of bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.). Plant and Soil 50, 287-303.

Horst, W. J., Fecht, M., Naumann, A., Wissemeier, A. H. and Maier, P. 1999. Physiology of manganese toxicity and tolerance in *Vigna unguiculata* (L.) Walp. Journal of Plant Nutrition and Soil Science 162, 263-274.

Horst, W.J. 1983. Factors responsible for genotypic manganese tolerance in cowpea (*Vigna unguiculata*). Plant and Soil 72, 213-218.

Horton, H.R., Moran, L.A., Ochs, R.S., Rawn, J.D., and Scrimgeour, K.G. 1993. V. Propiedades de las enzimas. In Hodgin, K., Ryan M. (Eds), Bioquimica Prentice Hall Inc., México, p.1-37.

Huang, Q., and Shindo, H. 2000. Effects of copper on the kinetics of free and immobilized acid phosphatase. Soil Biology and Biochemistry 32, 1885-1892.

Huang, Q., Shindo, H., Goh, T.B. 1995. Adsorption, activities and kinetics of acid phosphatase as influenced by montmorillonite with different interlayer materials. Soil Science 59, 271–278.

Hunter R.J. 1981. Zeta potential in colloid Science. Academic Press. New York.

Jara, A., Violante, A., Pigna, M. and Mora M.L. 2006. Mutual interactions of sulfate, oxalate, and phosphate on Synthetic and natural allophanes. Soil Science Society of American Journal 70, 337-346.

Jin, W. and Brennan, J.D. 2002. Properties and applications of proteins encapsulated within sol-gel derived materials. Analytica Chimica Acta 461, 1–36

Johnson, S.E. and Loeppert, R.H. 2006.Role of organic acids in phosphate mobilization from iron oxide. Soil Science Society of American Journal 70, 222-234.

Jones, D.1998. Organic acids in the rhizosphere – a critical review. Plant and Soil 205, 25-44.

Jones, J.B., Wolf, B. and Mills, H. 1991. Plant analysis handbook: a practical sampling preparation, analysis and interpretation guide. Micro-Macro Publishing, Georgia, USA. pp. 93–115.

Jones J.P and Fox , R.L. 1978. Phosphorus nutrition of plants influenced by manganese and aluminium uptake from an Oxisol. Soil Science 126, 203-236.

Jones, D. L. and Brassington, D.S. 1998. Sorption of organic acid in acid soil and its implications in the rhizosphere. European Journal of Soil Science. 49, 447- 455.

Jones, D. L. and Darrah, P. 1994. Role of root derived organic acids in the mobilization of nutrients from the rhizosphere. Plant and Soil 166, 247-257.

Jones, D. L., Prabowo, A. M. and Kochian, L. 1996. Kinetics of malate transport and decomposition in acid soils and isolated bacterial populations: The effect of microorganisms on root exudation of malate under Al stress. Plant and Soil 182, 239-247.

Kandeler E, Tscherko D, Bruce K D, Stemmer M, Hobbs P J, Bardgett R D and Amelung W. 2000. Structure and function of the soil microbial community in microhabitats of a heavy metal polluted soil. Biology and Fertility of Soils 32, 390- 400.

Kelleher, B.P., Simpson, A.J., Willeford, O.K., Simpson, M.J., Stout, R., Rafferty, A. and Kingery, W.L. 2004. Acid phosphatase interactions with organo-mineral complexes: influence on catalytic activity. Biogeochemistry 71, 285-297.

Kennedy J. F. and White C.A. 1991. Principios de la inmovilización de enzimas. En: Wiseman, A (Ed.) Manual de biotecnología de las enzimas. Editorial Acribia S.A., Zaragoza, España, p. 139-199.

Kertens, W. J., Brooks, R. R., Reeves, R. D. and Jaffré, T. 1980. Nature of nickel complexes in *Psychotria douarrei* and other nickel-accumulating plants. Phytochemistry 19, 1963-1965.

Klabunde T, Sträter N, Fröhlich R, Witzel H and Krebs B. 1996. Mechanism of Fe(III)-Zn(II) purple acid phosphatase based on crystal structures. Journal of Molecular Biology 259, 737-748.

Kobayashi Y. and Aomine S. 1967. Mechanism of inhibitory effect of allophane and montmorillonite on some enzymes. Soil Science and Plant Nutrition 13, 180–194.

Kochian, L.V. 1993. Zinc absorption from hydroponic solutions by plant roots. In A.D.Robson, (Ed.), Zinc in soils and plants, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, p. 45-51.

Krotz, R. M., Evangelou, B. P. and Wagner, G. J. 1989. Relationship between cadmium, zinc, Cd-peptide, and organic acid in tobacco suspension cells. Plant physiology 91, 780-787.

Ladd J.N. and Butler J.H. 1975. Humus-enzyme systems and synthetic, organic polymer-enzyme analogs. In: Paul, EA., and McLaren A.D, (Eds), Soil Biochemistry 4. 143-194. Marcel Dekker, New York.

Laemmli, U.K. 197). Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685.

Lan, M., Comeford, N.B. and Fox, T.R. 1995. Organic anions effect on phosphorus release from spodic horizons. Soil Science Society of American Journal 59, 1745-1749.

Le Mare, P.H. 1977. Experiments on effects of phosphorous on the manganese nutrition of plants. III. The effect of calcium: phosphorous ratio on manganese in cotton grown in Buganda soil. Plant and Soil 47, 621–630.

Lee, C.R. 1972. Interrelationship of aluminum and manganese on the potato plant. Agronomy Jouranal 64, 546–549.

Lee, J., Pritchard, M., Sedcole, J. and Robertson, M. 1984. Aluminium and ammonium ion effects on the depletion of potassium from hydroponics solutions by *Trifolium repens* L. cv. Huia. Journal of Plant Nutrition 7, 1635-1650.

Leidi, E., Gómez, M. and De la Guardia, M. 1986. Evaluation of catalase and peroxidase activity as indicators of Fe and Mn nutrition for soybean. Journal of Plant Nutrition 9, 1239-1249.

Lindsay, W.L. 1979. Chemical Equilibria in Soils. John Wiley and Sons, New York.

Lipton, D.S., Blanchar, R.W. and Blevins, D.G. 1987. Citrate, malate, and succinate concentration in exudates from P-sufficient and P-stressed *Medicago sativa* L. seedlings. Plant Physiology 85, 315-317.

Luckarift, H.R, Spain, JC., Naik, R.R., Stone, M. 2004. Enzyme immobilization in a biomimetic silica support. Nature Biotechnology 22, 211-213.

Ma, J.F, Ryan, P. R. and E. Delhaize. 2001. Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. Trends in Plant Science 6, 273-278.

MacNicol, R. D. and Beckett P. H. 1985. Critical tissue concentrations of potentially toxic elements. Plant and Soil 85, 107-129.

Marschner, H.1995. Mineral Nutrition of Higher Plants. Academic Press Inc., London, p. 889.

Martinek K and Mozhaev V.V. 1985. Immobilization of enzymes: an approach to fundamental studies in biochemistry. Advances in Enzymology 57, 179-249.

Marzadori, C., Gessa, C. and Ciurli, S. 1998. Kinetic properties and stability of potato acid phosphatase immobilized on Ca-polygalacturonate. Biology and Fertility of Soils 27, 97–103.

Mathur, S.P., MacDougall, J.I., McGrath, M. 1980. Levels of activities of some carbohydrases, protease, lipase and phosphatase in organic soils of differing copper content. Soil Science 129, 376–385.

Mathys W. 1977. The role of malate, oxalate, and mustard oil glucosides in the evolution of zinc-resistance in herbage plants. Physiologia Plantarum 40, 130-136.

McLaughlin,M.J., Smoders, E. and Merckx, R. 1998. Soil-root interface: Physicochemical processes. In: Huang, P.M. (Ed.), Soil chemistry and ecosystem health. Soil Sci. Soc., p.233- 241.

McNaugth, K.J.1970. Diagnosis of mineral deficiencies in grass-legume pastures by plant analysis. In: Norman, M.J.T (Ed.), Proceedings of XI International Grassland Congress, University of Queensland Press. Queensland, p.334-338.

Memon, A. R., and Yatazawa, M. 1984. Nature of manganese complexes in manganese accumulator plant – *Acanthopanax sciadophylloides*. Journal Plant Nutrition, 7, 961-974.

Memon, A. R., Chino, M., Takeoka, Y., Hora, K. and Yatazawa, M. 1980. Distribution of manganeso in leaf tissues of a manganese accumulator: *Acanthopanax sciadophylloides* as revealed by electron probe X-ray microanalyzer. Journal of Plant Nutrition 2, 457-476.

Miyasaka, SC., Buta J G, Howell R. K. and Foy C. D. 1991. Mechanism of aluminum tolerance in snapbeans. Root exudation of citric acid. Plant Physiology 96, 737-743.

Mora M.L., R. Demanet F., E. Vistoso, F. Gallardo A. 2005. Influence of Sulfate Concentration in Mineral Solution on Ryegrass Grown at different pH and aluminium levels. Journal of Plant Nutrition 28, 1-16.

Mora, M., Alfaro, M., Williams, P. H., Stehr, W. y Demanet, R. 2004. Effect of fertilizer input on soil acidification in relation to growth and chemical composition of a pasture and animal production. Journal of Soil Science and Plant Nutrition (Chile) 4, 29-40.

Mora, M., Cartes, P., Demanet, R. and I. S. Cornforth. 2002. Effects of lime and gypsum on pasture growth and composition on acid Andisol in Chile, South America. Communications in Soil Science and Plant Analysis 33, 2069-2081.

Mora, M., Schnettler, B. y Demanet, R.1999. Effect of liming and gypsum on soil chemistry, yield and mineral composition of rygrass grown in an acidic Andisol. Communications in Soil Science and Plant Analysis 30,1251-1266.

Mora, M.L., Alfaro, M.A., Jarvis, S.C., Demanet, R. and Cartes, P. 2006. Soil aluminum availability in Andisols of southern Chile and its effect on forage production and animal metabolism. Soil Use and Management. Aceptado.

Moreno, D. A, Víllora, G. and Romero L. 2003. Variations in fruit micronutrient contents associated with fertilization of cucumber with macronutrients. Scientia Horticulturae 97, 121-127.

Moroni, J.S., Scott, B. J. and Wratten, N. 2003. Differential tolerance of high manganese among rapeseed genotypes. Plant and Soil 253, 507 – 519.

Mozzarelli, A. and Bettati, S. 2001. Functional properties of immobilized proteins. In: Nalwa H.S. (Ed.), Physical properties and applications, Overseas Publishers Association, Singapore, p. 55–97.

Mukhopadhyay, M.J.and Sharma, A. 1991. Manganese in cell metabolism of higher plants. Botanical Review 57,117–149.

Murphy, L.S., Ellis Jr., R., Adriano, D.C. 1981. Phosphorus-micronutrient interaction effects on crop production. Journal of Plant Nutrition 3, 593-613.

Naidja, A., Huang, P.M. and Bollag, J.-M. 1997. Activity of tyrosinase immobilized on hydroxylaluminum-montmorillonite complexes. Journal of Molecular Catalisis A: Chemical. 115, 305-316.

Nannipieri P, Caccanti B, Bianchi D, Bonmati M. 1985. Fractionation of hydrolase-humus complexes by gel chromatography. Biology and Fertility of Soils 1:25-29.

Nannipieri P, Sequi P, Fusi P. 1996. Humus and enzyme activity. In: A. Piccolo (Ed.) Humic substances in terrestrial ecosystems. Elsevier Science, London. P. 3–328.

Nazrul, A. K. 1986. Effects of interaction of calcium and manganese on the growth and nutrition of *Epilobium hirsutum* L. Soil Science and Plant Nutrition 32, 161-168

Neil, M.W. and Horner, M.W. 1964. Studies on acid hydrolases in adult and foetal tissues. Acid p-nitrophenyl phosphate phosphohydrolases of adult guinea-pig liver. Biochemical Journal 92**,** 217–224.

Neumann, G. and Römheld, V. 1999. Root excretion of carboxylic acids and protons in phosphorus-deficient plants. Plant and Soil 211, 121-130.

Neumann, G. and V. Römheld. 2000. The release of root exudates as affected by the plant physiological status. In Pinton, R., Varanini, Z., Nannipieri, P. (Eds.),The Rhizosphere: Biochemistry and Organic Substances at the Soil-Plant Interface, Marcel Dekker Inc., New York, p. 41-93.

Ohashi F., Wada, S.-I., Susuki, M., Maeda, M. y Tomura S. 2002. Synthetic allophane from high-concentration solutions: nanoengineering of the porous solid. Clay minerals 37, 451-456.

Ohki K. 1975. Mn and B effects on micronutrient and P in cotton. Agronomy Journal 67, 204-207.

Olczack, M., Morawiecka, B. and Watorek, W. 2003. Plant purple acid phosphatases-genes, structures and biological function. Acta Biochimimica Polonica 50, 1245-1257.

Parfit, R.L. 1990. Allophane in New Zealand – A Review. Australian Journal of Soil Research 28, 343–360.

Parker, D. R., Zelazny, L. W. and T. B. Kinraide. 1987. Improvements to the program GEOCHEM. Soil Science Society of America Journal 51. 488-491.

Parker, D.R. and Norvell, W.A. 1999. Advances in solution culture methods for plant mineral nutrition research. Advances in Agronomy 65, 151-213.

Pellet, D. M., Grunes D. L. and Kochian L. V. 1995. Organc acid exudation as an aluminum-tolerance mechanism in maize (*Zea mays* L.) Planta 196, 788-795.

Peters, G.H., Frimurer, T.M., Andersen, J.N. and Olsen, O.H. 2000. Molecular dynamics simulations of protein-tyrosine phosphatase 1B. II. Substrate-enzyme interactions and dynamics. Biophysical Journal 78, 2191-2200.

Pioselli, B., Bettati, S., Demidkina, T.V., Zakomirdina, L.N. Phillips, R.S. and Mozzarelli, A. 2004. Tyrosine phenol-lyase and tryptophan indole-lyase encapsulated in wet nanoporous silica gels: Selective stabilization of tertiary conformations. Protein Science 13, 913-924.

Podbielska, H. and Ulatowska-Jar˙Za, A. 2005. Sol-Gel Technology For Biomedical Engineering. Bulletin Of The Polish Academy Of Sciences Technical Sciences Vol. 53, 261-271.

Prasad, K.V. S. K., Pardha Saradhi, P., Sharmila, P. 1999. Concerted action of antioxidant enzymes and curtailed growth and zinc toxicity in *Brassica juncea*. Environmental and Experimental Botany 42, 1-10.

Prasad, M.N.V. 1998. Metal-biomolecule complexes in plants: Occurrence, functions, and applications. Analusis Magazine 26, 26-28.

Quiquampoix, H., Staunton, S., Baron, M.H. and Ratcliffe, R.G. 1993. Interpretation of the pH dependence of protein adsorption on clay mineral surfaces and its relevance to the

understanding of extracellular enzyme activity in soil. Colloids Surfaces A: Physicochem. Eng. Asp. 75, 85-93.

Quiquampoix H., Servagent-Noinville S. and Baron M.H. 2002. Enzyme adsorption on soil mineral surfaces and consequences for the catalytic activity: nuclear magnetic resonance and Fourier transform infrared spectroscopical elucidation of the mechanisms. In: Burns R. G., Dick, R. (Eds.), Enzymes in the Environment: Activity, Ecology and Applications, Marcel Dekker, Inc. New York, p. 285-306.

Rao, M.A. and Gianfreda L. 2000. Properties of acid phosphatase-tannic acid complexes formed in the presence of Fe and Mn. Soil Biology and Biochemistry 32, 1921-1926.

Rao, M.A., Gianfreda, L., Palmiero, F. and Violante, A. 1996. Interaction of acid phosphatase with clays, organic molecules and organo-mineralcomplexes. Soil Science 11, 751-760.

Rao, M.A., Violante, A. and Gianfreda, L. 2000. Interaction of acid phosphatase with clays, organic molecules and organo-mineralcomplexes: kinetics and stability. Soil Biology and Biochemistry 32, 1007-1014.

Reichman, S. M. 2002. The Responses of Plants to Metal Toxicity: A Review Focusing on Copper, Manganese and Zinc. AMEEF Paper 14. Australian Minerals and Energy Environment Foundation, Melbourne. pp. 59.

Rengel, Z. 1997. Mechanisms of plant resistance to toxicity of aluminium and heavy metals. In: Basra, A. S., Basra, R. K. (Eds.), Mechanisms of Environmental Stress Resistance in Plants, Harwood Academic Publishers, Amsterdam, p. 241-276.

Rengel, Z. 2000. Uptake and transport of manganese in plants. In: Sigel, A. Sigel, H. (Eds.) Metal Ions in Biological Systems, Marcel Dekker, New York, p. 57-87.

Rodríguez, J. 1993. La fertilización de los cultivos: Un método racional. Colección en Agricultura. Facultad de Agronomía. Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile. pp.291.

Rorison, H. and Robinson, D. 1986. Mineral nutrition. In: Chapman, S.B. and Moore, P.D. (Eds.), Methods in Plant Ecology, 2nd. Blackwell Scientific, Oxford, p. 145-213.

Ru, M.T., Hirokane, S.Y., Lo, A.S., Dordick, J.S., Reimer, J.A., & Clark, D.S. 2000. On the salt –induced activation of lyophilized enzymes in organic solvents: effect of salt kosmotropicity on enzyme activity. Journal of American Chemical Society 122, 1565-1571.

Sadzawka, A. 1987. Efecto del manganeso sobre el crecimiento y contenido de nutrientes en lentejas (*Lens culinaris*). Agricultura Técnica (Chile) 47, 350-354.

Sadzawka, A., Bernardi, C., Carrasco, M. y Tabilo, T. 1976. Manganeso activo en suelos volcánicos de Chile. Agrochimica. XX, N° 1.

Sadzawka, R., Angélica Renato Grez Z., María Adriana Carrasco R. y María de la Luz Mora G. 2004. Métodos de análisis de tejidos vegetales. 53 p. Santiago, Chile, Comisión de Normalización y Acreditación Sociedad Chilena de la Ciencia del Suelo. Santiago,
http://www.inia.cl/platina/pubycom/charlas/docs/asadzawka_tejveg_2004.pdf

Sarkar, J.M. and Burns, R.G. 1984. Synthesis and properties of α-D-glucosidase-polyphenolic copolymers as analogues of soil humic enzyme complexes. Soil Biology and Biochemistry 16, 619-625.

Sarkar, D., Pandey S.K., Sudb, K.C., Chanemougasoundharam, A. 2004. In vitro characterization of manganese toxicity in relation to phosphorus nutrition in potato (*Solanum tuberosum* L.). Plant Science 167, 977–986.

Schenk G., Lawrence R. G., Carrington L.E., Mitic N., Valizadeh M., Hamilton S.E., Jersey J. and Guddat L.W. 2005. Phosphate forms an unusual tripodal complex with the Fe-Mn center of sweet potato purple acid phosphatase. PNAS 102, 273-278.

Schützendübel, A., and Polle, A. 2002. Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. Journal of Experimental Botany 53, 1351-1365.

Shen S, Tu SI. 1999. Immobilization of horseradish peroxidase in cross-linked phyllo silicates: conditions and characterizations. Biotechnology and Applied Biochemistry 29, 185-189.

Shenhar, R., Norsten, T.B, Rotello, V.M. 2005. Polymer-Mediated Nanoparticle Assembly: Structural Control and Applications. Advanced Materials 17, 657 – 669.

Shepherd, T. and Davies, H.V. 1994.Effect of exogenous amino acids, glucose and citric acid on the patterns of short-term amino acid accumulation and loss of amino acids in the root zone of sand-cultured forage rape (*Brassica napus* L.) Plant and Soil 158, 111.

Shi, Q., Zhu, Z., Xu, M., Quian, Q., Yu J. 2005. Effect of excess manganese on the antioxidant system in *Cucumis sativus* L. under two light intensities. Environmental and Experimental Botany. In press.

Smith, G. S., Edmeades, D. C. and Upsdell, M. 1983. Manganese status of New Zealand pastures. 1. Toxicity in ryegrass, white clover and lucerne. New Zealand Journal of Agricultural Research 26 , 215-221.

Sparrow, L. A. and Uren, N. C. 1987. Oxidation and reduction of Mn in acidic soils: Effect of temperature and soil pH. Soil Biology and Biochemistry 19, 143-148.

Skujins, J. 1978. History of abiontic soil enzyme research. In: Burn, R. (Editor) Soil Enzymes. Academic Press, Kent, Inglaterra, p. 1-33.

Staunton, S. and F. Leprince. 1996. Effect of pH and some organic anions on the solubility of soil phosphate: implications for P bioavailability. European Journal of Soil Science 47, 231-239.

Stauton, S. and Quiquampoix, H. 1994. Adsorption and conformation of bovine serum albumin on montmorillonite: Modification of the balance between hydrophobic and electrostatic interactions by protein methylation and pH variation. J. Colloid. Interf. Sci. 166, 89-94.

Steffens, J.C. 1990. The heavy metal-binding peptides of plants. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 41, 553-57.

Sträter, N., Klabunde, T., Tucker, P., Witzel, H. and Krebs, B. 1995.Crystal structure of a purple acid phosphatase containing a dinuclear Fe(III)-Zn(II) active site. Science 268, 1489-1492.

Strobel, B.W. 2001. Influence of vegetation on low-molecular-weight carboxylic acids in soil solution- a review. Geoderma 9, 69-198.

Sugawara, S., Inamoto, Y., & Ushijima, M. 1981. Resolution and some properties of acid phosphatase isozymes bound to the cell wall of potato tubers. Agricultural Biology Chemistry 45, 1767-1774.

Sugiura, Y., Kawabe, H., Tanaka, H., Fujimoto, S., and Ohara, A. 1981. Purification, enzymatic properties, and active site environment of a novel Manganese (III)-containing acid phosphatase. Journal of Biology and Chemistry 256, 10664-10670.

Tanaka, K., Takio, S. and T. Satoh. 1995. Inactivation of the cytosolic Cu/Zn superoxide dismutase induced by copper deficiency in suspension cultured cells of *Marchantia paleacer* var. diptera. Journal of Plant Physiology 146, 361–365.

Tate, R.L. 2002. Microbiology and enzymology of carbon and nitrogen cycling. In: Burns RG y Dick R (Eds). Enzymes in the environment activity, ecology and applications. New York, Marcell Dekker, p. 227-238.

Taylor, G.J. and Foy, C.D. 1985. Differential uptake and toxicity of ionic and chelated copper in *Triticum aestivum*. Canadian Journal of Botany 63, 1271-1275.

Theng, BKG. 1979 .Formation and properties of clay-polymer complexes, Elsevier Science Publishing, New York, pp 157-226.

Tso, S., and Chen, Y. 1997. Isolation and characterization of a group III isozyme of acid phosphatase from rice plants. Botanical Bulletin of Academia Sinica, 38, 245-250.

Uehara, K., Fujimoto, S., and Taniguchi, T. 1974. Studies on violet-colored acid phosphatase of sweet potato. I. Purification and some physical properties. Journal of Biochemistry 75, 627-638.

Valenzuela, J L, del Rio A, López-Cantero I, Sánchez A and Romero L 1993 A method of establishing optimal endogenous N, Fe and Mn levels in tomato and cucumber. Acta Horticulturae 335, 443-448.

Van Gronsveld, J. and Clijters, H. 1994.Toxic effects of metals. In Farago, M.E: (Ed.), Plants and Chemical Elements - Biochemistry, Uptake, Tolerance and Toxicity. VCH, Weinheim, p. 149-177.

Violante, A. and Gianfreda, L. 2000. Role of biomolecules in the formation and reactivity towards nutrients and organics of variable charge minerals and organo-mineral complexes in soil environment. In: Bollag, J-M. and Stotsky, S. Soil Biochemistry 10, 207-270. Marcel Dekker, New York.

Violante, A., De Cristófaro, A., Rao, M.A. and Gianfreda, L. 1995. Physicochemical properties of protein- smectita and protein-$Al(OH)_x$-smectite complexes. Clay Minerals 30, 325-336.

Wada, K. 1985. The distinctive properties of Andosols. Advances in Agronomy 2, 173-229.

Wada, K. 1989. Allophane and imogolite. In Dixon J.B., Weed, S.B. (Eds.) Minerals in Soil Environments, 2 nd. SSSA Book Ser. 1. SSSA, Madison, WI, p.1051- 1087.

Wallace, A. 1980. Effect of chelating agents on uptake of trace metals when chelating agents are supplied to soil in contrast to when they are applied to solution culture. Journal of Plant Nutrition 2, 171- 189.

Wang, J., Evangelou, B. P., Nielson, M. T. and Wagner, G. J. 1992. Computer, simulated evaluation of possible mechanisms for sequestering metal ion activity in plant vacuoles II. Zinc. Plant Physiology 99, 621-626.

Welch, R., Norvell, W., Schaefer, S., Shaff, J. and Kochian, L. 1993.Induction of iron (III) and copper (II) reduction in pea (*Pisum sativum* L.) roots by Fe and Cu status. Does the root-cell plasma Fe (III) reductase perform a general role in regulating cation uptake?. Planta 190, 555-567 .

Wheeler, D.M. and Power, I.L. 1995. Comparison of plant uptake and plant toxicity of various ions in wheat. Plant and Soil. 172, 167-173.

Whitehead, D. 2000. Nutrient elements in grassland. Soil-Plant-Animal Relationships. CABI publishing, UK. pp 220-252.

Wissemeier, A. H. and Horst, W. J. 1992. Effect of light intensity on manganese toxicity symptoms and callose formation in cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) Plant Soil 143, 299-309.

Yang, X. E., Baligar, V. C., Foster, J. C. and Martens, D. C. 1997. Accumulation and transport of nickel in relation to organic acid in ryegrass and maize grown with different nickel levels. Plant and Soil 196, 271-276.

Yu, Q. and Rengel, Z. 1999. Micronutrient deficiency influences plant growth and activities of superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in narrow leaf lupines. Annals of Botany 183, 175–182.

Yuan, G. 2004. Environmental nanomaterials (Occurrence, Syntheses, Characterization, Health Effect, and Potential Applications). A special issue of Journal of Environmental Science and Health A39 (10) (in press).

Zambonelli, C., and Roberts, M.F. 2003. An iron-dependent bacterial phospholipase D reminiscent of purple acid phosphatases. Journal of Biological Chemistry 278, 13706-13711.

Zenk, M.H. 1996. Heavy metal detoxification in higher plants. A review. Gene. **179**, 21-30.

Zhang, Z.Q., Wong, M.H., Nie, X.P. and Lan, C.Y. 1998. Effects of zinc (zinc sulfate) on rhizobia-earleaf acacia (*Acacia auriculaeformis*) symbiotic association. Bioresource Technology 64, 97-104.

Zheng, S. J., Ma, J. F. and H. Matsumoto. 1998. High aluminum resistance in buckwheat. I. Al-induced specific secretion of oxalic acid from root tips. Plant Physiology 117, 745-751.