

---

**Faculdade Nilo De Stéfani**  
Trabalho de Graduação

**CENTRO ESTADUAL DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA “PAULA SOUZA”**  
**FACULDADE NILO DE STÉFANI DE JABOTICABAL - SP (Fatec-JB)**  
**CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM BIOCOMBUSTÍVEIS**

**AVALIAÇÃO DE BACTÉRIAS ORIUNDAS DE CULTIVO DO AMENDOIM PARA  
SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO**

**JAQUELINE DEL GROSSI**

**PROF. ORIENTADOR: DR. LUIZ FLÁVIO JOSÉ DOS SANTOS**  
**PROF. COORIENTADOR: DR. JOÃO MARTINS PIZAURO JUNIOR**  
**PROFA COORIENTADORA: MSA. ANNA CAROLINA DE OLIVEIRA SOUZA**

**JABOTICABAL, S.P.**

**2024**

**JAQUELINE DEL GROSSI**

**AVALIAÇÃO DE BACTÉRIAS ORIUNDAS DE CULTIVO DO AMENDOIM PARA  
SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO**

Trabalho de graduação (TG) apresentado à Faculdade de Tecnologia Nilo De Stéfani de Jaboticabal (Fatec-JB), como parte dos requisitos para a obtenção do título de Tecnóloga em **Biocombustíveis**.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Flávio José dos Santos

Coorientador: Prof. Dr. João Martins Pizauro Junior

Coorientadora: Profa. Msa. Anna Carolina de Oliveira Souza

**JABOTICABAL, S.P.**

**2024**

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Del Grossi, Jaqueline

Avaliação de bactérias oriundas de cultivo do amendoim para solubilização de fosfato/ Jaqueline Del Grossi. — Jaboticabal: Fatec Nilo de Stéfani, Ano. xxp.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Flávio José dos Santos

Coorientador: Prof. Dr. João Martins Pizauro Junior

Trabalho (graduação) – Apresentado ao Curso de Tecnologia em Biocombustíveis, Faculdade de Tecnologia Nilo de Stéfani - Jaboticabal, 2024.

1. *Arachis hypogaea* L.. 2. fosfatase; fósforo. 3 solo. I. Santos, L. F. J. II. Avaliação de bactérias oriundas de cultivo do amendoim para solubilização de fosfato.

JAQUELINE DEL GROSSI

**AVALIAÇÃO DE BACTÉRIAS ORIUNDAS DE CULTIVO DO AMENDOIM PARA  
SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO**

Trabalho de Graduação (TG) apresentado à Faculdade de Tecnologia Nilo de Stéfani de Jaboticabal (Fatec-JB), como parte dos requisitos para a obtenção do título de Tecnóloga em Biocombustíveis.

**Orientador:** Prof. Dr. Luiz Flávio José dos Santos

**Coorientador:** Prof. Dr. João Martins Pizauro Junior

**Coorientadora:** Profa. Msa. Anna Carolina de Oliveira Souza

**Data da apresentação e aprovação: 26/novembro/2024.**

**MEMBROS COMPONENTES DA BANCA EXAMINADORA**

**Presidente e Orientador: Prof. Dr. Luiz Flávio José dos Santos**

**Faculdade de Tecnologia Nilo de Stéfani de Jaboticabal (Fatec-JB)**

**Segundo membro da banca examinadora: Profa. Dra. Gislane Aparecida da Cunha  
Etec Bento Carlos Botelho do Amaral, Guariba, São Paulo, Brasil.**

**Terceiro membro da banca examinadora: Prof. Dr. Vitor Teixeira  
Etec Bento Carlos Botelho do Amaral, Guariba, São Paulo, Brasil.**

**Local:** Faculdade de Tecnologia Nilo de Stéfani de Jaboticabal (Fatec-JB)  
Jaboticabal – SP – Brasil

Dedico esse trabalho a todos que me apoiaram até aqui e, especialmente, ao meu próprio esforço.

## **AGRADECIMENTOS**

A minha colega e amiga Isadora Maria Ziviani Fernandes por me ajudar e apoiar,

A meus orientadores e coorientadores Luiz Flávio José dos Santos, João Martins Pizauro Junior e Anna Carolina de Oliveira Souza por me fornecerem todo o auxílio e apoio necessários;

À Fatec-JB, aos gestores, professores, ao Laboratório de Bioquímica de microrganismos e de Plantas (LBMP) e ao CNPq pela bolsa de Iniciação Científica.

DEL GROSSI, Jaqueline. **Avaliação de bactérias oriundas de cultivo do amendoim para solubilização de fosfato**. Trabalho de Graduação. Centro Estadual de Educação Tecnológica “Paula Souza”. Faculdade de Tecnologia de Jaboticabal. 38 p. 2024.

## RESUMO

O amendoim (*Arachis hypogaea* L.) é uma oleaginosa economicamente importante no Brasil. Porém a carência de fósforo solúvel no solo limita a produção agrícola. Este trabalho teve por objetivo avaliar a capacidade de duas cepas bacterianas de uma cultura do amendoim em solubilizar fosfato e estudar parâmetros cinéticos da enzima fosfatase. A pesquisa, conduzida com cepas de *Burkholderia* e *Paraburkholderia*, focou na enzima fosfatase ácida. O estudo envolveu o cultivo das bactérias em diferentes concentrações de fosfato, sendo essas 0,1 mM; 0,5 mM e 1 M, avaliando posteriormente os efeitos do pH, do tempo de reação e de íons (Zn e Mg) sobre a atividade enzimática. Os resultados mostraram que pH ácido e menor concentração de fosfato favorecem o crescimento bacteriano e a atividade enzimática, promovendo a disponibilidade de fósforo, além de a enzima ser predominantemente de membrana. Assim, conclui-se que essas bactérias possuem considerável potencial para melhorar a fertilidade do solo, e ao utiliza-las agricultores podem aumentar os rendimentos das colheitas, especialmente em solos deficientes em fósforo.

**Palavras-chave:** *Arachis hypogaea* L.; fosfatase; fósforo; solo.

DEL GROSSI, Jaqueline. **Evaluation of bacteria from peanut cultivation for phosphate solubilization.** Trabalho de Graduação. Centro Estadual de Educação Tecnológica “Paula Souza”. Faculdade de Tecnologia de Jaboticabal. 38 p. 2024.

### **ABSTRACT**

Peanuts (*Arachis hypogaea* L.) are an economically significant oilseed crop in Brazil. However, phosphorus deficiency in the soil poses a significant challenge to agricultural production. This research was conducted with strains of *Burkholderia* and *Paraburkholderia*, focusing on the enzyme known as acid phosphatase. The study involved growing the bacteria in various concentrations of phosphate, after which the effects of pH, reaction time and ions (Zn and Mg) on enzymatic activity were evaluated. The results indicated that acidic pH and lower phosphate concentrations favor both bacterial growth and enzymatic activity, leading to enhanced phosphorus availability. Thus, it is concluded that these bacteria have considerable potential to improve soil fertility, and by using them farmers can increase crop yields, especially in phosphorus-deficient soils.

**Keywords:** *Arachis hypogaea* L.; phosphatase; phosphate; soil.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Curva de crescimento das bactérias De 7, De 13 e De 15 em meio LB líquido durante 48 horas medida em espectrofotômetro a 600 nm.	25
<b>Figura 2</b>	Curva de crescimento da linhagem <i>Burkholderia ambifaria</i> (RZ2MS16) durante 26 horas de cultivo em meio LB sob agitação constante (150 rpm) á 28 °C feita em espectrofotômetro no comprimento de onda de 600 nm.	26
<b>Figura 3</b>	Curva de crescimento da bactéria De 7 durante o período de 48 horas em diferentes concentrações de fosfato de potássio $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (0,1 mmol, 0,5 mmol e 1,0 mmol).	27
<b>Figura 4</b>	Curva de crescimento da bactéria De 13 durante o período de 48 horas em diferentes concentrações de fosfato de potássio $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (0,1 mmol, 0,5 mmol e 1,0 mmol).	28
<b>Figura 5</b>	Curva de crescimento da bactéria De 15 durante o período de 48 horas em diferentes concentrações de fosfato de potássio $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (0,1 mmol, 0,5 mmol e 1,0 mmol).	29
<b>Figura 6</b>	Atividade enzimática das diferentes frações da bactéria De 15 expressa em nanomols de produto gerado por minuto por ml de proteína.	30
<b>Figura 7</b>	Efeito do pH sobre a atividade enzimática utilizando-se os tampões Glicina (pH 3,0-4,5), Acetato (pH 4,5-6,5) e Tris (pH 6,5-8,5) expressa em nanomols de produto gerado por minuto por mg de proteína.	31
<b>Figura 8</b>	Efeito do tempo de reação sobre a atividade enzimática da fração P expressa em nanomols de produto gerado por minuto por mg de proteína.	32
<b>Figura 9</b>	Atividade enzimática da fração P da bactéria De 15 após 15 horas de crescimento com Zn e Mg, sem Mg, sem Zn e sem Zn e Mg medida em espectrofotômetro a 410 nm expressa em nanomols por minuto por mg de proteína.	33

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Identificação das cepas utilizadas	21
<b>Tabela 2</b>	Desvio padrão das médias das atividades da curva de pH.	31
<b>Tabela 3</b>	Desvio padrão das médias das atividades de variação de tempo de reação.	32

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
<b>2 REVISÃO BILIOGRÁFICA.....</b>	<b>18</b>
<b>2.1 Enzima .....</b>	<b>18</b>
<b>2.2 Bactérias selecionadas .....</b>	<b>18</b>
<b>3 METODOLOGIA DA PESQUISA .....</b>	<b>20</b>
<b>3.1.1 Materiais e métodos.....</b>	<b>21</b>
<b>3.1.1.1 Avaliação do crescimento bacteriano e adequação do estoque .....</b>	<b>21</b>
<b>3.1.1.2 Preparo das amostras para atividade enzimática.....</b>	<b>21</b>
<b>3.1.1.3 Dosagem de Proteína .....</b>	<b>22</b>
<b>3.1.1.4 Atividade p-nitrofenilfosfatásica (PNPPásica) das fosfatases .....</b>	<b>22</b>
<b>3.1.1.5 Efeito da variação do pH sobre a atividade enzimática .....</b>	<b>22</b>
<b>3.1.1.6 Efeito da variação de tempo sobre a atividade enzimática .....</b>	<b>23</b>
<b>3.1.1.7 Efeito da presença dos íons Zinco e Magnésio sobre a atividade enzimática .....</b>	<b>23</b>
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>24</b>
<b>4.1 Curva de crescimento .....</b>	<b>24</b>
<b>4.2 Curva de crescimento em meio contendo fosfato .....</b>	<b>25</b>
<b>4.3 Atividade p-nitrofenilfosfatásica (PNPPásica) das fosfatases .....</b>	<b>28</b>
<b>4.4 Efeito da variação do pH sobre a atividade enzimática .....</b>	<b>29</b>
<b>4.6 Efeito da presença dos íons Zinco e Magnésio sobre a atividade enzimática .....</b>	<b>31</b>
<b>5 CONCLUSÃO.....</b>	<b>34</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>35</b>
<b>APÊNDICE A – TERMO DE ORIGINALIDADE .....</b>	<b>37</b>
<b>ANEXO A – DECLARAÇÃO DE AUTORIZAÇÃO DA EMPRESA e/ou LABORATÓRIO.....</b>	<b>38</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O amendoim (*Arachis hypogaea* L.) é originário da América do Sul (Andrade, 2021) e é considerado uma das oleaginosas de maior importância econômica mundial. O amendoinzeiro é uma planta herbácea de ciclo anual amplamente adaptado às condições de clima de todas as regiões do Brasil, tendo inclusive, potencial para superar períodos de seca (Andrade, 2021). É amplamente cultivado na América, além de ser cultivado na Ásia e na África devido sua grande capacidade de se adaptar às diferentes condições climáticas, de solo, e hídricas (Andrade, 2021). Sua produção no Brasil tem se expandindo, com produção de 597 mil toneladas na safra de 2020/2021 (Andrade, 2021) e com uma previsão estimada em 908,3 mil toneladas na safra de 2023/2024 (CONAB, 2024). Devido às adaptações citadas anteriormente, o Brasil mostra valores de produtividade expressivas para essa cultura, estando entre os 10 primeiros exportadores mundiais de amendoim em grão, sendo São Paulo o estado que concentra a produção do amendoim e seus produtos (Samapio e Fredo, 2019).

Embora essa cultura apresente grande adaptabilidade às condições climáticas e ambientais, sua produtividade pode sofrer oscilações devido a alguns aspectos, tais como o solo e a quantidade de nutrientes presentes no mesmo. A exigência de fósforo do amendoim é moderada e ele tem a capacidade de absorvê-lo eficientemente mesmo em solos com baixos teores do nutriente (Andrade, 2021). Contudo, esse nutriente é exigido pela planta até o fim de sua maturação, visto que a maior parte dele (73%) é destinado para os grãos (Léles, 2012; Crusciol *et al.*, 2019). A produção agrícola pode, portanto, ser limitada pela deficiência desse elemento.

O fósforo é um elemento indispensável para os seres vivos, pois ele participa de reações metabólicas em plantas e animais, como fotossíntese, respiração, transferência de características genéticas além da transferência e armazenagem de energia por meio de moléculas de trifosfato de adenosina (ATP) (Braz, 2011). Segundo Reis (2021), este elemento é parte da composição de macromoléculas essenciais para os vegetais, como proteínas, coenzimas, ácidos nucleicos e fosfolipídios, participando, também, da atividade de alguns hormônios. O fósforo é o elemento, depois do nitrogênio, que mais limita a produção agrícola, pois, apesar de estar presente no solo, tanto de forma orgânica quanto inorgânica, é indisponível para as plantas, isso porque ele se encontra ligado a outros minerais que o tornam menos solúvel (Braz, 2011). Esse elemento pode ser encontrado de duas formas: orgânica, presente em seres vivos, e inorgânica, oriundo de rochas (Rombola, 2008). Entretanto, sua disponibilidade no solo para os vegetais é baixa devido a sua forte ligação com outros minerais como cálcio (Ca), ferro (Fe) e alumínio (Al), formando compostos com baixa solubilidade que não são assimiláveis

pelas plantas, o que restringe seu crescimento (Braz, 2011). Algumas características do solo determinam a disponibilidade de fósforo no solo, dentre elas o pH se destaca, pois influencia na disponibilidade de fósforo para os vegetais, pois esse fator determina grande parte da ionização do mesmo, dependendo dos elementos com os quais o fósforo está associado (Braz, 2011). Solos com pH alcalino apresentam grande quantidade de fosfato de cálcio, enquanto solos ácidos são ricos em ferro e alumínio, que, unidos ao fósforo, formam compostos com menor solubilidade se comparados ao fosfato de cálcio (Braz, 2011). Os solos brasileiros apresentam teores de fósforos insuficientes para as exigências das plantas (Sandrini, 2011), devido pH ácido da maioria dos solos do Brasil.

Uma das alternativas para minimizar a deficiência de fósforo no solo é a utilização de bactérias capazes de solubilizá-lo em sua forma insolúvel e torná-lo disponível para as plantas (Braz, 2011). Segundo Rombola (2008), os microrganismos têm um papel importante no funcionamento, no ecossistema e sustentabilidade da biosfera das raízes das plantas, pois são responsáveis por realizar praticamente todos os processos bioquímicos no microambiente e por disponibilizar nutrientes para plantas e até animais. Os microrganismos solubilizadores de fosfato podem atuar na molécula de fósforo inorgânico do solo ou mineralizando fósforo orgânico por meio de diferentes mecanismos. Quanto a mineralização do fósforo orgânico, é necessária a atividade de organismos sapotróficos, que liberam ortofosfato radical da estrutura do carbono, sendo necessária a ação de enzimas fosfatases microbianas para hidrolisar o fósforo orgânico em inorgânico (Nascimento, 2022).

Fosfatases ácidas bacterianas são enzimas produzidas por bactérias solubilizadoras de fosfato que geralmente são capazes de desfosforilar moléculas com fósforo (Rombola, 2008). Essas enzimas são classificadas de acordo com seu pH ótimo de atuação, sendo divididas em fosfatases ácidas, neutras e alcalinas, elas podem ser encontradas na rizosfera das plantas, ou seja, na região próxima à raiz, e isso se deve ao grande acúmulo de compostos orgânicos associados a membrana de microrganismos ou livres no solo (Sandrini, 2011). A maioria dos microrganismos presentes no solo possui atividade de algum tipo de fosfatase (Braz, 2011). Essas enzimas tornam o fósforo insolúvel do solo em formas disponíveis para as plantas, por meio da transformação do fósforo orgânico em inorgânico, fazendo com que ele seja absorvido por elas (Braz, 2011).

Diante do exposto, estudos focados em analisar bactérias com capacidade de solubilização de fosfato através da enzima fosfatase ácida se mostram muito promissores para melhoria da agricultura.

## 2 REVISÃO BILIOGRÁFICA

### 2.1 Enzima

#### **Fosfatase ácida**

As fosfatases são classificadas de acordo com seu pH ótimo, sendo divididas em fosfatases ácidas, neutras e alcalinas, elas podem ser encontradas na rizosfera das plantas, ou seja, na região próxima à raiz, e isso se deve ao grande acúmulo de compostos orgânicos associados a membrana de microrganismos ou livres no solo (Sandrini, 2011). Para que o fósforo solúvel esteja disponível no solo, é preciso a atividade enzimática da fosfatase microbiana, que o hidrolisa em fósforo inorgânico (Nascimento, 2022). A maioria dos microrganismos presentes no solo possui atividade de algum tipo de fosfatase (BRAZ, 2011). Essas enzimas podem ser secretadas para fora da membrana plasmática de forma solúvel ou serem mantidas ligadas a ela, outras ainda podem ser encontradas no citoplasma e estão envolvidas em reações de desfosforilação decorrentes de sinais de transdução e vias metabólicas dos microrganismos (Rombola, 2008).

Essas enzimas tornam o fósforo insolúvel do solo em formas disponíveis para as plantas, por meio da transformação do fósforo orgânico em inorgânico, fazendo com que ele seja absorvido por elas (Braz, 2011). Devido a isso, as fosfatases ácidas produzidas por microrganismos são importantes, fazendo com que moléculas orgânicas que apresentam fosfato como radical livre sofram ciclagem, liberando álcool e ácido fosfórico (Fachinelli, 2018).

### 2.2 Bactérias selecionadas

#### ***Burkholderia***

Várias espécies de bactérias do gênero *Burkholderia* são capazes de colonizar raízes, caules e folhas das plantas, desenvolvendo relações benéficas com elas. O complexo de bactérias *Burkholderia cepacia* é amplamente encontrado na natureza, estando presente, inclusive, no solo e na rizosfera de diversas culturas (ROMBOLA, 2008).

De acordo com Rombola (2008), a *Burkholderia cepacia* produz ácidos orgânicos e, por isso, é capaz de solubilizar fosfato tricálcio, além de, conforme dito em relatos, cepas dessa bactéria estarem envolvidas na remoção de fosfatos e o acúmulo de polifosfatos sob condições de baixo pH. Segundo Braz (2011), essa espécie tem a capacidade de sintetizar fosfatase ácida na ausência de fosfato solúvel.

#### ***Paraburkholderia***

A maioria das espécies de *Paraburkholderia* são encontradas no solo originário de ecossistemas florestais e muitas delas têm a capacidade de nodulação radicular (Wilhelm *et al.*, 2020). As bactérias desse do gênero são conhecidas por sua versatilidade metabólica, incluindo espécies fixadoras de nitrogênio (N), degradadoras de xenobióticos e solubilizadoras de fosfato de acordo com Nascimento, (2022), várias espécies desse gênero são classificadas como RPCPs (rizobactérias promotoras do crescimento de plantas). Rizóbios de *Paraburkholderia* foram isolados na América do Sul, predominantemente no Brasil, nos biomas Cerrado e Caatinga associados com espécies de *Mimosa* spp.

### 3 METODOLOGIA DA PESQUISA

#### 3.1 Bactérias

As bactérias foram selecionadas do banco de dados do laboratório de bioquímica de microbiologia e de plantas (LBMP) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (UNESP), Campus Jaboticabal.

Na Tabela 1, estão o gênero das bactérias utilizadas e suas respectivas siglas do laboratório.

**Tabela 1-** Tabela de identificação das cepas utilizadas

<b>Sigla do laboratório</b>	<b>Gênero</b>
<b>De 7</b>	<i>Burkholderia</i>
<b>De 13</b>	<i>Paraburkholderia</i>
<b>De 15</b>	<i>Paraburkholderia</i>

#### 3.2 Manutenção das bactérias

As bactérias foram inoculadas em meio líquido LB em Erlenmeyer contendo: triptona (10 g/L), cloreto de sódio (NaCl) (10 g/L) e extrato de levedura (5 g/L), pH 6,9.

#### 3.3 Curva de crescimento

As cepas foram inoculadas em meio líquido LB, sendo utilizadas 3 erlenmeyers para cada uma das bactérias e um controle. Os erlenmeyer foram mantidos na incubadora shaker a 30°C a 150 rpm. Então, foram retiradas aliquotas de 1 ml durante 48 horas nos tempos de 0, 1, 15, 24 e 48 horas, medidas em espectrofotômetro PHOX V12 a 600 nm. Com esses dados, montou-se uma curva de crescimento, utilizada para dar início aos testes. O experimento foi realizado em triplicata.

#### 3.4 Indução da fosfatase

As bactérias foram cultivadas em meio Czapeck líquido compondo-se de: glicose 20 g/L; nitrato de sódio (NaNO<sub>3</sub>) 2,0 g/L; sulfato de magnésio hepta-hidratado (MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O) 0,5 g/L; cloreto de potássio (KCl) 0,5 g/L; sulfato ferroso (FeSO<sub>4</sub>) 0,1 g/L; em diferentes concentrações de fosfato de potássio KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6,8, sendo essas 0,1 mM, 0,5 mM e 1 M. O meio líquido Czapeck foi mantido por 48 horas, sob uma constante agitação rotativa em 150 rpm, a 30° C, em erlenmeyer de 125 mL (Sato, 2011).

Foram escolhidas as concentrações de 0,1 mmol, 0,5 mmol e 1,0 mmol de fosfato de potássio para a realização do experimento. O experimento foi realizado em triplicata. Essa metodologia foi adaptada de Sato, 2011.

### **3.1.1 Materiais e métodos**

#### **3.1.1.1 Avaliação do crescimento bacteriano e adequação do estoque**

As cepas foram inoculadas, sendo utilizados 3 erlenmeyer para cada uma das bactérias e 1 controle em cada triplicata. Os erlenmeyer foram mantidos shaker a 30°C a 150 rpm. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi diluído em meio Czapeck nas concentrações de 0,1 mmol, 0,5 mmol e 1,0 mmol de fosfato de potássio. O experimento foi realizado em triplicata contendo 40 mL de meio em cada erlenmeyer. Os meios foram mantidos em constante rotação em uma incubadora shaker a 30 °C a 150 rpm. O crescimento das bactérias foi acompanhado durante 48 horas, onde nos intervalos de 0, 1, 15, 24 e 48 horas foram retiradas amostras de 1 ml de cada erlenmeyer e mediu-se a absorbância de cada amostra no espectrofotômetro PHOX V12 a 600nm. Com os resultados obtidos nessas medições, foi montada a curva de crescimento bacteriano. Essa metodologia foi baseada em Sato, 2011.

#### **3.1.1.2 Preparo das amostras para atividade enzimática.**

A cepa De 15 foi selecionada para a continuidade dos experimentos. A bactéria foi inoculada em meio líquido LB, sendo utilizados um Erlenmeyer para a bactéria e um controle. Os erlenmeyers foram mantidos em agitação em um shaker a 30°C a 150 rpm. Após 24 horas, a bactéria foi lavada em solução salina de NaCl 0,85%, foram centrifugados durante 20 minutos a 10000 rpm a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuscitado em meio Czapeck na concentração de 0,1 mmol de fosfato de potássio em Erlenmeyer, sendo 3 Erlenmeyers para a bactéria e um controle. Os Erlenmeyers foram mantidos em constante rotação em incubadora shaker a 30 °C a 150 rpm. Foram retiradas amostras de 80 ml do meio nos após 1, 6 e 15 horas de crescimento bacteriano.

As amostras foram centrifugadas a 10000g durante 10 min a 4°C. Após o término da centrifugação, o sobrenadante (S1) foi reservado. O precipitado foi ressuscitado em tampão acetato 1M pH 6,0 em homogeneizador do tipo POTTER e centrifugado durante 10 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuscitado em tampão acetato 1M pH 6,0 em homogeneizador do tipo POTTER e submetido a sonicação de 50 micro pulsos por minuto durante 3 ciclos, foi centrifugado novamente a 100000g a 4°C durante 1 hora. O sobrenadante (S2) foi reservado e o precipitado (P) foi ressuscitado em tampão acetato 1M pH 6,0 em

homogeneizador do tipo POTTER e reservado. Todas as amostras coletadas foram mantidas a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

O primeiro sobrenadante foi submetido a um processo de diálise em tampão acetato 1M pH 6,0 durante 12 horas, substituindo-se o tampão após 6 horas.

### **3.1.1.3 Dosagem de Proteína**

A concentração de proteína total foi determinada por meio do método de Bradford (1976). Utilizou-se inicialmente uma reta-padrão preparada com albumina sérica bovina em diferentes concentrações. Em sequência, utilizou-se as três amostras (S1, S2 e P) de extraídas após 1, 6 e 15 horas de cultivo bacteriano e estimou-se a quantidade de proteína em espectrofotômetro a 595nm.

### **3.1.1.4 Atividade p-nitrofenilfosfatásica (PNPPásica) das fosfatases**

A atividade PNPPásica foi realizada nas 3 frações (S1, S2 e P) extraídas do meio após 15 horas de cultivo bacteriano, foi determinada a  $37^{\circ}\text{C}$  por meio da formação do íon p-nitrofenolato ( $\epsilon = 17600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , pH 13) a partir da hidrólise de p-nitrofenilfosfato 1M em tampão Acetato 1M pH 6,0 contendo  $\text{MgCl}_2$  2 mM, de  $\text{ZnCl}_2$  1mM e PNPP 1 mM.

A reação enzimática foi iniciada pela adição do extrato enzimático ao meio de reação e interrompida por meio da adição de 1 mL de NaOH 1M após 30 minutos de reação, a absorvância foi determinada a 410nm. As determinações foram efetuadas em triplicatas.

Uma unidade de atividade enzimática foi definida e expressa como a quantidade de enzima que libera um nmol de p-nitrofenolato por minuto por mL de solução enzimática, nas condições de ensaio.

### **3.1.1.5 Efeito da variação do pH sobre a atividade enzimática**

O efeito do pH sobre a atividade das fosfatases foi determinado na fração P extraída do meio após 15 horas de cultivo bacteriano utilizando-se as seguintes soluções tampão: Glicina (pH 3,0-4,5), Acetato (pH 4,5-6,5) e Tris (pH 6,5-8,5), em concentração 100nM. A atividade foi determinada conforme descrito no item anterior.

Uma unidade de atividade enzimática foi definida e expressa como a quantidade de enzima que libera um nmol de p-nitrofenolato por minuto por miligrama de proteína presente no extrato, nas condições de ensaio.

### **3.1.1.6 Efeito da variação de tempo sobre a atividade enzimática**

O efeito da variação do tempo sobre a atividade enzimática foi realizado na fração P extraídas do meio após 15 horas de cultivo bacteriano utilizando-se o tampão Acetato pH 4,5 nas variações de tempo de 5, 10, 15 e 20 minutos de reação. A atividade foi determinada conforme descrito no item 3.1.1.4.

Uma unidade de atividade enzimática foi definida e expressa como a quantidade de enzima que libera um nmol de p-nitrofenolato por minuto por miligrama de proteína presente no extrato, nas condições de ensaio.

### **3.1.1.7 Efeito da presença dos íons Zinco e Magnésio sobre a atividade enzimática**

O efeito dos íons de zinco e magnésio sobre a atividade enzimática foi realizada durante 15 minutos na fração P extraídas do meio após 15 horas de cultivo bacteriano utilizando-se o tampão Acetato pH 4,5 nas seguintes condições: com  $MgCl_2$  e  $ZnCl_2$ , sem  $ZnCl_2$ , sem  $MgCl_2$  e sem  $MgCl_2$  e  $ZnCl_2$ . A atividade foi determinada conforme descrito no item 3.1.1.4.

Uma unidade de atividade enzimática foi definida e expressa como a quantidade de enzima que libera um nmol de p-nitrofenolato por minuto por miligrama de proteína presente no extrato, nas condições de ensaio.

### **Análise estatística**

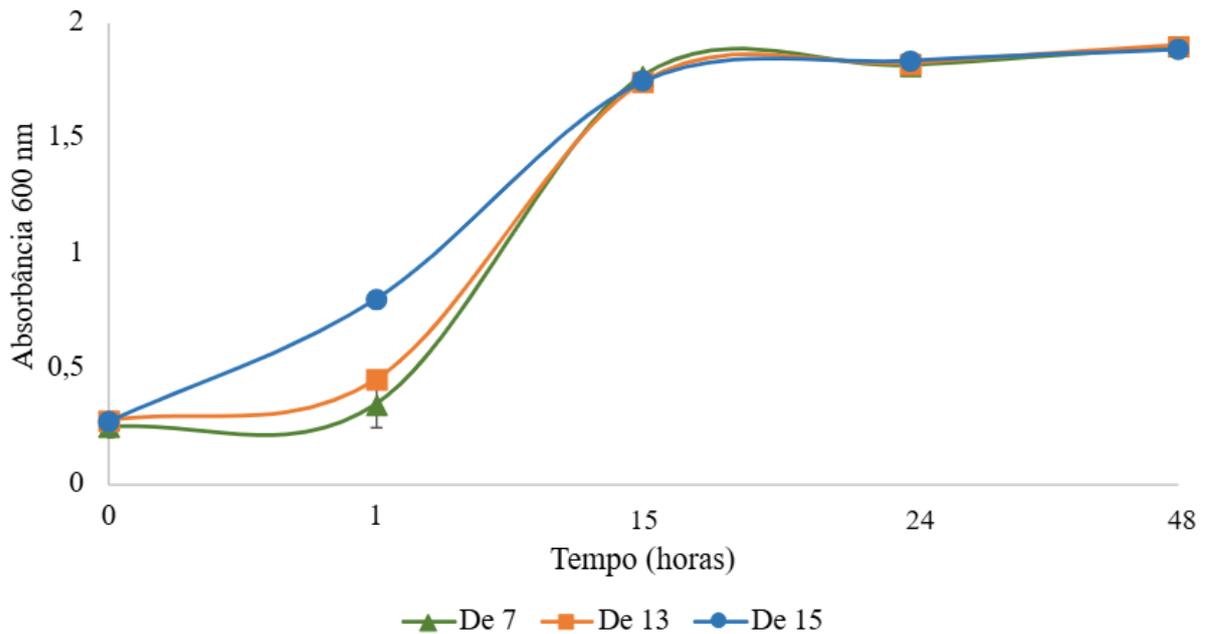
As análises estatísticas foram realizadas por meio do programa “SAS system” versão 9.0, considerando-se três repetições. Foram realizados testes de homocedasticidade, de normalidade dos erros, análise de variância e teste de Tukey para comparação das médias a 5% de probabilidade

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Curva de crescimento

A Figura 1 apresenta um gráfico de crescimento bacteriano das cepas estudadas em meio LB acompanhado durante 48 horas.

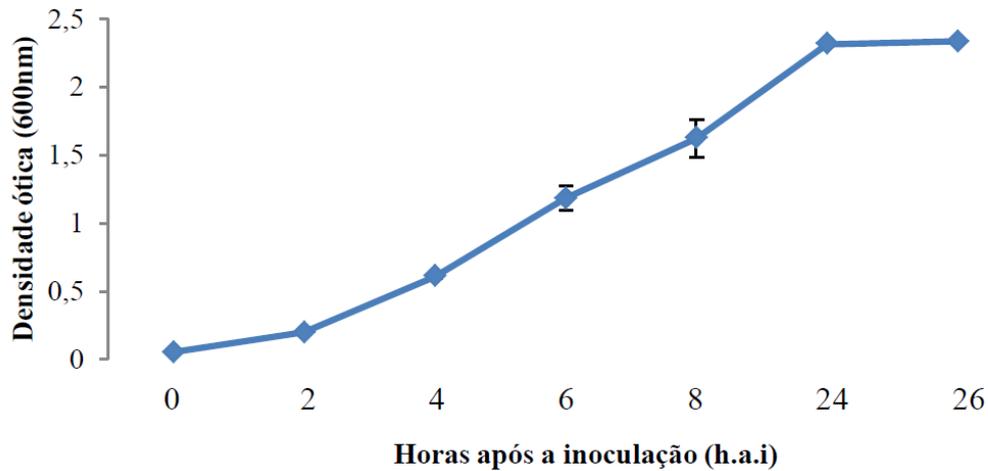
**Figura 1-** Curva de crescimento das bactérias De 7, De 13 e De 15 em meio LB líquido durante 48 horas medida em espectrofotômetro a 600 nm.



Fonte: O autor (2023).

A Figura 2 apresenta um gráfico de crescimento bacteriano da cepa *Burkholderia ambifaria* estudada por Tschoeke, 2016, para comparação do crescimento da cepa De 7.

**Figura 2-** Curva de crescimento da linhagem *Burkholderia ambifaria* (RZ2MS16) durante 26 horas de cultivo em meio LB sob agitação constante (150 rpm) á 28 °C feita em espectrofotômetro no comprimento de onda de 600 nm



Fonte: TSCHOEKE, 2016

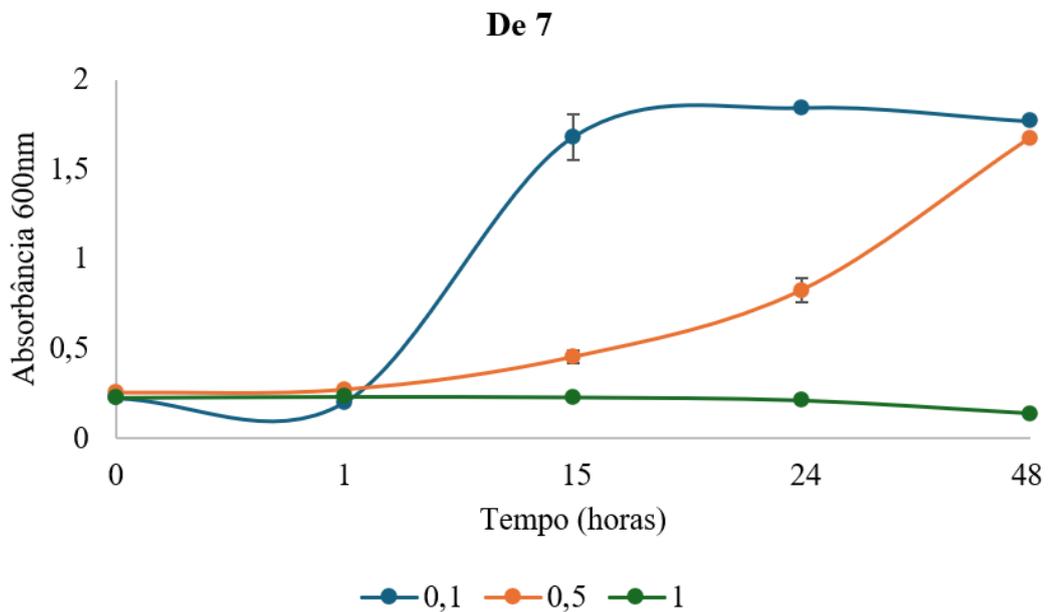
A Figura 2 apresenta um gráfico de uma bactéria da mesma família da De 7 (*Burkholderia*) cultivada em condições semelhantes às do experimento apresentado. Pode-se observar que a curva da bactéria De 7 entrou na fase exponencial com menos horas de cultivo do que a apresentada na curva de Tschoeke, 2016.

O crescimento das bactérias De 13 e 15 foi comparado com uma bactéria da mesma família de ambas (*Paraburkholderia*) do trabalho de Araújo, 2021, o qual apresenta uma curva de crescimento dessa bactéria em diferentes meios de cultivo. Observou-se que os microrganismos apresentaram crescimentos semelhantes na mesma medida de tempo.

#### 4.2 Curva de crescimento em meio contendo fosfato

Pode-se observar pela análise da Figura 3 que a bactéria De 7 apresentou maior crescimento na concentração 0,1 mmol de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Na concentração de 0,5 mmol, o crescimento bacteriano demonstrou ser mais lento, entrando na fase exponencial apenas 15 horas após o início do experimento e se mantendo assim até o final do tempo experimental. Contudo, na concentração 1,0 mmol, a bactéria não apresentou crescimento significativo durante o período experimental.

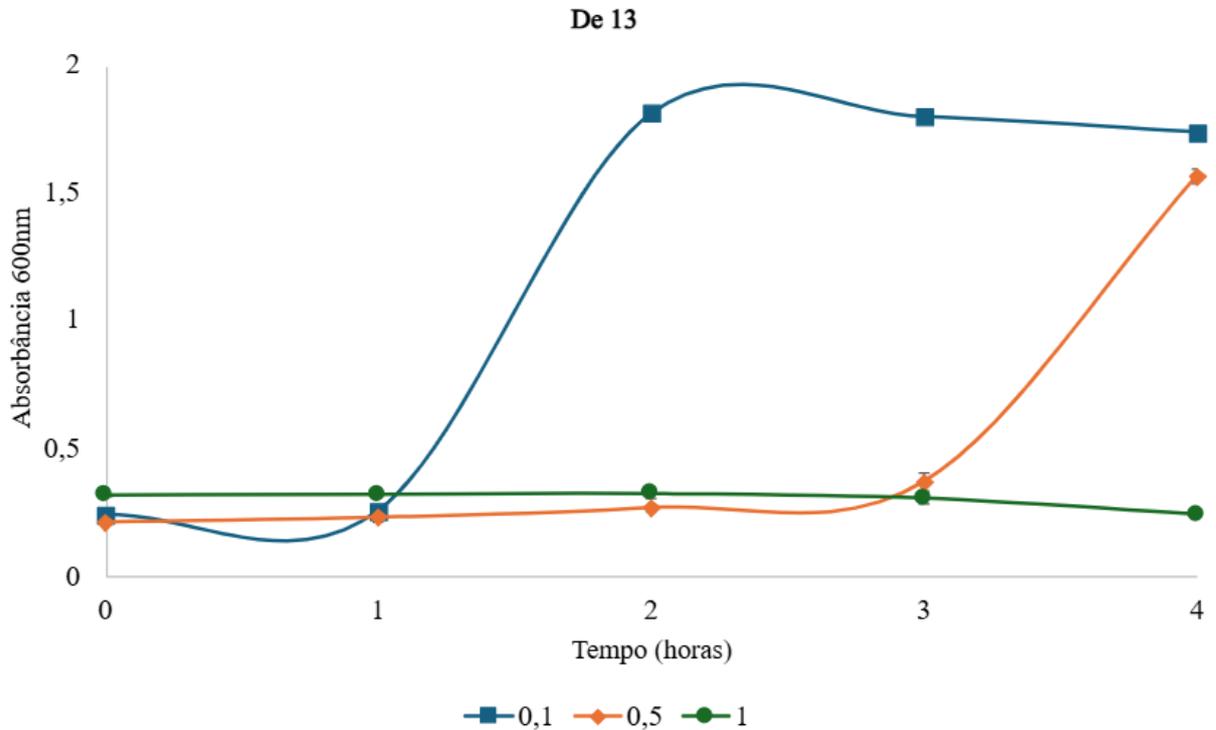
**Figura 3** - Curva de crescimento da bactéria De 7 durante o período de 48 horas em diferentes concentrações de fosfato de potássio  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,1 mmol, 0,5 mmol e 1,0 mmol).



**Fonte:** O autor (2023).

Com base nos dados apresentados na Figura 4, na concentração 0,1 mmol de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a bactéria De 13 apresentou crescimento satisfatório, demonstrando boa adaptação ao meio. Entretanto, na concentração 0,5 mmol, pode-se observar que a bactéria demonstrou crescimento tardio se comparado com a concentração 0,1 mmol, pois a fase exponencial de crescimento pode apenas ser observada após 48 horas. Já na concentração 1,0 mmol de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , a bactéria não cresceu de maneira significativa. No trabalho de Sato, 2016, a bactéria do gênero *Enterobacter* sp. apresentou uma diminuição da expressão quando cultivada em altas concentrações de fosfato, o que corrobora com os resultados obtidos.

**Figura 4** - Curva de crescimento da bactéria De 13 durante o período de 48 horas em diferentes concentrações de fosfato de potássio  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,1 mmol, 0,5 mmol e 1,0 mmol).

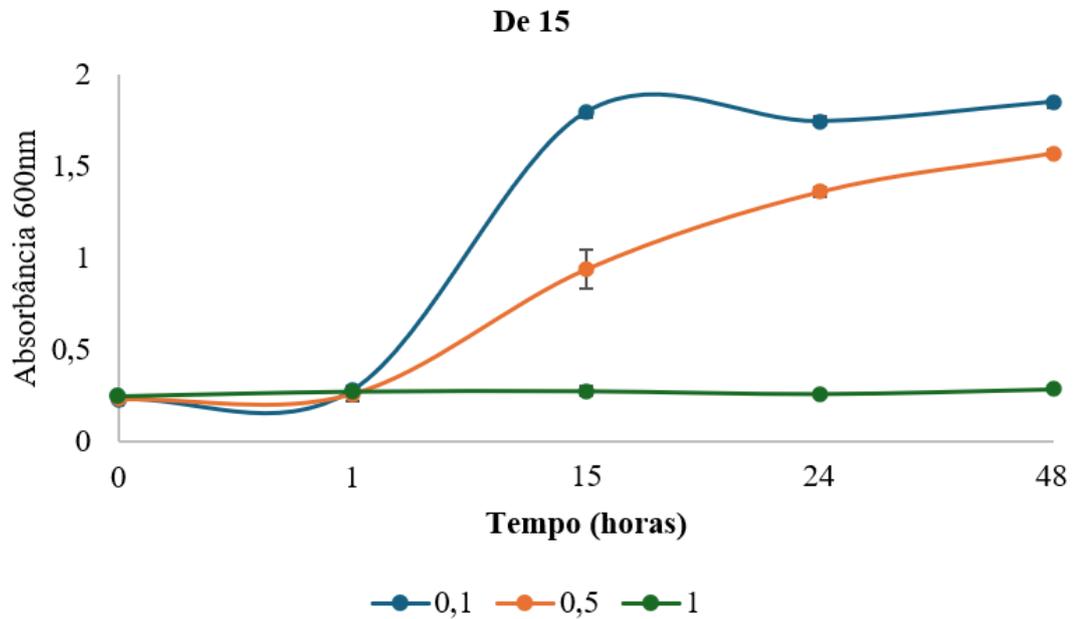


**Fonte:** O autor (2023).

Pode-se observar pela análise da Figura 5 que a bactéria De 15 apresentaram melhor crescimento na concentração 0,1 mmol de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Já na concentração 0,5 mmol, o crescimento foi menor se compara ao da contração 0,1 mmol, já que os valores da curva se mantiveram abaixo. Contudo, na concentração 1,0 mmol, a bactéria não apresentou crescimento significativo.

A Figura 5 apresenta um gráfico de crescimento bacteriano da cepa De 15 estudadas em meio Czapeck em diferentes concentrações de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .

**Figura 5-** Curva de crescimento da bactéria De 15 durante o período de 48 horas em diferentes concentrações de fosfato de potássio  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,1 mmol, 0,5 mmol e 1,0 mmol).



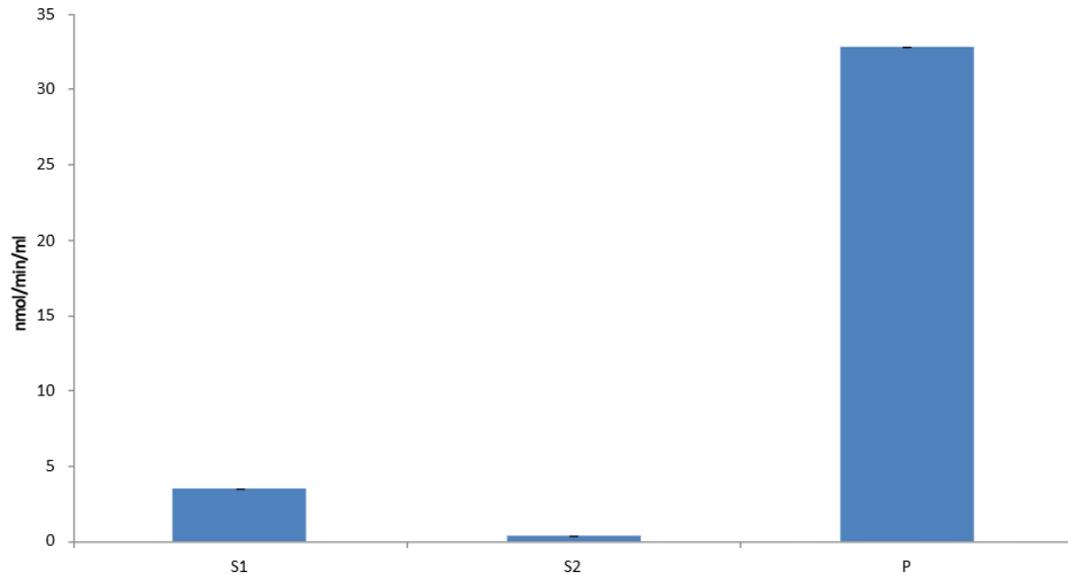
Fonte: O autor (2023).

Acredita-se que, em altas concentrações, o  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  possa se tornar um fator limitante ao crescimento dos microrganismos estudados, já que os mesmos apresentaram uma diminuição significativa em seu crescimento conforme a contração de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  aumentava.

### 4.3 Atividade p-nitrofenilfosfatásica (PNPPásica) das fosfatases

A Figura 6 apresenta um gráfico da atividade enzimática montada com base nos resultados obtidos com a dosagem de proteína e atividade enzimática das amostras S1, que contém o meio de cultura, S2, que contém o citoplasma bacteriano, e P, que contém a membrana celular da bactéria De 15 após 15 horas de crescimento.

**Figura 6-** Atividade enzimática das diferentes frações da bactéria De 15 expressa em nanomols de produto gerado por minuto por ml de enzima.



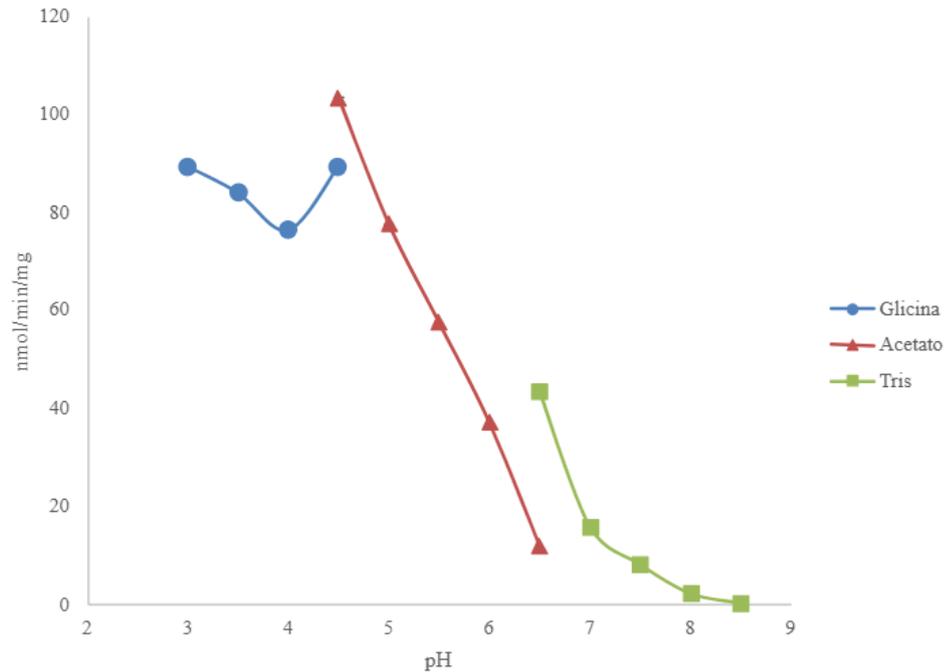
**Fonte: O autor (2024).**

Pode-se observar que a fração P, que contém a membrana celular da bactéria, apresentou maior atividade enzimática se comparado às frações S1, que continha o meio de cultivo, e S2, que continha o citoplasma da bactéria. Isso indica que a fosfatase presente na bactéria De 15 é uma enzima de membrana. De acordo com Sato (2011), as fosfatases bacterianas podem ser secretadas para o meio, mantidas ligadas a membrana plasmática ou no citoplasma. Devido a bactéria estudada apresentar uma maior atividade na fração contendo a membrana plasmática da bactéria, pode-se observar que a fosfatase estudada encontra-se ligada a membrana. De acordo com Sato *et al.*, 2016, fosfatases ligadas a membrana desempenham um papel fundamental na transdução de sinais, interação com diferentes hospedeiros e nutrição das plantas, tornando possível para a bactéria aumentar a liberação de fósforo inorgânico por meio da solubilização de fosfato mineral.

#### **4.4 Efeito da variação do pH sobre a atividade enzimática**

A Figura 7 apresenta um gráfico da atividade enzimática da bactéria De 15 em diferentes faixas de pH. O pH do solo determina grande parte da ionização do fósforo, e, consequentemente, sua disponibilidade, pois dependendo de sua associação com outros elementos químicos ele pode ser solúvel ou não para as plantas, pois solos alcalinos são ricos em fosfato de cálcio ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ), já solos ácidos são ricos em fosfato de ferro ( $\text{FePO}_4$ ) e fosfato de alumínio ( $\text{AlPO}_4$ ), que são menos solúveis do que o  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (Braz, 2011). Solos ácidos são predominantes no Brasil, e, devido a isso, apresenta compostos de baixa solubilidade para as plantas (Braz, 2011).

**Figura 7-** Efeito do pH sobre a atividade enzimática utilizando-se os tampões Glicina (pH 3,0-4,5), Acetato (pH 4,5-6,5) e Tris (pH 6,5-8,5) expressa em nanomols de produto gerado por minuto por mg de proteína.



Fonte: O autor (2024).

Observa-se na Figura 7 que a atividade enzimática apresenta máximo no pH 4,5 no tampão Acetato, e sua atividade decai conforme o pH entra em faixas alcalinas. O pH é um dos fatores que mais interfere na produção de enzimas (XAVIER *et al*, 2019). No trabalho de Sato, 2011, o pH ideal da fosfatase encontrada foi de 3,5. De acordo com Sato, 2011, são escassos os trabalhos que relatam fosfatases ácidas com pH ótimo entre 2,0 e 4,0, portanto a fosfatase estudada encontra-se em na faixa de pH comum para sua espécie. Pode-se observar que a enzima teria maior atividade em solos de pH ácido.

A Tabela 2 apresenta o desvio padrão da curva de pH.

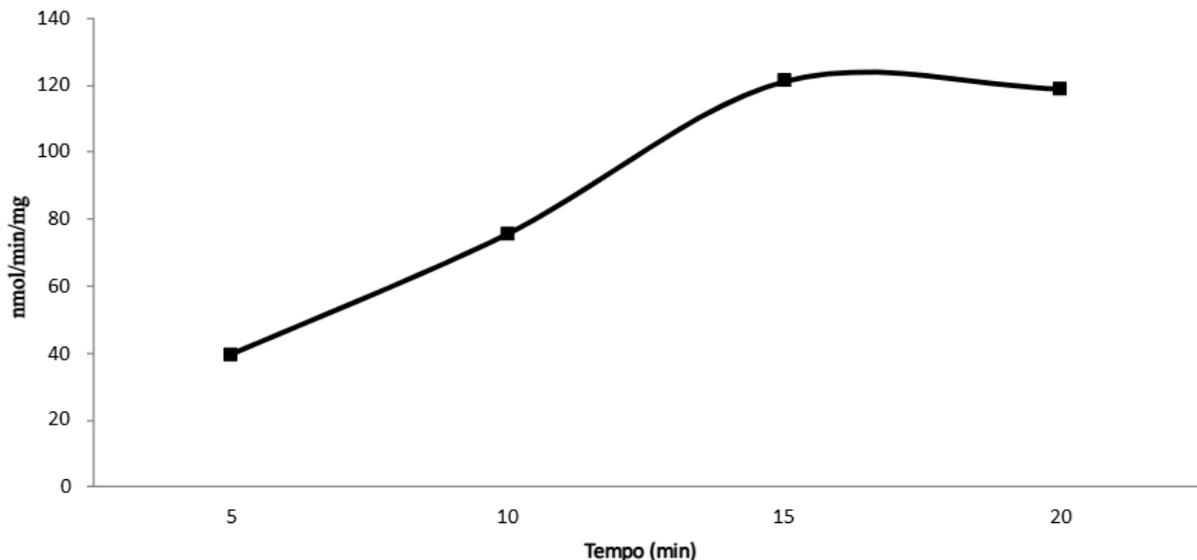
**Tabela 2-** Desvio padrão das médias das atividades da curva de pH.

Quantidade de bactérias por tempo			
pH	Glicina	Acetato	Tris
3	0,00895		
3,5	0,012347		
4	0,01124		
4,5	0,034001	0,012312	
5		0,028934	
5,5		0,021019	
6		0,01555	
6,5		0,01179	0,0157421
7			0,0065574
7,5			0,0023333
8			0,0008819
8,5			0,0006667

#### 4.5 Efeito da variação de tempo sobre a atividade enzimática

A Figura 8 apresenta um gráfico da atividade enzimática com variação de tempo de 5, 10, 15 e 20 minutos de reação da bactéria De 15.

**Figura 8-** Efeito do tempo de reação sobre a atividade enzimática da fração P expressa em nanomols de produto gerado por minuto por mg de proteína.



Fonte: O autor (2024).

Pode-se observar pela análise da Figura 8 que a atividade enzimática aumenta conforme a variação de tempo de reação, se estabilizando a partir dos 15 minutos. De acordo com estudos, é necessário um tempo de reação adequando ao rendimento da mesma, pois a hidrólise das moléculas proteicas origina peptídeos de cadeias mais curtas, que são mais solúveis (FISCHER et al., 2001, apud JUNIOR et al, 2010).

A Tabela 3 apresenta o desvio padrão da curva de variação de tempo.

**Tabela 3-** Desvio padrão das médias das atividades de variação de tempo de reação.

Quantidade de bactérias por tempo	
Tempo (min)	nmol/min/mg
5	0,010553216
10	0,01530795
15	0,007333333
20	0,011339867

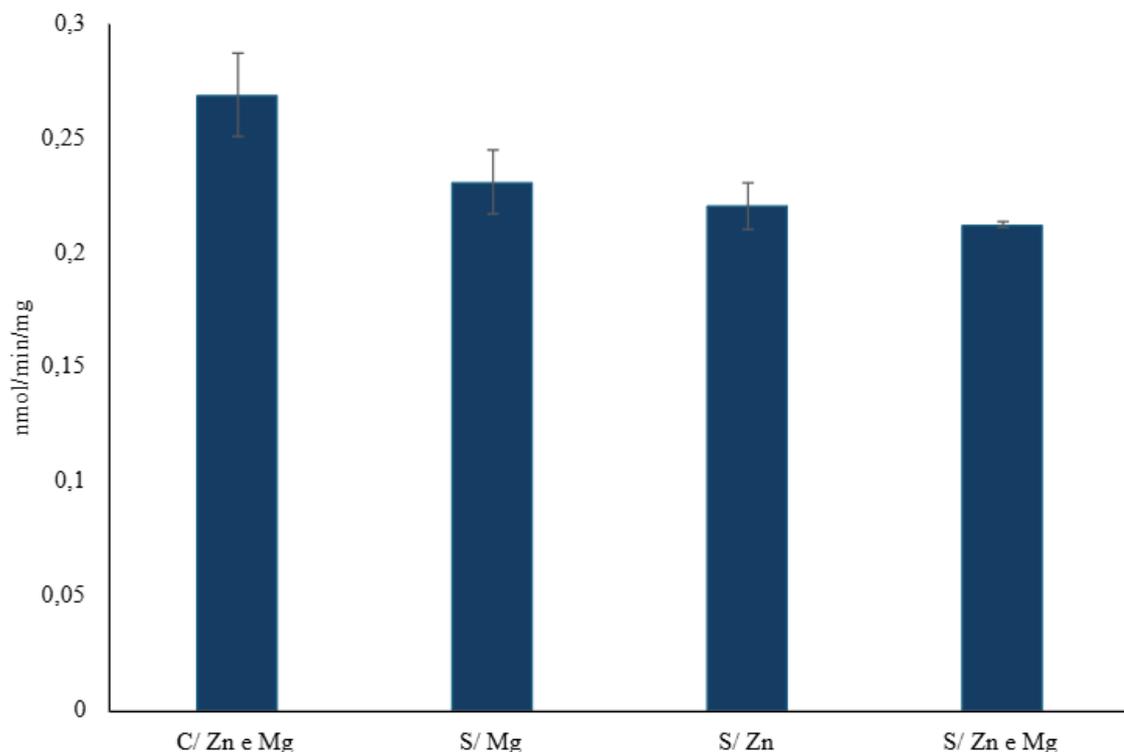
#### 4.6 Efeito da presença dos íons Zinco e Magnésio sobre a atividade enzimática

De acordo com Fachinelli, (2018), a enzima fosfatase não apresenta altos níveis de atividade em solos arenosos e argilosos, sendo sua atividade nesse último menor do que no

arenoso, pois a argila apresenta alta complexação do fósforo, e isso acaba limitando a produção de culturas agrícolas. Por isso, a produção de grãos no Brasil, principalmente nas regiões do Cerrado, acaba sendo limitada, pois nesses locais se encontram os Latossolos, que são constituídos por frações de argila (DICKMANN *et al*, 2022), por esse fato se faz necessário conhecimentos sobre o solo onde as culturas são plantadas, dentre essas informações, os íons que os compõe chamam a atenção, tendo destaque para Zinco e Magnésio. De acordo com Sato 2011, os estudos feitos para averiguar a influência de íons metálicos sobre a atividade da fosfatase tem como objetivo investigar a importância dos mesmos para a estabilidade e, principalmente, para a atividade da enzima de diferentes origens.

A Figura 9 apresenta um gráfico da atividade enzimática da bactéria De 15 sob o efeito da presença de diferentes íons. Observando-se a Figura 9, é possível notar que a atividade da enzima estudada é maior nos ensaios contendo íons de zinco e magnésio.

**Figura 9-** Atividade enzimática da fração P da bactéria De 15 após 15 horas de crescimento com Zn e Mg, sem Mg, sem Zn e sem Zn e Mg medida em espectrofotômetro a 410 nm expressa em nanomols por minuto por mg de proteína.



**Fonte:** O autor (2024).

Estudos sobre a influência de zinco e magnésio sobre a atividade fosfática indicam que o íon zinco é essencial para a manutenção da configuração nativa da fosfatase alcalina, além de

atuar como ativador (SATO, 2011). Já o íon magnésio foi indicado em estudos como um potente ativador de atividade enzimática (SATO, 2011). No trabalho de Sato *et al.*, 2016, os íons de magnésio estimularam a atividade da enzima em 50%, enquanto os íons de zinco não apresentaram efeito sobre a atividade da fosfatase.

## 5 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, foi possível observar que as bactérias oriundas do cultivo do amendoim possuem potencial para a solubilização de fosfato, apresentando variabilidade de desempenho em função das concentrações de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  testadas. As curvas de crescimento demonstraram que a concentração de 0,1 mmol de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  favoreceu o desenvolvimento das bactérias, indicando que concentrações mais elevadas podem limitar o crescimento, possivelmente devido a efeitos inibitórios associados à presença do fosfato de potássio em maior quantidade.

A análise da atividade enzimática revelou que a fosfatase estudada é predominantemente uma enzima de membrana com pH ótimo aparente de reação em 4,5, e que tem suas melhores atividade na presença dos íons zinco e magnésio.

## REFERÊNCIAS

ALVES, P.Z.; BEHAR, P.R. P. **Infecções hospitalares por enterobactérias produtoras de Kpc em um hospital terciário do sul do Brasil.** Revista da AMRIGS, Porto Alegre, v. 57, p. 213-218, jul.-set. 2013.

ANDRADE, J. H. A. J. **PRODUTIVIDADE DO AMENDOIM EM RESPOSTA A DOSES DE FÓSFORO E INOCULAÇÃO COM *Bradyrhizobium* sp.** 2021. Trabalho de graduação (graduação em Engenharia Agrônômica) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Unesp, Campus de Jaboticabal, Jaboticabal, 2021.

ARAÚJO, M. S. **ESTUDOS PARA O MELHORAMENTO DE UM CONSÓRCIO MICROBANO COM POTENCIAL BIOESTIMULANTE EM MUDAS DE *EUCALYPTUS*.** Monografia (Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia Paulo de Goés, Rio de Janeiro, 2021.

BRAZ, R. R. **ESTÍMULO DA SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO RESULTANTE DA CO-INOCULAÇÃO DE *Aspergillus niger* E *Burkholderia cepacia*.** Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2011.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Amendoim total (1ª e 2ª safra) – Safras 2021/22 e 2022/23:** Comparativo de área, produtividade e produção. 2023. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos>. Acesso em: 01 de ago. 2023.

CRUSCIOL, C. A. C. *et al.* Correção do solo e adubação na cultura do amendoim. In: Associação Regional de Engenharia, Arquitetura e Agronomia de Jaboticabal (AREA). **A CULTURA DO AMENDOIM E SEUS REFLEXOS ECONÔMICOS, SOCIAIS E TÉCNICOS.** 1.ª ed. Jaboticabal: 2019. p. 45-56.

DICKMANN, L. *et al.* Residual da adubação fosfatada e efeito da inoculação com *Azospirillum* brasilense em milho verão consorciado com gramínea em região de cerrado. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 3, p. 1-16, 2022.

FACHINELLI, R. **INFLUÊNCIA DA INOCULAÇÃO COM *Bradyrhizobium* E *Azospirillum* NA CULTURA DA SOJA.** Dissertação (Pós-Graduação em Agronomia) - Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, 2018.

LÉLES, E. P. **CORRETIVOS DE ACIDEZ E FONTES DE FÓSFORO NA DISPONIBILIDADE DE P NO SOLO, NUTRIÇÃO E PRODUÇÃO DO AMENDOIM E DO CAPIM MARANDU.** 2012. Tese (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrônômicas da Unesp, Campus de Botucatu, Botucatu, 2012.

NIETO, P. M.; GONZÁLEZ, D.G. G. BACTERIAS DIAZOTROFICAS Y SOLUBILIZADORAS DE FÓSFORO AISLADAS DE LAS ESPECIES FORESTALES ALTOANDINAS COLOMBIANAS *Weinmannia tomentosa* Y *Escallonia myrtilloides*. Revista Intropica, Santa Marta, v. 5, p. 63-76, maio 2010.

MOREIRA, F. M. S; KRISLE, S.; NÓBREGA, R. S. A., CARVALHO, F. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. *Comunicata Scientiae*, v. 1, n. 2, p. 74-99, 2010.

NASCIMENTO, E. **AVALIAÇÃO DA SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO POR RIZÓBIOS ISOLADOS DE LEGUMINOSAS NATIVAS DOS CAMPOS GERAIS DO PARANÁ.** Dissertação (Pós-graduação em Biologia Evolutiva) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2022.

REIS, M. N. O. **EFICIÊNCIA DO SISTEMA HIDROPÔNICO COMO METODOLOGIA PARA A SELEÇÃO DE CEPAS SOLUBILIZADORAS DE  $\text{CaHPO}_4$ , UTILIZANDO GLYCINE MAX COMO MODELO.** Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, Campus Rio Verde, Rio Verde, 2021.

ROMBOLA, T. H. **Indução da Expressão e Caracterização de uma possível fosfatase ácida ligada à membrana produzida por *Burkholderia sp.*** Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Jaboticaba, 2018.

SAMPAIO, R. M.; FREDO, C. E. O amendoim paulista e suas características de produção, socioeconômicas e tecnológicas. In: Associação Regional de Engenharia, Arquitetura e Agronomia de Jaboticabal (AREA). **A CULTURA DO AMENDOIM E SEUS REFLEXOS ECONÔMICOS, SOCIAIS E TÉCNICOS.** 1.<sup>a</sup> ed. Jaboticabal: 2019. p. 13-25.

SANDRINI, G. B. **CARACTERIZAÇÃO CINÉTICA DA FOSFATASE ÁCIDA DE *Enterobacter sp.* ISOLADA DE ORQUÍDEA.** Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Unesp, Câmpus de Jaboticabal, Jaboticabal, 2011.

SATO, V. S.; JUNIOR, R. F. G.; RODRIGUES, G. R.; LEMOS, E. G. M.; JUNIOR, J. M.P. Kinetic characterization of a novel acid ectophosphatase from *Enterobacter asburiae*. **Journal of Microbiology**, v. 54, n. 2, p. 106–113, fev. 2016.

SATO, V. S. **INDUÇÃO DA EXPRESSÃO in vivo E CARACTERIZAÇÃO CINÉTICA DA FOSFATASE ÁCIDA DE *Enterobacter sp.* ISOLADA DE RAÍZES DE ORQUIDÁCEAS.** Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Jaboticaba, 2011.

TSCHOEKE, B. A. P. **Monitoramento da interação entre rizobactéria RZ2MS16 (*Burkholderia ambifaria*) promotora de crescimento e bioinoculantes comerciais aplicados nas culturas de soja e milho.** Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Univeridade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Quiroz”, Piracicaba, 2016.

WILHELM, R. C.; CYLE, K. T.; MARTINEZ, C. E.; KARASZ, D. C.; NEWMAN, J. D.; BUCKLEY, D. H. *Paraburkholderia solitsugae* sp. nov. and *Paraburkholderia elongata* sp. nov., phenolic acid-degrading bacteria isolated from forest soil and emended description of *Paraburkholderia madseniana*. **INTERNACIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY.** v. 70, p. 5093–5105 ago. 2020.

## APÊNDICE A – TERMO DE ORIGINALIDADE

### TERMO DE ORIGINALIDADE

Eu, Jaqueline Del Grossi, RG 58.732.892-7, CPF484.675.148-17, declaro que o trabalho intitulado **inserir o título** é ORIGINAL.

Declaro que recebi orientação sobre as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), que tenho conhecimento sobre as Normas do Trabalho de Graduação da Fatec-JB e que fui orientado sobre a questão do plágio.

Portanto, estou ciente das consequências legais cabíveis em caso de detectado PLÁGIO (Lei Federal nº 9.610, de 19 de fevereiro de 1998, que altera, atualiza e consolida a legislação sobre direitos autorais, publicada no D.O.U. de 20 de fevereiro de 1998, Seção I, pág. 3) e assumo integralmente quaisquer tipos de consequências, em quaisquer âmbitos, oriundas de meu Trabalho de Graduação, objeto desse termo de originalidade.

Jaboticabal/SP, **inserir dia, mês e ano.**

**Assinatura do(a) aluno(a)**

Jaqueline Del Grossi

**ANEXO A – DECLARAÇÃO DE AUTORIZAÇÃO DA EMPRESA e/ou  
LABORATÓRIO entre outros (usar timbre do local)**

**DECLARAÇÃO DE AUTORIZAÇÃO**

Autorizamos para os devidos fins, o(a) senhor(a) **inserir nome do(a) aluno(a)**, R.G. 58.732.892-7, a divulgar o nome, os dados e as fotos da Empresa/Laboratório etc. **inserir nome da empresa, laboratório etc.**, CNPJ **preencher o número**, em seu trabalho de graduação, intitulado **inserir título do trabalho**, a ser apresentado na Faculdade de Tecnologia Nilo De Stéfani de Jaboticabal (Fatec-JB).

O(a) aluno(a) compromete-se a não utilizar/divulgar, por nenhum meio, os demais dados confidenciais da referida empresa.

Cidade/Estado, data.

**Assinatura do responsável (reconhecer firma)**

Nome do responsável

Cargo do responsável

R.G. do responsável