



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Caracterização parcial e Imobilização de fosfatase produzida por
Pluralibacter gergoviae

ERIKA VALENCIA MEJÍA

GOIÂNIA-GO

2015

ERIKA VALENCIA MEJÍA

**Caracterização parcial e Imobilização de fosfatase produzida por
*Pluralibacter gergoviae***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Bioquímica e Genética

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Kátia F. Fernandes

GOIÂNIA-GO

2015

ERIKA VALENCIA MEJÍA

**Caracterização parcial e Imobilização de fosfatase produzida por
*Pluralibacter gergoviae***

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Cirano José Ulhoa
Universidade Federal de Goiás

Prof. Dr. Ivan Torres Nicolau de Campos
Universidade Federal de Goiás

Profa. Dra. Kátia Flávia Fernandes
Universidade Federal de Goiás

Aprovada em: ____/____/____

AGRADECIMENTOS

À minha família, que sempre esteve ao meu “lado”, me dando um alicerce sólido, amor incondicional, tornando este processo mais leve. À minha querida mãe e meu amado irmão. Ao meu pai (*in Memoriam*) porque já são mais os anos de vida que tenho passado sem ele me acompanhando, mas me acompanhou o suficiente para educar a mulher que sou agora.

À professora Kátia por ter me recebido no Laboratório de Química de Polímeros (LQP), por me apoiar em momentos difíceis e acreditar na minha capacidade. Pela paciência e o carinho durante o desenvolvimento dessa dissertação. Por me proporcionar oportunidades de encontro com o profundo saber, não só científico, mas humano e social. Obrigada por ser essa pessoa maravilhosa que sempre me brindou um abraço para matar a saudade da minha mãe.

À minha família do LQP, por me permitir entrar por aquela porta azul. Obrigada a todos que compõe este grupo, vocês me proporcionaram momentos felizes. Como esquecer o cafezinho da tarde!!!

Aos professores da UFG Artur, Ivan e Cirano, pela disponibilização de equipamentos.

Ao Fabricio por me acompanhar neste processo de aprendizagem não só científico, também pessoal.

Aos amigos pessoais, Vero, Carmen, Alonso, Jesús, Andrés e Antonia. Obrigada pela amizade e carinho.

Muito obrigada a todos que colaboraram para a realização deste trabalho!

SUMÁRIO

Lista de Figuras	7
Lista de Tabelas	8
Resumo	9
Abstract	11
1. INTRODUÇÃO	12
1.1. Fosfatases	12
1.2. Fosfatases Ácidas	13
1.3. Microrganismos solubilizadores de fosfato	15
1.4. Imobilização de Enzimas	18
2. OBJETIVOS	22
2.1. Objetivo Geral	22
2.2. Objetivos Específicos	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1. Seleção das Bactérias Produtoras de Fosfatases	23
3.2. Identificação do Microrganismo	24
3.2.1. Extração de DNA	24
3.2.2. Reação em Cadeia da Polimerase – PCR	24
3.2.3. Sequenciamento do Gene rDNA 16S	25
3.3. Perfil de crescimento e produção de fosfatase de <i>Pluralibacter</i> <i>gergoviae</i>	27
3.3.1. Densidade Óptica (DO)	27
3.3.2. Atividade da fosfatase	27
3.3.3. Proteínas totais	28
3.3.4. Protease	28

3.4. Produção da Fosfatase	29
3.5. Atividade da Fosfatase Precipitada	29
3.6. Eletroforese Desnaturante em Gel de Poliacrilamida	30
3.7. Coloração do Gel com Coomassie Blue	30
3.8. Gel de Atividade não desnaturante	31
3.9. Caracterização Parcial da Fosfatase	31
3.9.1. Efeitos do pH na Atividade da Fosfatase	31
3.9.2. Efeito da Temperatura na Atividade da Fosfatase	32
3.9.3. Efeito de Íons na Atividade da Fosfatase	32
3.10. Imobilização da Fosfatase	33
4. Resultados e Discussão	35
4.1. Seleção das Bactérias Produtoras de Fosfatase	35
4.2. Identificação do Microrganismo	37
4.3. Perfil de crescimento e produção de fosfatase de <i>P. gergoviae</i>	39
4.4. Eletroforeses em Gel Desnaturante de Poliacrilamida e Gel de Atividade não desnaturante	40
4.5. Caracterização Parcial da Fosfatase	41
4.5.1. Efeito do pH na Atividade da Fosfatase	41
4.5.2. Efeito da Temperatura na Atividade da Fosfatase	43
4.5.3. Efeito de Íons na Atividade da Fosfatase	44
4.6. Imobilização da Enzima	45
5. Conclusões Parciais	49
6. Perspectivas	49
7. Referências Bibliográficas	50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema da ação das fosfatases sobre seus substratos	13
Figura 2. Classificação dos métodos de imobilização	20
Figura 3. Gene <i>DNAr 16S</i> desenhado com base na sequência de <i>E.coli</i>	25
Figura 4. Meio de cultura Pikovskya	35
Figura 5. Alinhamento	37
Figura 6. Dendograma	39
Figura 7. Curva de crescimento e atividade de <i>P. gergoviae</i>	40
Figura 8. A. Eletroforeses em gel de Poliacrilamida desnaturante B. Gel de atividade não desnaturante	41
Figura 9. Efeito do pH na atividade da enzima	42
Figura 10. Efeito da temperatura na atividade de enzima	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Bacterias Solubilizadoras de fosfato	16
Tabela 2. Medida da atividade da fosfatase e proteínas totais	36
Tabela 3. Influência de íons na atividade da fosfatase produzida por <i>P. gergoviae</i>	45
Tabela 4. Avaliação da eficiência da imobilização	47

RESUMO

O fósforo é um fator nutricional limitante para o crescimento das plantas. No entanto, mais de 80% do fósforo aplicado diretamente sobre o solo torna-se indisponível devido à adsorção, precipitação ou assimilação. Uma estratégia da planta para obter fosfato de solos é mediada pela ação de enzimas do tipo fosfatase, que catalisam a hidrólise de ésteres de fosfato, tornando-os derivados de fósforo solúvel.

Neste estudo, um microrganismo de solo de cerrado com a capacidade de solubilizar o fosfato foi utilizado como produtor de fosfatase. A fosfatase produzida foi parcialmente caracterizada e imobilizada em diferentes frações de solo.

O microrganismo que apresentou a maior atividade de fosfatase foi identificado como *Pluralibacter gergoviae*, com uma atividade específica de 27,43 U mg⁻¹. A atividade ótima da fosfatase produzida por *P. gergoviae* foi encontrada a pH 5,2 e uma temperatura de 55 °C. No estudo do efeito de inibidores comuns foi observado que o cálcio e magnésio não interferem na atividade da fosfatase de *P. gergoviae*, enquanto que o fosfato inorgânico, o amônio e o potássio inibem ligeiramente a atividade da enzima.

Os melhores resultados da imobilização foram obtidos nos ensaios com a sílica e a fração orgânica de solo, que apresentaram 44% de rendimento da imobilização. Por isso, a imobilização da fosfatase ácida produzida por *P. gergoviae* em frações de solo pode ser uma alternativa promissora para

aumentar o teor de fosfato solúvel no solo, o que pode contribuir para a melhoria da produtividade agrícola.

Palavras-Chave: microrganismos, *Pluralibacter gergoviae*, fosfatase, solubilização de fosfato, imobilização.

ABSTRACT

Phosphorus is a nutritional limiting factor for plant growth but over 80% of the phosphorus applied directly to the soil becomes unavailable due to adsorption, precipitation or assimilation to organic phosphorus. One plant's strategy to obtain phosphate from soils is mediated by the action of phosphatase enzymes, which catalyze hydrolysis of phosphate esters producing soluble phosphorus.

In this study, a phosphate-solubilizing microorganism from Cerrado soil was used as phosphatase producer. The produced phosphatase was partially characterized and immobilized in different soil fractions.

The microorganism that showed the highest phosphatase activity was identified as *Pluralibacter gergoviae* with a specific activity of 27.43 U/mg. The optimal activity of phosphatase produced by *P. gergoviae* was found at pH 5.2 and a temperature of 55°C. The effect of common inhibitors show that calcium and magnesium did not interfere in the phosphatase activity, whereas inorganic phosphate, ammonium and potassium slightly inhibited the enzyme activity.

The best results of immobilization were obtained in the tests with silica and the organic fraction, which presented 44% of immobilization yield. Therefore, the immobilization of acid phosphatase produced by *P.gergoviae* in soil fractions might be an promising alternative for increasing the inorganic phosphate content in soil, which might contributes to the enhancing the agricultural productivity.

Keywords: microorganisms, *Pluralibacter gergoviae*, phosphatase, phosphate solubilization, immobilization

1. INTRODUÇÃO

1.1. Fosfatases

As fosfatases são enzimas que conseguem hidrolisar ésteres e anidridos de ácido fosfórico em fosfato inorgânico, de modo que elas são responsáveis pela mineralização de fosfato orgânico. Essas enzimas também são essenciais nos processos de regulação do ciclo do fosfato nos solos (Dickman e Yarden, 1999) e estão amplamente distribuídas na natureza, onde são produzidas principalmente por procariotas e eucariotas (Guimarães et al. 2004; Aoyama et al. 2003).

De acordo com seu pH de atuação, as fosfatases estão divididas em dois grandes grupos: fosfatases ácidas, com pH ótimo igual ou inferior a 6.0 e fosfatases alcalinas, com pH de atuação igual ou superior a 8.0 (Guimarães et al. 2004). Além da faixa de pH ótimo para a catálise, as fosfatases alcalinas também se diferenciam das ácidas porque necessitam da presença de cátions, tais como magnésio, cobalto e manganês para realizar a sua catálise, ao contrário das fosfatases ácidas que realizam a catálise sem a necessidade desses íons (Coleman, 1992; Stec et al., 2000; Aoyama et al. 2003).

As fosfatases também podem ser reunidas em dois grupos como base na função, estrutura, especificidade, ativadores e inibidores que são o grupo das tirosinas fosfatases e o das serina/treonina fosfatases (Zhang, 2002).

1.2. Fosfatases Ácidas

As fosfatases ácidas encontram-se descritas em bactérias (Rombola, 2014), fungos (Tarafdar et al., 1988; Lima, 2006; Leitaó 2010), plantas (Fernandes et al., 2000) e células animais (Moura et al., 2006). As plantas e os microrganismos são responsáveis pela produção da maioria das fosfatases ácidas encontradas no solo, sendo sua atividade fundamental no ciclo do fósforo e na liberação desse composto para as plantas (Souza 2011).

A figura 1 mostra o esquema feito por Nakagi (2007) mostrando a ação das fosfatases sobre seus substratos:

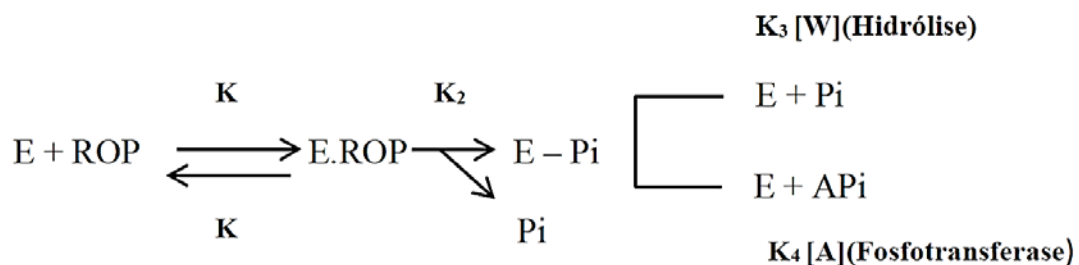


Figura 1. Esquema mostrando a ação das fosfatases sobre seus substratos - ROP: substrato; E.ROP: complexo enzima-substrato; E-Pi: fosforil enzima; Pi: fósforo inorgânico; APi: éster de fosfato; E: enzima livre.

Segundo o esquema, o substrato liga-se à enzima e assim pode ser observada a formação do complexo enzima-substrato (E.ROP). A quebra do complexo promove a liberação do fosfato inorgânico (Pi) e do intermediário fosforilado E – Pi. Então esta molécula reage com uma molécula de água (W) liberando o Pi e a enzima livre, realizando a reação de hidrólise. Se for adicionado ao meio de reação um aceptor (A), ocorre a transferência de fosfato inorgânico formando assim, um novo éster de fosfato (APi), numa reação de transfosforilação.

Dados da literatura consideram que a maior parte da atividade de fosfatase em solos é de origem microbiana, especialmente na rizosfera (Garcia et al. 1992; Xu e Johnson 1995; Tarafdar e Junk 1987) e tem sido demonstrado que as fosfatases ácidas de origem microbiana são mais eficientes na hidrólise de compostos orgânicos de fósforo, em comparação com os seus homólogos nas plantas (Tarafdar et al. 2001).

A catálise enzimática, em geral, é caracterizada pela interação entre o substrato e o sítio ativo da enzima. A atividade das enzimas depende de uma série de fatores, como a concentração de substrato e de enzima, a composição do meio de reação, temperatura, pH, íons inibidores, entre outros (Nakagi, 2007; Dick e Tabatabai, 1999). Desse modo, ao estudar a atividade enzimática nos solos, deve-se levar em conta a composição do solo estudado (Purcena, et al, 2014).

Diversos estudos relatam que as atividades das enzimas de solo podem ser utilizadas de forma prática como marcadores da qualidade em inúmeras situações envolvendo o ambiente solo–planta, incluindo aspectos relativos à fertilidade, estudos de ecologia, indicação de poluição, remediação de solos

contaminados, avaliações de impactos de manejo e da qualidade dos solos agrícolas (Purcena et al, 2014).

1.3. Microrganismos solubilizadores de fosfato

O fósforo é um dos principais macronutrientes no solo, onde é essencial para o desenvolvimento e crescimento das plantas e da biomassa microbiana. No entanto, a concentração de fósforo solúvel e assimilável é normalmente baixa em solos (Goldstein, 1994). Como consequência do seu ciclo, o fósforo tende a persistir na sua forma insolúvel, como no caso do fósforo adicionado como fertilizante, que rapidamente se torna insolúvel e se acumula pela absorção, precipitação química ou imobilização em frações orgânicas e inorgânicas do solo (Sanyal e Datta, 1991).

Não obstante, a maioria dos solos agrícolas contém grandes reservas de fósforo, uma parte considerável proveniente do que se acumulou em consequência de aplicações regulares de fertilizantes fosfatados (Richardson, 1994). Grande parte do fosfato inorgânico solúvel aplicado ao solo como fertilizante químico é rapidamente imobilizado logo após a aplicação e torna-se indisponível para as plantas (Dey, 1988).

Vários relatos têm examinado a capacidade de diferentes espécies de bactérias para solubilizar os compostos de fosfato insolúveis, tais como fosfato tricálcico, fosfato dicálcico, hidroxapatita e fosfato (Goldstein, 1986). Nestes relatos as bactérias desempenham um papel fundamental nos processos do solo, aumentando a disponibilidade de fósforo para o crescimento das plantas

através do processo de mineralização (Richardson, 2001). A tabela 1 apresenta algumas bactérias relatadas como solubilizadoras de fósforo.

Tabela 1. Bactérias solubilizadoras de fósforo.

Bactérias solubilizadoras de fósforo	Referência
<i>Escherichia freundii</i> ,	Sperber 1958 a, b
<i>Bacillus megaterium</i> , <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Bacillus subtilis</i>	Taha et al. 1969
<i>Pseudomonas striata</i> , <i>Bacillus polymixa</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>B. pulvifaciens</i> , <i>B. circulans</i> , <i>Citrobacter freundii</i>	Aurora e Gaur 1979
<i>Rhizobium</i> sp. <i>R. meliloti</i> , <i>R. leguminosarum</i> , <i>R. loti</i>	Halder e Chakrabarty 1993
<i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>C. freundii</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Serratia marcescens</i>	Thaller et al. 1995
<i>Burkholderia cepacia</i>	Rodriguez et al. 1996
<i>Klebsiella aerogenes</i>	
<i>Enterobacter agglomerans</i>	Kim et al. 1997
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>B. atrophaeus</i> , <i>Penibacillus macerans</i> , <i>Vibrio proteolyticus</i> , <i>Xantobacter agilis</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>E. taylorae</i> , <i>E. asburiae</i> , <i>Kluyvera cryocrescens</i> , <i>Pseudomonas aerogenes</i> , <i>Chryseomonas luteola</i>	Vazquez et al 2000
<i>Enterobacter intermedium</i>	Hwangbo et al. 2003
<i>Bacillus</i> sp.	Puente et al 2009
<i>Pseudomonas putida</i> , <i>Enterobacter sakaakii</i> , <i>Bacillus megaterium</i>	Lopez et al 2011
<i>Burkholderia gladioli</i>	Rombola et al. 2014

Há significativas populações de bactérias solubilizadoras de fosfato em solos próximos e na rizosfera das plantas (Ladd, 1978; Dick e Tabatabai, 1993), que incluem cepas aeróbias e anaeróbias, sendo a primeira predominante, sobretudo na rizosfera (Katznelson et al, 1962; Raghu e MacRae, 1966). Diferentes gêneros de bactérias, incluindo *Rhizobium*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Rahnella*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, foram descritos como solubilizadores de fosfato. No entanto, essas cepas divergem na sua capacidade de acumular fósforo solúvel, bem como a sua cinética de produção de fosfatases (Babenko et al., 1984; Khan e Bhatnagar, 1977).

Bactérias da rizosfera podem melhorar o crescimento das plantas por diferentes mecanismos (Glick, 1995). Uma delas é a dissolução de fosfatos insolúveis a partir do solo, fazendo com que o fósforo fique disponível para assimilação da planta. O fosfato inorgânico livre é liberado a partir de compostos de fósforo orgânicos por processos enzimáticos (Rossolini et al., 1998).

A densidade de bactérias produtoras de fosfatases não é suficiente para competir com outras bactérias mais acopladas com as condições da rizosfera. Conseqüentemente a inoculação de solos com bactérias solubilizadoras de fosfato tem sido utilizada como uma estratégia para promover o crescimento das plantas (Gerretsen, 1984; Cooper, 1959).

Entretanto, houve inconsistências com as experiências de laboratório e as de campo, sugerindo que as variáveis relacionadas com a composição do solo e outros fatores podem estar influenciando a eficiência do tratamento (Rodriguez e Fraga, 1999).

Seguindo esta lógica, a utilização de enzimas imobilizadas pode ser vista como uma alternativa para a inoculação com as bactérias promotoras do crescimento das plantas e suas limitações, dado que a imobilização da enzima resulta em um biocatalisador com uma localização específica e com o incremento da atividade e da estabilidade (Chibata et al., 1978; Dalla-Vecchia et al., 2004).

Como consequência, a imobilização da fosfatase tem um potencial de gerar biofertilizantes e promotores de crescimento para plantas com maior atividade, estabilidade e mais fácil de usar e aplicar, além de ser um produto natural, biodegradável e capaz de gerar reações específicas sem produtos secundários (Gavrilescua e Chistib 2005).

1.4. Imobilização de Enzimas

As enzimas são proteínas especiais na catálise das reações biológicas. Elas estão entre as mais notáveis das biomoléculas conhecidas, devido à sua especificidade e seu poder catalítico, que é muito maior do que os catalisadores artificiais. No entanto, uma das limitações para o seu uso é o custo da obtenção e purificação, assim como na baixa estabilidade das enzimas em solução, o que aumenta o custo do processo e consequentemente, do produto final (Fernandes et al., 2010).

Consequentemente, um dos avanços mais importantes da tecnologia enzimática são as técnicas de imobilização. Muitas pesquisas mostraram que as enzimas imobilizadas apresentam vantagens em relação à enzima livre no

que diz respeito ao aumento da estabilidade (Xi et al., 2005). A utilização de moléculas imobilizadas tem vantagens sobre o emprego dessas moléculas livres. A maior delas é o aumento da resistência a fatores desnaturantes. Também é reduzido o custo pela reutilização do sistema (Kang, Kim, Kim, 1997; Aksoy, Tumturk, Hasirci, 1998)

Nelson e Griffin relataram em 1916 a primeira imobilização de enzimas ao verificar a adsorção da invertase em carvão ativado, mantendo a atividade da enzima após vários ciclos de utilização e lavagens (Kennedy e White, 1986). Mas foi a partir dos anos 1960 que houve um grande avanço das técnicas de imobilização gerando a possibilidade de uso contínuo e repetido das enzimas a partir de técnicas de imobilização, que proporcionaram um grande progresso dos processos industriais, no sentido de diminuir os custos e aumentar a produção (Vitolo, 2001).

Segundo Chibata et al. (1978), enzimas imobilizadas “são aquelas que estão fisicamente confinadas, ou localizadas em certa região definida do espaço, com retenção de suas atividades catalíticas, e que podem ser usadas repetidamente e continuamente”. De modo geral os métodos de imobilização têm como fim manter as propriedades das enzimas e melhorar o seu desempenho depois de imobilizadas.

As enzimas podem ser imobilizadas por diferentes protocolos. Elas podem ser encapsuladas; adsorvidas em materiais insolúveis como resinas de troca iônica; copolimerizadas ou se ligar a uma matriz insolúvel por ligações covalentes (Villeneuve et al., 2000; Guisan, 2006). No entanto, apesar de haver uma ampla diversidade de protocolos de imobilização, não há um método aplicável para todas as enzimas já que a escolha do protocolo depende das

combinações entre enzima, suporte e destino do material imobilizado (Silva, 2000).

Segundo Kennedy e Whithe (1986), os métodos de imobilização, são classificados combinando a natureza do suporte com a natureza da interação responsável pela imobilização (Figura 2).

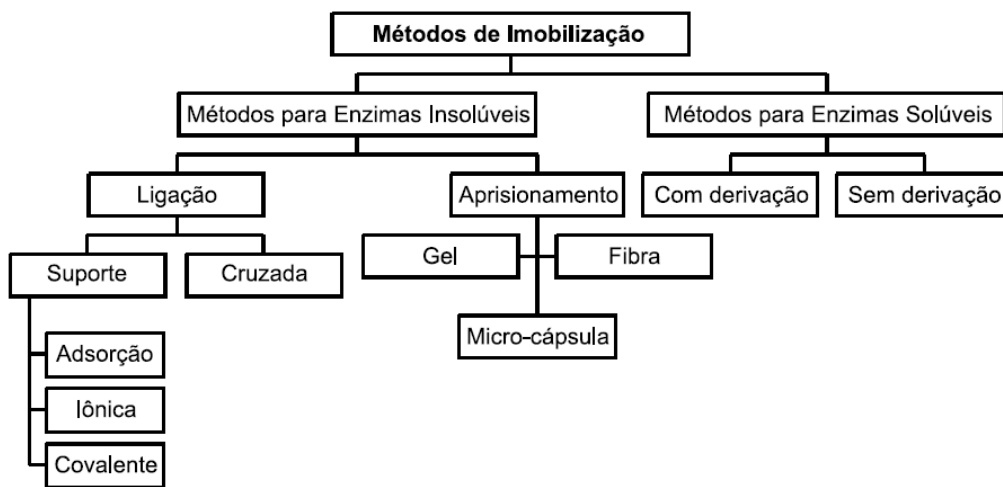


Figura 2. Classificação dos métodos de imobilização segundo Kennedy e White, 1986.

A escolha do método de imobilização a ser utilizado precisa passar por uma análise da aplicação do sistema da enzima imobilizada. Uma vez definida a aplicação e, portanto, as condições onde a enzima deverá atuar, podem-se então avaliar, dentre as técnicas disponíveis, aquela que melhor se adequa às necessidades. Isto posto, é importante avaliar o tempo e os custos necessários para se viabilizar o método escolhido, uma vez que tais parâmetros irão se refletir no processo e, portanto, nos custos do produto final (Silva, 2000).

Além do método, a maior contribuição para o desempenho ótimo da enzima imobilizada é dada pelo suporte. Por isso na seleção de um suporte,

devem ser analisadas suas propriedades físicas e químicas, bem como a possibilidade de regeneração do material. As principais características a serem observadas na seleção de um suporte para uma determinada aplicação são: área superficial, permeabilidade, insolubilidade, capacidade de regeneração, morfologia e composição, natureza hidrofílica ou hidrofóbica, dentre outras. Eles podem ser classificados como orgânicos e inorgânicos, e conforme sua morfologia em materiais porosos, não porosos e de estrutura de gel (Villeneuve et al., 2000).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Produzir uma fosfatase utilizando um microrganismo do solo de cerrado e testar sua imobilização em sílica, argila, areia e matéria orgânica do solo.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar bactérias extraídas do solo de cerrado para produção de fosfatase
- Identificar por sequenciamento o microrganismo que apresentasse a maior atividade da fosfatase
- Caracterizar parcialmente a fosfatase nos seguintes parâmetros:
 - Efeito do pH na atividade da enzima
 - Efeito da temperatura na atividade da enzima
 - Efeito de Íons na atividade da enzima
- Imobilizar a enzima em quatro suportes diferentes relacionados às frações do solo: argila, sílica, areia e fração orgânica.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Seleção das Bactérias Produtoras de Fosfatases

Neste trabalho foram utilizadas 20 cepas de bactérias isoladas de solo de Cerrado provenientes de culturas de cana de açúcar da Usina Goiasa, no Estado de Goiás, Município de Goiatuba. As bactérias foram inoculadas em placas de Petri contendo ágar Pikovskaya (glicose 10 g; $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 5.0 g; NaCl 0.2 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.002 g; $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.002 g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 g; KCl 0.2 g; extrato de levedura 0.5 g e ágar 15 g em 1 L de solução) (Pikovskaya, 1948), a fim de fazer uma primeira seleção dos microrganismos com potencial para solubilizar o fósforo. Todas as amostras foram inoculadas em triplicata e incubadas a 37 °C em estufa bacteriológica por 72 horas. As cepas que formaram um halo amarelado foram assumidas como potenciais produtores de fosfatases.

A seguir, um ensaio para medir a atividade de fosfatase usando p-nitrofenilfosfato (p-NPP) como substrato, foi desenvolvido a partir de uma cultura de 12, 24 e 48 horas em um meio mínimo modificado (KH_2PO_4 3 g; $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.4 g; $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g; glicose 1 g e extrato de levedura 2.5 g em 1 L de solução) a fim de selecionar o microrganismo que apresentasse a maior atividade da fosfatase.

3.2. Identificação do Microrganismo

3.2.1. Extração de DNA

Para a extração do DNA foi realizado o seguinte procedimento: o microrganismo foi inoculado em meio de cultura mínimo modificado e deixado sob agitação a 37 °C e 150 rpm por 24 horas. Uma alíquota de 2 mL foi centrifugada por 5 minutos a 13.000 rpm, e a este adicionou-se 600 µL da solução de lise (Tris 50 mM, pH 7,5; EDTA 25 mmol L⁻¹; NaCl 400 mmol L⁻¹, SDS 1% p/v) e misturou-se gentilmente. Após de incubar a amostra por 10 minutos a 80 °C, esta foi esfriada em gelo por 5 minutos. Adicionou-se 3 µL de RNase (25 µg mL⁻¹) e incubou-se por mais 15 minutos a 37 °C. Após, adicionou-se 200 µL de NaCl 5 mol L⁻¹, misturou-se e incubou-se no gelo por mais 5 minutos, centrifugou-se a 13.000 – 16.000g por 3 minutos e transferiu-se o sobrenadante para um tubo limpo contendo 600 µL de etanol 70% (v/v) e centrifugou-se a 13.000g por 2 minutos. Descartou-se o sobrenadante e secou-se o pellet por 10 a 15 minutos, finalmente reidratou-se o pellet em 50 µL de água mili-Q. A presença e o grau de integridade do DNA foram avaliados por eletroforese em gel de agarose 0,8% (p/v).

3.2.2. Reação em Cadeia da Polimerase – PCR

O DNA extraído foi utilizado como molde na reação em cadeia da polimerase para amplificação da região DNAr 16S, utilizando os iniciadores universais para organismos procariotos do domínio bactéria propostos por

Hayashi et al. (2005), que são: 27F 5'- AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG -3' e 1492R 5'- GGT TAC CTT GTT ACG ACT T -3'.

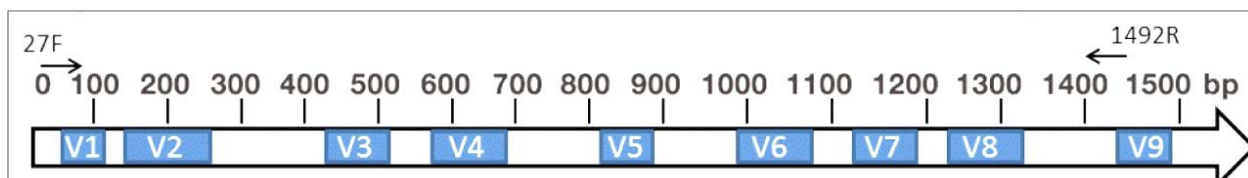


Figura 3. Gene *DNAr* 16S desenhado com base na sequência de *E.coli* (Brosius et al., 1981) Marcações em azul: regiões variáveis entre gêneros ou espécies bacterianas. Espaços em branco: sequencia conservada no Domínio Bactéria. Setas: indicação de local de anelamento dos “primers” utilizados neste trabalho.

As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 20 μL contendo 7,5 ng de DNA extraído, 25 mmol L^{-1} de MgCl_2 , 2 mmol L^{-1} de dNTP's, 20 μM de cada iniciador e 5 $\text{U } \mu\text{L}^{-1}$ de Taq Polimerase (Invitrogen). A amplificação foi realizada em termociclador GeneAmp PCR System, seguindo o programa: 94 $^{\circ}\text{C}$ durante 5 minutos, 30 ciclos de 94 $^{\circ}\text{C}$ por 1 minuto, 55 $^{\circ}\text{C}$ por 1 minuto e 72 $^{\circ}\text{C}$ por 1 minuto, seguido de mais 5 minutos a 72 $^{\circ}\text{C}$.

A visualização do gene 16S amplificado foi feita, após eletroforese em gel de agarose 1% (p/v).

3.2.3. Sequenciamento do Gene rDNA 16S

O produto de PCR foi precipitado adicionando 40 μL de isopropanol 65% (v/v). A mistura foi homogeneizada no vortex (Vortex Genie-2-Scientific Industries) por 30 segundos. A precipitação foi realizada a temperatura

ambiente por 20 minutos. As amostras foram centrifugadas por 45 minutos a 10.000 rpm. O precipitado foi lavado com 250 µL de etanol 60% (v/v), e centrifugado por 10 minutos a 10.000 rpm e o processo de lavagem foi repetido utilizando 100 µL de álcool. A placa contendo as amostras foi centrifugada de maneira invertida por 1 minuto a 500rpm para garantir que fosse removido todo o álcool. Uma secagem complementar foi realizada deixando a placa por 10 minutos na capela de fluxo laminar. Este material foi ressuspensão em 10 µL de formamida, desnaturado por 5 minutos a 95 °C e levado ao sequenciador (3500 Genetic Analyzer/Applied Biosystems).

As sequências obtidas foram comparadas com as sequências depositadas na base de dados do Ribosomal Data Project, utilizando o programa seqmatch. Este programa faz uma comparação heurística múltipla da sequência desconhecida contra uma base de dados previamente alinhada e depurada de mais de dos milhões de sequências de rDNA. A comparação e determinação taxonômica são feitas com o algoritmo "Naive Bayesian" (Wang et al., 2007). Este algoritmo classifica as sequências do rDNA 16S baseado na taxonomia proposta no Bergey's Taxonomic Outline of the Prokaryotes e gera uma assinatura taxonômica de domínio ao gênero com uma estimativa de confiança para cada assinatura (S_{ab} score). Cole et al. demonstraram que este método é mais preciso do que BLAST para encontrar as sequências mais similares numa comparação de distâncias multiplex pareadas (pairwisealigned distance). (Cole, 2005)

3.3. Perfil de crescimento e produção de fosfatase de *Plurilobacter gergoviae*

Após a seleção do microrganismo identificado como *Plurilobacter gergoviae* (*P. gergoviae*) foram realizados testes para a determinação do perfil de crescimento e produção de fosfatase. Para a realização dos testes foram adicionados 2 mL do pré-inóculo a 200 mL de meio mínimo modificado, em Erlenmeyer de 500 mL estéril. O inóculo foi mantido sob agitação em shaker a 140 rpm e 37 °C, num período de 72 horas. As análises foram feitas nos tempos iniciais (tempo 0) e a cada 3 horas, até completar 48 horas de crescimento e finalmente, a última amostra foi coletada após 72 horas. As alíquotas foram testadas quanto a densidade óptica (600 nm), atividade da fosfatase, atividade de protease e determinação de proteínas totais.

3.3.1. Densidade Óptica (DO)

A leitura da densidade óptica (DO) foi feita num espectrofotômetro (UV/visível) a comprimento de onda de 600 nm.

3.3.2. Atividade da fosfatase

A atividade da fosfatase foi medida como a quantidade de p-nitrofenol (p-NP) liberado. A mistura do ensaio consistiu em 50 µL da enzima, 100 µL de solução de p-NPP 5 mmol L⁻¹ e 350 µL de tampão acetato de sódio 50 mmol L⁻¹ pH 5.0. Após incubação da mistura a 55 °C por 15 minutos, a reação foi

interrompida com a adição de 1000 μL de NaOH 0.1 mol L^{-1} . A quantidade de $\rho\text{-NP}$ liberado foi determinada em espectrofotômetro (UV/visível) a comprimento de onda de 405nm.

A curva padrão foi feita utilizando $\rho\text{-NP}$. Uma unidade enzimática (U) foi definida como a quantidade necessária para produzir 1 μmol de $\rho\text{-NP}$ por mililitro de reação em 1 minuto.

3.3.3. Proteínas totais

A concentração de proteínas foi determinada pelo método descrito por Bradford (1976). Um volume de 100 μL da amostra da cultura foi adicionado a 1 mL do reagente de Bradford. Após incubação por 15 minutos à temperatura ambiente, realizou-se a leitura de absorbância das amostras a 595 nm. A concentração de proteínas foi calculada em relação à curva padrão do reagente, com leituras de concentrações crescentes de albumina sérica bovina (BSA).

A dosagem de proteínas também foi feita por um método fluorométrico utilizando o equipamento Qubit® 2.0 (Invitrogen).

3.3.4. Protease

A medida da atividade de protease foi feita segundo Ladd (1972) com modificações. Um volume de 100 μL da amostra da cultura foi misturado com 400 μL de tampão fosfato de sódio 0.1 mol L^{-1} pH 7.6 e 500 μL de caseína 1% (p/v), pH 8.0. Após incubação por 10 minutos a $37 \text{ }^\circ\text{C}$, adicionou-se 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) 10% (p/v) e deixou-se em incubação a temperatura

ambiente por 30 minutos. Finalmente, centrifugou-se por 5 minutos e o sobrenadante leu-se em espectrofotômetro (UV/visível) a comprimento de onda de 280nm.

3.4. Produção da Fosfatase

Para a produção de fosfatase, 2 mL do pré-inóculo do micro-organismo foram inoculados em frascos Erlenmeyer de 500 mL, contendo 200 mL de meio mínimo modificado (KH_2PO_4 3 g; $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.4 g; $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g; glicose 1 g e extrato de levedura 2.5 g em 1 L de solução). O pH inicial do meio de cultura foi ajustado para 5,0. Os frascos foram incubados em agitador rotatório a 37 °C, com velocidade de 140 rpm. Após 24 horas, a cultura foi centrifugada por 10 minutos a 5.000 g e o sobrenadante precipitado com acetona (1:1 v/v) para obtenção do extrato protéico. A mistura de acetona e meio de cultura (após 24 horas de crescimento), foi deixada em freezer a -20°C por 24 horas. A seguir, o material foi centrifugado por 10 minutos a 12.000 g, posteriormente o precipitado foi deixado à temperatura ambiente para a secagem e após, foi armazenada a -20°C.

3.5. Atividade da Fosfatase Precipitada

Para este ensaio, foram pesadas 20 mg da enzima precipitada e foram misturados com 600 μL de tampão acetato de sódio 50 mmol L^{-1} pH 5.0. A mistura do ensaio consistiu em 10 μL da enzima, 100 μL de solução de p-NPP e 390 μL de tampão acetato de sódio 50 mmol L^{-1} , pH 5.0. Após incubação da

mistura por 15 minutos a 55 °C, a reação foi interrompida com a adição de 1000 µL de NaOH 0,1 mol L⁻¹. A atividade da fosfatase foi medida como a quantidade de p-nitrofenol liberado, e esta quantidade foi determinada em espectrofotômetro (UV/visível) a comprimento de onda de 405 nm.

3.6. Eletroforeses em Gel de Poliacrilamida Desnaturante (SDS- PAGE)

Neste ensaio 10 µL da enzima precipitada foi adicionada ao tampão de amostra (tampão tris-HCl 100 mmol L⁻¹ pH 6.8; SDS 4% (p/v); azul de bromofenol 0.2% (p/v); glicerol 20% (v/v) e β-mercaptoetanol 10% (v/v) na proporção 1:1 e foi fervida antes de ser aplicada no gel (Laemmli, 1970).

A eletroforese foi conduzida usando-se um gel de separação de 12% (p/v) e um gel de aplicação de 5% (p/v) em condições desnaturantes. A amperagem de corrida foi fixada em 30 mA. A quantidade de amostra aplicada no gel foi de 20 µL, aproximadamente 20 µg de proteína.

3.7. Coloração Do Gel Com Coomassie Blue

Após o termino da corrida, o gel foi tratado por 20 minutos à temperatura ambiente com uma solução corante (metanol 50% (v/v), ácido acético 10% (v/v) e Coomassie Blue R250 0.1% (p/v). Em seguida foi colocado em uma solução descorante reveladora (metanol 40% (v/v) e ácido acético 10% (v/v).

3.8. Gel de Atividade não desnaturante

As amostras foram ressuspensas em tampão de amostra (50 μL de tampão Tris-HCl 50 mmol L^{-1} , pH 6.8; 100 μL de glicerol, traços de azul de bromofenol e água destilada suficiente para 1,0 mL). A eletroforese foi realizada usando-se um gel de separação de 10% (p/v) e um gel de aplicação de 5% (p/v), ambos sem a presença de dodecil sulfato de sódio (SDS). A corrida foi conduzida por 8 horas à temperatura ambiente, com uma voltagem de 80 V. O gel foi incubado em tampão acetato de sódio 50 mmol L^{-1} pH 5.2 (pH ótimo da enzima); por 3 vezes durante 20 minutos. A atividade de fosfatase foi detectada por sobreposição de um gel de agarose 1,5 % (p/v) contendo 0.42 mol L^{-1} de 4-metilumbeliferilfosfato (M-8168, Sigma Chemical Company). Os dois géis foram incubados a 40 °C por 1 hora e 30 minutos. Após o tempo de incubação, a liberação de 4-metilumbeliferona foi detectada pela exposição dos géis em luz UV no fotodocumentador.

3.9. Caracterização Parcial da Fosfatase

3.9.1. Efeitos do pH na Atividade da Fosfatase

O pH ótimo para a atividade da fosfatase foi avaliado incubando-se a enzima em tampão acetato de sódio 50 mmol L^{-1} , com valores de pH entre 3.6 e 5.6 e tampão citrato de sódio 50 mmol L^{-1} com valores de pH entre 5.0 e 6.2 com intervalos de 0.2 para cada tampão. No ensaio enzimático, a mistura consistiu em 10 μL da enzima precipitada, 100 μL de solução de p-NPP e 390

μL de tampão. Após incubação da mistura a $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 minutos, a reação foi interrompida com a adição de 1 mL de NaOH $0,1\text{ mol L}^{-1}$. A quantidade de p-nitrofenol foi determinada em espectrofotômetro (UV/visível) a comprimento de onda de 405 nm.

3.9.2. Efeito da Temperatura na Atividade da Fosfatase

As temperaturas avaliadas variaram de 30° a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$, com intervalos de 5°C . O ensaio enzimático consistiu de $10\text{ }\mu\text{L}$ da enzima precipitada, $100\text{ }\mu\text{L}$ de solução de p-NPP e $390\text{ }\mu\text{L}$ de tampão acetato de sódio 50 mmol L^{-1} e pH 5.6, pH ótimo da enzima. Logo, as amostras foram incubadas nas respectivas temperaturas, por 15 minutos e a reação foi interrompida com a adição de 1 mL de NaOH $0,1\text{ mol L}^{-1}$. A quantidade de p-nitrofenol foi determinada em comprimento de onda de 405 nm.

3.9.3. Efeito do Íons na Atividade da Fosfatase

A enzima (8 mg de proteína) foi pré-incubada por 10, 20 e 30 minutos com cloreto cálcio numa concentração de 5 e 10 mmol L^{-1} . Após o tempo de incubação, adicionou-se $100\text{ }\mu\text{L}$ de solução de 5 mmol L^{-1} de p-NPP e $390\text{ }\mu\text{L}$ de tampão acetato de sódio 50 mmol L^{-1} , pH 5.2. A mistura foi incubada a $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 minutos, a reação foi interrompida com a adição de 1 mL de NaOH $0,1\text{ mol L}^{-1}$. A quantidade de p-nitrofenol foi determinada em espectrofotômetro (UV/visível) a 405 nm. A atividade foi comparada com aquela observada na ausência de cálcio. Testes similares foram feitos com os seguintes sais: cloreto

de amônio, cloreto de magnésio e fosfato de sódio, nas mesmas concentrações utilizadas no ensaio com cloreto de cálcio.

3.10. Imobilização da Fosfatase

A imobilização da fosfatase foi realizada utilizando-se como suportes: argila, sílica G, areia e a fração orgânica do solo.

A ativação dos suportes foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Fernandes et al. (2003). Brevemente: 10 mg de cada suporte foram postos a reagir com 5 mL de glutaraldeído 25% (v/v) por 45 minutos em agitação orbital. Após a ativação, os suportes foram lavados com tampão acetato de sódio 50 mmol L⁻¹ pH 5.2 para retirar o excesso de glutaraldeído. Após a lavagem os suportes foram secos em estufa a 35 °C e utilizados para a imobilização do extrato protéico.

A imobilização foi realizada utilizando-se 5 mg de suporte, 50 µL de extrato proteico (0.856 mg mL⁻¹) e 400 µL de tampão acetato de sódio 50 mmol L⁻¹ pH 5.2. O sistema foi incubado por 1 hora a temperatura ambiente sob agitação orbital o material foi centrifugado por 10 minutos a 5000 g e o precipitado foi lavado 2 vezes com tampão acetato de sódio 50 mmol L⁻¹ pH 5.2.

A medida da atividade enzimática da fosfatase imobilizada e livre foi realizada utilizando-se p-NPP como substrato, como descrito no item 3.5.

A porcentagem da eficiência foi calculada com a seguinte fórmula:

$$\% \text{ Eficiência} = AE \text{ final} / AE \text{ inicial} * 100$$

AE inicial: Atividade Especifica da enzima livre

AE final: Atividade Especifica da enzima imobilizada

4. Resultados e Discussão

4.1. Seleção das Bactérias Produtoras de Fosfatases

Com a finalidade de determinar a capacidade de produção de fosfatase, as estirpes bacterianas foram cultivadas em ágar de Pikovskaya, um meio de cultura seletivo para a detecção de microrganismos solubilizadores de fosfato. Os resultados evidenciaram que, entre as 20 estirpes de bactérias de solo de Cerrado, apenas 8 mostraram o halo amarelo característico indicando que essas cepas foram capazes de decompor o fosfato orgânico e liberar o fósforo inorgânico.



Figura 4. Foto demonstrativa do halo formado em torno da colônia devido à solubilização de fosfato presente no meio de cultura Pikovskaya.

As cepas que apresentaram resultado positivo para produção de fosfatase em meio sólido foram selecionadas para uma avaliação mais aprofundada em curva de crescimento em meio líquido, com acompanhamento da produção de fosfatase e proteínas totais para determinação de atividade

específica. Como pode ser visto na Tabela 2, as cepas bacterianas selecionadas apresentaram um perfil distinto na produção de fosfatase.

Tabela 2. Medida da atividade específica da fosfatase produzida a cada 24 hora

Cepa	24 horas			48 horas			72 horas		
	Atividade (U)	P (mg/mL)	A E (U/mg)	Atividade (U)	P (mg/mL)	A E (U/mg)	Atividade (U)	P (mg/mL)	A E (U/mg)
CS9B	0,125	0,106	1,182	0,083	0,093	0,888	0,142	0,090	1,577
CS14	2,671	0,199	13,37	2,586	0,094	27,43	2,602	0,092	28,35
CS16 ^a	0,395	0,122	3,234	0,289	0,113	2,547	0,347	0,107	3,261
CS40 ^a	0,427	0,085	4,999	0,275	0,121	2,279	0,310	0,118	2,633
CS6B	0,190	0,124	1,523	0,299	0,122	2,447	0,243	0,118	2,065
CS7B	0,182	0,134	1,358	0,251	0,120	2,093	0,208	0,112	1,857
CS41	0,262	0,069	3,767	0,270	0,077	3,493	0,240	0,080	3,005
CS59	0,208	0,077	2,715	0,219	0,094	2,330	0,272	0,090	3,028

* P – Proteína

* AE – Atividade específica

Os resultados evidenciaram que a estirpe 14 foi a mais eficaz na produção de fosfatase, atingindo nas primeiras 24 horas de cultivo uma atividade de 6,3 vezes maior que o segundo melhor produtor (CS40^a) e ao final do terceiro dia uma atividade específica de 28,35 U mg⁻¹, valor 8,7 vezes mais alto do que o segundo melhor (CS16^a). A avaliação da curva de produção de fosfatase em termos de atividade específica mostrou que para a cepa 14, o aumento na produção de fosfatase após 48 horas de cultivo foi desprezível, ficando estabelecido o tempo de 48 horas como padrão para produção da enzima.

4.2. Identificação do Microrganismo

A identificação molecular da cepa CS14 foi feita por meio da amplificação do 16S rDNA e comparação dos resultados com os dados depositados no banco de dados “Ribosomal Data Project”. A sequência obtida para o gene 16S da cepa CS14 foi alinhada com a sequência de nucleotídeos do gene 16S rDNA de *Pluralibacter gergoviae* (figura 5).

Range 1: 320585 to 321890 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
2248 bits(1217)	0.0	1268/1309(97%)	6/1309(0%)	Plus/Plus

Features: [rRNA-16S ribosomal RNA](#)

Query	2	CGCCCTCCCG-AGGTT-AGCT-CCTACTTC	TTTTGCAACCCACTCCCATGGTGTGACGGG	58
Sbjct	320585	CGCCCTCCCGAAGGTTAAGCTACCTACTTC	TTTTGCAACCCACTCCCATGGTGTGACGGG	320644
Query	59	CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATT	CACCGTGGCATTCTGATCCACGATTACTAGCG	118
Sbjct	320645	CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATT	CACCGTGGCATTCTGATCCACGATTACTAGCG	320704
Query	119	ATTCGGACTTCATGGAGTCGAGTTCGAGAC	TCCAATCCGGACTACGACGCACCTTTATGAG	178
Sbjct	320705	ATTCGGACTTCATGGAGTCGAGTTCGAGAC	TCCAATCCGGACTACGACGCACCTTTATGAG	320764
Query	179	GTCCGCTTGCTCTCGCGAGGTCGCTTCT	CTTTGTATGCGCCATTGTAGCACGTGTGTAGC	238
Sbjct	320765	GTCCGCTTGCTCTCGCGAGGTCGCTTCT	CTTTGTATGCGCCATTGTAGCACGTGTGTAGC	320824
Query	239	CCTACTCGTAAGGGCCATGATGACTTGAC	GCATCCCACCTTCTCCAGTTTATCACTG	298
Sbjct	320825	CCTACTCGTAAGGGCCATGATGACTTGAC	GCATCCCACCTTCTCCAGTTTATCACTG	320884
Query	299	GCAGTCTCCTTTGAGTTC	CCGRCCGRAYCGCTGGCAACAAAGGATAAAGGGTTGCGCTCGT	358
Sbjct	320885	GCAGTCTCCTTTGAGTTC	CCGACCGAATCGCTGGCAACAAAGGATAAAGGGTTGCGCTCGT	320944
Query	359	TGCGGGACTTAACCCAACATTT	CACAACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCT	418
Sbjct	320945	TGCGGGACTTAACCCAACATTT	CACAACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCT	321004

```

Query 419      CAGAGTTCCCGAAGGCACCAAAGCATCTCTGCTAAGTTCTCTGGATGTCAAGAGTAGGTA 478
                |||
Sbjct 321005   CAGAGTTCCCGAAGGCACCAAAGCATCTCTGCTAAGTTCTCTGGATGTCAAGAGTAGGTA 321064

Query 479      AGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTA AACACACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTC 538
                |||
Sbjct 321065   AGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTA AACACACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTC 321124

Query 539      AATTCATTTGAGTTTTAACCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGTCTACTTAACGCGTTAG 598
                |||
Sbjct 321125   AATTCATTTGAGTTTTAACCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGTCTACTTAACGCGTTAG 321184

Query 599      CTCCGGAAGCCACGSYTCAAGRSCACAGCCTCCAAGTAGACATCGTTTACGGCGTGGACT 658
                |||
Sbjct 321185   CTCCGGAAGCCACGSCCTCAAGGCCACAGCCTCCAAGTAGACATCGTTTACGGCGTGGACT 321244

Query 659      ACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTGAGCGTCAGTCTTCGTC 718
                |||
Sbjct 321245   ACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTGAGCGTCAGTCTTCGTC 321304

Query 719      CAGGGGGCCGCCTTTTCGCCACCGGTATTCCTCCAGATCTCTACGCATTTACCCGCTACAC 778
                |||
Sbjct 321305   CAGGGGGCCGCC-TTCGCCACCGGTATTCCTCCAGATCTCTACGCATTTACCCGCTACAC 321363

Query 779      CTGGAATTCTACCCCCCTCTACGAGACTCAAGCCTGCCAGTTTCGAAATGCAGTTCCCA 838
                |||
Sbjct 321364   CTGGAATTCTACCCCCCTCTACGAGACTCAAGCCTGCC-AGTTTCG-AATGCAGTTCCCA 321421

Query 839      KGKTGARSCCGGGRWTTACATCCGACTTGACAGACCGCCysygbssgykykrcsyyya 898
                |||
Sbjct 321422   GGTGAGCCCGGGGATTTACATCCGACTTGACAGACCGCCCTGCGTGCCTTTACGCCCA 321481

Query 899      gtavykCCGATTAACGCTTGCACCCTCCGTATTACCGSGGCTGTGGCACGGAGWTAGCC 958
                |||
Sbjct 321482   GTAATTCGATTAACGCTTGCACCCTCCGTATTACCGSGGCTGTGGCACGGAGWTAGCC 321541

Query 959      GGTGCTTCTTCTGCGGGTAACGTCAATGAATGAGGTTATTAACCTCACTCCCTTCTCCC 1018
                |||
Sbjct 321542   GGTGCTTCTTCTGCGGGTAACGTCAATGAATGAGGTTATTAACCTCACTCCCTTCTCCC 321601

Query 1019     CGCTGAAAGTACTTTACAACCCGAAGGCCTTYTTCATACACGGGCATGGCTGCATCAGG 1078
                |||
Sbjct 321602   CGCTGAAAGTACTTTACAACCCGAAGGCCTTCTTCATACACGGGCATGGCTGCATCAGG 321661

Query 1079     CTTGCGCCCAATTGTGCAATATTCCCCCTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCT 1138
                |||
Sbjct 321662   CTTGCGCCCAATTGTGCAATATTCCCCCTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCT 321721

Query 1139     CAGTTCAGTGTGGCTGGTCATCCTCTCAGACCAGCTAGGGATCGTCGCCTAGGTGAGCC 1198
                |||
Sbjct 321722   CAGTTCAGTGTGGCTGGTCATCCTCTCAGACCAGCTAGGGATCGTCGCCTAGGTGAGCC 321781

Query 1199     GTTACCCACCTACTAGCTAATCCCATCTGGGCACATCCGATGGCAAGAGGCCCGAAGGT 1258
                |||
Sbjct 321782   GTTACCCACCTACTAGCTAATCCCATCTGGGCACATCCGATGGCAAGAGGCCCGAAGGT 321841

Query 1259     CCCCTCTTTGGTCCGAAGACGTTATGCGGTATTAGCTACCGTTTCAG 1307
                |||
Sbjct 321842   CCCCTCTTTGGTCCGAAGACGTTATGCGGTATTAGCTACCGTTTCAG 321890

```

Figura 5. Alinhamento entre as sequências de nucleotídeos do gene 16S rDNA do microrganismo CS14 e a sequência de *Pluralibacter gergoviae*

Os resultados da análise filogenética mostraram que a estirpe pertencia a um gênero *Pluralibacter* (Figura 6), que mostra 97% de semelhança com a sequência das bactérias *Pluralibacter gergoviae* (nº acesso CP009450). O *P.*

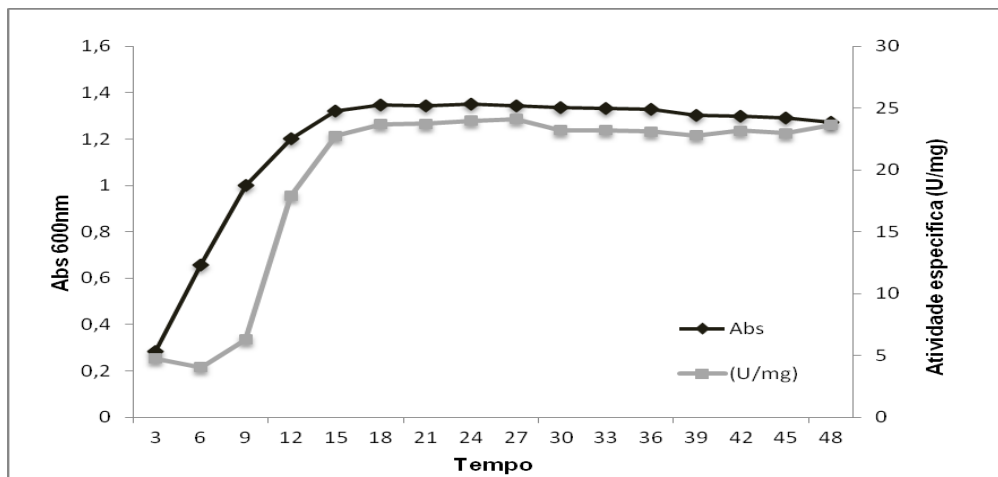


Figura 7. Curva de crescimento e de produção de fosfatase de *Pluralibacter gergoviae*, microrganismo selecionado por apresentar a maior atividade da fosfatase.

4.4. Eletroforeses SDS-PAGE e Gel de Atividade

As proteínas produzidas por *P. gergoviae* em meio de cultura foram concentradas e precipitadas por adição de acetona e analisadas por SDS-PAGE. Na figura 8(A), correspondente à SDS-PAGE, pode ser observada a presença de nove bandas de proteínas, distribuídas ao longo do gel. Destas, apenas as bandas presentes na porção superior do gel apresentaram atividade de fosfatase, como pode ser visto no gel de atividade para fosfatase mostrado na figura 8 (B). A banda larga na região de alta massa molecular, com atividade de fosfatase corresponde a uma massa molecular de aproximadamente 66 kDa, o que nos permite sugerir que *P. gergoviae* produz apenas uma isoforma de fosfatase.

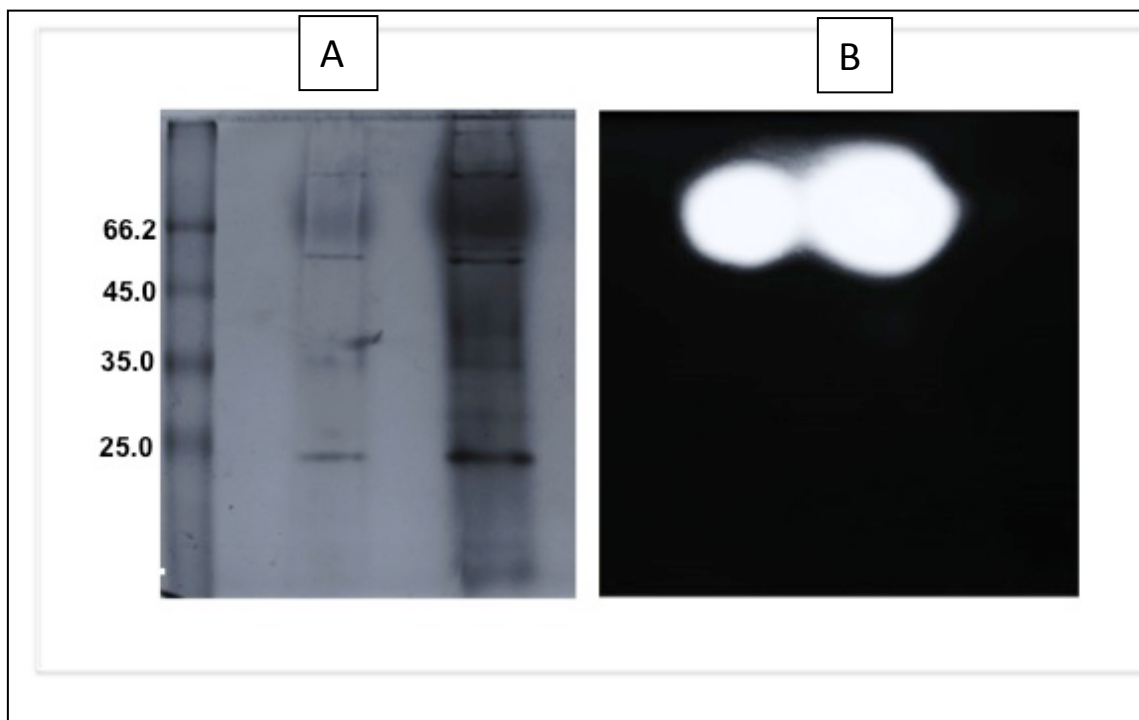


Figura 8. A - Eletroforese em gel de poliacrilamida - SDS. Linha 1 – marcadores de massa molecular; linha 2 e 3 – proteínas totais precipitadas por acetona (20µg e 40µg respectivamente). B. Gel de atividade. Linhas 1 e 2 - atividade de proteínas totais (20µg e 40µg respectivamente).

4.5. Caracterização Parcial da Fosfatase

4.5.1. Efeito do pH na Atividade da Fosfatase

Sabe-se que o pH é um dos fatores mais importantes que afetam a atividade de uma enzima e no caso das fosfatases constitui fator de distinção entre membros desta família de enzimas. Por outro lado, avaliar o comportamento da fosfatase em diferentes valores de pH é importante para estabelecer protocolos de utilização destas enzimas, especialmente considerando o desenvolvimento de novas estratégias para a utilização destas

como uma alternativa para melhorar a disponibilidade de fósforo inorgânico no solo, com a conseqüente melhoria na qualidade do solo e da produtividade da cultura.

O perfil enzimático da fosfatase produzida por *P.gergoviae* frente a diferentes valores de pH é mostrado na Figura 9. Como pode ser visto, a fosfatase apresentou atividade máxima na faixa de pH entre 5,0 a 6,2, com valor ótimo em pH 5,2, sendo portanto caracterizada como uma fosfatase ácida. Vários autores relataram que o pH ótimo para a atividade da fosfatase ácida varia entre cerca de 3,5 a 6,0, dependendo do microrganismo produtor (Rombola et al., 2014; Coello, 2002; Magboul et al., 1999; Garcia et al., 2004). Em geral, os microrganismos do solo de cerrado são capazes de produzir enzimas da classe das fosfatases ácidas em vez neutras ou básicas, uma vez que o pH destes solos varia entre 4,9-5,7 (Purcena et al., 2014).

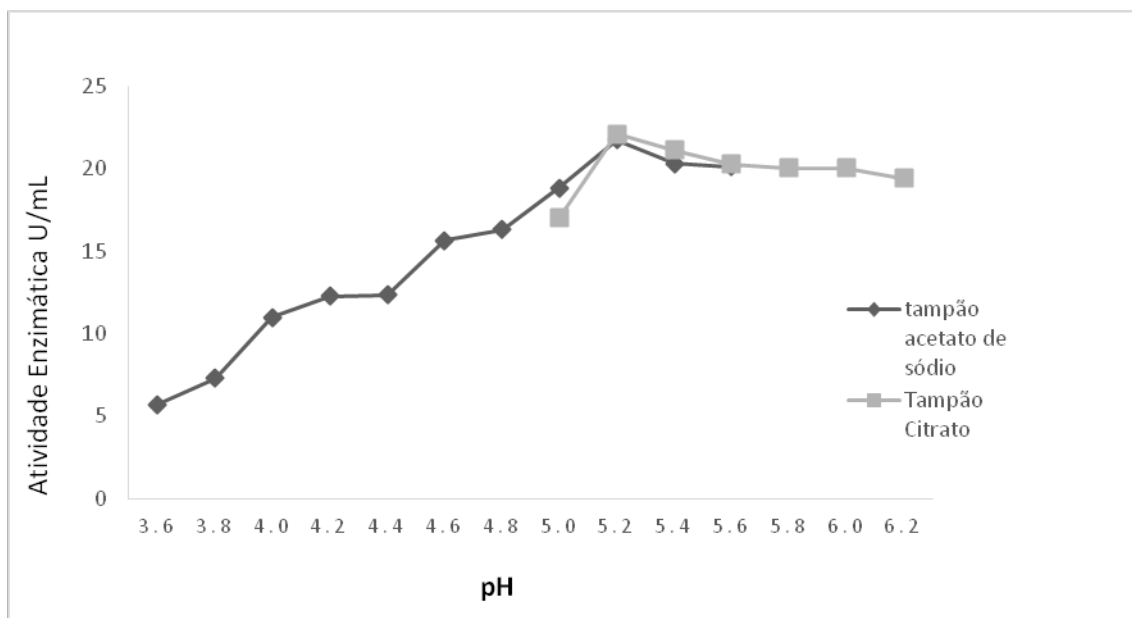


Figura 9. Efeito do pH na atividade enzimática da fosfatase ácida produzida por *P. gergoviae*. Tampões utilizados: acetato de sódio na faixa de 3,6 a 5,6 e tampão citrato de sódio na faixa de 5,0 a 6,2.

4.5.2. Efeito da Temperatura na Atividade da Fosfatase

Outro fator importante na caracterização de uma enzima é sua temperatura de trabalho. A influência da temperatura na atividade da fosfatase produzida por *P. gergoviae* foi avaliada entre 30 °C a 70 °C. A fosfatase manteve uma atividade relativa maior que 90% na faixa de temperatura entre 50 °C e 60 °C, e apresentou melhor atividade de reação a 55 °C (Figura 10). Valores iguais ou próximos são descritos para fosfatases por outros autores (Gonnety, 2006; Jing et al., 2006). No entanto, os valores de temperatura ótima das fosfatases ácidas podem variar. Um exemplo disto são fosfatases ácidas intra e extracelulares de *Aspergillus caespitosus*, que apresentaram atividade máxima de reação a 80 °C (Guimarães et al., 2004).

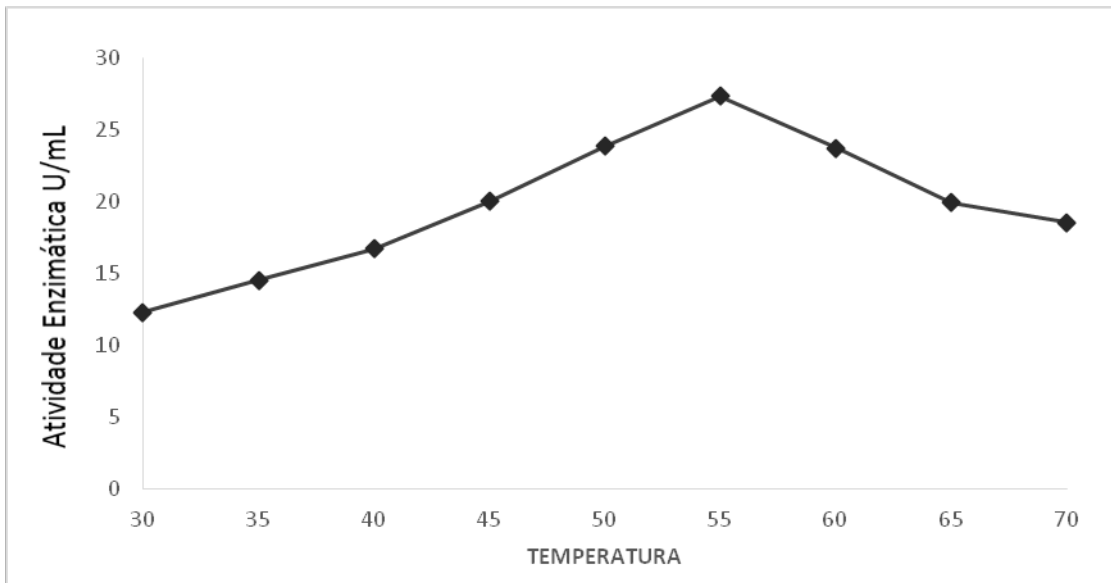


Figura 10. Efeito da temperatura na atividade fosfatase ácida produzida por *P. gergoviae*

4.5.3. Efeito de alguns íons sobre a atividade da fosfatase ácida

O efeito de compostos descritos na literatura como potenciais inibidores da atividade da fosfatase foi avaliada neste estudo. Como pode ser visto na Tabela 3, dentre os compostos testados, os íons cálcio e magnésio não interferiram na atividade da fosfatase, enquanto que o fosfato, o amônio e o potássio inibiram ligeiramente a atividade da enzima. Sabe-se que o fosfato inorgânico é um inibidor comum da maior parte das fosfatases ácidas produzidas por fungos e esta inibição pode estar associada a mecanismos de regulação da síntese de secreção da enzima (Guimaraes et al., 2004; Haas et al., 1991; Bernard et al., 2002; Li et al., 2006).

Tabela 3. Influência de alguns compostos sobre a atividade da fosfatase ácida produzida por *P.gergoviae*

Compostos (10 mM)	Atividade Relativa %
Controle	100
Cloreto de amônio	83
Cloreto de magnésio	103.1
Cloreto de cálcio	105.3
Cloreto de potássio	98.3
Fosfato de sódio	66.7

4.6. Imobilização da Enzima

Considerando-se que as plantas não podem utilizar o fosfato orgânico diretamente do meio, o uso de fosfatases ácidas para disponibilizar fosfato inorgânico para que a planta possa absorver este composto iria contribuir para a melhoria da produtividade agrícola e a fertilidade do solo (Srivastava e Anand, 2014; Purcena et al., 2014). No entanto, a atividade da fosfatase pode ser afetada por muitos fatores ambientais, tais como alterações no pH do solo, a presença de inibidores e proteases (Zhua et al., 2010; Sarkar et al., 1989; Kandeler, 1990; Huang et al., 2005).

Uma alternativa para superar este problema pode ser a imobilização de fosfatases em um suporte que preserve a sua atividade, sem interferir com as características do solo. O processo de imobilização aumenta a estabilidade da

enzima e oferece um ambiente favorável contra variações no pH, de temperatura, contra a proteólise e a lixiviação (Huang et al., 2009). Nesse sentido, no presente estudo, utilizou-se quatro componentes diferentes de solo de cerrado como suporte para a imobilização covalente da fosfatase ácida produzida por *P. gergoviae*.

A ativação prévia dos suportes a serem utilizados para imobilização de enzimas com glutaraldeído gera grupos aldeído sobre a superfície dos suportes, que poderão reagir com grupos amino superficiais da molécula de enzima através da formação de base de Schiff, conduzindo a imobilização da molécula enzima.

Os suportes testados neste estudo constituem os principais componentes do solo, responsáveis pela textura (granulometria) e características importantes tais como retenção de água, compactação, capacidade de lixiviação, disponibilidade de matéria orgânica, entre outras (Purcena et al, 2014). Há relatos na literatura de enzimas que apresentam capacidade de retenção (imobilização) em graus diferentes para frações que constituem o solo (Yan et al, 2010; Huang et al, 2009).

Como pode ser observado na Tabela 4, a eficiência da imobilização da fosfatase variou dependendo da fração de solo utilizado. Os melhores resultados de imobilização foram obtidos nos testes em que a sílica e a fração orgânica foram utilizadas como suporte, com rendimento de imobilização ao redor de 44%.

Tabela 4. Avaliação da eficiência da imobilização da fosfatase ácida produzida por *P. gergoviae* em diferentes frações de solo

Suporte	Proteína Imobilizada (mg/mL)	Atividade (U) Imobilizada	Atividade Específica
Argila	0,816	8,78	10,76
Areia	0,802	4,87	6,07
Sílica	0,815	10,44	12,81
Fração Orgânica	0,812	10,18	12,54

Os melhores resultados foram obtidos com a sílica e com a fração orgânica, que apresentaram valores de atividade específica por volta de 12 U mg P⁻¹, seguida pela argila com atividade específica de 10 U mg P⁻¹. A areia apresentou a capacidade de retenção mais baixa, com cerca de 6 U mg P⁻¹.

Em termos químicos, espera-se que a composição das frações argila e sílica sejam similares, uma vez que a argila deriva parcialmente da decomposição da sílica em fragmentos menores. Daí a similaridade na capacidade de retenção destas duas frações. Por outro lado, a baixa retenção observada na areia pode ter diferentes explicações. O fato da retenção de proteína na fração areia ser similar à observada nas outras frações, no permite sugerir uma explicação que passa por características intrínsecas deste suporte. É possível que na ativação com glutaraldeído tenham sido gerados um excessivo número de pontos de reticulação na superfície da areia e com isso tenha ocorrido uma sobre carga de enzima imobilizada neste suporte. A

proximidade entre as moléculas de fosfatase immobilizadas na superfície deste suporte pode ter causado impedimento espacial entre as moléculas da enzima, o que resultou em uma enzima immobilizada com atividade reduzida, ou mesmo inativa, diminuindo assim a eficiência do processo de imobilização.

Um ponto importante a ser destacado é que a fosfatase de *P. gergoviae* foi passível de ser immobilizada nas diferentes frações do solo, o que dá a esta enzima uma versatilidade de aplicações, pois independente da composição do solo alvo para recomposição com esta enzima, sua aplicação no solo resultará em catalisador imobilizado e, portanto, retido no ambiente sem risco de lixiviação.

Além disto, apesar de algumas frações de solo terem sido menos eficazes na retenção da atividade da fosfatase, o processo de imobilização tem como vantagem a possibilidade de aumentar a estabilidade da enzima, evitando a desnaturação e degradação da fosfatase no solo. Esta melhoria na estabilidade pode contribuir para aumentar a durabilidade catalítica da fosfatase ácida no solo e, por conseguinte, contribuir para aumentar a quantidade de fósforo inorgânico disponível para as plantas.

5. Conclusões

- Foi possível selecionar organismos produtores de fosfatase presentes em solo de cerrado.
- O organismo identificado com *P. gergoviae* foi caracterizado como um bom produtor *in vitro* de fosfatase
- O estudo de pH ótimo de atividade desta fosfatase permitiu caracterizá-la como uma fosfatase ácida, não-dependente de cálcio
- Esta fosfatase apresenta temperatura ótima de atividade em 55° C, sendo estável entre 50 e 60° C por 15 min
- Esta fosfatase pode apresentar maior afinidade por sílica quando submetida a testes de imobilização

6. Perspectivas

- Purificar a enzima
- Caracterizar a enzima após de imobilizada
- Testar o uso da enzima imobilizada em sílica para reposição de fosfatase em solo e fazer avaliações ao longo do tempo para medir a atividade enzimática no solo.

7. Referências Bibliográficas

AKSOY, S.; TUMTURK, H.; HASIRCI, N. Stability of α -amylase immobilized on poly(methyl methacrylate – acrylic acid) microspheres. *Journal of Biotechnology*, v. 60, p. 37 – 46, 1998.

AN, Q.; DONG, Y.; WANG, W.; LI, Y.; LI, J. Constitutive expression of the *nifA* gene activates associative nitrogen fixation of *Enterobacter gergoviae* 57-7, an opportunistic endophytic diazotroph. *Journal of Applied Microbiology*, v.103, p. 613 – 620, 2007.

ARORA, D.; GAUR, C. Microbial solubilization of different inorganic phosphates. *Indian J Exp Biol*, v. 17, p. 1258–1261, 1979.

AOYAMA H.; SILVA, T. M. A.; MIRANDA, A.; FERREIRA, C. V. Proteínas tirosinas fosfatases: propriedades e funções biológicas. *Química Nova*, v. 26, p. 896-900, 2003.

BABENKO, Y.S.; TYRYGINA, G.; GRIGORYEV, E. F.; DOLGIKH, L. M.; BORISOVA, T. I. Biological activity and physiologo-biochemical properties of bacteria dissolving phosphates. *Microbiologia*, v. 53, p. 533–9, 1984.

BERNARD, M.; MOUYNA, I.; DUBREUCQ, G.; DEBEAUPUIS, J-P.; FONTAINE, T.; VORGIAS, C.; FUGLSANG, C.; LATGE, J-P. Characterization of a cell-wall acid phosphatase (PhoAp) in *Aspergillus fumigatus*. *Microbiology*, v. 148, p. 2819–2829, 2002.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRADY, C.; CLEENWERCKB, I.; VENTERC, S.; COUTINHOC, T.; VOS, P. Taxonomic evaluation of the genus *Enterobacter* based on multilocus sequence

analysis (MLSA): Proposal to reclassify *E. nimipressuralis* and *E. amnigenus* into *Lelliottia* gen. nov. as *Lelliottia nimipressuralis* comb. nov. and *Lelliottia amnigena* comb. nov., respectively, *E. gergoviae* and *E. pyrinus* into *Pluralibacter* gen. nov. as *Pluralibacter gergoviae* comb. nov. and *Pluralibacter pyrinus* comb. nov., respectively, *E. cowanii*, *E. radicincitans*, *E. oryzae* and *E. arachidis* into *Kosakonia* gen. nov. as *Kosakonia cowanii* comb. nov., *Kosakonia radicincitans* comb. nov., *Kosakonia oryzae* comb. nov. and *Kosakonia arachidis* comb. nov., respectively, and *E. turicensis*, *E. helveticus* and *E. pulveris* into *Cronobacter* as *Cronobacter zurichensis* nom. nov., *Cronobacter helveticus* comb. nov. and *Cronobacter pulveris* comb. nov., respectively, and emended description of the genera *Enterobacter* and *Cronobacter*. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 36, p. 309 – 319, 2013.

BROSIUS, J.; DULL, T.J.; SLEETER, D.D.; NOLLER, H.F. Gene organization and primary structure of a ribosomal rna operon from *Escherichia coli*. *Journal Molecular Biology*, v.148, p. 107 – 127, 1981.

CHIBATA, I.; TOSA, T.; SATO, T.; MORY, T. Introduction. In: *Immobilized Enzymes – Research and Development*, New York: John Wiley & Sons, cap 1, p. 1-8, 1978.

COELLO, P. Purification and characterization of secreted acid phosphatase in phosphorusdeficient *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum*, v.116, p. 293-298, 2002.

COLE, J. R., B. CHAI, R. J. FARRIS, Q. WANG, S. A. KULAM, D. M. MCGARRELL, G. M. GARRITY, AND J. M. TIEDJE. The Ribosomal Database Project (RDP-II): sequences and tools for high-throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.*v 33, D294–D296, 2005.

COLEMAN, J. E. Structure and mechanism of Alkaline phosphatase. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* v. 21, p. 441-483, 1992.

COOPER, R. Bacterial fertilizers in the Soviet Union. *Soils Fertilizers*, v. 22, p. 327–30, 1959.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Alicações sintéticas de lipase imobilizadas em polímeros. *Quim. Nova*, v. 27, p. 623-630, 2004.

DICK, W. A.; TABATABAI, M. A. Significance and potential uses of soil enzymes. *Soil Microbial Ecology*. Metting FB (ed). Marrel Dekker, New York, p. 95-127, 1993

DICKMAN, M. B. e YARDEN, O. Serine/Threonine Protein Kinases and Phosphases in filamentous Fungi. *Fungal Genetic Biology*, v. 26, p. 99 – 117, 1999.

DEY, K. B. Phosphate solubilizing organisms in improving fertility status. In: Sen SP, Palit P, editors. *Biofertilizers: Potentialities and Problems*. Calcutta: Plant Physiology Forum, Naya Prokash, p. 237–48, 1988.

FERNANDES, L. A. ET AL. Frações de fosforo e atividade de fosfatase ácida em plantas de feijoeiro cultivadas em solo de várzea. *Ver. Bras. Ciência do Solo*. Brasília, v. 24, n. 3. P. 561-571, 2000.

FERNANDES, K. F.; LIMA, C. S.; PINHO, H.; COLLINS, C. H. Immobilization of Horseradish Peroxidase onto Polyaniline Polymers. *Process Biochemistry*, v. 38, p. 1379 – 1384, 2003.

FERNANDES, K. F.; LIMA, C. S.; LOPES, F. M. Técnicas de Imobilização de Enzimas. *Revista Processos Químicos*, v. 2, p. 53 – 58, 2010.

GARCÍA, T. A. N.; OLIVEIRA, M.; IRIBARNE C.; LLUCH, C. Partial purification and characterization of a non-specific acid phosphatase in leaves and root nodules of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 42, p. 585-591, 2004.

GARCIA, C.; FERNANDEZ, T.; COSTA, F.; CERRANTI, B.; MASCIANDARO, G. Kinetics of phosphatase activity in organic wastes. *Soil Biol. Biochem.*, v. 25, p. 361–5, 1992.

GAVRILESCUA, M.; CHISTI, J. Biotechnology: a sustainable alternative for chemical industry. *Biotechnol. Adv.*, v. 23, p. 471–499, 2005.

GERRETSEN, F. C. The influence of microorganisms on the phosphate intake by the plant. *Plant Soil.*, v 1, p. 51–81, 1984.

GLICK, B.R. The enhancement of plant growth by free living bacteria *Can. J. Microbiol.*, v. 41, p. 109–117, 1995.

GOLDSTEIN A.H., Bacterial solubilization of mineral phosphatases: historical perspective and future prospects. *Am J Altern Agri.*, v. 1, p. 51 – 57, 1986.

GOLDSTEIN, A. Involvement of the quinoprotein glucose dehydrogenase in the solubilization of exogenous mineral phosphates by gram-negative bacteria A. Torriani-Gorni, E. Yagil, S. Silver (Eds.), *Phosphate in Microorganisms: Cellular and Molecular Biology*, ASM Press, Washington, DC, p. 197–203, 1994.

GONNETY, J. T.; NIAMKÉ, S.; FAULET, B. M.; JEAN-PARFAIT, E.; KOUADIO, N.; KOUAMÉ, L. P. Purification and characterization of three low molecular-weight acid phosphatases from peanut (*Arachis hypogaea*) seedlings. *African Journal of Biotechnology*, v. 5(1), p. 35-44, 2006.

GUIMARÃES, L. H. S.; TEREZI, H. F.; JORGE, J. A.; LEONE, F. A.; POLIZELI, M. de L. T. Characterization and properties of acid phosphatases with phytase activity produced by *Aspergillus caespitosus*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v. 40, p. 201-207, 2004.

GUISAN, J. M. Em *Immobilization of Enzymes and Cells*; Guisan J. M., ed.; Humana Press: Totowa, cap. 1, 2006.

HAAS, H., REDL, B.; LEITNER, E.; STOFFLER G. *Penicillium chrysogenum*

extracellular acid phosphatase: purification and biochemical characterization. *Biochim Biophys*, v. 1074(3), p. 392–397, 1991.

HALDER, A.K.; CHAKRABARTTY, P.K. Solubilization of inorganic phosphate by *Rhizobium*. *Folia Microbiol*, v. 38, p. 325–330, 1993.

HAYASHI, H.; TAKAHASHI, R.; NISHI, T.; SAKAMOTO, M.; BENNO, Y. Molecular analysis of jejunal, ileal, caecal and recto-sigmoidal human colonic microbiota using *16S rRNA* gene libraries and terminal restriction fragment length polymorphism. *Journal of Medical Microbiology*, v. 54, p. 1093 – 1101, 2005.

HUANG, Q.; LIANG, W.; CAI, P. Adsorption, desorption and activities of acid phosphatase on various colloidal particles from an Ultisol. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 45, p. 209 – 214, 2005.

HUANG, Q.; ZHU, J.; QIAO, X.; CAI, P.; RONG, X.; LIANG, W.; CHEN, W. Conformation, activity and proteolytic stability of acid phosphatase on clay minerals and soil colloids from an Alfisol. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 74, p. 279-283, 2009

HWANGBO, H.; PARK, R.D.; KIM, Y.W.; RIM, Y.S.; PARK, K.H.; KIM, T.H.; SUCH, J.S.; KIM, K.Y. 2-ketogluconic acid production and phosphate solubilization by *Enterobacterintermedium*. *Curr Microbiol*, v. 47, p. 87–92, 2003.

JING, G.; LI, L.; LI, Y.; XIE, L.; ZHANG, R. Purification and partial characterization of two acid phosphatase forms from pearl oyster (*Pinctada fucata*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, v.143, p. 229-235, 2006.

KANDELER, E. Characterization of free and adsorbed phosphatases in soils. *Biology and Fertility of Soils*, v.9, p. 199 – 202, 1990.

KANG, G.; KIM, M.J.; KIM, J.M. Immobilization of thermostable amylase from *Bacillus stearothermophilus* for Continuous Production of Branched Oligosaccharides. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 45, p. 4168-4172, 1997.

KATZNELSON, H.; PETERSON, E. A.; ROVATT, J. W. Phosphate dissolving microorganisms on seed and in the root zone of plants. *Can J Bot.*, v. 40, p. 1181–6, 1962.

KHAN, J. A.; BHATNAGAR, R. M. Studies on solubilization of insoluble phosphate rocks by *Aspergillus niger* and *Penicillium* sp. *Fertil. Technol.*, v. 14, p. 329–333, 1977.

KENNEDY, J. F.; WHITE, C. A. Principles of immobilization of enzymes. In: WISEMAN, A. (ed). *Handbook of enzymes Biotechnology*. New York: John Wiley and Sons. cap.4, p.147-207, 1986.

KIM, K.Y.; MCDONALD, G.A.; JORDAN D. Solubilization of hydroxyapatite by *Enterobacter agglomerans* and cloned *Escherichia coli* in culture medium. *Biol Fertil Soils*, v. 24, p. 347–352, 1997.

LADD, J.N. Origin and range of enzymes in soils. *Soil enzymes*. Burns RG (ed) Academic Press London, p. 51-96, 1978.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, p. 680-685, 1970.

LEITÃO, V. O.; LIMA, R. C. M.; VAINSTEIN, M. H.; ULHOA, C. J. Purification and characterization of an acid phosphatase from *Trichoderma harzianum*, *Biotechnology Letters*, v. 32(8), p. 1083-1088, 2010.

LI, Z.; WANG, Z.; PENG, G.; YIN, Y.; ZHAO, H.; CAO, Y.; XIA, Y. Purification and characterization of a novel thermostable extracellular protein tyrosine phosphatase from *Metarhizium anisopliae* strain CQMa102. *Biosci Biotechnol*

Biochem, v. 70(8), p. 1961–1968, 2006.

LIMA, M. C, R. Caracterização Bioquímica de uma fosfatase ácida produzida por *Thichoderma harzianum*. 2006. 54p. Tese (Mestrado) Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas, Goiânia, 2006.

LOPEZ, B.R.; BASHAN, Y; BACILIO, M. Endophytic bacteria of *Mammillaria fraileana*, an endemic rock-colonizing cactus of the Southern Sonoran Desert. *Arch Microbiol*, v. 193, p. 527–541, 2011.

MAGBOUL, A. A. A. e MCSWEENEY, P. L. H. Purification and characterization of an acid phosphatase from *Lactobacillus curvatus* DPC2024. *International Dairy Journal*, v. 9, p. 849-885, 1999.

MOURA, V. M. B. D. et al. Mensuração de hormônios andrógeno, estrógeno, fosfatase ácida prostática e antígeno prostático específico em cães adultos com próstata normal e hiperplásica. *Braz. J. vet. Res. Anim. Sci.*, São Paulo, v 43, p 65-73, 2006.

NAKAGI, V. S. Caracterização da atividade da fosfatase ácida de *Penicillium implicatum*. 2007. 32 f. Dissertação (Mestre em Microbiologia Agropecuária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho” Campus de Jabutical, 2007.

PIKOVSKAYA, R. I. Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species. *Mikrobiologiya*, v. 17, p. 362-370, 1948.

PUENTE, M.E.; LI, C.Y.; BASHAN, Y. Endophytic bacteria in cacti seeds can improve the development of cactus seedlings. *Environ Exp Bot*, v. 66, p. 402–408, 2009.

PURCENA, L. L. A, DI MEDEIROS M. C. B, LEANDRO W. M, FERNANDES K. F. Effects of Organic and Conventional Management of Sugar Cane Crop on

Soil Physicochemical Characteristics and Phosphomonoesterase Activity. Journal Agricultural and Food Chemistry, v. 62, p 1456–1463, 2014.

RAGHU, K.; MACRAE, I. C. Occurrence of phosphate-dissolving microorganisms in the rhizosphere of rice plants and in submerged soils. J. Appl. Bacteriol., v. 29, p. 582–586, 1966.

RICHARDSON, A. E. Soil microorganisms and phosphorus availability. In: Pankhurst CE, Doube BM, Gupta VVSR, Grace PR, editors. Soil Biota, Management in Sustainable Farming Systems. Melbourne, Australia: CSIRO, p. 50–62, 1994.

RICHARDSON, A. E. Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. Aust J. Plant Physiology, v. 28, p. 897-907, 2001.

RODRIGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. Biothechnol. Adv., v. 17, p. 319-339, 1999.

RODRÍGUEZ, H.; GOIRE, I.; RODRÍGUEZ, M. Caracterización de cepas de *Pseudomonas* solubilizadoras de fósforo. Rev ICIDCA, v. 30, p. 47–54, 1996.

ROMBOLA, T. H.; NASCIMBEM, E. A.; LEMOS, E. G.; MARQUES, A.; JOSÉ DOS SANTOS, L. F.; MARTINS, J. Identification and enzymatic characterization of acid phosphatase from *Burkholderia gladioli*. BioMed Central Research Notes, v. 7: 221, 2014.

ROSSOLINI, G.M.; SHIPA, S.; RICCIO, M.L.; BERLUTTI, F.; MACASKIE, L.E.; THALLER, M.C. Bacterial non-specific acid phosphatases: physiology, evolution, and use as tools in microbial biotechnology. Cell. Mol. Life Sci., v. 54, p. 833–850, 1998.

SANYAL, S. K.; DATTA, de S. K. Chemistry of phosphorus transformation in soil. *Advances in Soil Science*, v.133 (2), p. 455–471, 1991.

SARKAR, J.M.; LEONOWICZ, A.; BOLLAG, J.M. Immobilization of enzymes on clays and soils. *Soil Biology and Biochemistry*, v.21, p. 223 – 230, 1989.

SILVA, K.F.F., Imobilização de horseradish peroxidase em diferentes poli (Anilinas): Aplicações analíticas. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas (SP). 217f. 2000.

SRIVASTAVA, P.K.; ANAND, A. Immobilization of acid phosphatase from *Vigna aconitifolia* seeds on chitosan beads and its characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*, v.64, p. 150 – 154, 2014.

SOUZA, A. A. Produção e caracterização bioquímica de uma fosfatase ácida de *Trichoderma harzianum* (ALL42). 2011.82f. Dissertação (Mestre em Biologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, 2011.

SPERBER, J.I. The incidence of apatite-solubilizing organisms in the rhizosphere and soil. *Aust J Agr Res*, v. 9, p. 778–781, 1958^a.

SPERBER, J.I. Solubilization of apatite by soil microorganisms producing organic acids. *Aust J Agr Res*, v. 9, p. 782–787, 1958^b.

STEC, B.; HOLTZ, K. M.; KANTROWITZ, E. R. A revised mechanism for the alkaline phosphatase reaction involving three metal ions. *Journal Molecular Biology*, v. 299, p. 1303 – 1311, 2000.

TAHA, S.M.; MAHMOUD S.A.Z.; EL-DAMATY A.A.; EL- HAFEZ A.M. Activity of phosphate dissolving bacteria in Egyptian soil. *Plant Soil*, v. 31, p.149.

THALLER, M.C.; BERLUTTI, F.; SCHIPPA, S.; IORI, P.; PASSARIELLO, C.; ROSSOLINI, G.M. Heterogeneous patterns of acid phosphatases containing

low-molecular-mass Polipeptides in members of the family Enterobacteriaceae. *Int J Syst Bacteriol*, v.4, p. 255–261, 1995.

TARAFDAR, J. C. e CLAASSEN, N. Organic phosphorus compounds as a phosphorus source for higher plants through the activity of phosphatases production by plant roots and microorganisms. *Biology and Fertility of Soil*, v. 5, p. 308 – 312, 1988.

TARAFDAR, J. C. e JUNGK, A. Phosphatase in the rhizosphere and its relation to the depletion of soil organic phosphorus. *Biology and Fertility of Soils*, v. 3, p. 199–204, 1987.

TARAFDAR, J. C.; YADAV, R. S.; MEENA, S. C. Comparative efficiency of acid phosphatase originated from plant and fungal sources. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* v. 164, p. 279-282, 2001.

VAZQUEZ, P.; HOLGUIN, G.; PUENTE, M.; LOPEZ-CORTES, A; BASHAN, Y. Phosphate solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semi-arid coastal lagoon. *Biol Fertil Soils*, v. 30, p. 460–468, 2000.

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J. M.; GRAILLE, J.; HAAS, M. J. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, v. 9, p. 113 – 148, 2000.

VITOLLO, M. Imobilização de Enzimas. In: LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. (coords.). *Biotecnologia Industrial: processos fermentativos e enzimáticos*, vol 3, cap. 18, São Paulo: Edgard Blucher, 2001.

WANG, Q; GARRITY, G. M.; TIEDJE, J. M.; COLE, J. R. Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. *Appl Environ Microbiol*, v. 73(16), p. 5261-5267, 2007.

XI, F., WU, J., JIA, Z., LIN, X. Preparation and characterization of trypsin immobilized on silica gel supported macroporous chitosan bead. *Process Biochemistry* 40: 2833-2840, 2005.

XU, J. G.; JOHNSON, R. L. Root growth, microbial activity and phosphatase activity in oil-contaminated, remediated and uncontaminated soils planted to barley and field pea. *Plant Soil*, v. 173, p. 3–10, 1995.

ZHANG, Z. Y. Protein tyrosine phosphatases: structure and function, substrate specificity, and inhibitor development. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, v. 42, p. 209-234, 2002.

ZHUA, J.; HUANGA, Q.; PIGNAB, M.; VIOLANTEB, A. Immobilization of acid phosphatase on uncalcined and calcined Mg/Al-CO₃ layered double hydroxides. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v.77, p.166 – 173, 2010.