

Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz De Queiroz”
Centro de Energia Nuclear na Agricultura

ENZIMAS DO SOLO E SUAS ASSOCIAÇÕES COM GENES DO CICLO DO CARBONO, FÓSFORO E ENXOFRE EM SOLOS DA AMAZÔNIA OCIDENTAL

Vitor Fernando Barro
Discente em Ciências Biológicas

Orientadora:
Prof^a. Dr^a. Tsai Siu Mui

Projeto de TCC apresentado para a
obtenção do título de Bacharel em
Ciências Biológicas.

Piracicaba – SP
Maio – 2023

1. Introdução e justificativa

A floresta Amazônica ocupa uma área de 7 milhões de km² ao longo de 9 países, sendo a maior floresta tropical do mundo. Em decorrência disso, funciona como um importante reservatório de biodiversidade, abrigando em torno de 40 mil espécies de plantas, 3.000 espécies de peixes, 1.300 espécies de aves, 427 espécies de mamíferos e de anfíbios e 378 espécies de répteis (SILVA; CASTRO-GAMBOA; BOLZANI, 2010). A floresta Amazônica também apresenta grande relevância na regulação climática através do armazenamento de cerca de 123 ± 31 Pg de carbono em sua biomassa total e do controle das chuvas tanto na própria floresta como no restante do país (MALHI et al., 2006; SANTOS et al., 2021). No entanto, o aumento do desmatamento na região, que no ano de 2022 chegou a 10.573 km² (IMAZON, 2023), coloca todos esses serviços ecossistêmicos em risco.

O desmatamento na Amazônia pode ser causado por efeitos ambientais diretos, ou seja, aqueles em que os impactos ocorrem de maneira imediata em escala local, como expansão de pastagens e áreas agrícolas, extração madeireira e expansão da infraestrutura, e causas indiretas, ou seja, decorrentes de processos sociais, como aumento populacional e políticas públicas (GEIST; LAMBIN, 2002). Das causas diretas, a expansão pecuária é a mais expressiva, estando relacionada com 80% do desmatamento (SKIDMORE et al., 2021), isso por causa da baixa densidade animal e baixa produtividade por hectare, sendo resultados do baixo investimento e pequena manutenção do meio necessários para desenvolver tal atividade (PAULO; ABDALLA, 2019). Como consequência, grandes extensões de terra encontram-se com cobertura ineficiente, o que facilita sua erosão ao mesmo tempo que reduz a retenção de água e estimula a lixiviação de nutrientes, impactando negativamente na fertilidade do solo. Nesse contexto, os sistemas agroflorestais são uma ótima alternativa uma vez que melhoram as propriedades do solo (RIBASKI, 2015) e contribuem para a mitigação do efeito estufa através do aumento nos estoques de carbono na biomassa vegetal e do solo (TORRES et al., 2014).

O carbono (C), o fósforo (P) e o enxofre (S) são elementos fundamentais para a manutenção e continuidade da vida na Terra, pois são os constituintes primários da matéria orgânica. O ciclo do C é importante para a regulação das mudanças climáticas, por meio do controle de gases de efeito estufa, como o dióxido de carbono (CO₂) e metano (CH₄) (ROSS; WASKOW; GE, 2021). Já o P e o S são importantes para a

vitalidade das plantas, estando presentes em vários processos essenciais para a ocorrência da fotossíntese e, conseqüentemente, no crescimento e desenvolvimento vegetativo (NARAYAN et al., 2022; VASCONCELOS et al., 2022). Além disso, o P atua na síntese de ATP para a manutenção e transformação de carboidratos, gerando resistência contra doenças e estresses ambientais (DIANESE; BLUM, 2010; LANZA, 2021). No entanto, esse elemento apresenta baixa disponibilidade nos solos brasileiros, devido principalmente ao alto processo de intemperização dos minerais de argila (PAVINATO et al., 2020).

Tendo isso em vista, conhecer e entender como os ciclos desses elementos vem se alterando ao longo do tempo na floresta Amazônica em função da mudança no uso do solo é imperativo para a conservação do bioma, de sua biodiversidade e sua funcionalidade, além de estimular o uso de medidas que permitam o aumento da produtividade concomitantemente à redução do desmatamento. A capacidade da floresta Amazônica em atuar como receptor de carbono está diretamente associada com sua produtividade, que é dependente dos elementos presentes no solo, dentre eles, o fósforo e o enxofre (MALHI et al., 2009; HOFANSL et al., 2020). No entanto, as características edáficas da Amazônia são bastante variadas, por isso, nas regiões leste e centro, que estão fundamentadas em um solo mais antigo, o fósforo encontra-se menos disponível (REICHERT et al., 2022). Por exemplo, em um experimento conduzido em uma floresta na Amazônia central, foi verificado o aumento da produtividade primária líquida em decorrência do melhor desenvolvimento do dossel e das raízes finas de suas árvores após dois anos de aplicação de P (CUNHA et al., 2022). Por outro lado, Reichert et al. (2022) encontraram que grande parte das características morfológicas radiculares não se alteram significativamente com a fertilização com fósforo inorgânico, mas que seu comprimento aumentava em condições de elevado CO₂. Isso levanta o questionamento de quanto carbono poderia estar sendo capturado da atmosfera em contraste com o quanto de fato está sendo transformado em biomassa.

Segundo Adetunji et al. (2017), enzimas atuam melhor como indicadores da qualidade do solo do que fatores químicos ou físicos em decorrência de serem mais sensíveis aos impactos ambientais, o que faz com que seu estado seja alterado mais rapidamente. A enzima beta-glicosidase faz parte do ciclo do C e sua ação consiste na hidrólise das moléculas de celobiose presentes na última etapa da degradação da celulose, servindo como fonte de energia para microrganismos (CAÑIZARES;

BENITEZ; OGUNSEITAN, 2011; MORENO et al., 2013), enquanto a ação da fosfatase consiste na transformação do fósforo orgânico em inorgânico, para ser posteriormente absorvida pelas plantas, sendo que sua concentração no solo será maior quando houver menos fosfato inorgânico disponível (ADETUNJI et al., 2017). Já a arilsulfatase participa do ciclo do S através da hidrólise de ésteres de sulfato, produzindo íons sulfato, que então também poderão ser assimilados pelas plantas (TABATABAI; BREMNER, 1970). É observado de forma frequente a correlação entre a atividade dessa enzima com o carbono orgânico presente no solo, atribuída à proteção da matéria orgânica deixada no ambiente, e evidenciado a diminuição de seu desempenho quanto maior a profundidade do solo (DENG; TABATABAI, 1997).

Apesar de uma fração das enzimas encontradas no solo serem sintetizadas por plantas e animais, a sua maior parte se deve à ação de microrganismos (ADETUNJI et al., 2017; ATTADEMO et al., 2021), ou seja, possuem papel fundamental na ciclagem de nutrientes. Nesse sentido, a composição e estrutura das comunidades microbianas do solo são essenciais e devem ser preservadas, pois podem ser alteradas drasticamente em função do uso da terra (TAMILSELVI et al., 2022). Sendo assim, entender e identificar alguns genes relacionados aos ciclos biogeoquímicos podem ser de suma importância para identificar de forma preventiva a perda ou redução de funções da ciclagem de nutrientes no solo. Por exemplo, os genes *phoC* e *pqqC* são bastante utilizados para estudar o ciclo do P (FRASER et al., 2017; ZHENG et al., 2017), enquanto os genes *mcrA* e *pmoA* são utilizados para estudar o ciclo do CH₄ (OBREGON et al., 2023; PEDRINHO et al., 2023), e os genes *soxB* e *dsrAB* são os principais utilizados no ciclo do S (WANG et al., 2021; VENTURINI et al., 2022). No entanto, a correlação desses genes funcionais e a atividade dessas enzimas ainda são pouco entendidas em solos da região Amazônica.

Portanto, estudar a atuação das enzimas fosfatase, beta-glicosidase e arilsulfatase sob diferentes modos de utilização da terra possibilita entender melhor a ciclagem de nutrientes, a taxa de decomposição da matéria orgânica e o impacto da ação humana nos ambientes bem como pensar em medidas para contornar essa problemática. E associar essas informações com dados genéticos possibilita entender quais funções microbianas estão sendo favorecidas e quais papéis elas estão exercendo no solo.

2. Objetivo

O projeto tem como objetivo analisar enzimas envolvidas nos ciclos do carbono, fósforo e enxofre, em solos de floresta Amazônica (três sistemas agroflorestais, uma floresta primária e uma pastagem) na camada superficial (0-10 cm), intermediária (10-20 cm) e inferior (20-30 cm) do solo, durante a estação seca e chuvosa.

3. Hipóteses

Os solos de agroflorestas possuem uma atividade enzimática semelhante ao de uma floresta primária e maiores que o de uma pastagem degradada. Essa atividade será maior na estação chuvosa do que na estação seca devido a maior atividade microbiana, e também irá diminuir quanto maior a profundidade do solo em decorrência da menor disponibilidade de matéria orgânica. Além disso, espera-se que os genes funcionais relacionados à ciclagem do carbono, fósforo e enxofre estejam positivamente correlacionados com as atividades enzimáticas correspondentes.

4. Materiais e métodos

4.1. Descrição das áreas

As áreas de estudo estão localizadas nos municípios de Manaus e Manacapuru, no estado do Amazonas. O primeiro sistema agroflorestal (SAF1) tem 30 anos e está localizado Ramal do Laranjal (03°16'50" S; 60°30'17" W), em Manacapuru. O segundo sistema agroflorestal (SAF2) tem 20 anos e está localizado no Centro de Referência Ecológica do Instituto Federal do Amazonas (IFAM) (03°05'01" S; 59°56'09" W). O terceiro sistema agroflorestal (SAF3) tem 10 anos e está localizado na área experimental da Comissão Executiva do Plano Lavoura Cacaueira (CEPLAC) (02°33'23" S; 60°02'05" W). Todos os SAFs possuem Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) como cultura principal, mas também possuem outras culturas comerciais de interesse, como Cacau (*Theobroma cacao*), Açaí (*Euterpe oleracea*), Seringueira (*Hevea brasiliensis*) e Castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa*). Concomitantemente, uma área de Floresta Nativa (FN) localizada próxima ao SAF1 (03°16'47" S; 60°30'19" W), e uma área de Pastagem Degradada (PD), localizada próximo ao SAF3 (02°28'36" S; 60°02'02" W), serão utilizadas como referência para os efeitos das mudanças

causadas no uso da terra. As amostras foram coletadas em tubos tipo Falcon de 50mL em três profundidades (0-10cm, 10-20cm e 20-30cm), cada uma com 5 repetições, sendo um ponto central e outros quatro espaçadas em torno de 30m desta, em direções opostas, formando um quadrado com um ponto central no meio. As coletas foram realizadas em estação chuvosa e seca.

4.2. Atividade de fosfatase ácida

A análise da atividade enzimática no solo será feita segundo Tabatabai e Bremner (1969). Para isso, 1 g de solo de cada amostra será pesado em tubos Falcon de 50 mL, sendo então acrescentados 4mL de MUB (tampão universal modificado) pH 6,5 e 1mL de p-nitrofenil fosfato de sódio (PNP), este último em todas as amostras, menos nas controle. Os tubos Falcon então serão agitados por 5 segundos para que o solo e os reagentes se misturem e serão incubados durante 1h em um agitador orbital. Após esse período, será acrescentado 1mL de CaCl_2 0,5M e 4 mL de NaOH 0,5M em todas as amostras e 1 mL de PNP nas amostras controle. As amostras serão novamente agitadas por 5 segundos e então postas para filtrar em filtro Whatman nº. 2. A intensidade da cor do extrato será mensurada utilizando espectrofotômetro em 405 nm.

4.3. Atividade de beta-glicosidase

A análise da enzima beta-glicosidase no solo será feita segundo Tabatabai (1994). Para isso, 1 g de solo de cada amostra será pesado em tubos Falcon de 50 mL, sendo então acrescentados 4 mL de MUB (tampão universal modificado) pH 6 e 1 mL de p-nitrofenol- β -D-glicosídeo (PNG), este último em todas as amostras, menos nas controle. Os tubos Falcon então serão agitados por 5 segundos para que o solo e os reagentes se misturem e serão incubados durante 1 h em um agitador orbital. Após esse período, será acrescentado 1 mL de cloreto de cálcio 0,5 M e 4 mL de THAM 0,1M pH 12 em todas as amostras e 1 mL de PNG nas amostras controle. As amostras serão novamente agitadas por 5 segundos e então postas para filtrar em filtro Whatman nº. 2. A intensidade da cor do extrato será mensurada utilizando espectrofotômetro em 405 nm.

4.4. Atividade da arilsulfatase

A análise da enzima arilsulfatase no solo será feita segundo Tabatabai e Bremner (1970). Para isso, 1 g de solo de cada amostra será pesado em tubos Falcon de 50 mL, sendo então acrescentados 4 mL do tampão acetato pH 5,8 e 1 mL de p-nitrofenilsulfato (PNS), este último em todas as amostras, menos nas controle. Os tubos Falcon então serão agitados por 5 segundos para que o solo e os reagentes se misturem e serão incubados durante 1h em um agitador orbital. Após esse período, será acrescentado 1 mL de CaCl_2 0,5 M e 4 mL de NaOH 0,5M em todas as amostras e 1 mL de PNS nas amostras controle. As amostras serão novamente agitadas por 5 segundos e então postas para filtrar em filtro Whatman nº. 2. A intensidade da cor do extrato será mensurada utilizando espectrofotômetro em 405 nm.

4.5. Curva padrão

Serão diluídos 1mL da solução padrão de p-nitrofenil fosfato em 100 mL de água. Então, 0, 1, 2, 3, 4 e 5 mL dessa diluição serão distribuídos em seus respectivos frascos e ajustado para 5 mL. Serão acrescentados 1mL de CaCl_2 e 4 mL de NaOH 0,1M em cada frasco. Estes serão agitados e então filtrados. O filtrado resultante será lido em espectrofotômetro e a partir dos resultados será feita uma regressão linear no Excel entre os níveis conhecidos de solução com os valores de absorbância obtidos no espectrofotômetro.

4.6. PCR quantitativo (qPCR)

A técnica de qPCR será utilizada para quantificar a abundância dos genes funcionais *phoC*, *pqqC*, *mcrA*, *pmoA* e *soxB*. A sequência dos primers utilizados e especificações das reações podem ser encontradas na Tabela 1. Todas as amostras serão analisadas em duplicatas, cada reação será realizada em um volume total de 10 μL , contendo 5 μL de SYBR Green ROX qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, Massachusetts, EUA), 1 μL do primer forward e 1 μL do primer reverse, 0,2 μL de BSA (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, Massachusetts, EUA), 1,8 μL de água Milli-Q autoclavada e 1 μL de DNA. As reações serão realizadas no termociclador StepOnePlus (Applied Biosystems). As quantificações serão baseadas por meio da preparação de uma curva padrão realizada entre 10^1 até 10^8 pela diluição seriada de

uma amostra inicial contendo 3 µL da amostra de interesse diluída em 27 µL de água Milli-Q autoclavada.

Tabela 1. Primers e perfis térmicos usados para ensaios qPCR dos genes funcionais.

Elemento	Gene alvo	Primer	Sequência (5'-3')	Anelamento (°C)	Referência
Fósforo	<i>phoC</i>	phoc-A-F1	CGGCTCCTATCCGTCCGG	58	Fraser et al. (2017)
		phoc-A-R1	CAACATCGCTTTGCCAGTG		
	<i>pqqC</i>	pqqC-Fw	ACCGCTTCTACTACCAG	62	
		pqqC-Rv	GCGAACAGCTCGGTCAG		
Metano	<i>mcrA</i>	mlas-mod-F	GGYGGTGTMGDDTTAC-MCARTA	57	Zheng et al. (2017) Angel; Klaus; Conrad, (2012) Steinberg; Regan (2008)
		mcrA-rev	CGTTCATBGCCTAGTTVG-GRTAGT		
	<i>pmoA</i>	A189	GGNGACTGGGACTTCTGG	60	
		mb661	CCGGMGCAACGTCYTTACC		
Enxofre	<i>soxB</i>	soxB432F	GAYGGNGGNGAYACNTGG	54	Zhao et al. (2017)
		soxB693B	TANGGRAANGCYTGNC CGAT		

5. Cronograma

Tabela 2. Atividades a serem desenvolvidas

Atividades	1º e 2º mês	3º e 4º mês	5º e 6º mês
Coleta de solo	Etapa já realizada		
Atividade enzimática	X	X	
Quantificação de genes por qPCR	X	X	
Análise dos resultados	X	X	
Redação do trabalho de conclusão do curso		X	X

6. Referências

ADETUNJI, A. T. et al. The biological activities of β -glucosidase, phosphatase and urease as soil quality indicators: A review. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, v. 17, n. 3, p. 794–807, 2017.

ANGEL, R.; CLAUS, P.; CONRAD, R. Methanogenic archaea are globally ubiquitous in aerated soils and become active under wet anoxic conditions. *ISME Journal*, v. 6, n. 4, p. 847–862, 2012.

ATTADEMO, A. M. et al. Enzyme Activities as Indicators of Soil Quality: Response to Intensive Soybean and Rice Crops. *Water, Air, and Soil Pollution*, v. 232, n. 7, 2021.

CAÑIZARES, R.; BENITEZ, E.; OGUNSEITAN, O. A. Molecular analyses of β -glucosidase diversity and function in soil. *European Journal of Soil Biology*, v. 47, n. 1, p. 1–8, 2011.

COSTELLO, A. M.; LIDSTROM, M. E. Molecular Characterization of Functional and Phylogenetic Genes from Natural Populations of Methanotrophs in Lake Sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 65, n. 11, p. 5066–5074, nov. 1999.

CUNHA, H. F. V. et al. Direct evidence for phosphorus limitation on Amazon forest productivity. *Nature*, v. 608, n. 7923, p. 558–562, 2022.

DENG, S. P.; TABATABAI, M. A. Effect of tillage and residue management on enzyme activities in soils: III. Phosphatases and arylsulfatase. *Biology and Fertility of Soils*, v. 24, n. 2, p. 141–146, 1997.

DIANESE, A. C.; BLUM, L. E. O Uso de Fosfitos no Manejo de Doenças Fúngicas em Fruteiras e Soja. p. 29, 2010.

FRASER, T. D. et al. Quantification of bacterial non-specific acid (phoC) and alkaline (phoD) phosphatase genes in bulk and rhizosphere soil from organically managed soybean fields. *Applied Soil Ecology*, v. 111, p. 48–56, 2017.

GEIST, H. J.; LAMBIN, E. F. Proximate causes and underlying driving forces of tropical deforestation. *BioScience*, v. 52, n. 2, p. 143–150, 2002.

HOFHANSL, F. et al. Climatic and edaphic controls over tropical forest diversity and vegetation carbon storage. *Scientific Reports*, v. 10, n. 1, p. 1–11, 2020.

HOLMES, A. J. et al. Evidence that particulate methane monooxygenase and ammonia monooxygenase may be evolutionarily related. v. 132, p. 203–208, 1995.

IMAZON. Amazônia perdeu quase 3 mil campos de futebol por dia de floresta em 2022, maior desmatamento em 15 anos. Disponível em: <[https://imazon.org.br/im-prensa/amazonia-perdeu-quase-3-mil-campos-de-futebol-por-dia-de-floresta-em-2022-maior-desmatamento-em-15-anos/#:~:text=A Amazônia sofreu em 2022, monitorar a região%2C em 2008.>](https://imazon.org.br/im-prensa/amazonia-perdeu-quase-3-mil-campos-de-futebol-por-dia-de-floresta-em-2022-maior-desmatamento-em-15-anos/#:~:text=A%20Amaz%C3%93nia%20sofreu%20em%202022,monitorar%20a%20regi%C3%A3o%20em%202008.>)> Acesso em: 18 abr. 2023.

LANZA, M. G. D. B. Macronutrientes e estresse vegetal. Disponível em: <https://agro-advance.com.br/macronutrientes-e-estresse-vegetal-maior-aplicacao-para-maior-protacao/#Fosforo_P>. Acesso em: 11 maio. 2023.

MALHI, Y. et al. The regional variation of aboveground live biomass in old-growth Amazonian forests. *Global Change Biology*, v. 12, n. 7, p. 1107–1138, 2006.

MALHI, Y. et al. Comprehensive assessment of carbon productivity, allocation and storage in three Amazonian forests. *Global Change Biology*, v. 15, n. 5, p. 1255–1274, 2009.

MORENO, B. et al. Genetic diversity of bacterial β -glucosidase-encoding genes as a function of soil management. *Biology and Fertility of Soils*, v. 49, n. 6, p. 735–745, 2013.

NARAYAN, O. P. et al. Sulfur nutrition and its role in plant growth and development. *Plant Signaling & Behavior*, v. 00, n. 00, 7 fev. 2022.

OBREGON, D. et al. Functionality of methane cycling microbiome during methane flux hot moments from riparian buffer systems. *Science of the Total Environment*, v. 870, n. February, 2023.

PAULO, S.; ABDALLA, C. A. As principais causas diretas do desmatamento na Amazônia. *As principais causas diretas do desmatamento na Amazônia*. p. 1–29, 2019.

PAVINATO, P. S. et al. Revealing soil legacy phosphorus to promote sustainable agriculture in Brazil. *Scientific Reports*, v. 10, n. 1, p. 1–11, 2020.

PEDRINHO, A. et al. Impacts of deforestation and forest regeneration on soil bacterial communities associated with phosphorus transformation processes in the Brazilian Amazon region. *Ecological Indicators*, v. 146, n. December 2022, 2023.

REICHERT, T. et al. Plant phosphorus-use and -acquisition strategies in Amazonia. *New Phytologist*, v. 234, n. 4, p. 1126–1143, 2022.

RIBASKI, J. *As vantagens dos Sistemas Agroflorestais*. 2015.

ROSS, K.; WASKOW, D.; GE, M. Como as emissões de metano contribuem com as mudanças climáticas. Disponível em: <<https://www.wribrasil.org.br/noticias/como->

emissoes-de-metano-contribuem-com-mudancas-climaticas>. Acesso em: 11 maio. 2023.

SANTOS, A. M. DOS et al. Deforestation drivers in the Brazilian Amazon: assessing new spatial predictors. *Journal of Environmental Management*, v. 294, n. May, 2021.

SILVA, D. H. S.; CASTRO-GAMBOA, I.; BOLZANI, V. D. S. Plant diversity from Brazilian Cerrado and Atlantic Forest as a tool for prospecting potential therapeutic drugs. In: *Comprehensive Natural Products II: Chemistry and Biology*. [s.l.: s.n.]. v. 3p. 95–133.

SKIDMORE, M. E. et al. Cattle ranchers and deforestation in the Brazilian Amazon: Production, location, and policies. *Global Environmental Change*, v. 68, p. 102280, 1 maio 2021.

STEINBERG, L. M.; REGAN, J. M. Phylogenetic comparison of the methanogenic communities from an acidic, oligotrophic fen and an anaerobic digester treating municipal wastewater sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 74, n. 21, p. 6663–6671, 2008.

TABATABAI, M. A. Soil Enzymes. In: *Methods of Soil Analysis: Part 2 Microbiological and Biochemical Properties*, 5.2. [s.l.: s.n.]. p. 775–833.

TABATABAI, M. A.; BREMNER, J. M. Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 1, n. 4, p. 301–307, 1969.

TABATABAI, M. A.; BREMNER, J. M. Arylsulfatase Activity of Soils. *Soil Science Society of America Journal*, v. 34, p. 225–229, 1970.

TAMILSELVI, S. M. et al. Microbial behavior, responses toward salinity stress, mechanism of microbe-mediated remediation for sustainable crop production. [s.l.] Elsevier Inc., 2022.

TORRES, C. M. M. E. et al. Sistemas Agroflorestais no Brasil: Uma abordagem sobre a estocagem de carbono. *Pesquisa Florestal Brasileira*, v. 34, n. 79, p. 235, 2014.

VASCONCELOS, M. J. V. DE et al. Plant Phosphorus Use Efficiency in Acid Tropical Soil. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, v. 21, 2022.

VENTURINI, A. M. et al. Genome-resolved metagenomics reveals novel archaeal and bacterial genomes from Amazonian forest and pasture soils. *Microbial Genomics*, v. 8, n. 7, 2022.

WANG, M. et al. Soil bacteria, genes, and metabolites stimulated during sulfur cycling and cadmium mobilization under sodium sulfate stress. *Environmental Research*, v. 201, n. 12, p. 111599, 2021.

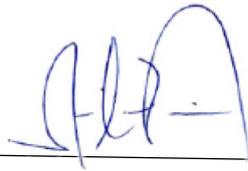
ZHAO, C. et al. Abundance and diversity of sulphur-oxidising bacteria and their role in oxidising elemental sulphur in cropping soils. *Biology and Fertility of Soils*, p. 159–169, 2017.

ZHENG, B. X. et al. Long-term nitrogen fertilization decreased the abundance of inorganic phosphate solubilizing bacteria in an alkaline soil. *Scientific Reports*, v. 7, n. February, p. 1–10, 2017.

Vitor Fernando Barro

Aluno: Vitor Fernando Barro

vitorfernando@usp.br



Orientadora: Prof. Dra. Tsai Siu Mui

tsai@cena.usp.br

**TERMO DE RESPONSABILIDADE DO PESQUISADOR RESPONSÁVEL E DEMAIS
PESQUISADORES ENVOLVIDOS NO PROJETO DE PESQUISA**

À Comissão de Coordenação do Curso de Ciências Biológicas, Coc CB
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", ESALQ-USP

Com relação ao projeto de título "PAPEL DAS ENZIMAS DO SOLO NA CICLAGEM DO CARBONO E FÓSFORO EM SOLOS DA AMAZÔNIA", desenvolvido para cumprimento das atividades da Disciplina LCB0525, sob supervisão de Prof. Dra. Tsai Siu Mui e com execução parcial ou total sob responsabilidade de Vitor Fernando Barro, declaramos que:

1. Estamos cientes do conteúdo e assumimos o compromisso de cumprir os termos das Leis e Decretos complementares (Lei No 6.894 de dezembro de 1980, Lei N 7.803 de 18 de julho de 1989, Lei No 9.985 de 18 de julho de 2000, Lei No 9.974 de 6 de junho de 2000, Decreto No 99.556 de 1 de Outubro de 1990, Decreto No 4.340 de 22 de agosto de 2002, Instrução Normativa N 154 de 01 de março de 2007, Decreto N 4.074 de 4 de janeiro de 2002, Instrução Normativa N 169/2008, ABNT-NBR10004 2004, Resolução ANVISA RDC 306 - 07 de dezembro de 2004, Resolução No 358, de 29 de abril de 2005) acrescida dos dispositivos e alterações, bem como os demais decretos e instruções normativas posteriores relativos aos assuntos ambientais pertinentes. Também cientes, que apresentaremos todas as declarações e documentos exigidos pela Comissão de Ética Ambiental na Pesquisa CEAP-ESALQ se solicitados;
2. Todos os procedimentos, organismos, insumos, equipamentos e quaisquer outros itens que serão utilizados direta ou indiretamente nesta pesquisa serão adquiridos e empregados segundo a legislação/normas dos órgãos competentes;
3. O projeto prevê recursos financeiros, se necessários, para o gerenciamento dos resíduos oriundos da pesquisa;
4. Todo impacto ambiental decorrente da má condução do projeto é de inteira responsabilidade dos pesquisadores envolvidos no projeto;
5. Estamos cientes das normas estabelecidas pelo Programa de Gerenciamento de Resíduos Químicos da ESALQ (PGRQ-ESALQ) e comprometemo-nos com o seu cumprimento na sede da instituição responsável pela condução do projeto, colaborando para sua adequada realização;
6. Comprometemo-nos a providenciar, quando exigido em função da natureza do projeto de pesquisa, todos os documentos/autorizações exigidos por órgãos públicos ou privados.

Piracicaba, 12 de Maio de 2023

Assinam:



Tsai Siu Mui
Docente Orientador(a)



Vitor Fernando Barro
Aluna(o)