



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DO MAR
CURSO DE CIÊNCIAS AMBIENTAIS

RUBSON MATEUS MATOS CARVALHO

**INDUÇÃO DE BACTÉRIAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATOS EM
CULTIVO DE FEIJÃO-CAUPI (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)**

FORTALEZA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- C327i Carvalho, Rubson Mateus Matos.
Indução de bactérias solubilizadoras de fosfatos em cultivo de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) / Rubson Mateus Matos Carvalho. – 2017.
54 f. : il. color.
- Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Instituto de Ciências do Mar, Curso de Ciências Ambientais, Fortaleza, 2017.
Orientação: Prof. Oscarina Viana de Sousa.
Coorientação: Prof. Me. Marcelo de Sousa Pinheiro.
1. Bioprospecção. 2. Biotecnologia. 3. Semiárido. 4. Cactácea. 5. Leguminosa. I. Título.
- CDD 333.7
-

RUBSON MATEUS MATOS CARVALHO

INDUÇÃO DE BACTÉRIAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATOS EM CULTIVO DE
FEIJÃO-CAUPI (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)

Monografia apresentada ao curso de graduação em Ciências Ambientais do Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR) da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Ambientais.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Oscarina Viana de Sousa.
Co-orientador: M. Sc. Marcelo de Sousa Pinheiro.

FORTALEZA

2017

RUBSON MATEUS MATOS CARVALHO

INDUÇÃO DE BACTÉRIAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATO EM CULTIVO DE
FEIJÃO-CAUPI (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)

Monografia apresentada ao Curso de graduação
em Ciências Ambientais do Instituto de Ciências
do Mar (LABOMAR) da Universidade Federal do
Ceará, como requisito parcial à obtenção do título
de Bacharel em Ciências Ambientais

Aprovado em: 15/12/2017

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Oscarina Viana de Sousa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^ª. Dr^ª. Claudia Miranda Martins
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr^ª. Ana Kelly Firmino da Silva
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Nós semeamos!
A todos e todas do campo.
Aos meus ancestrais, dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Universidade Federal do Ceará pela oportunidade de acesso ao conhecimento. Agradeço em especial ao Programa de Residências Universitárias, sem ele seria impossível continuar na universidade.

Agradeço aos meus pais, Sulidade e Autran, e aos meus irmãos, Rudson e Rubén, que sempre estiveram comigo, uma palavra amiga, de conforto e motivação.

Aos meus familiares, avós, tias (os), primas (os), em especial a minha avó Francisca e a meu avô Julião, que como pessoas do campo, foram fonte inspiradora para esse TCC; às tias Conceição, Lídia, Aparecida e Maria. Às primas Thayana, Hilana, Débora e ao Joaquim.

A meus amigos/irmãos que fiz no decorrer do curso, em especial a Anderson Tavares, Marcelo Rebouças, Viviane Tomaz, Izabelle Santana, Lucas Fontenele, Hemilly Paxedes, Clara Bindá e Marcelo Dutra.

Em agradecimento mais que especial a minha “irmã”, Mariana Fernandes, e a seus pais, a “tia” Cita, Sr. Sergio, e também a Marília Fernandes. Estão sempre no meu coração.

Agradeço em especial a Prof^ª. Dr^ª. Oscarina Viana de Sousa, pela paciência, dedicação incondicional e incansável para a realização desse trabalho; a Prof^ª. Dr^ª Regine H. S. dos F. Vieira, pelos conselhos, atenção e dedicação; a Dr^ª. Fátima Cristiane T. de Carvalho (Cris), professora, conselheira e amiga; a Prof^ª. Dr. Rosa H. Rebouças pelos conselhos, disponibilidade e dedicação, mesmo quando muito ocupada; a Prof^ª. Dr^ª. Gleire Rodrigues, firme, atenta e sempre disposta a ajudar; a Dr^ª. Marina T. T. Rodrigues, pelas aulas de espanhol, conselhos e disponibilidade. Agradeço também a toda equipe do Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado (LAMAP) do Instituto de Ciências do Mar (Labomar/UFC).

Aos amigos que fiz no LAMAP, Sylvânio, Jéssica Lucinda, Thiara, Gisele, Jamile, Jade, Jhones, Daniel, Rebeca, Isaias, Mariana, Raul, Adson, Lorrana e ao Rafael.

Agradecimento especial ao meu Moção de laboratório, Jéssica Frota. Moção, amiga, companheira.

Agradeço a equipe do Laboratório de Microbiologia Ambiental (LAMAB/UFC), Fernando Gouveia, Valéria, Fernando, Prof^ª. Dr^ª. Suzana e em especial, a Prof^ª. Dr^ª. Cláudia Miranda Martins e ao Marcelo de Sousa Pinheiro, que sem sua contribuição, tudo teria sido tão mais difícil.

A equipe do Laboratório de Análise de Sementes (LAS/UFC), Ana Kelly, Halina Lopes, Charles, D. Salete, Prof. Sebastião.

Agradeço ao Professor Dr. Renato Innecco por disponibilizar a casa de vegetação onde o experimento foi executado e a D. Aurilene pela disponibilidade e prestatividade.

Agradeço aos professores do Instituto de Ciências do Mar, em especial ao Prof. Marcelo Moro, Juliana Melo, Marcos Vinicius, Marcelo Soares, Cristina de Almeida e Ana Maria.

Aos meus amigos da vida, Vanderléia França (Léia), Júnior França, Patrício Ramonn, Joel Ferreira, Thomas R, Kcrishina Vilanova, Francimeire Costa, entre tantos outros que nunca me deixaram perder a fé.

Come il profumo di una sorpresa
Di una speranza che si è accesa
Qualsiasi posto insieme a te
È sempre casa.

(Laura Pausini, *Le cose che non mi aspetto*)

RESUMO

A relação ecológica existente entre plantas e microrganismos é bastante conhecida, no entanto, ainda é sub-explorada. Dessa forma, o objetivo desta pesquisa foi testar consórcios bacterianos como indutores de crescimento em cultivo de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) formados a partir de isolamentos de bactérias solubilizadoras fosfato (BSF) do solo rizosférico de uma cactácea do bioma Caatinga. A amostra de solo foi analisada e foram quantificadas bactérias heterotróficas cultiváveis (BHC) e BSF através do método de contagem padrão em placas (CPP), utilizando ágar padrão de contagem (Agar PCA) e ágar extrato de levedura e glicose (Agar GL), respectivamente. Foram isoladas 12 cepas e submetidas ao teste de coloração de Gram para caracterização morfotintorial e testes de capacidade de solubilização de fosfato férrico (FePO_4). O teste de antagonismo pela técnica de estrias cruzadas foi usado como critério na montagem dos consórcios bacterianos. Os consórcios foram introduzidos em cultivo de feijão-caupi realizado em casa de vegetação do departamento de Fitotecnia da Universidade Federal do Ceará. Passados 45 dias de cultivo, as plantas foram avaliadas quanto ao comprimento da parte aérea (CPA); massa seca da parte aérea (MSPA); massa seca da raiz (MSR); e massa seca total (MST). O substrato foi avaliado quanto ao teor de P lábil. As variáveis foram submetidas a teste estatístico. As contagens de BHC e BSF apresentaram valores de $4,62 \times 10^7$ e $3,475 \times 10^7$ UFC/g, respectivamente. Cerca de 82% dos isolados apresentaram morfologia de bastonetes Gram-negativos e 18% de bastonetes Gram-positivos. Dos 12 isolados capazes de solubilizar CaHPO_4 sete foram capazes de solubilizar FePO_4 . A partir do teste de antagonismo foi eleito quatro consórcios bacterianos que foram induzidos no cultivo de feijão-caupi. Pode-se inferir, pela análise estatística, que o consórcio C4 foi mais eficiente que os demais no acúmulo de MSR e MST. Da análise de acúmulo de P lábil no substrato, C3 e C4 foram os que apresentaram melhor eficiência para esse processo. Foi possível observar que os tratamentos com maiores médias de MST foram também aqueles com maiores médias de P lábil no substrato.

Palavras chave: bioprospecção, biotecnologia, semiárido, cactácea, caatinga, leguminosa.

ABSTRACT

Ecological relationship between microorganisms and plants is well known, however it is still under-explored. Thus, the aim of this research was to evaluate bacterial consortia as a growth inducers on cultivation of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) by phosphate-solubilizing bacteria (PSB) of rizospheric soil of a cactus from Caatinga biome. Soil samples were analyzed and quantified to Cultivable Heterotrophic Bacteria (CHB) and PSB by Standard Plate Count (SPC) on Plate Count Agar (PCA) and Yeast Dextrose Agar (YDA), respectively. Twelve strains were isolated and submitted to Gram stain and Phosphate-Ferric (FePO_4) solubilization capacity test. Antagonistic test by cross-streak technique was performed to assembly of bacterial consortia. Bacterial consortia was introduced on cultivation of cowpea, which was performed on vegetable house of Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal do Ceará. After 45 cultivation days, the plants were evaluated to aerial portion length (APL), aerial portion dry mass (APDM), root dry mass (RDM) and total dry mass (TDM). The substrate was evaluated to labile P content. Variables were submitted to statistical tests. CHB and PSB counts showed values of 4.62×10^7 and 3.475×10^7 CFU/g, respectively. About 82% of strains were Gram-negative and 18% were Gram-positive. Of the 12 strains capable to solubilize CaHPO_4 seven were capable to solubilize FePO_4 . From the antagonism test were elected four bacterial consortia which were induced on cowpea cultivation. According to statistical tests, C4 consortia was more efficient by BDM and TDM accumulation. From the labile P substrate accumulation analysis, C3 and C4 consortia were showed best efficiency to this process. Therefore, it was possible to verify that the treatments with higher TDM averages were also those with higher labile P content in the substrate.

Keywords: bioprospection, biotechnology, semi-arid, cactus, caatinga, leguminous.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ponto de coleta da amostra de solo rizosférico	29
Figura 2 – Presença do halo de solubilização de P ao redor de colônia crescida em meio GL	31
Figura 3 – Meio teste para solubilização de fosfato férrico	33
Figura 4 – Teste de agregação ao tubo de vidro	33
Figura 5 – Teste de antagonismo pela técnica de estrias cruzadas.....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características dos principais sistemas alternativos de produção de base agroecológica	21
Tabela 2 – Densidade de BSF e BHC isoladas de solo rizosférico de cactácea da caatinga	30
Tabela 3 – Coloração de Gram, teste de antagonismo e solubilização de fosfato férrico das estirpes isoladas da raiz da planta <i>Cereus</i> sp.	32
Tabela 4 – Resultado do teste de antagonismo entre as cepas isoladas	35
Tabela 5 – Consórcios eleitos para os tratamentos em campo	36
Tabela 6 – Médias ¹ e desvios padrão dos tratamentos de acordo com as variáveis ..	37
Tabela 7 – Médias e desvios padrão para fósforo lábil (mg.kg ⁻¹) presente nos substratos	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHC	Bactérias Heterotróficas Cultiváveis
BSF	Bactérias Solubilizadoras de Fosfato
C1	Consórcio número 1
C2	Consórcio número 2
C3	Consórcio número 3
C4	Consórcio número 4
CPA	Comprimento da parte aérea
CPP	Contagem Padrão em Placa
GL	Glicose-Levedura
LAMAP	Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado
MSF	Microrganismos solubilizadores de fosfatos
MSPA	Massa seca da parte aérea
MSR	Massa seca da raiz
MST	Massa seca total
NaClO	Hipoclorito de sódio
NT	Tratamento com nutriente total
P	Fósforo
SN	Tratamento sem nutriente
TAV	Teste de Aderência ao Vidro
TSB	Caldo Triptona de Soja
UFC	Unidades Formadoras de Colônias

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
cm	Centímetro
g	Gramma
h	Hora
mL	Mililitro
°C	Graus Celsius
UFC/g	Unidades Formadoras de Colônias por grama

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1	Bactérias Solubilizadoras de Fosfato e mecanismos de solubilização	16
2.2	O fósforo no meio ambiente e na agricultura	18
2.3	Feijão-caupi	20
2.4	Agroecologia	22
3	OBJETIVOS	24
3.1	Objetivos específicos	24
4	METODOLOGIA	25
4.1	Coleta e processamento da amostra	25
4.1.1	<i>Quantificação e Isolamento das Bactérias Heterotróficas Cultiváveis (BHC) ...</i>	25
4.1.2	<i>Quantificação e Isolamento das Bactérias Solubilizadoras de Fosfato (BSF) ...</i>	25
4.1.3	<i>Bactérias solubilizadoras de fosfato férrico</i>	26
4.2	Coloração de Gram	26
4.3	Teste de aderência a superfície do vidro (TAV)	27
4.4	Condução do teste de antagonismo <i>in vitro</i>	27
4.5	Condução dos ensaios <i>in vivo</i>	28
4.6	Inoculante	29
4.7	Variáveis analisadas	29
4.7.1	<i>CPA, MSPA, MSR, MST e fósforo lábil</i>	29
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1	Caracterização da área da coleta da amostra	31
5.2	Contagem Padrão em Placa (CPP)	32
5.3	Coloração de Gram	33
5.4	Bactérias solubilizadoras de fosfato férrico	34
5.5	Teste de aderência ao tubo de vidro (TAV)	35
5.6	Teste de antagonismo <i>in vitro</i>	36
5.7	Ensaio <i>in vivo</i>	38
6	CONCLUSÃO	42
7	CONSIDERAÇÃO FINAL	42
8	REFERÊNCIAS	43

1 INTRODUÇÃO

O uso irracional de compostos químicos como herbicidas, inseticidas e fertilizantes na produção de alimentos tem influência sobre a qualidade ambiental dos solos e das águas. Dada a necessidade de garantir a preservação desses recursos é importante que se tenha a implementação de práticas agrícolas sustentáveis como estratégia para redução dos impactos provocados pela depreciação do equilíbrio ambiental nos ecossistemas (MULETA *et al.*, 2013; PINEDA, 2014).

Uma importante parcela dos solos brasileiros é caracterizada como ácida, de baixa fertilidade e deficiente em fósforo solúvel devido a sua baixa mobilidade e fácil compatibilidade com outros minerais, como o ferro e o alumínio, por exemplo. O Fósforo é elemento indispensável para o crescimento dos vegetais, o que torna necessária a aplicação de elevadas doses de fosfatos sob a forma de adubos, contribuindo com o aumento nos custos de produção, além de provocar impactos onde esse recurso é explorado (HOLANDA *et al.*, 1995; MOURA *et al.*, 2001).

Nesse contexto de sustentabilidade no campo, diversas alternativas são apontadas, desde os modelos agroecológicos (SANTOS *et al.*, 2013) ao uso de microrganismos solubilizadores de fosfato (MSF), podendo ser usados em substituição a aplicação de fertilizantes ricos em fósforo (PINEDA, 2014).

Atrás apenas do nitrogênio, o fósforo é o segundo elemento mais importante para as plantas. Atua em diversos processos metabólicos, sendo indispensável nos estágios iniciais do desenvolvimento dos vegetais (GRANT, *et al.*, 2001; SOUTO, *et al.*, 2009; KHAN *et al.*, 2010).

O aproveitamento do fosfato pelas plantas pode ser maximizado pela atuação dos microrganismos solubilizadores de fosfato (MSF) contribuindo para o crescimento vegetal. O uso comercial de fertilizantes enriquecidos com MSF tem papel auxiliar no melhor aproveitamento do fosfato presente no próprio solo (SILVA FILHO; VIDOR, 2001; OTEINO, *et al.*, 2015).

Por meio de interações entre microrganismos e plantas na região conhecida por rizosfera, microrganismos disponibilizam fosfato solúvel para as plantas e em troca as plantas liberam ricas fontes de carbono em especial açúcares e ácidos orgânicos, fundamentais para o crescimento bacteriano (KHAN, *et al.*, 2010; CARVALHO, *et al.*, 2016).

Conhecido como feijão-de-corda ou ainda como feijão-macassar, o feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) é uma cultura de origem africana, tendo sido introduzida no

Brasil pelos portugueses no século XVI no estado da Bahia (FREIRE FILHO *et al.*, 1988). É uma importante fonte de nutrição, rico em proteínas, vitaminas, aminoácidos essenciais, carboidratos, minerais e fibras. Comercializado principalmente *in natura*, o feijão-caupi representa uma importante fonte de renda, principalmente em áreas do Norte e do semiárido nordestino pela agricultura de pequeno porte, onde ainda se faz uso de técnicas tradicionais (ANDRADE JÚNIOR *et al.*, 2002; FREIRE FILHO *et al.*, 2011).

A região semiárida brasileira é caracterizada pelas altas temperaturas, forte incidência de luz solar, sazonalidade de chuvas e solos salinos (SOARES JÚNIOR, 2012). Ocupando 11% do território nacional e 70% da região semiárida, a Caatinga é composta por uma vegetação caracterizada pelo pequeno porte, caducifólia, xerofolia, sendo constantemente subestimada quanto a sua riqueza e diversidade vegetal. São características dessa região, os altos níveis de insolação e temperatura, além de escassos recursos hídricos e chuvas irregulares, não sendo raros, períodos longos de estiagem (GORLACH-LIRA; COUTINHO, 2007; GONÇALVES, 2011).

O uso de bactérias solubilizadoras de fosfatos pode ajudar a reduzir o uso de fertilizantes fosfatados na agricultura, contribuindo para redução de custos, aproveitamento do fósforo presente no próprio solo e a sustentabilidade dos cultivos (PINEDA, 2014).

A importância do fósforo para o desenvolvimento dos vegetais, o feijão como cultura forte na agricultura familiar de subsistência, além das características da região semiárida, justifica o uso de MSF na disponibilização natural de fósforo para as culturas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Bactérias Solubilizadoras de Fosfato e mecanismos de solubilização

Os microrganismos são fundamentais para a realização de diversos processos biológicos (SILVA *et al.*, 2011), atuam também sobre os ciclos biogeoquímicos (ADUAN; VILELA; REIS JÚNIOR, 2004) como o do fósforo. A exemplo do fósforo, alguns microrganismos são capazes de disponibilizar esse nutriente a partir de compostos insolúveis, como as rochas ricas nesse elemento (CHAGAS JÚNIOR *et al.*, 2010).

Bactérias Solubilizadoras de Fosfato (BSF) são organismos capazes de disponibilizar diferentes formas de fosfato insolúvel em compostos aproveitáveis pelos vegetais por meio da produção de ácidos orgânicos (RAMÍREZ; GALVEZ; BURBANO, 2014) e enzimas (CARDOSO, 1992). A interação entre bactérias e plantas ocorre no microbioma conhecido por rizosfera (CARVALHO *et al.*, 2016), onde as bactérias promovem a liberação do fosfato até então insolúvel, enquanto as plantas disponibilizam importantes fontes de carbono sob a forma de açúcares e ácidos orgânicos essenciais ao crescimento bacteriano, além de proteção (KHAN *et al.*, 2010).

As Rizobactérias são conhecidas por construírem uma associação benéfica, bactéria-planta. Esses organismos são caracterizados por colonizarem o sistema radicular dos vegetais conferindo-lhes vantagem (MELO *et al.*, 1998). Na literatura, os principais gêneros bacterianos relacionados nessas relações simbióticas e por atuarem na produção de ácidos orgânicos capazes de solubilizar fosfato, são: *Aerobacter*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Yarrowia* e *Streptosporangium* (RAMÍREZ; GALVEZ; BURBANO, 2014).

Para promover a solubilização de fosfatos, as bactérias têm como principal mecanismo a redução do pH do meio para valor próximo de 2,0, isso ocorre pela liberação de ácidos orgânicos de baixo peso molecular (LARA; ESQUIVEL; NEGRETE, 2011). A solubilização de fosfato pelas bactérias ocorre associada ao metabolismo desses organismos, pela decomposição de compostos de alto peso molecular, como os carboidratos, peptídeos e lipídeos (BAZIRAMAKENGA; SIMARD; LEUROUX, 1995).

Diversos tipos de ácidos orgânicos produzidos por microrganismos são capazes de quelatar fosfato, dentre eles estão os ácidos 2-cetoglucônico, acético, adípico, butírico, cítrico, fórmico, fumárico, glicônico, glucônico, indol-acético, láctico, málico, malônico, oxálico, succínico, tartárico (REYES, 1991; BABU-KHAN *et al.*, 1995; PAREDES; ESPINOSA, 2010;

PÉREZ; DE LA OSSA; MONTES, 2012). A solubilização de fosfatos vai depender do tipo de ácido orgânico, do pH do meio, além da qualidade dos minerais encontrados no solo (PAREDES; ESPINOSA, 2010).

A solubilização de fosfatos realizada por bactérias produtoras de ácidos orgânicos pode ocorrer a partir de dois mecanismos: pela troca de ácidos e pela concentração de ácidos no meio. Na troca de ácidos, o P presente em cristais de Alumínio e Ferro são liberados por meio de trocas por íons H^+ (ANDREWS, 1990; HALDER *et al.*, 1990).

Um exemplo de mecanismo de solubilização de fosfato ocorre pela produção de H_2S que reage com $FePO_4$ presente no meio, liberando sulfato ferroso e fósforo ao mesmo tempo (SINDHU *et al.*, 2014).

O segundo mecanismo depende da concentração de ácido orgânico no ambiente produzidos por microrganismos, esses ácidos contribuiriam para formação de complexos com íons metálicos presentes na rocha fosfórica (SINGH; AMBERGER, 1998).

Esses ácidos têm importantes propriedades quelantes, o que favorece a formação de complexos insolúveis com metais, promovendo a liberação do fosfato ligado a esses compostos (FERNÁNDEZ *et al.*, 2005). Os ácidos orgânicos secretados podem dissolver o fosfato mineral como resultado da troca de ânions $PO_{4/3-}$ ou podem quelatizar íons de $Fe^{2+/3+}$ e Al^{3+} associados com fosfatos (CHAGAS JUNIOR *et al.*, 2010) o que pode dar origem aos chamados biofertilizantes.

Microrganismos são inoculados em resíduos de diferentes tipos visando a reutilização de compostos orgânicos para produção de fertilizantes a partir de compostos até então inacessíveis (STAMFORD *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2011). Entre esses compostos estão as rochas fosfatadas e potássicas. O produto formado por microrganismos que atuam nesse processo é chamado de biofertilizante. Esse processo ainda carece de aprofundamento acerca dos reais impactos ambientais e econômicos, além dos organismos (bactérias, actinobactérias e fungos) (PINEDA, 2014) capazes de realizar esses processos (SILVA *et al.*, 2011).

No solo, a densidade de BSF é muito maior que a de fungos solubilizadores de fosfato, sendo essa densidade superada de 2 a 150 vezes (BANIK; DEY, 1983). Parte dos organismos presentes no solo, são capaz de solubilizar fosfato de cálcio, sendo uma minoria capaz de solubilizar complexos fosfatados ligados a metais de ferro e alumínio (BANIK; DEY, 1983; GYANESHWAR *et al.*, 2002).

2.2 O fósforo no meio ambiente e na agricultura

O fósforo em minerais fosfatados é facultado para a natureza a partir de processos de intemperismo, esse processo forma minérios secundários (SANTOS; GATIBONI; KAMINSKI, 2008), que tem em sua composição diferentes variedades de rocha fosfatada (MINING, 2017). Esses minérios secundários podem ser mais estáveis termodinamicamente, ou incorporados a compostos orgânicos por processos biológicos (SANTOS; GATIBONI; KAMINSKI, 2008).

A dinâmica do fósforo (P) no solo pode ser dividida em duas classificações, fósforo inorgânico e fósforo orgânico, que podem ser enquadrados ainda como P lábil e P não-lábil, essa classificação irá depender do composto a qual ele está ligado (SANTOS; GATIBONI; KAMINSKI, 2008). O P inorgânico pode ser encontrado como parte de minerais de cálcio, ferro e alumínio, formados pela ação de precipitação, podendo ser liberado muito lentamente para o meio. Esse tipo de fósforo está presente em diversos compostos (CaHPO_4 , $\text{Ca}(\text{HPO}_4)_2$, FePO_4 , AlPO_4 , entre outros) em solução, cristalinos ou na forma coloidal no solo (SANTOS; GATIBONI; KAMINSKI, 2008; BOBADILLA; RINCÓN, 2008).

Na forma orgânica ou lábil, assimilável pelos vegetais, esse nutriente está presente na matéria orgânica que se forma por meio da degradação microbiana de restos de animais e vegetais (GYANESHWAR *et al.*, 2002; PINEDA, 2014).

Os níveis de fósforo disponível no solo estão associados às características mineralógicas do ambiente geoquímico do tipo de solo, que podem ou não, favorecer a retenção dos íons fosfato, por óxidos de ferro e alumínio promovendo uma redução nos níveis desse elemento em solução (MENDES; REIS JÚNIOR, 2003). Cerca de 1 a 10% do fósforo presente no solo, está imobilizado na biomassa de microrganismos (RICHARDSON, 1994). Embora esse P não esteja diretamente disponível para os vegetais, é possível compreender a dinâmica do ciclo do fósforo no solo, estando ligado a fertilidade, e as diferentes práticas agrícolas, bem como a sua sazonalidade (MENDES; REIS JÚNIOR, 2003).

O ciclo do fósforo envolve as plantas, animais e microrganismos. Os vegetais o absorvem do solo, os animais se alimentam desses vegetais e os microrganismos realizam processos de decomposição e de reciclagem biológica desse nutriente que volta para as plantas e animais. Além disso, ocorrem também reações de sorção pelas argilas, óxidos e hidróxidos presentes no solo (STEVENSON, 1994).

Com o uso da terra para cultivo, esse ciclo é alterado, dada adição de adubo e também pela retirada em virtude da colheita. Processos de desgaste, mau uso das áreas

produtoras, erosão e percolação também podem ter efeitos sobre o ciclo do P provocando sua deficiência no solo (STEVENSON, 1994; KLEIN; AGNE, 2012).

No metabolismo vegetal, P é componente essencial em moléculas orgânicas de adenosina difosfato e adenosina trifosfato, importantes para o armazenamento e transferência de energia nos vegetais. Também é um importante componente estrutural de nucleotídeos, fosfolípidios, fosfoproteínas e coenzimas. Essas características impõem condições limitantes ao desenvolvimento dos vegetais, principalmente na fase inicial (HAVLIN *et al.*, 2004; SOUTO *et al.*, 2009).

O Brasil é o sexto maior produtor de fosfato mineral, sendo também o quarto maior importador de adubo NPK, o que representou mais de 8 milhões de toneladas em 2016. Tanta demanda se dá em decorrência da escassez do nutriente no solo, que é indispensável para alguns vegetais (KHAN *et al.*, 2010; ANDA, 2017;).

Segundo Holanda *et al.* (1995), o fósforo é o macronutriente mais aplicado em adubações no Brasil, devido sua carência no solo dada sua baixa mobilidade e alta afinidade por minerais de ferro e alumínio, por conta disso, as plantas acabam entrando numa “competição” por esse nutriente.

O uso excessivo de adubos ricos em fósforo nas áreas agrícolas pode provocar a eutrofização em cursos d’água. Embora o P tenha uma baixa mobilidade no solo, o transporte desse elemento dos sistemas terrestres até os recursos hídricos pode se dar, principalmente, de duas formas, a primeira por escoamento superficial e a segunda por percolação no perfil (SHARPLEY; HALVORSON, 1994; KLEIN; AGNE, 2012).

Segundo Cordell e Neset (2014), as fontes de P são limitadas e tendem ao esgotamento se não houver uma gestão sustentável desse recurso que garanta sua disponibilidade a longo prazo para as futuras gerações. Por se tratar de elemento essencial ao desenvolvimento de qualquer organismo, o uso racional desse recurso é fundamental para a continuidade da vida no planeta.

Alguns fatores chamam a atenção a cerca da disponibilidade do fósforo, como: o incessante crescimento populacional global, que ainda neste século deve atingir os 9 bilhões de habitantes aliado a um aumento na qualidade nutricional nos países em desenvolvimento da África e da Ásia, além do fato de que o fósforo é um elemento não renovável limitado, não podendo ser substituído nos fertilizantes. É imprescindível que novas soluções sejam encontradas a fim de garantir a produção alimentícia eficiente, o consumo e a recuperação desse elemento, além da sustentabilidade (CORDELL; NESET, 2014; CARVALHO *et al.*, 2016).

2.3 Feijão-caupi

A produção mundial de feijão em 2013 foi de 23,1 milhões de toneladas, tendo o Brasil como responsável por 12% desse volume, se qualificando como o terceiro maior produtor do grão, atrás apenas de Myanmar (16,4%) e da Índia (15,7%) (FAO, 2015). Apesar das oscilações na produtividade nos últimos três anos, para 2017 a expectativa é de alta. O total estimado para a safra do grão no ano de 2017 é de 3.327,8 mil toneladas, distribuído em: 2.122,8 mil de cores, 669,2 mil toneladas de feijão-caupi e 536,1 de preto (CONAB, 2017).

Comumente chamado de feijão-de-corda ou feijão-macassar, o feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) é originário da África e foi introduzido no Brasil na segunda metade do século XVI pelos colonizadores portugueses no Estado da Bahia (FREIRE FILHO, 1988).

O feijão-caupi apresenta diversos cultivares, fruto de pesquisas de melhoramento. Com o objetivo de melhorar a produção e atender as expectativas do mercado, alguns cultivares são recomendados para cada região, para o Ceará, por exemplo, os cultivares recomendados são João Paulo II, EPACE-10, EPACE-11 e o Setentão (FREIRE FILHO; RIBEIRO; BANDEIRA, 1997). Este último tem como principais características morfológicas o porte semi-ramador, um ciclo de 60-70 dias, produtividade média de 800kg/ha no sistema de sequeiro e 1200kg/ha no sistema irrigado (FREIRE FILHO; RIBEIRO; BANDEIRA, 1997; PAIVA *et al.*, 2017).

É característico do caupi alta capacidade de adaptação a condições de estresses hídrico, salino e térmico (MARTINS; NEVES; RUMJANEK, 1997), além de elevados teores nutritivos e baixos custos de produção, o que justifica o cultivo por parte de pequenos e médios produtores (LIMA *et al.*, 2007).

No que se refere à disponibilidade hídrica, a planta deve dispor de no mínimo 300 mm durante todo o ciclo vegetativo para que se tenha o bom desenvolvimento do cultivar. Da temperatura, a faixa ideal oscila de 20 a 30°C. Temperaturas superiores a 35°C prejudicam a floração provocando aborto espontâneo das flores, além disso, ocasiona também a retenção das vagens na planta e reduz consideravelmente a quantidade de grãos por vagem. Já condições inferiores a 19°C comprometem a produtividade e retardam o desenvolvimento com o aumento do ciclo vegetativo (CAMPOS; SILVA; SILVA, 2010). A salinidade do solo pode ou não estar diretamente ligada à qualidade da água usada para irrigação. O grau de tolerância da planta ao estresse salino varia de acordo com os genótipos (DANTAS *et al.*, 2002). Segundo Lima *et al.* (2007) os níveis de salinidade afetam o desenvolvimento da planta negativamente, existindo uma relação linear entre crescimento vegetativo e teor de salinidade.

O feijão-caupi é tradicionalmente cultivado no Nordeste brasileiro, em especial nas áreas semiáridas, juntamente com outras culturas anuais em regime de solteiro ou consorciado (principalmente ao milho ou algodão) (CAMPOS; SILVA; SILVA, 2010; FREIRE FILHO, 2011). O cultivo de caupi é geralmente realizado por pequenos e médios produtores, constituindo-se em fonte de renda e subsistência. Em virtude do baixo emprego de infraestrutura tecnificada, o cultivo é feito durante o período de chuvas (LIMA *et al.*, 2007; FREIRE FILHO, 2011).

Nos últimos 20 anos a cultura passou por diversos processos de melhoramento buscando aumentar a capacidade adaptativa da planta as condições de clima, o que acabou atraindo o interesse de produtores do Centro-Oeste, onde o cultivo ocorre principalmente na entre safra sendo realizado em larga escala desde 2006. A cultura tem migrado também para regiões agrícolas dos Cerrados do Norte, Nordeste e Centro-Oeste, por ser compatível com o sistema de rotação de culturas e o regime pluviométrico das regiões (FREIRE FILHO, 2011).

No Centro-Oeste a produção de feijão deu um salto, saindo de 3.759 toneladas, em 2006, chegando a 104.349 toneladas, em 2009, o que representou para o período uma produtividade média anual de 960 kg/ha^{-1} , grandeza muito maior que a média nacional de 369 kg/ha^{-1} para o mesmo período (FREIRE FILHO *et al.*, 2011).

Diversos fatores limitam o aumento da área plantada com caupi, um deles é a baixa produtividade por hectare, que oscila de 300 a 400 kg/ha . Embora isso ocorra devido ao baixo nível tecnológico aplicado aos sistemas de cultivo, existe também a necessidade de tecnologias voltadas para promoção da fixação de nitrogênio, realizado pela associação entre essas plantas e bactérias (MEDEIROS *et al.*, 2007). Além disso, o solo brasileiro apresenta deficiência de nutrientes no solo, como o fósforo, constituindo-se em limitante ao desenvolvimento dos cultivares (HOLANDA *et al.*, 1995; MOURA *et al.*, 2001). Quando dispõe de nutrientes, a cultura tem potencial produtor de até 6.000 kg/ha (FREIRE FILHO *et al.*, 2005).

O nitrogênio é o principal elemento mais requerido para o desenvolvimento da cultura do feijão, seguido do fósforo e do potássio. O fósforo é um nutriente essencial ao desenvolvimento da cultura do feijão, sua deficiência provoca alterações na coloração das folhas com queda prematura, o caule torna-se mais curto e fino, as vagens apresentam má formação com reduzido número de grãos, provocando retardo no tempo de colheita (ROSOLEM; MARUBAYASHI, 1994; ANDRADE JÚNIOR *et al.*, 2002; KHAN *et al.*, 2010).

2.4 Agroecologia

A agroecologia surgiu como ciência a partir da década de 1970, funcionando como suporte teórico em face aos diferentes tipos de agricultura alternativa. Tem papel preponderante, pois funciona como uma resposta aos movimentos opostos a uma nova agricultura integrada ao meio ambiente (ASSIS; ROMEIRO, 2002).

Tendo por objetivo a aplicação de práticas e técnicas produtivas ecologicamente sustentáveis, a agroecologia abre um paradigma, ao valorizar o conhecimento de todos: do homem do campo aos cientistas, indígenas, agrônomos entre outros, propondo alternativas em substituição às práticas predadoras típicas da agricultura convencional (LEFF, 2002).

A agroecologia procura o desenvolvimento sustentável na agricultura (SILVA *et al.*, 2013) funcionando como uma técnica fundamental de apoio a transição dos modelos atuais de agricultura convencional para uma agricultura sustentável (CAPORAL; COSTABEBER, 2004). Esse modelo de ciência reconhece os processos naturais de forma equilibrada com as questões humanas (justiça social, saúde ambiental, viabilidade econômica), respeitando as diferenças entre os povos e suas gerações (GLIESSMAN, 2001).

A agricultura alternativa procura valorizar, reconhecer e difundir o conhecimento tradicional, rejeitando o uso abusivo de insumos agrícolas industrializados. Esse pensamento encontra-se alinhado com a ruptura da monocultura e a ideia de novas práticas de produção, aliado ao reconhecimento da importância das relações ecológicas nos sistemas agrícolas para a redução de insumos externos ao agroecossistema. Essa ideia de ruptura com a forma de fazer agricultura tradicional tem tido uma aceitação cada vez maior no mercado (ASSIS; ROMEIRO, 2002).

Diferente do que foi citado acima, diversos passivos ambientais e sociais podem ser atribuídos à agricultura convencional (FOLEY *et al.*, 2011), sendo caracterizada pela alta dependência por insumos externos, tais como os fertilizantes e os agrotóxicos (ADL; IRON; KOLOKOLNIKOV, 2011). As diferenças entre os sistemas de produção agroecológicos e os convencionais estão no apelo social e ambiental, já que as relações homem-natureza e homem-homem tornam-se cada vez mais estreitas (PADOVAN, 2006). Essa relação mais harmônica tem encorajado os produtores a substituir suas práticas de cultivo convencional, por práticas mais sustentáveis (PANZENHAGEN *et al.*, 2008).

Diversas correntes de produção agrícola alternativa tomaram os princípios agroecológicos como base de seu desenvolvimento, isto é, priorizar a preservação dos espaços naturais, estimular a reciclagem de nutrientes e conservar a biodiversidade (SANTOS *et al.*,

2013). Entre essas correntes estão à agricultura biodinâmica, agricultura ecológica, agricultura natural, agricultura biológica, a permacultura e a agricultura orgânica, cada uma com suas características como apontada na Tabela 1 (CAMPANHOLA; VALARINI, 2001; ASSIS; ROMEIRO, 2002; BARBOZA *et al.*, 2012).

Tabela 1 - Características dos principais sistemas alternativos de produção de base agroecológica

Sistema alternativo	Característica
Agricultura Natural	Método no qual o sistema de produção toma a natureza como modelo.
Agricultura Biológica	Trabalha o processo de compostagem na superfície do solo.
Permacultura	Associa práticas antigas com as modernas, na busca de construir um modelo de produção ecológico.
Agricultura Orgânica	Baseia-se na rotação de culturas, manejo e fertilização do solo, além do manejo da matéria orgânica como geração de boa fertilidade e estruturação do solo.
Agricultura Biodinâmica	Possui ligação direta entre a natureza e as forças cósmicas, tratando a unidade produtiva como um organismo único em harmonia com o seu habitat, utilizando-se dos preparados Biodinâmicos, elaborados com plantas medicinais, esterco e silício.

Fonte: Upnmoor (2003), adaptado em Santos (2013).

Enquanto na agricultura convencional os impactos ambientais gerados pelo uso de fertilizantes químicos e os agrotóxicos são ignorados, nos sistemas alternativos com base agroecológica essa preocupação é preponderante (SANTOS *et al.*, 2013).

Dentre os sistemas alternativos, se destaca a agricultura orgânica como forma de cultivo que melhor se preocupa com a manutenção da qualidade do meio ambiente, bem como dos alimentos produzidos. Desloca-se da agricultura convencional, por manter o sistema de forma equilibrada e livre de exageros (SANTOS *et al.*, 2013). É o sistema de produção mais conhecido no mercado, sendo tratado como sinônimo para os demais sistemas de base agroecológica (ASSIS; ROMEIRO, 2002; BARBOZA *et al.*, 2012; SANTOS *et al.*, 2013).

3 OBJETIVOS

Objetivo geral

- Desenvolver consórcio bacteriano capaz de solubilizar fosfato insolúvel presente no solo, de forma a influenciar positivamente na cultura do feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), no desenvolvimento econômico e sustentável dessa atividade agrícola.

3.1 Objetivos específicos

- Isolar bactérias solubilizadoras de fosfato a partir de uma cactácea do gênero *Cereus* sp. presente em área degradada do bioma caatinga;
- Testar a capacidade de produzir exopolissacarídeos por meio da agregação *in vitro*;
- Avaliar *in vitro* a capacidade antagônica dos isolados e a partir disso montar consórcios bacterianos para indução em espécie vegetal cultivada *in vivo*;
- Introduzir os consórcios bacterianos em cultivo de feijão-caupi e avaliar a eficiência desses consórcios em disponibilizar fosfatos lábil em casa de vegetação.

4 METODOLOGIA

4.1 Coleta e processamento da amostra

Foi coletada no município de Irauçuba (Ceará), uma amostra de solo rizosférico de uma cactácea do gênero *Cereus* sp., a uma profundidade de 20cm em relação a superfície. Após a coleta, a amostra foi armazenada a temperatura ambiente e transportada até o Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado – LAMAP/UFC, onde foram realizadas posteriores análises conforme descritas a seguir.

4.1.1 *Quantificação e Isolamento das Bactérias Heterotróficas Cultiváveis (BHC)*

A quantificação das BHC foi feita pelo método de Contagem Padrão em Placas (CPP), pela técnica de *Pour Plate*, onde dez gramas (10g) das raízes da cactácea foram homogeneizados, sob agitação, com 90 mL de solução salina a 0,85%, a partir dessa etapa foram feitas diluições seriadas até a diluição 10^{-5} . Aliquotas de 1mL das diluições foram inoculadas em placas de Petri, em duplicata, e cobertas com o meio de cultura Ágar Triptona de Soja (TSA), incubadas em estufa a 35°C por 48h (DOWNS; ITO, 2001). Após o período de incubação, as placas com número de colônias entre 25 e 250 foram contadas e os resultados expressos em unidades formadoras de colônias por grama de rizosfera. Colônias que apresentavam pigmentação e/ou maior tamanho em relação as outras foram selecionadas sobre o meio de cultura, pescadas e inoculadas em novo TSA para isolamento, estoque e purificação.

4.1.2 *Quantificação e Isolamento das Bactérias Solubilizadoras de Fosfato (BSF)*

A quantificação das BSF se deu a partir de inóculos das diluições seriadas (descrito no item anterior) em meio de cultura seletivo GL (Glicose-Levedura) descrito por Sylvester-Bradley *et al.* (1982). Para composição do meio GL foram usadas 10g de glicose; 0,5g de extrato de levedura e 15g L⁻¹ de ágar, com adição de K₂HPO₄ (10%) e de CaCl₂ (10%) a fim de formar o precipitado insolúvel de CaHPO₄. A técnica de inoculação das amostras diluídas foi *Spread Plate*. As amostras foram incubadas a 35 °C por 72 horas. Foram contadas as colônias crescidas formando halos transparentes ao redor, indicando a solubilização do fosfato disponível. Após a contagem foram selecionadas seis colônias que apresentavam características mais diversas

(tamanho, pigmentação, forma). As colônias foram pescadas e inoculadas em TSA estoque para purificação.

4.1.3 Bactérias solubilizadoras de fosfato férrico

As cepas pertencentes ao grupo das heterotróficas e das solubilizadoras de fosfato de cálcio isoladas da amostra de solo rizosférico foram testadas quanto a capacidade de solubilizar FePO_4 (fosfato férrico) em meio sólido como descrito por Gadagi e Sa (2002).

As cepas foram transferidas para tubos de ensaio contendo meio TSA, permanecendo em estufa bacteriológica a 35°C por 24h. Passado esse período, as cepas puderam ser inoculadas em placas de petri contendo: sacarose, 10g; NaCl, 0,1g; MgSO_4 , 0,5g; extrato de levedura, 0,2g; NH_4Cl , 0,5g; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,1g; FePO_4 , 2g; bromocresol verde 0,5%, onde permaneceram em estufa a 35° C por 48h. A solubilização de fosfato férrico pelas bactérias, foi verificada a partir da redução do pH do meio partindo do pH neutro (coloração verde) para o ácido (coloração amarela).

4.2 Coloração de Gram

A técnica de coloração de Gram tem como finalidade verificar as características da parede celular dos isolados bacterianos seguindo protocolo descrito por Levy (2004).

Por meio da coloração de Gram é possível dividir as células bacterianas em dois grandes grupos, em Gram positivas e Gram negativas. O teste envolve os seguintes processos: esfregaço das bactérias em lâmina de vidro. Imersão das lâminas em solução corante Cristal Violeta por um minuto. Passado um minuto, as lâminas são rapidamente lavadas em água destilada corrente e imersas em solução de Lugol por um minuto. Passado esse período, as lâminas são imersas em solução de álcool-acetona por aproximadamente 15 segundos e lavadas com água destilada corrente. Depois de lavadas em água destilada corrente, as lâminas são imersas em solução Safranina por 30 segundos e lavadas em água destilada corrente. Depois de secas, é adicionada uma gota de óleo de imersão sobre a superfície das lâminas, de forma a possibilitar a observação em microscópio óptico, objetiva de imersão (100x), onde a morfologia e a parede coração da parede celular podem ser classificadas e diferenciadas em Gram positivas e Gram negativas.

4.3 Teste de aderência a superfície do vidro (TAV)

O protocolo descrito a seguir foi adaptado de Christensen *et al.* (1985). As cepas foram inoculadas em TSA a 35°C por 24h. Em sequência, os inóculos foram transferidos para tubos de ensaio em triplicata contendo 4mL de Caldo Triptona de Soja (TSB) e levados à estufa bacteriológica onde permaneceram a 35°C por 48h.

Após o período de crescimento bacteriano, os caldos foram descartados e o interior dos tubos lavado com água destilada por três vezes. Em seguida, os tubos foram colocados para secar na posição invertida com a boca para baixo em temperatura ambiente. Depois de secos, foi adicionado safranina 0,1% por um minuto em cada tubo. A solução foi removida, os tubos foram lavados com água destilada para retirar o excesso de corante e invertidos para secagem.

Para o teste foi considerada agregação positiva quando ocorreu a formação de biofilme na parede dos tubos evidenciados pelo corante. A bactéria *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) foi usada como controle positivo. A capacidade das bactérias aderirem ao tubo de vidro foi classificada em:

Ausente – nenhum dos tubos apresentou formação de biofilme;

Fraca – apenas um tubo apresentou formação de biofilme;

Média – dois tubos apresentaram formação de biofilme;

Alta – os três tubos apresentaram formação de biofilme.

4.4 Condução do teste de antagonismo *in vitro*

Foi feito um inóculo, em posição central, sentido vertical, na superfície da placa com meio TSA com uma das cepas testadas. Em seguida, foram feitos quatro inóculos perpendiculares à primeira estria mantendo uma distância de aproximadamente 0,5cm. As placas permaneceram a 35°C por 24h em estufa bacteriológica. A atividade antagônica foi observada através da inibição do crescimento das culturas estriadas. Cepas que não apresentavam inibição de crescimento na proximidade de outra foram consideradas negativas no teste de antagonismo. Não antagonismo e solubilização de fosfato férrico foram os critérios usados para composição dos consórcios bacterianos.

4.5 Condução dos ensaios *in vivo*

Os ensaios *in vivo* foram conduzidos em casa de vegetação do Departamento de Fitotecnia (UFC) durante os meses de setembro e outubro de 2017.

As etapas do ensaio *in vivo* compreenderam a esterilização do substrato, desinfecção dos vasos e das sementes.

O substrato foi composto por areia grossa e vermiculita expandida. A areia grossa foi lavada em água corrente para remoção da argila. Após lavagem, a areia permaneceu em secagem ao sol por três dias. Passado esse período, a areia grossa foi misturada com vermiculita na proporção de 2:1, respectivamente. A mistura dos substratos foi autoclavada a 121°C por 1 hora em sacos plásticos de rafia. Após autoclavagem a mistura foi mantida em descanso por um período de 15 dias.

Os vasos, onde os cultivos foram realizados, foram lavados em água corrente, imersos em solução de hipoclorito de sódio (NaClO) 0,5% por 24 horas, posteriormente, foram enxaguados com água para remoção do excesso do NaClO.

As sementes de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) variedade Setentão, foram desinfetadas por imersão em álcool 95% durante 3 minutos. Em seguida, as sementes passaram por lavagens sucessivas em água destilada estéril. Após o enxágue, procedeu-se um novo tratamento em solução de NaClO 5% por 3 minutos e por fim, as sementes foram lavadas abundantemente em água destilada estéril.

Após a desinfecção do substrato, vasos e das sementes, deu-se início à etapa de plantio. Onde os vasos foram preenchidos com um volume aproximado de 3L de substrato e em seguida foram semeadas cinco sementes de feijão-caupi por vaso. Após sete dias de crescimento, foi feita uma observação visual das plantas germinadas, seguido do desbaste. Em cada vaso foram retiradas as plantas menores e sem uniformidade de folhas, permanecendo apenas uma planta no vaso.

O experimento foi dividido em seis conjuntos de cinco vasos. Dois conjuntos foram classificados como tratamento adubado (NT) e tratamento sem adubação (SN). Nenhum desses dois tratamentos recebeu consórcio bacteriano e apenas ao primeiro foi adicionado semanalmente 40mL de solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1950), sendo ambos irrigados diariamente. Outros quatro conjuntos receberam diferentes consórcios bacterianos.

Sete cepas foram avaliadas, distribuídas em quatro consórcios, contendo três cepas, cada. Os consórcios foram testados em réplicas de cinco vasos contendo substrato e feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.).

Aos conjuntos de vasos que receberam os consórcios bacterianos foi adicionada, semanalmente, solução nutriente livre de fósforo solúvel (HOAGLAND; ARNON 1950), contudo, uma segunda solução rica em fosfato férrico à 0,5% passou a ser administrada junto a solução nutritiva.

4.6 Inoculante

As cepas que compõem os consórcios foram ajustadas de acordo com a escala de McFarland (0,5nm), feito o ajuste, o consórcio foi montado aplicando-se alíquotas de 1mL de cada cepa em tubos tipo falcon estéril, totalizando 3mL, que foram adicionadas aos vasos após oito dias de semeadura, com exceção dos tratamentos que não receberam nenhum tipo de inoculante (NT e SN).

4.7 Variáveis analisadas

Foi analisado o comprimento da parte aérea (CPA); massa seca da parte aérea (MSPA); e massa seca da raiz (MSR); massa seca total (MST), também foi determinado o fósforo lábil presente no solo pelo método Carolina do Norte (Embrapa Solos). Os dados serão submetidos à análise de variância, e para isso foi usado o software estatístico Past3 versão *beta*, ao nível de 5% de confiança, no qual foram realizados os testes de comparação de médias pelo teste de ANOVA, seguido do teste Tukey's.

4.7.1 CPA, MSPA, MSR, MST e fósforo lábil

O comprimento da parte aérea foi obtido a partir de medidas do colo até o ápice da planta. Massa seca da parte aérea e massa seca da raiz foram obtidas após o acondicionamento das amostras de parte aérea e raízes em estufa a 75°C até que atingissem peso constante. Massa seca total foi obtida somando os resultados de MSPA e MSR.

A extração de P lábil das amostras foi realizada no Laboratório de Solo e Água (Convênio UFC/FUNCEME) do departamento de solo da UFC pelo método Meilich-1 ou Carolina do Norte. O substrato foi analisado após o cultivo e para isso foram coletadas 3 amostras de 100g de cada tratamento mais três amostras de substrato não cultivado. O substrato foi seco, peneirado (peneira de 2mm) e pesado. Foi adicionado 50mL da solução de Meilich-1

(0,0125 mol L⁻¹ de H₂SO₄ e 0,050 mol L⁻¹ de HCl) em 5g da amostra e mantidos sob agitação por 15 minutos seguido de repouso por 24 horas para formação do extrato.

Após o período de repouso, frações de 5mL do extrato foram transferidas para um Becker, no mesmo recipiente foram adicionadas 5mL de mobilidato de amônia e aproximadamente 1mL de ácido ascórbico. A solução foi mantida em repouso por 30 minutos. Passado esse período as amostras foram lidas em espectrofotômetro com leitura de absorvância de 660nm.

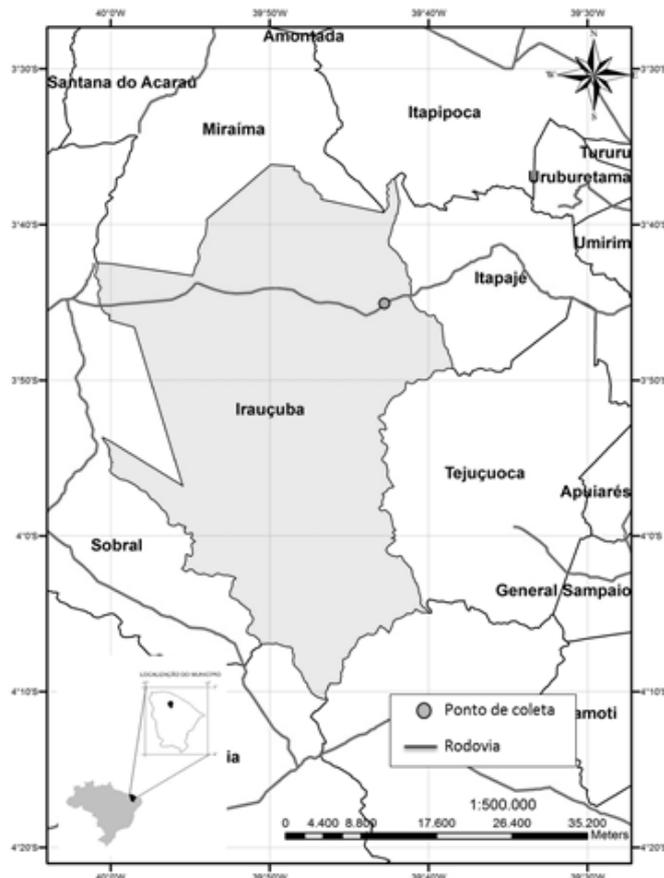
A curva de absorvância foi preparada usando cinco amostras de fósforo lábil em concentrações conhecidas de 1 a 5ppm.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização da área da coleta da amostra

A coleta da amostra de solo rizosférico de uma cactácea do gênero *Cereus* sp. ocorreu no município de Irauçuba, Ceará (93° 42' 16.100"O; 4° 6' 29.853"S) (Figura 1). É característico da região o clima tropical quente semiárido, temperaturas entre 26° e 28°C com baixo índice pluviométrico médio (IPECE, 2014). As classes de solo predominante são: Planossolos Haplicos solodicos e natricos. Esses solos se caracterizam por serem imperfeitamente ou mal drenados, apresentam também um horizonte "A" pouco profundo em relação ao horizonte "B", que por sua vez é argiloso, conferindo uma permeabilidade lenta a muito lenta provocando acúmulo de sais que tentem a prejudicar o crescimento dos vegetais (MARIN, 2012).

Figura 1 – Ponto de coleta da amostra de solo rizosférico



Fonte: CARVALHO, 2016.

Para além das características de solo e vegetação, a área encontrava-se sob intenso uso como pasto e silvicultura, apesar de estar em evidente processo de desertificação, onde segundo Barbosa *et al.* (2005), esse processo é acelerado pela ação do homem, através da utilização de práticas inadequadas, trazendo consequências danosas para a terra e para quem dela tira o sustento.

5.2 Contagem Padrão em Placa (CPP)

A densidade populacional das Bactérias Heterotróficas Cultiváveis (BHC) associadas à raiz da cactácea do gênero *Cereus* sp. foi de $4,62 \times 10^7$ UFC/g e a densidade populacional de Bactérias Solubilizadoras de Fosfato (BSF) foi de $3,475 \times 10^7$ UFC/g. A relação BHC/BSF observada foi próxima a 75% (Tabela 2). Significa que inseridas no universo da população bacteriana mesófila encontra-se uma importante parcela de microrganismos com capacidade específica de solubilizar fosfato.

Tabela 2 – Densidade de BSF e BHC isoladas de solo rizosférico de cactácea da caatinga

Meios de Cultura	Nº x 10 ⁷ UFC/g	Relação BHC/BSF
Bactérias Solubilizadoras de Fosfato	3,47	75,1%
Bactérias Heterotróficas Cultiváveis	4,62	24,9%

Fonte: o autor.

A densidade bacteriana heterotrófica observada foi superior ao descrito por outros estudos conduzidos em ambientes de semiárido, como o exposto por Lima *et al.* (2014), onde foi observada densidade de $5,0 \times 10^6$ UFC g⁻¹ no solo coletado de caatinga natural e de $6,3 \times 10^5$ UFC g⁻¹ em área de carrasco. Superior também as quantidades encontradas por Gorch-Lira e Coutinho (2007) com contagens de $5,0 \times 10^6$ UFC g⁻¹ para BHC do solo da caatinga.

Para densidades de bactérias solubilizadoras de fosfato, este trabalho apresentou resultados superiores ao observado por Lima *et al.* (2014) ao quantificar BSF em solo da caatinga no município de Aiuaba (Ceará), em área conservada e em vegetação de carrasco, registraram densidades de $2,5 \times 10^3$ UFC/g⁻¹ e $1,0 \times 10^5$ UFC/g⁻¹, respectivamente, menores ao apontado por este estudo.

A concentração e disponibilidade microbiana no solo varia de acordo com a localização geográfica, a temperatura, características do solo, pH, teores de matéria orgânica e umidade (ARIFUZZAMAN; KHATUN; RAHMAN *et al.*, 2010). Concentrações mais elevadas

de BSF no solo permite inferir que maiores são as concentrações de P insolúvel (LIMA *et al.*, 2014). A pouca informação sobre a densidade de microrganismos em solos secos, principalmente da caatinga, é fator limitante em estudos comparativos (GORLACH-LIRA; COUTINHO, 2007; LIMA *et al.*, 2014).

O fosfato no solo da caatinga encontra-se na sua forma inorgânica, ou seja, não acessível as plantas. A importância da presença das bactérias solubilizadoras de fosfato no solo está diretamente relacionada com a disponibilização do nutriente na sua forma orgânica que é assimilável por vegetais (CARVALHO *et al.*, 2016).

Nas colônias crescidas em meio GL destacam-se aquelas com características distintas, com presença de halo indicando a solubilização do precipitado de CaHPO_4 contido no meio (Figura 2) (SOUCHIE; ABBOUD, 2007; KHAN *et al.*, 2010).

Figura 2 – Presença do halo de solubilização de P ao redor de colônia crescida em meio GL.



Fonte: O autor.

De acordo com Di Simine *et al.* (1998), é possível observar a presença de bactérias solubilizadoras de fosfato inorgânico pela formação de um halo de solubilização transparente em torno da colônia, resultante do consumo do fosfato adicionado ao meio de cultura, em contraste com o meio opaco.

5.3 Coloração de Gram

Os resultados dos testes de caracterização fenotípica estão expressos na Tabela 3.

A coloração de Gram é amplamente utilizada para verificar a morfologia e a pureza dos isolados. As bactérias heterotróficas cultiváveis apresentaram morfologia de bastonete curto Gram-negativa. As bactérias isoladas do meio específico para solubilizadoras de fosfato apresentaram morfologia de bastonetes Gram-negativos e bastonete Gram-positivo com formação de esporos. A formação de esporos permite a esses organismos resistir a solos secos por longos períodos (CHEN ; ALEXANDER, 1973).

Tabela 3 – Morfologia, coloração de Gram, teste de antagonismo e solubilização de fosfato férrico das cepas isoladas da raiz da planta *Cereus* sp.

Estirpe	Morfologia/Gram	TAV	FePO₄
BHC1	Bastonete/Gram-negativo	Forte	+
BHC2	Bastonete/Gram-negativo	Forte	+
BHC3	Bastonete/Gram-negativo	Fraca	+
BHC4	Bastonete/Gram-negativo	Forte	+
BHC5	Bastonete/Gram-negativo	Forte	+
BHC6	Bastonete/Gram-negativo	Forte	+
BSF1	Bastonete/Gram-positivo	Forte	+
BSF2	Bastonete/Gram-positivo	Forte	-
BSF3	Bastonete/Gram-negativo	Forte	-
BSF4	Viável, mas não cultivável	*	*
BSF5	Bastonete/Gram-negativo	Forte	+
BSF6	Bastonete/Gram-negativo	Forte	-

BHC: bactéria heterotrófica cultivável; BSF: bactéria solubilizadoras de fosfato; TAV: Teste de agregação em vidro; + Solubilizadora de FePO₄; - Não solubilizadora de FePO₄; * Sem resultado.

5.4 Bactérias solubilizadoras de fosfato férrico

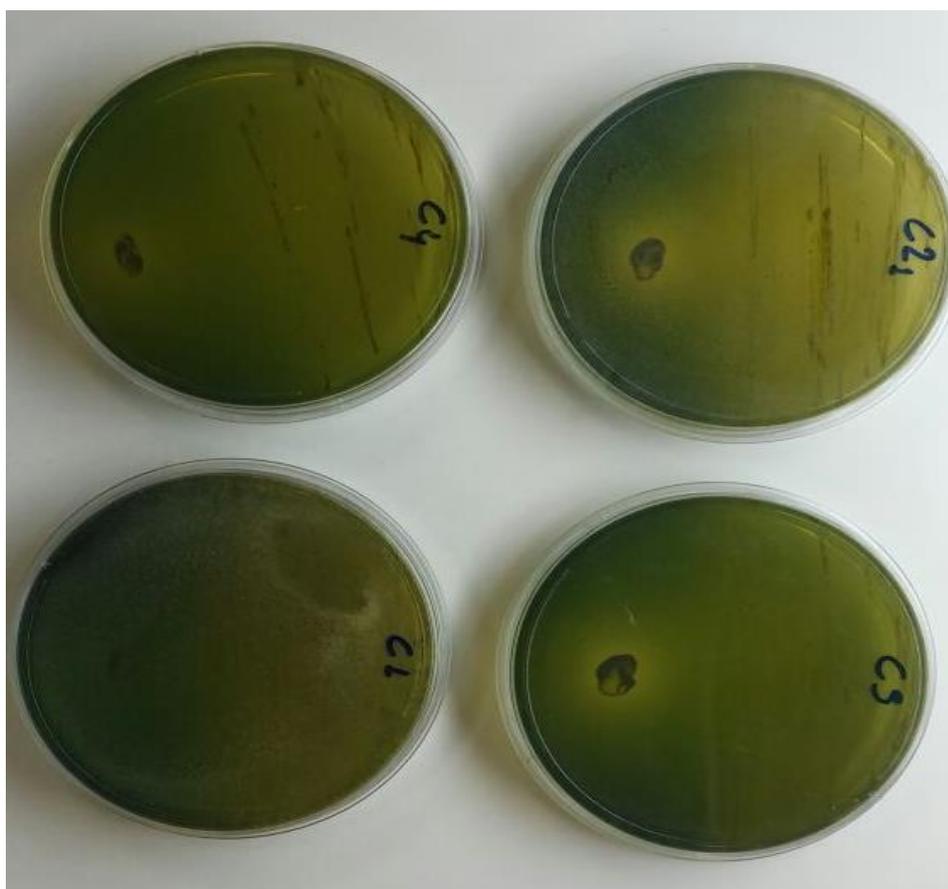
A alta relação BHC/BSF presente na amostra resultou em um novo teste para verificar quais cepas do controle também seriam capazes de solubilizar fosfato férrico, aumentando assim, o número de cepas que poderão ser usadas nos futuros ensaios.

Todas as cepas do controle e duas cepas isoladas do meio GL (meio teste para solubilização de fosfato de cálcio (CaHPO₄) foram capazes de solubilizar fosfato férrico. O resultado positivo pôde ser verificado pela mudança da coloração do meio em virtude da

redução do pH (Figura 3; Tabela 3). O meio em pH neutro tem coloração verde, quando acidificado adota coloração amarela, quando basificado adota o tom azul.

Os resultados desse experimento se aproximam dos obtidos por Silva Filho e Vidor (2000), onde a maioria dos isolados apresentou capacidade de solubilizar fosfato ligado ao cálcio, mas não é capaz de, ao mesmo tempo, solubilizar fosfato férrico. Isso ocorre em função da baixa solubilidade do FePO_4 , em relação do CaHPO_4 .

Figura 3 – Meio teste para solubilização de fosfato férrico.



Fonte: O autor.

5.5 Teste de aderência ao tubo de vidro (TAV)

Outra característica testada para os isolados do solo rizosférico da raiz da cactácea foi à capacidade de aderência à superfície por meio do teste de agregação em vidro (CHRISTENSEN *et al.*, 1985). Os resultados do teste foram classificados em ausente, fraco, médio ou forte para formação de mucilagem. Apenas uma cepa apresentou resultado fraco no teste (Tabela 3).

A habilidade de secretar compostos exopolissacarídeos também está ligada a capacidade adaptativa dessas células a resistirem a ambientes de baixa umidade, permitindo que sobrevivam a essa condição (Figura 4). Aliada a isso, bactérias com essa capacidade, podem auxiliar vegetais a sobreviverem a condições de estresse hídrico (NOCKER *et al.*, 2012; ROPER *et al.*, 2007).

Figura 4 – Teste de agregação ao tubo de vidro



Fonte: O autor.

5.6 Teste de antagonismo *in vitro*

O antagonismo ou não existente entre as bactérias pode ser observado em placa de petri, sendo classificadas como antagônicas quando o crescimento bacteriano nas estrias é inibido pelo crescimento de outra (Figura 5).

Figura 5 – Teste de antagonismo pela técnica de estrias cruzadas.



Fonte: O autor.

O resultado do teste pode ser observado na Tabela 4. É importante destacar a complexidade de relações existentes, mesmo entre um número reduzido de indivíduos, e as variadas possibilidades de combinações que podem ser feitas com as cepas a partir do resultado do teste.

Tabela 4 – Resultado do teste de antagonismo entre as cepas isoladas

Teste de antagonismo <i>in vitro</i>											
Cepas	BHC1	BHC2	BHC3	BHC4	BHC5	BHC6	BSF1	BSF2	BSF3	BSF4	BSF5
BHC1	■	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+
BHC2	+	■	+	-	-	-	+	+	+	-	+
BHC3	-	+	■	+	+	+	+	+	+	+	+
BHC4	+	-	+	■	-	+	-	-	+	-	+
BHC5	-	-	+	-	■	+	-	+	-	+	+
BHC6	-	-	+	+	+	■	-	-	+	-	+
BSF1	-	+	+	+	-	-	■	+	-	+	+
BSF2	+	+	+	-	+	-	+	■	+	-	+
BSF3	+	+	+	+	-	+	+	-	■	-	+
BSF5	+	-	+	-	+	-	+	-	-	■	-
BSF6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	■

+ antagonicas; - não antagonicas. Fonte: o autor.

No solo, a microbiota varia de acordo com algumas características, como a variação da temperatura, do pH e da disponibilidade de matéria orgânica (MICHEREFF; ANDRADE; MENEZES, 2005).

Os microrganismos encontram-se em intensa interação. Essa interação pode ser sinérgica, antagônica, mutualística, parasitária ou saprofítica. Além de competirem entre si, esses organismos atuam para impedir que espécies novas vençam a competição por recursos sobre as espécies autóctones. Essas disputas favorecem o desenvolvimento de novos e diferentes nichos ecológicos, contribuindo assim com a grande variedade microbiológica do solo (MICHEREFF; ANDRADE; MENEZES, 2005).

De acordo com o teste de antagonismo *in vitro*, foram eleitos quatro consórcios, listados na Tabela 5, para serem avaliados *in vivo* com a cultura de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. Os critérios de escolha das bactérias formadoras dos consórcios foram: bactérias que não apresentassem atividade antagônica, as que foram classificadas com capacidade de agregação forte e as que fossem capazes de solubilizar FePO₄.

Tabela 5 – Consórcios eleitos para os tratamentos em campo.

Consórcio	Cepas
C1	BHC2 + BHC4 + BSF5
C2	BHC1 + BHC5 + BSF1
C3	BHC2 + BHC4 + BHC5
C4	BHC2 + BHC6 + BSF5

Fonte: o autor.

5.7 Ensaio *in vivo*

Todos os tratamentos apresentaram médias de Comprimento da parte aérea (CPA), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR) e massa seca total (MST) superiores ao tratamento sem nutriente (SN) (Tabela 6). O tratamento C1 foi o que teve o maior CPA, embora isso não tenha se convertido em maiores médias de MSPA, MSR e MST quando comparado com os outros tratamentos. Para MSPA, a média do tratamento C4 foi significativamente diferente quando comparada com o tratamento com adubação (NT), sendo 27,1% superior.

Tabela 6 – Médias¹ e desvio padrão dos tratamentos de acordo com as variáveis.

	CPA (cm pl ⁻¹)		MSPA (g pl ⁻¹)		MSR (g pl ⁻¹)		MST (g pl ⁻¹)	
	M	DP	M	DP	M	DP	M	DP
C1	30,74a	1,592	3,586b	0,076	1,176b	0,093	4,762b	0,133
C2	28,96a	0,720	3,616b	0,147	1,316b	0,172	4,932b	0,178
C3	28,62a	0,747	3,672b	0,145	1,422a	0,105	5,094b	0,143
C4	28,76a	0,642	4,21a	0,147	1,886a	0,177	6,096a	0,229
NT	25,86a	1,751	3,096b	0,229	1,466a	0,088	4,562b	0,252
SN	18,56b	0,773	0,946c	0,183	0,368c	0,061	1,314c	0,191

CPA: Comprimento da parte aérea; MSPA: Massa seca da parte aérea; MSR: Massa seca da raiz; MST: Massa seca total; M: Média; DP: Desvio padrão; NT: Tratamento com nutriente; SN: Tratamento sem nutriente; ¹Médias com mesma letra nas colunas não diferem entre si ($p>0,05$), pelo teste de Tukey.

Nas variáveis MSR e MST o tratamento C4 foi o que apresentou resultados diferentes dos demais. Para MSR, o resultado de C4 foi superior, estatisticamente, ao dos tratamentos C1, C2 e SN, porém, não houve diferença estatística quando comparado com o tratamento NT. O consórcio C4 foi 37,64% superior à média de C1, 30,2% superior a C2 e 80% superior a SN para MSR. Para MST, os tratamentos C4 e SN foram estatisticamente diferentes dos demais tratamentos. Tendo C4 obtido média superior e SN inferior quando comparados com os demais. A média de MST do tratamento C4 foi 25,16% superior à de NT e 78,44% superior ao tratamento Sem Nutriente (SN).

Da análise de fósforo lábil no substrato onde os vegetais foram cultivados, os resultados estão expressos na Tabela 7.

Tabela 7 – Concentração de fósforo lábil (mg.kg⁻¹) presente nos substratos.

Tratamentos	P lábil (mg.kg ⁻¹)	
	Média ¹	D. Padrão
C1^D	57,71b	4,83
C2^D	49,65b	10,74
C3^D	60,74a	8,28
C4^D	66,36a	10,00
NT^D	26,23c	3,57
SN^{SD}	19,0c	1,51
SNC^{SD}	15,01c	1,78

C1: Consórcio número 1; C2: Consórcio número 2; C3: Consórcio número 3; C4: Consórcio número 4; CP: Tratamento adubado com micronutrientes e macronutrientes; SN: Tratamento não adubado; SNC: Substrato sem cultivo; SD: amostras sem diluição; D: amostras diluídas; ¹Médias com mesma letra nas colunas não diferem entre si ($p > 0,05$), pelo teste de Tukey.

Os tratamentos C3 e C4 não apresentaram diferença estatística. O grupo C3 foi estatisticamente superior aos tratamentos CP, SN e SNC, respectivamente 56, 70 e 76%. Os mesmos tratamentos quando comparados com C4, a diferença foi respectivamente de 60, 71 e 77%. Pode-se inferir uma relação entre a disponibilidade de fósforo e uma maior MST como observado em C4 e C3 que apresentaram as maiores médias de MST e P lábil no substrato.

Pode-se inferir que o fósforo lábil presente na amostra de SN seja resultado do acúmulo desse material no substrato, já que nesse tratamento o fósforo adicionado é comum ao empregado em fertilizantes.

Os substratos C1, C2 e C4 apresentaram taxas de fósforo lábil dentro da margem apontada por Goedert *et al.* (1986), entre 50 a 350 mg dm⁻³ de P para os solos do Cerrado.

Na cultura do feijão-caupi, o nível crítico de P gira em torno de 10mg.kg⁻¹, sendo as doses recomendadas por volta de 20 a 60mg.kg de fósforo assimilável (ANDRADE JÚNIOR *et al.*, 2002). Porém, outros autores têm relatado melhor desempenho do vegetal, quando dispõem de fósforo em doses superiores, como forma de obter maior biomassa e produtividade (ZUCARELI *et al.*, 2006; COUTINHO *et al.*, 2014).

Quanto maior os teores de fósforo disponíveis, maior será a absorção e incorporação desse nutriente à biomassa (SANTOS *et al.*, 2011), porém, limitado a doses de 200mg kg⁻¹ (COUTINHO *et al.*, 2014). É observado que existe um maior incremento de matéria seca no feijão quando o fósforo passa a ser incorporado ao substrato antes do início do plantio (SANTOS; GATIBONI; KAMINSKI, 2008).

Além da disponibilização de fosfatos, microrganismos também podem auxiliar no desenvolvimento dos vegetais pela disponibilização de fitohormônios (reguladores naturais de crescimento vegetal), como o ácido indol acético, entre outras possibilidades de relações benéficas (MARCHIORO, 2005; PEREIRA *et al.*, 2012).

É importante destacar que os resultados desse estudo foram obtidos sob determinadas condições controladas, como em situação de casa de vegetação fechada, solo estéril, irrigação e adubação regular, o que conferiu vantagens para o desenvolvimento dos vegetais e de instalação das bactérias em estudo, sem que houvesse competição entre elas, como ocorreria no ambiente natural com a presença de microrganismos autóctones do solo.

A casa de vegetação onde os tratamentos foram aplicados apresentava um bloqueio de luz solar principalmente no início das manhãs e no final das tardes, isso pode ter influenciado negativamente no desenvolvimento da cultura.

O estudo sobre o potencial biotecnológico das BSF é de grande importância em virtude do intenso uso de fertilizantes fosfatados no mundo todo, em especial no Brasil, que se destaca como um dos principais importadores desse tipo de produto.

Esses organismos podem ser convertidos em uma alternativa sustentável para o aproveitamento de fósforo inorgânico, possibilitando um melhor aproveitamento do solo pela disponibilização natural do nutriente, redução de impactos ambientais associados ao uso de fertilizantes, possível redução de custos de produção, impactos sobre a sustentabilidade local, entre outros processos benéficos.

6 CONCLUSÃO

A densidade populacional de BSF cultiváveis no solo rizosférico da cactácea *Cereus* sp. foi significativo em relação à população de BHC totais cultiváveis.

A maior parte dos isolados apresentou característica morfológica de parede celular Gram negativa (82%) e produção de exopolissacarídeos que configuram vantagens competitivas em ambientes com temperaturas mais elevada.

Sob as condições experimentais, o consórcio C4 se mostrou mais eficiente em relação aos demais e aos tratamentos controle (CP e SN), na promoção do crescimento de feijão-caupi pela disponibilização de P na forma lábil. É possível inferir também, que os consórcios C3 e C4 são os mais eficientes em dispor P lábil para o substrato.

7 CONSIDERAÇÃO FINAL

Os resultados se mostraram promissores e, portanto, novas pesquisas devem ser incentivadas a fim de ampliar o conhecimento sobre o potencial biotecnológico de bactérias do solo da caatinga e que forneçam subsídios ao desenvolvimento de estratégias para o melhoramento da eficiência da fertilização e desenvolvimento vegetal como uma estratégia menos agressiva ao ambiente na produção de alimentos em sistemas de monocultivo.

8 REFERÊNCIAS

- ADL, S.; IRON, D.; KOLOKOLNIKOV, T. A threshold area ratio of organic to conventional agriculture causes recurrent pathogen outbreaks in organic agriculture. **Science of the Total Environment**. v. 409, p. 2192–2197. 2011.
- ADUAN, R. E.; VILELA, M. F.; REIS JÚNIOR, F. B. Os grandes ciclos biogeoquímicos do planeta. **Embrapa Cerrados**. Plaltina, DF. 2004.
- ANDA – **Associação Nacional para a Difusão de Adubos**. Disponível em: <<http://www.anda.org.br/index.php?mpg=03.00.00&ver=por>>. Acesso em 8 de agosto de 2017.
- ANDRADE JÚNIOR, A. S.; SANTOS, A. A.; SOBRINHO, C. A.; BASTOS, E. A.; MELO, F. B.; VIANA, F. M. P. Sistemas de Produção. Cultivo do Feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). **Embrapa**. Teresina, PI. 2002.
- ANDREWS, G. F. Large-scale bioprocessing of solids. **Biotechnology Progress**. v. 6, p. 225-230. 1990.
- ARIFUZZAMAN, M.; KHATUN, M. R.; RAHMAN, H. Isolation and screening of actinomycetes from Sundarbans soil for antibacterial activity. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n.29, p. 4615-4619, 2010.
- ASSIS, R. L.; ROMEIRO, A. R. Agroecologia e agricultura orgânica: controvérsias e tendências. **Desenvolvimento e Meio Ambiente**. v. 6, p. 67-80, 2002.
- BABU-KHAN, S.; YEO, T. C.; MARTIN, W. L.; DURON, M. R.; ROGERS, R. D.; GOLDSTEIN, A. H. Cloning of a mineral phosphate solubilizing gene from *Pseudomonas cepacia*. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 61, p. 972-978. 1995.
- BANIK, S.; DEY, B. Available phosphate content of an alluvial soil as influenced by inoculation of some isolated phosphate-solubilizing micro-organisms. **Plant and Soil**. v. 69, p. 353-364. 1983.
- BARBOSA, M. P.; FERNANDES, M. F.; SILVA, M. J.; GUIMARÃES, C. L.; COSTA, I. C. Diagnóstico socioeconômico ambiental da APA Chapada do Araripe: Ceará, Pernambuco e Piauí. Relatório final. **ATECEL**, Campina Grande. 127-324 p., 2005.

BARBOZA, L.G.A.; THOMÉ, H.V.; RATZ, R.J.; MORAES, A.J. Para além do discurso ambientalista: percepções, práticas e perspectivas da agricultura agroecológica. **Ambiência**. v. 8, n. 2, p. 389-401. 2012.

BARROTI, G.; NAHAS, E. População microbiana total e solubilizadora de fosfato em solo submetido a diferentes sistemas de cultivo. **Pesquisa agropecuária brasileira**. p. 2043-2050, v.35, 2000.

BAZIRAMAKENGA, R.; SIMARD, R. R.; LEUROUX, G. D. Determination of organic acids in soil extracts by ion chromatography. **Soil Biology and Biochemistry**. v. 27, p. 349-356.1995.

BOBADILLA, C.; RINCÓN, S. Aislamiento y producción de bacterias fosfato solubilizadoras a partir de compost obtenido a partir de residuos de plaza. Tese em Microbiologia Industrial. **Pontificia Universidad Javeriana**. Bogotá. 2008.

CAMPANHOLA, C.; VALARINI, P. J. A agricultura orgânica e seu potencial para o pequeno agricultor. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**. v.18, n.3, p. 69-101. 2001.

CAMPOS, J. H. B.; SILVA, M. T.; SILVA, V. P. R. Impacto do aquecimento global no cultivo do feijão-caupi, no Estado da Paraíba. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. Campina Grande. v. 14, n. 4, p. 396–404, 2010.

CAPORAL, F. R.; COSTABEBER, J. A. **Agroecologia: alguns conceitos e princípios**. Brasília: MDA/SAF/DATER-IICA, 2004. 24p.

CARDOSO, E. J. B. N. **Microbiologia do solo**. Sociedade Brasileira de Ciências do solo, Campinas SP. 1992.

CARVALHO, R. M. M.; SILVA, M. R.; CARVALHO, F. C. T.; REBOUÇAS, R. H.; SOUSA, O. V. Bactérias Solubilizadoras de Fosfato em solo rizosférico da Caatinga. **Revista Geonorte – Edição Especial V**. v. 7, n. 26, p. 48-60, 2016.

CHAGAS JÚNIOR, A. F.; OLIVEIRA, L. A.; OLIVEIRA, A. N.; WILLERDING, A. L. Capacidade de solubilização de fosfato e eficiência simbiótica de rizóbios isolados de solos da Amazônia. **Acta Scientiarum Agronomy**. v. 32. n.2. p.359-366. 2010.

CHEN, M.; ALEXANDER, M. Survival of soil bacteria during prolonged desiccation. **Soil Biology and Biochemistry**, vol. 5, p. 213-221. 1973.

CHRISTENSEN, G. D.; SIMPSON, W. A.; YOUNGER, J. J.; BADDOUR, L. M.; BARRETT, F. F.; MELTON D. M.; BEACHEY, E. H. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 22, p.996–1006, 1985.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIEMNTO. **Indicadores da Agropecuária**: observatório agrícola, maio 2017. Brasília. 2017.

CORDELL, D.; NESET, T. -S. S. Phosphorus vulnerability: a qualitative framework for assessing the vulnerability of national and regional food systems to the multidimensional stressors of phosphorus scarcity. **Global Environmental Change**. v. 24, p. 108-122. 2014.

COUTINHO, P. W. R.; SILVA, D. M. S.; SALDANHA, E. C. M.; OKUMURA, R. S.; SILVA JUNIOR, M. L. S. Doses de fósforo na cultura do feijão-caupi na região nordeste do Estado do Pará. **Revista Agro@mbiente On-line**. v. 8, n. 1, p. 66-73. 2014.

DANTAS, J. P.; MARINHO, F. J. L.; FERREIRA, M. M. M.; AMORIM, M. S. N.; ANDRADE, S. I. O.; SALES, A. L. Avaliação de genótipos de caupi sob salinidade. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. Campina Grande, v.6, n.3, p.425-430, 2002.

DI SIMINE, C. D.; SAYER, J. A.; GADD, G. M. Solubilization of zinc phosphate by a strain of *Pseudomonas fluorescens* isolated from a forest soil. **Biology and Fertility of Soils**, p.87-94, 1998.

DOWNES. M. P.; ITO. K.; Compendium of methods for the microbiological examination of foods. **American Public Health Association (APHA)**. p. 69-89, 2001.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Statistical Pocketbook**: World food and agriculture. Rome. 2015.

FERNÁNDEZ, L. A.; ZALBA, P.; GÓMEZ, M. A.; SAGARDOY, M. A. Bacterias solubilizadoras de fosfato inorgánico aisladas de suelos de la región sojera. **Ciencia del Suelo (Argentina)**. v. 23, n. 1, p. 31-37. 2005.

FOLEY, J. A.; RAMANKUTTY, N.; BRAUMAN, K. A.; CASSIDY, E. S.; GERBER, J. S.; JOHNSTON, M.; MUELLER, N. D.; O'CONNELL, C.; RAY, D. K.; WEST, P. C.; BALZER, C.; BENNETT, E. M.; CARPENTER, S. R.; HILL, J.; MONFREDA, C.; POLASKY, S.;

ROCKSTROM, J.; SHEEHAN, J.; SIEBERT, S.; TILMAN, D.; ZAKS, D. P. M. Solutions for a cultivated planet. **Nature**. v. 478, p. 337-342. 2011.

FREIRE FILHO, F. R. Feijão-caupi no Brasil. Produção, melhoramento genético, avanços e desafios. **Embrapa Meio-Norte**. Teresina, PI. 2011.

FREIRE FILHO, F. R. Origem, evolução e domesticação do caupi. In: ARAÚJO, J. P. P. de; WATT, E. E. (Org.). **O caupi no Brasil**. Brasília, DF: IITA: EMBRAPA, 1988. p. 26-46.

FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. A.; RIBEIRO, V. Q. **Feijão-caupi: avanços tecnológicos**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica. p. 519. 2005.

FREIRE FILHO, F. R.; RIBEIRO, V. Q.; BANDEIRA, L. M. R. **Cultivares de feijão caupi recomendadas para o plantio nas regiões Norte e Nordeste**: Ano agrícola 1996/97. Teresina: EMBRAPA-CPAMN. p.26. 1997.

FREIRE FILHO, F. R.; SANTOS, A. A.; CARDOSO, M. J.; SILVA, P. H. S.; RIBEIRO, V. Q. BR 17 -GURGUÉIA: nova cultivar de caupi com resistência a vírus para o Piauí. **EMBRAPA-CPAMN**. Teresina, PI. p. 6, 1994.

GADAGI, R. S.; SA, T. New isolation method for microorganisms solubilizing iron and aluminum phosphates using dyes. **Soil Science and Plant Nutrition**. v. 48, p. 615-618, 2002.

GLIESSMAN, S. R. **Agroecologia: processos ecológicos em agricultura sustentável**. 2 ed. Porto Alegre: Ed. Universidade/UFRGS, 2001. 653p.

GONÇALVES, G. S. Estratégias de controle de invasão biológica por *Prosorpiis juliflora*, na Caatinga e ecossistemas associados. Dissertação (Mestrado em Agronomia). **Universidade Federal da Paraíba**, Centro de Ciências Agrárias. Paraíba, 2011.

GORLACH-LIRA, K.; COUTINHO, H. D. M. Population dynamics and extracellular enzymes activity of mesophilic and thermophilic bacteria isolated from semi-arid soil of northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**. p. 135-141, 18 jan. 2007.

GRANT, C. A.; FLATEN, D. N.; TOMASIEWICZ, D. J.; SHEPPARD, S. C. A importância do fósforo no desenvolvimento inicial da planta. **Informações Agrônomicas**. n. 95, p. 1-5. 2001.

GYANESHWAR, P.; NARESH, G.; KUMAR, L.; PAREKH, J.; POOLE, P. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. **Plant and Soil**. 245: p. 83-93. 2002.

HALDER, A. K.; MISHRA, A. K.; BHATTACHARYA, P.; CHAKRABARTTY, P. K. Solubilization of rock phosphate by *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*. **The Journal of General and Applied Microbiology**. v. 36, p. 81-92. 1990.

HAVLIN, J.L.; BEATON, J.D.; TISDALE, S. L.; NELSON, W.L. Soil fertility and fertilizers: An introduction to nutrient management. Prentice-Hall. Upper Saddle River, NJ. 7ª edição. 2004.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. The water-culture method for growing plants without soil. **California Agricultural Experiment Station**. California. 1950.

HOLANDA, J. S.; BRASIL, E. C.; SALVIANO, A. A. C.; CARVALHO, M. C. S.; RODRIGUES, M. R. L.; MALAVOLTA, E. Eficiência de extratores de fósforo para um solo adubado com fosfatos e cultivado com arroz. **Scientia agricola**. (Piracicaba, Braz.).1995.

IGPB. **Recomendação para a Rio +20: Segurança alimentar para um planeta sob pressão**. Disponível em: <http://www.inpe.br/igbp/arquivos/FoodSecurity_Final_LR-portugues.pdf>. Acesso em 08 de março de 2017.

IPECE – Instituto de Pesquisa e Estratégia Econômica do Ceará. **Perfil básico Municipal (Irauçuba)**. IPECE, 2014.

KHAN, M. S.; ZAIDI, A.; AHMAD, M.; OVES, M.; WANI, P. A. Plant growth promotion by phosphate solubilizing fungi – current perspective. **Archives of Agronomy and Soil Science**. p. 73–98, 2010.

KLEIN, C.; AGNE, S. A. A. Fósforo: de nutriente a poluente. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**. v. 8, n. 8, p. 1713-1721. 2012.

LARA, C.; ESQUIVEL, L.; NEGRETE, J. Bacterias nativas solubilizadoras de fosfato para incrementar los cultivos en el departamento de Córdoba-Colombia. **Biotechnología en el sector agropecuario y agroindustrial**. v. 9, n. 2, p. 114 - 120. 2011.

LEFF, E. Agroecologia e saber ambiental. **Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável**. v.3, n.1, p. 36-51. 2002.

LEVY, C. E. **Procedimentos laboratoriais: da requisição do exame à análise microbiológica**. In: Manual de microbiologia clínica para o controle de infecção em serviços de saúde. Editora Agencia de Vigilância Sanitária (ANVISA), módulo 3, 45 p., 2004.

LIMA, C. J. G. S.; OLIVEIRA, F. A.; MEDEIROS, J. F.; OLIVEIRA, M. K. T.; JÚNIOR, A. B. A. Resposta do feijão caupi a salinidade da água de irrigação. **Revista Verde**. Mossoró, RN. v. 2, n.2, p. 79–86. 2007.

LIMA, J. V. L.; PINHEIRO, M. S.; FIÚZA, L. M. C. G.; MARTINS, S. C. S.; MARTINS, C. M. Populações microbianas cultiváveis do solo e serrapilheira de uma unidade de conservação no semiárido brasileiro. **Enciclopédia Biosfera**. v. 10, n. 18, p. 2330-2316, 2014.

MARCHIORO, L. E. T. Produção de ácido indol acético e derivados por bactérias fixadoras de nitrogênio. Dissertação (Mestrado em microbiologia, parasitologia e patologia). **Universidade Federal do Paraná**. Centro de Ciências Agrárias. Paraná, 2005.

MARIN, A. M. P.; CAVALCANTE, A. M. B.; MEDEIROS, S. S.; TINÔCO, L. B. M.; SALCEDO, I. H. Núcleos de desertificação no semiárido brasileiro: ocorrência natural ou antrópica?. **Parceria Estratégica**, v. 17, n. 34, p. 87-106. 2012.

MARTINS, L. M. V.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. Growth characteristics and symbiotic efficiency of rhizobia isolated from cowpea nodules of the north-east region of Brazil. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 29, p. 1005- 1010, 1997.

MEDEIROS, E. V.; SILVA, K. J. P.; MARTINS, C. M.; BORGES, W. L. Tolerância de bactérias fixadoras de nitrogênio provenientes de municípios do Rio Grande do Norte à temperatura e salinidade. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 7, n. 2, p. 160-168, 2007.

MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Ecologia Microbiana**. 1 ed. Jaguaraúna, SP: EMBRAPA Meio Ambiente, 1998.

MENDES, I. C.; REIS JÚNIOR, F. B. **Microrganismos e disponibilidade de fósforo (P) nos solos: uma análise crítica**. Documentos Embrapa Cerrados. Planaltina, DF. p. 26. 2003.

MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E. G. T.; MENEZES, M. **Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais**. UFRPE, Imprensa Universitária. p. 398. 2005.

MINING. **Mineração de fosfato.** Disponível em: <<http://noticiasmineracao.mining.com/2011/10/05/mineracao-de-fosfato/>>. Acesso em 02 de agosto de 2017.

MOURA, W. M.; LIMA, P. C.; CASALI, V. W. D.; PEREIRA, P. R. G. Eficiência nutricional para fósforo em linhagens de pimentão. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 19, n. 3, p. 306-312, 2001.

MULETA, D.; ASSEFA, F.; BÖRJESSEON, E.; GRANHALL, U. Phosphate solubilising rhizobacteria associated with *Coffea arabica* L. in natural coffee forests of southwestern Ethiopia. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**. v. 12. p. 73–84. 2013.

NOCKER, A.; FERNÁNDEZ, P. S.; MONTIJN, R.; SCHUREN, F. Effect of air drying on bacterial viability: a multiparameter viability assessment. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 90, p.86-95, 2012.

OTEINO, N; LALLY, R. D.; KIWANUKA, S.; LLOYD, A.; RYAN, D.; GERMAINE, J. D.; DOWLING, D. N. Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic *Pseudomonas* isolates. **Frontiers in Microbiology**, p. 01-09, 2015.

PADOVAN, M. P. **Conversão de Sistemas de Produção Convencionais para Agroecológicos: Novos Rumos à Agricultura Familiar**. Dourados-MS: Edição do Autor, v. 1, p. 37-50, 2006.

PAIVA, L. B.; FREIRE FILHO, F. R.; TEÓFILO, E. M.; RIBEIRO, V. Q. **Feijão-caupi: Melhoramento genético no Centro de Ciências Agrárias**. UFC edições. p. 2017.

PANZENHAGEN, N.V.; KOLLER, O.C.; VAQUIL, P.D.; SOUZA, P.V.D.; SOGLIO, F.K.D. Aspectos técnico-ambientais da produção orgânica na região citrícola do Vale do Rio Caí, RS. **Ciência Rural**. v. 38, n. 1, p. 90-95. 2008.

PAREDES-MENDONZA, M.; ESPINOSA-VICTORIA, D. Ácidos orgánicos producidos por rizobacterias que solubilizan fosfatos: una revisión crítica. **Terra Latinoamericana**. v. 28, n. 1, p. 61-70. 2010.

PEREIRA, A. P. A.; SILVA, M. C. B.; OLIVEIRA, J. R. S.; RAMOS, A. P. S.; FREIRE, M. B. G. S.; FREIRE, F. J. KUKLINSKY-SOBRA, J. Influência da salinidade sobre o crescimento

e a produção de ácido indol acético de *Burkholderia* spp. endofíticas de cana-de-açúcar. **Bioscience Journal**. v. 28, p. 112-121. 2012.

PÉREZ, A.; DE LA OSSA, J.; MONTES, D. Hongos solubilizadores de fosfatos en fincas ganaderas del departamento de Sucre. **Revista Colombiana Ciencia Animal**. v. 4, n. 1, p. 35-45. 2012.

PINEDA, M. E. B. La solubilización de fosfatos como estrategia microbiana para promover el crecimiento vegetal. **Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria**. v. 15, n. 1, p. 101-113, 2014.

RAMÍREZ, L. C. C.; GALVEZ, Z. Y. A.; BURBANO, V. E. M. Solubilización de fosfatos: una función microbiana importante en el desarrollo vegetal. **NOVA - Publicación Científica en Ciencias Biomédicas**. v. 12, n. 21, p. 67 – 79. 2014.

REYES, I. Cuantificación de microorganismo solubilizadores de fosfatos en suelos del yacimiento de roca fosfórica de monte fresco. **Revista Facultad de Agronomía**. v. 17, p. 373 – 397. 1991.

RICHARDSON, A. E. Soil microorganisms and phosphorus availability. In: PANKHURST, C. E.; DOUBE, B. M.; GUPTA, V. V. S. R.; GRACE, P. R. (Ed.). Soil biota management in sustainable farming systems. Melbourne: CSIRO, 1994. p. 50-62.

ROPER, M. C.; GREVE, L. C.; LABAVITCH, J. M.; KIRKPATRICK, B. C. Detection and visualization of an exopolysaccharide produced by *Xylella fastidiosa* in vitro and in planta. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.73, p. 7252-7258, 2007.

ROSOLEM, C. A. & MARUBAYASHI, O. M. Seja o doutor do seu feijoeiro. **Arquivo Agrônômico**. n. 7 p. 1-18, 1994.

SANTOS, D. R.; GATIBONI, L. C.; KAMINSKI, J. Fatores que afetam a disponibilidade do fósforo e o manejo da adubação fosfatada em solos sob sistema plantio direto. **Ciência Rural**, v.38, n.2, p.576-586, 2008.

SANTOS, J. O.; SANTOS, R. M. S.; FERNANDES, A. A.; BORGES, M. G. B.; FERREIRA, R. T. F. V.; SALGADO, A. B. Os sistemas alternativos de produção de base agroecológica. **Agropecuária Científica no Semiárido**. v. 9, n. 1, p. 01-08. 2013.

SANTOS, J. Z. L.; FURTUNI NETO, A. E.; RESENDE, A. V.; CARNEIRO, L. F. CURI, N.; MORETTI, B. S. Resposta do feijoeiro à adubação fosfatada em solos de cerrado com diferentes históricos de uso. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**. v. 35, p. 193-202, 2011.

SHARPLEY, A. N.; HALVORSON, D.A. The management of soil phosphorus availability and its impact on surface water quality. In: LAL, R. & STEWART, B.A.(Ed). **Soil Processes and Water Quality**. Madison. p.7-89, 1994.

SILVA FILHO, G. N.; VIDOR, C. Atividade de microrganismos solubilizadores de fosfatos na presença de nitrogênio, ferro, cálcio e potássio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 36, n. 12, p. 1495-1508. 2001.

SILVA FILHO, G. N.; VIDOR, C. Solubilização de fosfatos por microrganismos na presença de fontes de carbono. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. v. 24, p. 311-319, 2000.

SILVA, I. M.; GOMES, J. B. P.; BINOTTO, E.; RUVIARO, C. F. Sistemas agroecológicos como proposta de produção sustentável: um estudo de caso na Chácara Dourados. **Revista Eletrônica Mestrado em Educação Ambiental**. v. 30, n.2, p. 187-203. 2013.

SILVA, M. O.; STAMFORD, N. P.; AMORIM, L. B.; ALMEIDA JÚNIOR, A. B.; SILVA, M. O. Diferentes fontes de P no desenvolvimento do meloeiro e disponibilidade de fósforo no solo. **Revista Ciência Agronômica**. v. 42, n. 2. 2011.

SINDHU, S. S.; PHOUR, M.; CHOUDHARY, S. R.; CHAUDHARY, D. Phosphorus Cycling: Prospects of Using Rhizosphere Microorganisms for Improving Phosphorus Nutrition of Plants. In: PARMAR, N.; SINGH, A. **Geomicrobiology and Biogeochemistry**. Berlin: Springer-Verlag, 2014. p. 10-302.

SINGH, C. P.; AMBERGER, A. Solubilization of rock phosphate by humic and fulvic acids extracted from straw compost. **Agrochimica**. v. 41, p. 221-228. 1998.

SOARES JR., F. L.; MELO, I. S.; DIAS, A. C. F.; ANDREOTE, F. D. Cellulolytic bacteria from soils in harsh environments. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, p. 2195-2203, 2012.

SOUCHIE, E. L.; ABOUD, A. C. S. Solubilização de fosfato por microrganismos rizosféricos de genótipos de Guandu cultivados em diferentes classes de solo. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, p.11-18, mar. 2007.

SOUTO, J. S.; OLIVEIRA, F. T.; GOMES, M. M. S.; NASCIMENTO, J. P.; SOUTO, P. C. Efeito da aplicação de fósforo no desenvolvimento de plantas de feijão guandu (*Cajanus cajan* (L) Mill sp.). **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**. v. 4, n. 1, p. 135-140. 2009.

STAMFORD, N. P.; MOURA, A. M. M. F.; SANTOS K. S.; SANTOS, P. R. Atuação de *Acidithiobacillus* na solubilização de fosfato natural em solo de tabuleiro cultivado com jacatupé (*Pachyrhizus erosus*). **Revista Brasileira Ciência do Solo**. v. 28, n. 01, p. 75-83, 2004.

STEVENSON, F. J. **Humus Chemistry: genesis, composition, reactions**: 2. Ed. New York: John Wiley. p. 496. 1994.

SYLVESTER-BRADLEY, R.; ASAKAWA, N.; LA TORRACA, S.; MAGALHÃES, F. M. M.; OLIVEIRA, L. A.; PERREIRA, R. M. Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfato de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia. **Acta Amazônica**, v. 12, p. 15-22, 1982.

ZUCARELI, C.; RAMOS JÚNIOR, E. U.; BARREIRO, A. P.; NAKAGAWA, J.; CAVARIANI, C. Aubação fosfatada, componentes de produção, produtividade e qualidade fisiológica em sementes de feijão. **Revista Brasileira de Sementes**. v. 28, n. 1, p. 09-15, 2006.