



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA
VETERINÁRIA**

**SOLUBILIZAÇÃO DE FÓSFORO E ZINCO POR
BACTÉRIAS ISOLADAS DE SOLO CULTIVADO COM
MILHO**

Everton Fulgêncio de Oliveira

Orientador(a): Dr^a. Alessandra Monteiro de Paula

BRASÍLIA - DF

JULHO/2023



EVERTON FULGÊNCIO DE OLIVEIRA

**SOLUBILIZAÇÃO DE FÓSFORO E ZINCO POR
BACTÉRIAS ISOLADAS DE SOLO CULTIVADO COM
MILHO**

Trabalho de conclusão de curso
de Graduação em Agronomia
apresentado junto à Faculdade
de Agronomia e Medicina
Veterinária da Universidade de
Brasília

Orientadora: Prof^a.Dr^a. Alessandra Monteiro de
Paula

BRASÍLIA - DF
JULHO/2023

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

F048s	Fulgêncio de Oliveira, Everton Solubilização de fósforo e zinco por bactérias isoladas de solo cultivado com milho / Everton Fulgêncio de Oliveira; orientador Alessandra Monteiro de Paula. -- Brasília, 2023. 35 p. Monografia (Graduação - Agronomia) -- Universidade de Brasília, 2023. 1. solubilização de fosfatos. 2. bactérias promotoras de crescimento das plantas. 3. solubilização de óxido de zinco. I. Monteiro de Paula, Alessandra, orient. II. Título.
-------	---

Cessão de direitos

Nome do Autor: Everton Fulgêncio de Oliveira

Título do Trabalho de Conclusão de Curso: Solubilização de fosfato e zinco por bactérias isoladas de solo cultivado com milho sob diferentes sistemas de manejo.

Ano: 2023

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta monografia e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva-se a outros direitos de publicação e nenhuma parte desta monografia pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.

EVERTON FULGÊNCIO DE OLIVEIRA

**SOLUBILIZAÇÃO DE FÓSFORO E ZINCO POR BACTÉRIAS
ISOLADAS DE SOLO CULTIVADO COM MILHO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, como parte das exigências do curso de Graduação em Agronomia, para obtenção do título de Engenheiro Agrônomo.

Aprovado em 25 de Julho de 2023.

COMISSÃO EXAMINADORA

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Alessandra Monteiro de Paula
Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária – Universidade de Brasília

Examinador interno: Prof. Dr. Jader Galba Busato
Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária – Universidade de Brasília

Examinador externo: Prof. Dr. Bruno Rogério de Souza

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por tudo que tem feito em minha vida, pelos desafios e dificuldades que me ajudou a superar pelo caminho e por ter colocado pessoas em minha vida que me ajudaram chegar até onde cheguei.

À minha família, aos meus pais, Marta Santos de Oliveira e Aristóteles Fulgêncio de Oliveira, pelo amor, carinho, por todo o apoio e suporte que me deram durante a vida, pelos incentivos aos estudos e a realização do curso de Agronomia.

Aos colegas e amigos que fiz durante a graduação, principalmente a Ana Vitória, Danilo Souza, Fábio Luiz, João Rozendo, João Paulo, Pedro Maciel e Thiago Santana que me apoiaram e ajudaram durante a realização do curso.

À minha professora e orientadora Alessandra Monteiro de Paula, por toda sua orientação, ensinamentos, dedicação e paciência.

Por fim, aos funcionários e pesquisadores do Laboratório de Química do Solo, principalmente a Samia Gomes, pelo auxílio e acompanhamento durante a realização do experimento deste trabalho.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	11
2.1 BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ASSOCIATIVAS.....	11
2.2 SOLUBILIZAÇÃO DE FÓSFORO.....	13
2.3 SOLUBILIZAÇÃO DE ZINCO.....	14
3 HIPÓTESES.....	16
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	16
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
7 CONCLUSÕES.....	28
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	28

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP - Adenosina trifosfato

CTC - Capacidade de troca catiônica

DYGS - Meio de cultura

FBN - Fixação Biológica de Nitrogênio

IS - Índice de solubilização

JNFB - Meio de cultura

Luz UV - Luz ultravioleta

mm - Milímetros

NFB - Meio de cultura

P - Fósforo

pH - potencial hidrogeniônico

RPCV - Rizobactérias promotoras do crescimento vegetal

Zn - Zinco

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Bactérias utilizadas no primeiro teste de solubilização para fósforo e zinco. 19

Tabela 2 - Bactérias utilizadas no segundo teste de solubilização para fósforo e zinco. 20

Tabela 3 - Diâmetro das colônias e dos halos formados no primeiro teste de solubilização de fósforo e seu índice de solubilização (IS). 22

Tabela 4 - Diâmetro das colônias e dos halos formados no segundo teste de solubilização de fósforo e seu índice de solubilização (IS). 23

Tabela 5 - Diâmetro das colônias e dos halos formados no primeiro teste de solubilização de zinco e seu índice de solubilização (IS). 24

Tabela 6 - Diâmetro das colônias e dos halos formados no segundo teste de solubilização de zinco e seu índice de solubilização (IS). 25

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Reação do Zn^{2+} na superfície da goetita. 15

Figura 2 - Isolados 7J4BII (A) e 2N2BIA (B). 21

Figura 3 - Isolado 2N4BIA (A). 22

Figura 4 - Isolados 7J4BII (A) 8J5AII (B), 2N4CI (C), 2N2AII (D), 3N2CI (E), 3N4AIB (F). 23

Figura 5 - Isolados 2N3BIA (A), 2N4BIB (B) e 3N2BI (C). 25

RESUMO

O fósforo é um elemento essencial para o desenvolvimento das plantas, sendo ele o segundo macronutriente mais limitante para o crescimento dessas, pois grande parte do fósforo presente no solo encontra-se em formas que não estão prontamente disponíveis para as plantas. Outro nutriente que possui limitações por conta de sua disponibilidade para a planta é o zinco, no qual sua escassez pode trazer grandes prejuízos, o que torna um desafio visto que apenas uma parte do zinco presente no solo está prontamente disponível para as plantas. Muitos microrganismos da rizosfera acabam por tornar esses nutrientes disponíveis para absorção por meio de suas atividades metabólicas. O presente trabalho teve como intuito identificar a capacidade de solubilização de fósforo e de zinco por bactérias de solo cultivado com milho. Utilizando 36 isolados de bactérias, foi testado a capacidade e potencial de solubilização destes isolados. Foi utilizado meios de cultura com fontes insolúveis de fósforo e zinco, avaliando a capacidade e o índice de solubilização desses isolados bacterianos in vitro, através da formação de um halo translúcido em volta das colônias dessas bactérias inoculadas nesses meios de cultura em placas de petri. Com os testes, foi possível confirmar a solubilização de fósforo e zinco por bactérias presentes em solo cultivado com milho, sendo identificado três isolados de bactérias que solubilizaram o fósforo e nove isolados que solubilizaram zinco.

Palavras-chave: solubilização de fosfatos; bactérias promotoras de crescimento das plantas; solubilização de óxido de zinco.

SUMMARY

Phosphorus is an essential element for plant development, being the second most limiting macronutrient for their growth, as a significant portion of phosphorus in the soil exists in forms that are not readily available to plants. Another nutrient that faces limitations due to its availability to the plant is zinc, the scarcity of which can cause significant damage. This poses a challenge, considering that only a fraction of the zinc present in the soil is readily available

to plants. Many microorganisms in the rhizosphere end up making these nutrients available for absorption through their metabolic activities. The present study aimed to identify the phosphorus and zinc solubilization capacity of bacteria in soil cultivated with corn. Using 36 bacterial isolates, the solubilization capacity and potential of these isolates were tested. Culture media with insoluble sources of phosphorus and zinc were used to evaluate the capacity and solubilization index of these bacterial isolates in vitro, by observing the formation of a translucent halo around the colonies of bacteria inoculated on these culture media in petri dishes. The tests confirmed the solubilization of phosphorus and zinc by bacteria present in soil cultivated with corn. Three bacterial isolates capable of solubilizing phosphorus and nine isolates capable of solubilizing zinc were identified.

Keywords: *phosphate solubilization; plant growth-promoting bacteria; zinc oxide solubilization.*

1 INTRODUÇÃO

O fósforo é um elemento essencial para o crescimento e desenvolvimento das plantas, estando presente em diversos componentes estruturais das células e em componentes metabólicos móveis que armazenam energia. Esse elemento tem como sua principal forma de absorção pelo sistema radicular da planta, sendo assim a disponibilidade deste no solo se torna fundamental (GATIBONI, 2003).

Sendo o segundo macronutriente mais limitante para o crescimento das plantas, o fósforo presente no solo encontra-se com cerca de 95-99 % na forma de fosfatos insolúveis, logo esse não podendo ser utilizados diretamente pelas plantas (PRADHAN & SUKLA, 2005). Sendo assim, diversos microrganismos desempenham um papel fundamental para essa absorção, principalmente na região da rizosfera, podendo atuar solubilizando essas formas indisponíveis de fosfato (MAHESWAR & SATHIYAVANI, 2012).

Outro elemento importante para as plantas é o zinco, sendo esse um micronutriente essencial. Sua escassez no solo pode acabar causando

distúrbios no metabolismo vegetal, podendo influenciar na produção de matéria seca e no índice foliar, assim comprometendo a produção agrícola (SOBRINHO et al., 1979). A quantidade total do zinco no solo irá representar a capacidade potencial do solo em fornecer este nutriente à planta sendo que essa quantidade disponível de zinco depende do material de origem desse solo e dos processos que atuaram na sua formação (ABREU, 2001). Do zinco presente no solo, apenas uma parte estará prontamente disponível para as plantas, sofrendo influência de vários fatores para sua disponibilidade, tais como: a porcentagem de matéria orgânica, a capacidade de troca catiônica (CTC), a porcentagem de fosfatos, referindo-se a quantidade de fosfato presente no solo, e as atividades dos microrganismos (SOBRINHO et al., 1979).

Esse micronutriente é considerado limitante na produção do milho no Brasil, comumente sendo verificada sua deficiência em todas as regiões do país. Os relatos de deficiência de zinco na produção de milho provém principalmente de regiões com solo Argiloso Vermelho Amarelo ou Latossolos que foram altamente intemperizados e ácidos da região dos cerrados (BÜLL, 1993). Em solos menos férteis, a aplicação de calcário se torna um indutor dessa carência. O zinco no solo é um micronutriente muito dependente do pH, podendo ocorrer sua deficiência nos estágios iniciais do desenvolvimento do milho também em razão do pH mais elevado no solo (RITCHEY et al., 1986).

O presente trabalho tem como objetivo verificar o potencial de solubilização de fósforo e de zinco por bactérias isoladas de um solo cultivado com milho sob diferentes sistemas de manejo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ASSOCIATIVAS

Os microrganismos presentes no solo realizam diversos processos de grande importância para a ciclagem de nutrientes no ambiente, sendo um desses a fixação biológica de nitrogênio atmosférico, no qual é realizada por microrganismos conhecidos como diazotróficos. (MOREIRA et al., 2010). Os diazotróficos podem ser associados às plantas, viver de forma livre ou até

realizar simbiose com espécies leguminosas. Os grupos de bactérias fixadoras de nitrogênio pode ser classificados em três tipos: os diazotrófos de vida livre, no qual irão fixar nitrogênio para uso próprio, os diazotrófos associativos, no qual esses vão contribuir para o crescimento da planta sem que haja a formação de estruturas diferenciadas, estabelecendo assim uma simbiose, por último há o grupo dos diazotrofos simbióticos, no qual qual estabelecem uma interação muito estreita entre macro e microsimbionte, podendo até em alguns casos formar estruturas diferenciadas, denominadas nódulos (EVANS & BURRIS, 1992).

O nitrogênio está presente na atmosfera em grande abundância, porém em uma forma extremamente estável a temperatura ambiente, os organismos do grupo dos eucariotos, os animais e as plantas, não conseguem se utilizar desse elemento diretamente. Entrando em ação uma porção de organismos procariotos, como nesse caso as bactérias, o qual conseguem converter ou reduzir enzimaticamente o nitrogênio da atmosfera em amônia, o qual pode ser incorporada e utilizada para a manutenção da vida das células. Sendo esses organismos os diazotróficos, responsáveis por essa incorporação de nitrogênio na biomassa, sendo essa atividade denominada fixação biológica de nitrogênio (FBN) (MARIN et al., 1999). A enzima nitrogenase, responsável pela redução do N_2 , é inativada quando submetida a presença de amônio, fazendo com que o processo de fixação biológica de nitrogênio seja regulado pela necessidade do ambiente e das espécies fixadoras (Rudnik et al., 1997).

Dentro desse grupo de microrganismos diazotróficos, encontram-se diversas bactérias, como as arqueobactérias, cianobactérias, bactérias gram-positivas e gram-negativas, representando uma grande diversidade. As bactérias diazotróficas que se associam de forma positiva com as plantas, as associativas, podem promover benefícios para as plantas de diversas maneiras além da FBN, como a produção de substâncias como o ácido acético, que vão auxiliar o crescimento das raízes (MOREIRA et al., 2010).

Sendo assim, essas bactérias também são conhecidas como rizobactérias promotoras do crescimento vegetal (RPCV), tendo esse importante papel em estimular o crescimento das plantas. Há também outras formas importantes de ação dessas bactérias para contribuir para o crescimento vegetal, como a solubilização de fosfatos inorgânicos, a síntese de

compostos que promovam o crescimento das raízes, como o ácido indol acético, a produção de fitormônios, como auxinas, giberelinas e citocininas, até compostos que apresentam efeitos antagônicos contra fitopatógenos, como sideróforos, (MOREIRA et al., 2010).

2.2 SOLUBILIZAÇÃO DE FÓSFORO

Um dos elementos essenciais para o desenvolvimento das plantas é o fósforo, estando presente em diversas moléculas, como ácidos nucleicos, fosfolípidios e ATP (KAPRI & TEWARI, 2010), participando também da regulação de vias metabólicas e controle de reações enzimáticas (SCHACHTMAN et. al., 1998).

O fósforo é o décimo elemento químico mais presente na crosta terrestre (SCHULZE, 1989), porém esse é o segundo elemento que mais limita a produtividade dos solos tropicais. Um dos motivos é que esse elemento possui alta estabilidade na fase sólida, formando compostos de alta energia de ligação com os colóides, como partículas de argila, óxidos de ferro, óxidos de alumínio e até mesmo matéria orgânica. Por esse ponto, mesmo com grandes quantidades desse elemento presente no solo, apenas parte dele estará com uma baixa energia de ligação, possibilitando assim sua dessorção e estando disponível para as plantas (GATIBONI, 2003).

De acordo com a natureza do composto que está se ligando ao fósforo, esse é dividido em dois grupos, o fósforo inorgânico e o fósforo orgânico. O fósforo inorgânico pode ser dividido em fósforo dos minerais primários ou estrutural e fósforo adsorvido. Esse pode ser encontrado ligado ao ferro, alumínio e cálcio, adsorvido a argilas silicatadas 1:1, adsorvido à matéria orgânica do solo, adsorvido a oxihidróxidos de ferro e alumínio, o que vai resultar em baixos teores de solução do solo. Já o fósforo orgânico pode constituir de 20 a 80% do total do solo e atua ativamente na disponibilidade de fósforo às plantas. Esse é originado dos resíduos vegetais que foram incrementados no solo, tecidos microbianos e produtos da sua decomposição (GATIBONI, 2003).

O fósforo inorgânico irá se constituir de fosfatos minerais insolúveis e ânions fosfatos adsorvidos a hidróxidos de ferro e alumínio, silicatos de

alumínio e carbonatos de cálcio. Já as formas de fósforo orgânico são encontradas como inositolis-fosfatos, fosfolipídios e ácidos nucleicos (MENDES; REIS JUNIOR, 2003).

Vários microrganismos irão atuar solubilizando e mineralizando o fósforo presente no solo, como as bactérias, fungos e actinomicetos. (PAUL & CLARCK, 1996). Atuando de diversas maneiras, como deslocando o equilíbrio de adsorção, resultando na transferência de íons fosfato para a solução do solo ou incrementando a mobilidade de formas orgânicas de P. Podem também estimular processos metabólicos que irão solubilizar e mineralizar o fósforo a partir de formas pouco disponíveis de fósforo orgânico e inorgânico, dentro desse processo estão incluídos a excreção de íons de hidrogênio, liberação de ácidos orgânicos, produção de sideróforos e enzimas fosfatases (MENDES; REIS JUNIOR, 2003).

Se tratando do fósforo inorgânico, os microrganismos que participam do processo de solubilização excretam ácidos orgânicos e seus prótons associados, que irão atuar dissolvendo diretamente o material fosfático ou quelando os cátions que acompanham o ânion fosfato. (KUCEY et al, 1989; RICHARDSON, 1994). Os ácidos que se destacam são os ácidos láctico, glicólico, cítrico, málico, oxálico, succínio e tartático (KUCEY et al, 1989). Já se tratando dos fosfatos em forma orgânica, esses precisam ser mineralizados para serem utilizados pelas plantas. Nesse caso, os microrganismos irão produzir enzimas, denominadas de fosfatases e fitases, que irão catalisar a hidrólise de ésteres e anidridos de H_3PO_4 . (SCHMIDT & LASKOWSKI, 1961).

As plantas também possuem mecanismos que vão influenciar na disponibilidade de P, como mudança do pH da rizosfera, liberação de ácidos orgânicos, agentes quelantes e fosfatases, até mesmo podendo ter modificações morfológicas da raízes, como raízes proteóides (MARSCHNER, 1995; HINSINGER, 2001; DAKORA & PHILIPS, 2002).

2.3 SOLUBILIZAÇÃO DE ZINCO

No solo, o zinco se encontra nos minerais e adsorvido nas superfícies e nos sítios de troca. Vários elementos irão influenciar a retenção do zinco no

solo, como a matéria orgânica presente, os óxidos de ferro, alumínio, manganês e os minerais de argila. Os óxidos de ferro e manganês adsorvem quantidades consideráveis de zinco, em uma reação específica (GADDE & LAITINEN, 1974). Kalbasi (1978) demonstrou o mecanismo para a adsorção do Zn^{2+} na superfície da goetita, no qual essa reação depende fortemente do pH, quando o pH diminui, o equilíbrio da reação é deslocado para a esquerda, logo essa adsorção do zinco também diminui.

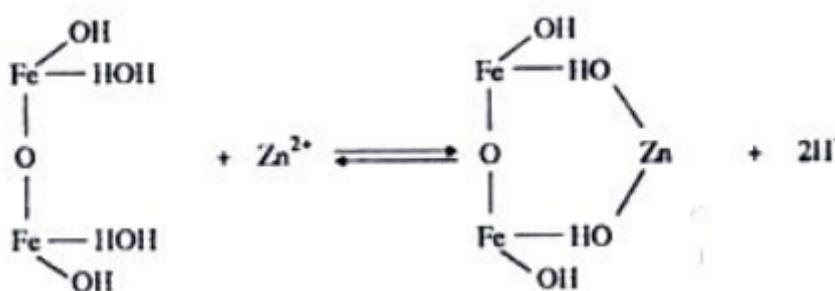


Figura 1. Reação do Zn^{2+} na superfície da goetita.

Fonte: Camargo (2006, p.16).

A adsorção do zinco em superfícies de óxidos tem grande influência da presença de íon fosfato no meio. A presença de fosfato aumenta a adsorção de zinco por óxidos de ferro e alumínio amorfos (STANTON & BURGUER, 1967,1970). A difusão acaba por ser o principal mecanismo responsável pelo transporte do zinco para a superfície das raízes das plantas, isto é, vai do lugar com maior disponibilidade para o lugar com menor disponibilidade. Sendo assim, o elemento se desloca do ponto de maior concentração para o ponto de menor concentração (OLIVER & BARBER, 1966).

Apenas uma pequena parte do zinco presente no solo encontra-se prontamente disponível para as plantas. Isso se deve a vários fatores, tais como reação com outros elementos, porcentagem de matéria orgânica, atividade de microrganismos, porcentagem de fosfatos e a capacidade de troca catiônica. A disponibilidade do zinco diminui a partir do aumento do pH acima de 6 (SOBRINHO et al., 1979).

Uma solução encontrada na literatura para essa baixa disponibilidade de zinco, são aplicações no solo de quelatos ou complexos, vistos como produtos mais eficientes que as fontes inorgânicas em condições de alto pH no solo

(HOLDEN & BROWN, 1965). A maior eficiência desses agentes quelantes se dá porque esses controlam as reações do íon metálico pelo bloqueio dos sítios de reação destes íons. Dessa maneira, o zinco na forma de quelatos não sofreria as reações de insolubilização do solo, proporcionando uma tese de correção mais eficiente desse nutriente no solo com doses menores (MORTVEDT, 2001).

3 HIPÓTESES

Hipótese: As bactérias isoladas a partir do solo cultivado com milho apresentam capacidade de solubilização de fosfato ou zinco.

4 OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo avaliar o potencial de bactérias que foram isoladas de um solo cultivado com milho em solubilizar fosfato e zinco *in vitro*.

5 MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi desenvolvido no Laboratório de Química do Solo, da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília. Inicialmente bactérias que foram previamente isoladas de raízes de milho para serem crescidas novamente em meio DYGS sólido (RODRIGUES NETO et al., 1986). Essas bactérias foram isoladas em dois meios de cultura seletivos para o isolamento de bactérias diazotróficas associativas, o meio JNFB e o meio NFB, sendo estas identificadas pelas letras J e N, respectivamente (DÖBEREINER; BALDANI, V.L.; BALDANI, J.I., 1995). Assim, foram obtidos 17 isolados bacterianos a partir do meio JNFB e 19 isolados bacterianos a partir do meio NFB.

Os números informam as áreas de milho de onde as amostras foram coletadas, a saber: 2 e 3 (áreas de milho sob manejo de agricultura familiar, apenas com adubação mineral de plantio); 7 e 8 (áreas de milho sob manejo de

produção convencional e adubação de plantio e cobertura com nitrogênio). Os números e letras que se seguem na denominação dos isolados, fazem referência a diluição da amostra e ao número de repicagens até a confirmação de isolamento da bactéria.

Para o preparo deste meio DYGS sólido foi utilizado 2 g L⁻¹ de glicose, 2 g L⁻¹ de ácido málico, 1,5 g L⁻¹ de peptona bacteriológica, 2 g L⁻¹ de extrato de levedura, 0,5 g L⁻¹ de fosfato de dipotássio (K₂HPO₄), 0,5 g L⁻¹ de sulfato de magnésio heptahidratado (MgSO₄.7H₂O), 1,5 g L⁻¹ de ácido glutâmico, após a adição desses produtos foi ajustado o pH desse meio com solução de KOH a 10%, para se adequar melhor de acordo com o meio que essas bactérias foram isolados e após esse ajuste foi adicionado 15g L⁻¹ de ágar, e água destilada para completar a medida. Para isolados em NFB o pH foi ajustado para 6,8, já para isolados em JNFB o pH foi ajustado para 6.

O meio foi esterilizado em autoclave, vertido em placas de Petri, que também foram autoclavadas previamente, dentro da câmara de fluxo. Essa que foi limpa com álcool 70% e exposta a sua luz UV durante 20 minutos, para evitar contaminações durante o preparo das placas. Após o preparo de todas as placas com o meio DYGS, as bactérias foram repassadas para essas placas com o auxílio de uma haste de metal. Após isso todas essas placas foram incubadas em uma câmara de crescimento, a 30 °C por 7 dias. Após esse período foram verificadas as placas que apresentavam sinais de crescimento bacteriano e essas foram utilizadas nos testes de solubilização de fosfato e de zinco.

As bactérias foram crescidas e avaliadas quanto ao potencial de solubilização de fósforo e de zinco, essas estão apresentadas separadas pelo seu meio de armazenamento, NFB e JNFB. Como foram realizados dois testes de solubilização em dois períodos distintos, as bactérias que foram utilizadas para cada teste de solubilização se diferem.

Foram realizados dois testes de solubilização de fósforo e dois testes para solubilização de zinco em períodos distintos. No primeiro teste de solubilização de zinco e no primeiro de fósforo foram utilizados 13 isolados mantidos em meio NFB: 2N2AII, 2N2BIA, 2N2BIIA1, 2N2BIIA2, 2N4CI, 2N5CI, 3N2BII, 3N2CI, 3N3AIB, 3N3CIA, 3N4AIA, 3N4AIA3 e 3N4AIB. Além desses, foram avaliados 11 isolados mantidos em meio JNFB: 2J2CI, 3J2AIA, 3J2AIB,

3J2BII, 3J3AI, 3J3AII, 3J3CII, 3J4AII, 7J4BII, 8J4BII e 8J5CII.

Após os primeiros testes de solubilização, foram realizadas novamente a passagem das bactérias isoladas em NFB e JNFB para o meio de cultura DYGS, para essas bactérias serem avaliadas novamente quanto ao potencial de solubilização de fósforo e de zinco. As que foram isoladas e mantidas em meio NFB, compreendendo 6 isolados, foram: 2N3BIA, 2N4BIA, 2N4BIB, 3N2BI, 3N2BII e 3N4AIB. Considerando aquelas que foram isoladas e mantidas em meio JNFB foram 6, a saber: 2J3CII, 3J2AIA, 3J2AIB, 3J3BII, 3J4AII e 8J5CII.

Para o teste de solubilização de fosfato, foi realizado o preparo do meio NBRIP sólido (NAUTIYAL, 1999). Para o preparo deste meio, foram utilizados soluções de glicose 10 g L^{-1} , de cloreto de magnésio ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 5 g L^{-1}), de sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $0,25 \text{ g L}^{-1}$), de cloreto de potássio (KCl, $0,2 \text{ g L}^{-1}$), de sulfato de amônio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $0,1 \text{ g L}^{-1}$), de ágar (15 g L^{-1}). Para a solidificação do meio e formação do precipitado, foram utilizados 100 ml de fosfato dipotásico (K_2HPO_4) a 10% em solução e 50 ml de cloreto de cálcio (CaCl_2) a 10% em solução, ao final da adição de todos os reagentes o meio foi completado com água destilada.

Para o teste de solubilização de zinco, foi preparado outro meio denominado de “meio de solubilização de óxido de zinco”. Para o preparo deste meio, foram utilizados 10 g L^{-1} de glicose, 1 g L^{-1} de sulfato de amônio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), $0,2 \text{ g L}^{-1}$ de cloreto de potássio (KCl), $0,1 \text{ g L}^{-1}$ de fosfato dipotásico (K_2HPO_4), $0,2 \text{ g L}^{-1}$ de sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 1 g L^{-1} de óxido de zinco (ZnO), 15 g L^{-1} de ágar e completado com água destilada.

Para ambos os meios o método de preparo e análise foram os mesmos. O meio foi esterilizado em autoclave, em seguida, vertido na câmara de fluxo, após limpeza da mesma com álcool 70% e exposição à luz UV por 20 minutos. O meio foi vertido em placas de petri e essas placas foram divididas em quatro áreas iguais, sendo três partes destinadas para serem repassadas às bactérias e uma para o controle. Com o auxílio de uma haste de ferro, os isolados foram inoculados no centro dessas três partes de cada placa. Após isso, as placas foram colocadas na câmara de crescimento a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ por 7 dias. Após esse período, foi verificado se essas placas apresentavam sinais de solubilização de fosfato ou zinco por meio da visualização de um halo transparente em volta das

colônias de bactérias no centro de cada parte das placas.

As bactérias que apresentaram solubilização do fósforo ou zinco, pela formação de um halo translúcido em volta de suas colônias no meio, tiveram o tamanho do halo e da colônia medidos com o auxílio de um paquímetro digital. Com esses valores, foi determinado o índice de solubilização (IS), determinado pela relação entre o diâmetro do halo (mm) com o diâmetro da colônia (mm) (BERRAQUERO et al., 1976).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os isolados empregados na primeira etapa apresentaram solubilização são apresentados na Tabela 1, enquanto os que apresentaram solubilização no segundo teste estão na Tabela 2.

Tabela 1 - Bactérias utilizadas no primeiro teste de solubilização para fósforo e zinco.

Bactérias	Solubilização de P	Solubilização de Zn
Meio NFB	-	-
2N2AII	-	+
2N2BIA	+	-
2N2BIIA1	-	-
2N2BIIA2	-	-
2N4CI	-	+
2N5CI	-	-
3N2BII	-	-
3N2CI	-	+
3N3AIB	-	-
3N3CIA	-	-
3N4AIA	-	-
3N4AIA3	-	-

3N4AIB	-	+
Meio JNFB		
2J2CI	-	-
3J2AIA	-	-
3J2AIB	-	-
3J2BII	-	-
3J3AI	-	-
3J3AII	-	-
3J3CII	-	-
3J4AII	-	-
7J4BII	+	+
8J4BII	-	-
8J5CII	-	+

Na segunda etapa dos testes de solubilização , as seguintes bactérias foram utilizadas e apresentaram solubilização (Tabela 2):

Tabela 2 - Bactérias utilizadas no segundo teste de solubilização para fósforo e zinco.

Bactérias	Solubilização de P	Solubilização de ZN
Meio NFB		
2N3BIA	-	+
2N4BIA	+	-
2N4BIB	-	+
3N2BI	-	+
3N2BII	-	-
3N4AIB	-	-
Meio JNFB		

2J3CII	-	-
3J2AIA	-	-
3J2AIB	-	-
3J3BII	-	-
3J4AII	-	-
8J5CII	-	-

No primeiro teste de solubilização de fósforo, foi verificado o aparecimento de halo para dois isolados de bactérias, 7J4BII e 2N2BIA (Tabela 1). Como as colônias apresentaram formato diverso do formato circular, para o cálculo do índice de solubilização foi considerado a média entre o maior e menor comprimento da colônia. As imagens das bactérias que formaram o halo in vitro estão apresentaram a seguir (Figura 1).

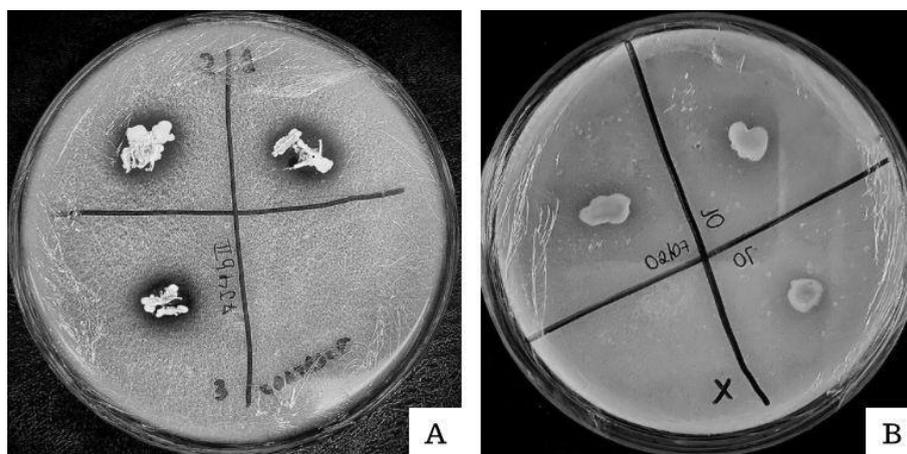


Figura 2. Isolados 7J4BII (A) e 2N2BIA (B).

Os tamanhos das colônias, dos halos formados e os índices de solubilização foram calculados e são apresentados na Tabela 3. O isolado 7J4BII apresentou índice de solubilização médio de 1,49, enquanto o isolado 2N2BIA apresentou índice de solubilização médio de 1,12.

Tabela 3 - Diâmetro das colônias e dos halos formados no teste de solubilização de fósforo e seu índice de solubilização (IS)

Bactéria	Tamanho da colônia (mm)	Tamanho do halo (mm)	Índice de Solubilização
7J4BII - 1	9,25	11,83	1,27
7J4BII - 2	9,29	14,04	1,51
7J4BII - 3	4,62	8,69	1,88
7J4BII média	7,73	11,52	1,49
2N2BIA - 1	5,31	6,39	1,20
2N2BIA - 2	7,13	7,71	1,08
2N2BIA - 3	7,4	8,15	1,10
2N2BIA média	6,61	7,41	1,12

Posteriormente, foi realizado novamente o teste para solubilização de fosfato com doze isolados de bactérias (Tabela 2), dessa vez obtendo o aparecimento de halo em apenas uma bactéria, a 2N3BIA (Figura 2). O índice de solubilização médio do isolado 2N4BIA foi de 1,5 (Tabela 4).

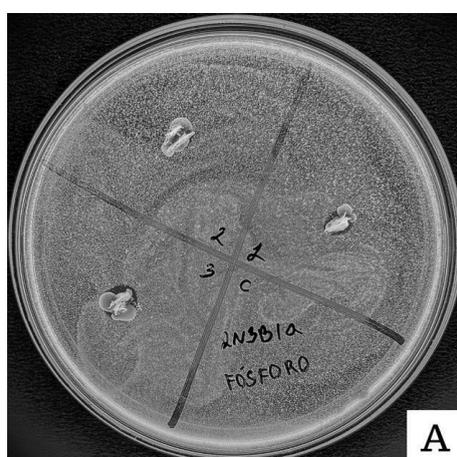


Figura 3. Isolado 2N4BIA (A).

Tabela 4 - Diâmetro das colônias e dos halos formados no segundo teste de solubilização de fósforo e seu índice de solubilização (IS).

Bactéria	Tamanho da colônia (mm)	Tamanho do halo (mm)	Índice de Solubilização
2N3BIA - 1	3,11	4,91	1,59
2N3BIA - 2	3,41	4,74	1,39
2N3BIA - 3	4,33	7,6	1,82
2N3BIA média	3,62	5,75	1,6

Após a realização do teste de solubilização de fosfato, foi realizado o teste para análise de solubilização do zinco. No primeiro teste, foi observado o aparecimento de halo em seis isolados 7J4BII, 8J5CII, 2N4CI, 2N2AII, 3N2CI, 3N4AIB (Tabela 1: Figura 3).

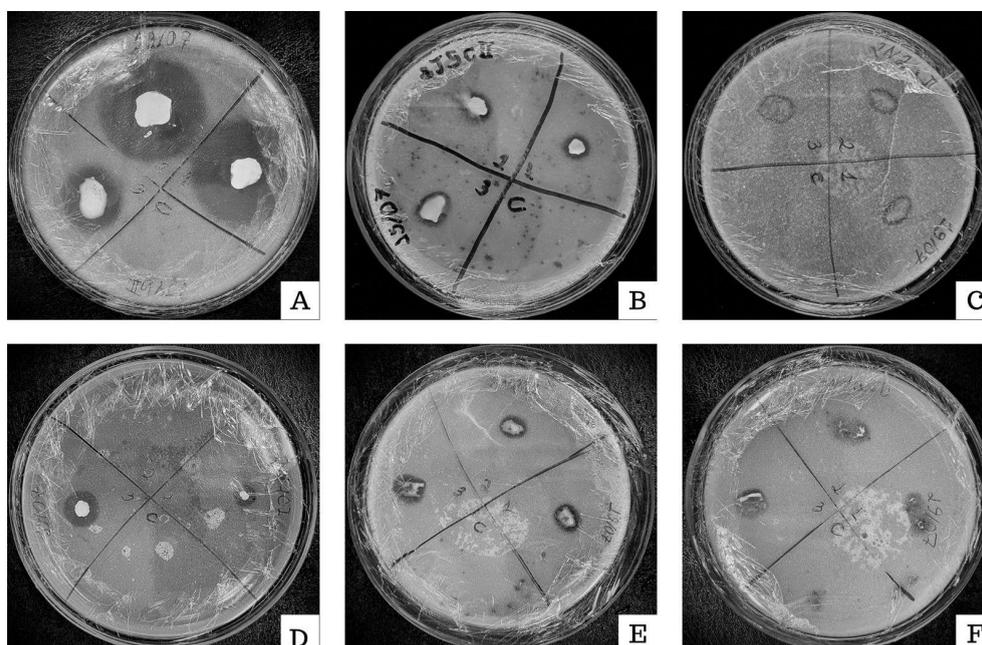


Figura 4. Isolados 7J4BII (A) 8J5CII (B), 2N4CI (C), 2N2AII (D), 3N2CI (E), 3N4AIB (F).

Os diâmetros das colônias, dos halos formados e os índices de solubilização estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Diâmetro das colônias e dos halos formados no teste de solubilização de zinco e seu índice de solubilização (IS)

Bactéria	Tamanho da colônia (mm)	Tamanho do halo (mm)	Índice de Solubilização (mm)
7J4BII - 1	10,16	26,07	2,57
7J4BII - 2	11,92	25,67	2,15
7J4BII - 3	10,68	17,84	1,67
7J4BII média	10,92	21,19	2,13
8J5CII - 1	4,90	6,62	1,35
8J5CII - 2	5,09	6,8	1,34
8J5CII - 3	6,74	7,59	1,13
8J5CII média	5,58	7,00	1,27
2N2AII - 1	6,18	8,81	1,43
2N2AII - 2	5,93	8,30	1,40
2N2AII - 3	8,69	10,68	1,23
2N2AII média	6,93	9,26	1,35
2N4CI - 1	2,62	6,48	2,47
2N4CI - 2	-	-	-
2N4CI - 3	5,26	11,50	2,19
2N4CI média	3,94	8,99	2,33
3N2CI - 1	5,34	7,57	1,42
3N2CI - 2	5,61	6,97	1,24

Bactéria	Tamanho da colônia (mm)	Tamanho do halo (mm)	Índice de Solubilização (mm)
3N2CI - 3	6,34	10,01	1,58
3N2CI média	5,76	8,18	1,41
3N4AIB - 1	6,92	9,25	1,34
3N4AIB - 2	6,3	9,71	1,54
3N4AIB - 3	8,05	9,79	1,22
3N4AIB média	7,09	9,58	1,37

Assim como para o fosfato, o teste para o zinco foi realizado outra vez, sendo avaliados doze isolados nesse teste, com formação de halo em 2N3BIA, 2N4BIB e 3N2BI (Tabela 2: Figura 4).

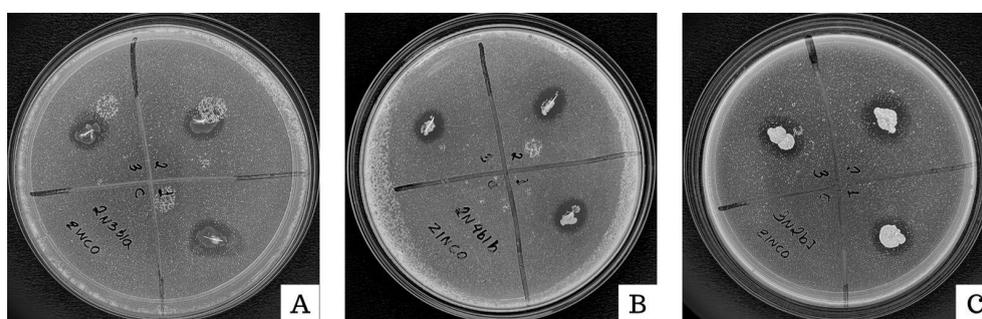


Figura 5. Isolados 2N3BIA (A), 2N4BIB (B) e 3N2BI (C).

O diâmetro das colônias, dos halos e os índices de solubilização estão na tabela seguinte (Tabela 6).

Tabela 6 - Diâmetro das colônias e dos halos formados no teste de solubilização de zinco e seu índice de solubilização (IS)

Bactéria	Tamanho da	Tamanho do	Índice de
----------	------------	------------	-----------

	colônia (mm)	halo (mm)	Solubilização (mm)
2N3BIA - 1	7,66	11,29	1,47
2N3BIA - 2	7,36	10,91	1,48
2N3BIA - 3	6,69	9,76	1,46
2N3BIA média	7,24	10,65	1,47
2N4BIB - 1	5,03	9,96	1,98
2N4BIB - 2	4,42	9,56	2,16
2N4BIB - 3	4,96	8,86	1,79
2N4BIB média	4,80	9,46	1,98
3N2BI - 1	7,64	11,24	1,47
3N2BI - 2	7,91	11,29	1,43
3N2BI - 3	6,69	9,76	1,46
3N2BI média	7,41	10,76	1,45

Os isolados bacterianos avaliados foram obtidos de áreas de milho sobre diferentes manejos de produção, como o manejo de produção convencional, com adubação mineral de plantio e cobertura (amostras 7 e 8) e sistema de produção agrícola familiar, apenas com adubação de plantio (2 e 3). A ocorrência de bactérias diazotróficas associativas é abundante em solos agrícolas, podendo ser influenciada pelos sistemas de manejo (PEDRINHO, 2009), afetando sua abundância e também suas habilidades na promoção do crescimento vegetal, como a solubilização de nutrientes, como o fósforo e o zinco. Neste trabalho foi realizada apenas uma avaliação qualitativa da habilidade dos isolados bacterianos em solubilizar in vitro os nutrientes fósforo e zinco. Os resultados aqui apresentados serão utilizados em avaliações subsequentes, a fim de avaliar a influência dos sistemas de manejo na

habilidade dos isolados em promover o crescimento vegetal.

Vários estudos utilizam metodologias que comparam o halo translúcido formado com o tamanho da colônia da bactéria para analisar a solubilização de fósforo e zinco in vitro. Rozo (2017) calculou o diâmetro do halo como sendo igual ao diâmetro total menos o diâmetro da colônia. Já para avaliar o potencial de solubilização, utilizou-se o índice de solubilização calculado como o diâmetro do halo dividido pelo diâmetro da colônia (MASSENSINI et al., 2016).

Segundo Rozo (2017), dos 29 isolados de bactérias obtidos em tomateiro, 12 apresentaram a capacidade para solubilizar fosfato de cálcio, cujo Índice de solubilização foi de 3 para 4 isolados e no valor de 2 para os outros 8 isolados, apresentando assim uma média de 2,33. Se comparado aos dados obtidos neste trabalho, apresentou índices superiores, pois as bactérias de solo cultivado com milho apresentaram uma média de 1,37 no índice de solubilização de fosfato. Já para a solubilização de zinco, os valores do índice não foram disponibilizados no trabalho de Rozo, não sendo possível a comparação.

Bezerra (2021) avaliou microrganismos bactérias isoladas de cana-de-açúcar e também calculou o grau de solubilização a partir da medida da colônia e do halo de solubilização formado, obtendo o índice de solubilização que foi calculado a partir do diâmetro da colônia com halo dividido pelo diâmetro da colônia sem halo (BHARUCHA; PATEL; TRIVEDI, 2013).

O índice de solubilização (IS) de fosfato pode ser classificado em níveis no qual considera como baixo o IS menor que 2, médio o IS entre 2 e 3 e alto o IS maior que 3 (MADHAIYAN et al, 2004). Nesse caso, foram utilizados isolados endofíticos da rizosfera e do solo. Dentre os isolados testados, nove se apresentaram como solubilizadoras, apresentando índices de solubilização que variaram entre 1,3 e 4,2, sendo classificado como IS baixo. Já entre os isolados da rizosfera, sete apresentaram solubilização de fosfato, com índices de solubilização entre 3 e 6,6, sendo classificado como médio e alto. Por fim, onze isolados de solo apresentaram solubilização de fosfato, com valores entre 1,1 e 5, tendo classificações de baixo, médio e alto.

Em trabalho sobre a atividade de bactérias diazotróficas e seu uso como biofertilizante em gramíneas do gênero *Brachiaria* (RIBEIRO, 2018), testou 222

isolados de bactérias obtidos de braquiária em testes de solubilização de fosfato inorgânico e de óxido de zinco. Avaliando a solubilização a partir da medição do halo no décimo segundo dia após a inoculação nos meios respectivos ricos em fosfato e zinco. Para efeito de comparação, o índice de solubilização foi calculado conforme descrito por Kumar e Narula (1999), no qual o valor é obtido dividindo o diâmetro total, que seria o diâmetro da colônia mais o diâmetro do halo formado, pelo diâmetro da colônia. Do total de isolados testados por Ribeiro (2018), 87 apresentaram capacidade de solubilizar fosfato inorgânico, cerca de 39,2% das estirpes testadas. O índice de solubilização desses isolados variou de 1,11 até 2,60, esses valores foram classificados como sendo baixo para IS abaixo de 2, médio para IS entre 2 e 3 e alto para IS acima de 3 (MADHAIYAN et al, 2004). Dos 39,2% de estirpes que apresentaram solubilização de fosfato, 8,05% apresentaram IS médio e o restante apresentaram nível baixo de solubilização (IS).

Já com relação aos isolados que apresentaram capacidade de solubilizar óxido de zinco, 21 das 222 estirpes apresentaram solubilização. Os isolados apresentaram índice de solubilização entre 1,27 e 5,13. De acordo com a classificação de Madhaiyan et al (2004), 9 isolados apresentaram IS baixo, 2 isolados apresentaram IS médio e 10 apresentaram IS alto.

A importância de pesquisas de prospecção de bactérias solubilizadoras de fosfato e zinco se expressa na produção e comercialização de bioinsumos, como o inoculante BiomaPhos® contendo bactérias de *Bacillus*, isolados de rizosfera de milho e atualmente recomendado no Brasil para aumentar a disponibilidade de fósforo em lavouras de milho (OLIVEIRA-PAIVA et al. 2021).

7 CONCLUSÕES

Três isolados apresentaram a formação de halo translúcido indicando solubilização para fosfato nos testes realizados para essa solubilização. Já para o zinco nove isolados de bactérias apresentaram a formação de halo translúcido indicando solubilização para esse elemento.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, C.A. **Disponibilidade e avaliação dos elementos catiônicos: zinco e cobre.** In: FERREIRA, M.E.; CRUZ, M.C.P da; RAIJ, B. v.; ABREU, C.A. Micronutrientes e elementos tóxicos na agricultura. Jaboticabal, CNPq; FAPESP; Potafos, 2001, p.124- 150.

BARUCHA, U. D.; PATEL, K. C.; TRIVEDI, U. B. **In vitro screening of isolates for its plant growth promoting activities from the rhizosphere of Alfafa (Medicago Sativa).** Journal of Microbiology and Biotechnology Research, v. 3, n. 5, 2013.

BERRAQUERO, F. R., Baya, A. M., Cormenzana, A. R. (1976) **Establecimiento de índices para el estudio de La solubilización de fosfatos por bacterias Del suelo.** Ars Pharmaceutica, 17:399-406.

BEZERRA, Gabrielle Alves. **Isolamento e seleção de microrganismos de cana-de-açúcar com potencial de promoção de crescimento vegetal.** 2021. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados) – Universidade Federal de São Carlos, Araras, 2021.

BÜLL, L.T. Nutrição mineral do milho. In: BÜLL, L. T.; CANTARELLA, H. **Cultura do milho: fatores que afetam a produtividade.** Piracicaba: POTAFOS, 1993. p.63-145.

CAMARGO de, Otávio Antonio. **Reações e interações de micronutrientes no solo.** Minas Gerais: InfoBibos, 2006.

DAKORA, F. D.; PHILIPS, D. A. **Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments.** Plant and Soil, The Hague, v. 245, p.35-47, 2002.

DÖBEREINER, Johanna; BALDANI, Vera Lúcia Divan; BALDANI, José Ivo.

Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Distrito Federal: Embrapa, 1995.

EVANS, H.J.; BURRIS, R.H. **Highlights in Biological Nitrogen Fixation during the last 50 years.** In: STACEY, G.; BURRIS, R.H.; EVANS, H.J eds. Biological Nitrogen Fixation. New York: Chapman and Hall, 1992, p.1-42.

GADDE, R.R. & LAITINEN, H.A. **Studies of heavy metal adsorption by hydrous iron and manganese oxides.** Analytical Chemistry, Washington, 46:2022-6, 1974.

GATIBONI, LUCIANO COLPO. **Disponibilidade de formas de fósforo do solo às plantas.** Rio Grande do Sul: Universidade Federal de Santa Maria, 2003.

HINSINGER, P. **Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review.** Plant and Soil, The Hague, v. 237, p. 173-195, 2001.

HOLDEN, E.R.; BROWN, J.R. **Influence of slowly soluble, soluble and chelated zinc on zinc content and yield of alfalfa.** Journal of Agriculture and Food Chemistry, Washington, v.13, p.180-184, 1965.

KALBASI, M.; RACZ, G.J.; LOEWEN-RUDGERS, L.A. **Mechanism of zinc adsorption by iron and aluminum oxides.** Soil Science, Baltimore, 125:146-50, 1978.

KAPRI, A. & TEWARI, L. 2010. **Phosphate solubilization potential and phosphatase activity of rizospheric Trichoderma spp.** Brazilian Journal of Microbiology, 41(3): 787-795.

KUCEY, R. M. N.; JANZEN, H. H.; LEGGET, M. E. **Microbially mediated increases in plant-available phosphorus.** Advances in Agronomy, New

York, v. 42, p. 199-228, 1989.

KUMAR, V.; NARULA, N. **Solubilization of inorganic phosphates and growth emergence of wheat as affected by Azotobacter chroococcum mutants.** Biol. Fert. Soils, v.28, n.3, p.301-305. 1999.

MADHAIYAN, M. et al. **Occurrence of Gluconacetobacter diazotrophicus in tropical and subtropical plants of Western Ghats, India.** Microbiological Research, v.159, p.233–243, 2004.

MAHESWAR, N.U. & SATHIYAVANI, G. 2012. **Solubilization of phosphate by Bacillus Sps, from groundnut rhizosphere (Arachishypogaea L).** Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, 4(8): 4007-4011.

MASSESSINI, André Marcos et al. **Isolamento e caracterização de bactérias solubilizadoras de fosfato da rizosfera de Eucalyptus sp.** Revista Árvore, v. 40, n. 1, p. 125-134, 2016.

MARIN, Victor Augustus et al. **Fixação biológica de nitrogênio: Bactérias fixadoras de nitrogênio de importância para a agricultura tropical.** Rio de Janeiro: Embrapa Agrobiologia, 1999.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants.** 2nd ed. London: Academic Press, 1995.

MENDES, Iêda de Carvalho; REIS JUNIOR, Fábio Bueno dos. **Microrganismos e disponibilidade de fósforo (p) nos solos: uma análise crítica.** Distrito Federal: Embrapa Cerrados, 2003.

MOREIRA, Fatima Maria de Souza Moreira et al. **Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações.** Piauí: Comunicata Scientiae, 2010.

MORTVEDT, J.J. **Tecnologia e produção de fertilizantes com**

micronutrientes. Presença de elementos tóxicos. In: FERREIRA, M. E.; CRUZ, M. C. P.; RAIJ, B. van; ABREU, C. A. (Eds). Micronutrientes e elementos tóxicos na agricultura. Jaboticabal, CNPq/FAPESP/POTAFOS, 2001. p.237-253.

OLIVEIRA-PAIVA, C. A. et al. **Inoculante à base de bactérias solubilizadoras de fosfato nas culturas do milho e da soja (BiomaPhos®): dúvidas frequentes e boas práticas de inoculação.** Minas Gerais: Embrapa, 2021.

OLIVER, S. & BARBER, S.A. **Mechanisms for the movement of Mn, Fe, B, Cu, Zn, Al and Sr from the soil to the surface of soybean roots.** Soil Science Society of America Proceedings, Madison, 30:468-70, 1966.

PAUL, E. A.; CLARK, F. E. **Soil microbiology and biochemistry.** San Diego: Academic Press, 1996. 340 p.

PEDRINHO, Eliamar Aparecida Nascimbém. **Isolamento e caracterização de bactérias promotoras de crescimento em milho (Zea mays).** 2009. x, 74 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2009.

PRADHAN, N. & SUKLA, L.B. 2005. **Solubilization of inorganic phosphates by fungi isolated from agriculture soil.** African Journal of Biotechnology, 5(10): 850-854.

RIBEIRO, Nathália Virgínia da Silva. **Estudo da atividade funcional de bactérias diazotróficas e o potencial de uso como biofertilizante em genótipos de Brachiaria.** 2018. 160 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica - RJ, 2018.

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.

RITCHEY, K.D.; COX, F.R.; GALRÃO, E.Z.; YOST, R.S. **Disponibilidade de zinco para as culturas do milho, sorgo e soja em Latossolo Vermelho-Escuro argiloso**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v.21, n.3, p. 215-225, 1986.

ROZO, Fernando Antonio Moreno. **Isolamento, caracterização e seleção de bactérias diazotróficas em tomateiro**. 2017. 71 f. Dissertação (Mestrado em Manejo e Conservação de Ecossistemas Naturais e Agrários) - Universidade Federal de Viçosa, Florestal. 2017.

Rudnik, P., Meletzus, D., Green, A., He, L. Kennedy, C. 1997. **Regulation of nitrogen fixation by ammonium in diazotrophic species of proteobacteria**. Soil Biology Biochemistry 29: 831-841.

STANTON, D.A. & BURGER, R.T. **Availability to plants of zinc sorbed by soil hydrous iron oxides**. Geoderma, Amsterdam, 1:13-7,1967.

STANTON, D.A. & BURGER, R.T. **Studies on zinc in selected Orange Free State soils**. V. Mechanisms for the reactions of zinc with iron and aluminum oxides. Agrochemophysics, Pretória, 2: 65-76, 1970.

SCHACHTMAN, D.P., REID, R.J. & AYLING, S.M. 1998. **Phosphorus uptake by plants: from soil to cell**. Plant Physiology, 116: 447-453.

SCHMIDT, G.; LASKOWSKI, M. Phosphate ester cleavage (survey). In: BOYER, P. D.; LARDY, H.; MYBARBACK, K. (Ed.). **The enzymes**. 2nd ed. New York: Academic Press, 1961. p. 3-35.

SCHULZE, D. G. An introduction to soil mineralogy. In: DIXON, J. B.; WEED, S. B. (Eds.) **Minerals in soil environments**. SSSA, Madison, 1989, p. 1-34.

SOBRINHO, Moacyr de Oliveira Camponéz do Brasil et al. **Zinco no solo e na planta.** s.l.: Revista de Agricultura, 1979.