

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
DEPARTAMENTO DE GRADUAÇÃO DO CURSO SUPERIOR DE  
TECNOLOGIA EM GESTÃO AMBIENTAL

VERA LÚCIA BORTOLOTTI

PRODUÇÃO DE SIDERÓFOROS E HORMÔNIO DE CRESCIMENTO  
VEGETAL DO TIPO ÁCIDO INDOLACÉTICO POR BACTÉRIAS  
DIAZOTRÓFICAS PROVENIENTES DE NÓDULOS DE *Mimosa spp.*  
EM SOLOS ULTRAMÁFICOS

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

MEDIANEIRA

2014

**VERA LÚCIA BORTOLOTTI**

**PRODUÇÃO DE SIDERÓFOROS E HORMÔNIO DE CRESCIMENTO  
VEGETAL DO TIPO ÁCIDO INDOLACÉTICO POR BACTÉRIAS  
DIAZOTRÓFICAS PROVENIENTES DE NÓDULOS DE *Mimosa* spp.  
EM SOLOS ULTRAMÁFICOS**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação, apresentado à disciplina de Trabalho de Diplomação, do Curso Superior de Tecnologia em Gestão Ambiental, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Medianeira, como requisito parcial para obtenção do título de Tecnólogo em Gestão Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Periotto  
Coorientador: Dr. Fábio Bueno dos Reis Junior

**MEDIANEIRA**

**2014**



## TERMO DE APROVAÇÃO

Produção de Sideróforos e Hormônio de Crescimento Vegetal do Tipo Ácido Indolacético por Bactérias Diazotróficas Provenientes de Nódulos de *Mimosa* spp. em Solos Ultramáficos

por

Vera Lúcia Bortolotti

Este Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) foi apresentado em 05 de junho de 2014 como requisito parcial para a obtenção do título de Tecnólogo em Gestão Ambiental, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná Campus Medianeira. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Fernando Periotto  
Prof. Orientador

Fábio Bueno dos Reis Junior  
Coorientador

Prof. Me. Ismael Laurindo Costa  
Junior

Profa. Me. Marcia Antonia Bartolomeu  
Agustini

Dedico este trabalho a meus queridos pais, pelo apoio incondicional em todos os momentos desta caminhada.

## **AGRADECIMENTOS**

Certamente estes parágrafos não irão atender a todas as pessoas que fizeram parte dessa importante fase de minha vida. Portanto, desde já peço desculpas àquelas que não estão presentes entre essas palavras, mas elas podem estar certas que fazem parte do meu pensamento e de minha gratidão.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Fernando Periotto, por ter aceitado meu convite mesmo sendo a distância e pela sabedoria com que me guiou nesta trajetória.

Ao Dr. Fábio Bueno dos Reis Junior pela orientação, paciência, estímulo apoio, amizade e, principalmente, pelo privilégio de fazer parte de sua equipe de pesquisa.

A todos os colegas do Laboratório de Microbiologia do Solo da EMBRAPA Cerrados.

Ao apoio do CNPq e da Mineradora Anglo American do Brasil para a realização desse estudo.

Gostaria de deixar registrado também, o meu reconhecimento à minha família, pois acredito que sem o apoio deles seria muito difícil vencer esse desafio.

Enfim, a todos os que por algum motivo contribuíram para a realização desta pesquisa.

Somente obedecendo, somente tendo o  
orgulho humilde, mas sagrado, de  
obedecer, é que se conquista então o  
direito de comandar. (Benito Mussolini)

## RESUMO

BORTOLOTTI, Vera Lúcia. **Produção de Sideróforos e Hormônio de Crescimento Vegetal do Tipo Ácido Indolacético por Bactérias Diazotróficas Provenientes de Nódulos de *Mimosa* spp. em Solos Ultramáficos.** 2014. 36 f. Trabalho de Conclusão de Curso - Curso Superior de Tecnologia em Gestão Ambiental, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Medianeira, 2014.

São características dos solos ultramáficos, o excesso de metais pesados e a baixa disponibilidade de nutrientes, o que resulta em forte desequilíbrio mineral, estimulando a ocorrência de espécies vegetais adaptadas a essas condições. A presença dessa flora está relacionada a uma associação estreita com a microbiota da rizosfera, o que contribui para a sua adaptabilidade. Um grupo importante dessa microbiota é constituído por bactérias diazotróficas. Plantas do gênero *Mimosa* figuram dentre as espécies vegetais predominantes em solos ultramáficos de Barro Alto (GO). Além da fixação biológica de nitrogênio, bactérias em simbiose com essas plantas podem promover o crescimento vegetal, por meio da produção de fitohormônios como o ácido indolacético (AIA). Adicionalmente, tais bactérias podem excretar sideróforos, moléculas orgânicas capazes de sequestrar o Fe, dentre outros metais, que podem alterar a disponibilidade de elementos tóxicos na rizosfera. Nesse contexto, a presente proposta objetivou avaliar a produção de AIA e sideróforos por 23 isolados de bactérias diazotróficas oriundos de nódulos de *Mimosa* spp. encontradas no maciço ultramáfico de Barro Alto (GO). Dentre os isolados avaliados, três (W5, W15 e W24) se destacaram, pois, foram capazes de produzir sideróforos e maior quantidade de AIA. Esses isolados seriam candidatos interessantes para testes de avaliação de promoção de crescimento de plantas, visando sua utilização em programas de recuperação de áreas degradadas pela atividade mineradora.

**Palavras-chave:** Promoção de crescimento vegetal. Metais pesados. Níquel (Ni). Fixação biológica de nitrogênio.

## ABSTRACT

BORTOLOTTI, Vera Lúcia. **Production of Siderophores and Plant Growth Hormone Type Indoleacetic Acid by Diazotrophic Bacteria come from Nodules of *Mimosa* spp. in Ultramafic Soils.** 2014. 36s. Trabalho de Conclusão de Curso - Curso Superior de Tecnologia em Gestão Ambiental, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Medianeira, 2014.

Metals excess and the low availability of nutrients are characteristic of ultramafic soils. It's results in strong mineral imbalance and stimulates the occurrence of plant species adapted to these conditions. The presence of this flora is related to a close association with the rhizosphere microorganisms which contributes to its adaptability. An important group of endogenous microbiota consists of diazotrophs. Plants from the genus *Mimosa* are listed among the predominant species in ultramafic soils from Barro Alto (GO). Besides the biological nitrogen fixation, bacteria symbiotically associated with these plants can promote plant growth through the production of phytohormones such as indole acetic acid (IAA). Additionally, these bacteria may excrete siderophores, organic molecules capable of sequestering Fe, among other metals, which may alter the availability of toxic elements in the rhizosphere. In this context, this proposal aims to evaluate the production of IAA and siderophores by diazotrophic bacteria isolated from nodules of *Mimosa* spp. found in the ultramafic massif of Barro Alto (GO). Among the evaluated isolates, three (W5, W15 and W24) stood out because they were able to produce siderophores and greater amounts of AIA. These isolates would be interesting candidates for evaluation tests of plant growth promotion aiming their use in recovery programs for areas degraded by mining activity.

**Keywords:** Plant growth promotion. Heavy metals. Nickel (Ni). Biological nitrogen fixation.

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b> - Área em processo de exploração de Ni. da Mineradora Anglo American do Brasil em Barro Alto, (GO).....	15
<b>FIGURA 2</b> - <i>Mimosa somnias</i> .....	17
<b>FIGURA 3</b> - <i>Mimosa claussenni</i> .....	17
<b>FIGURA 4</b> - Nodulação apresentada pela especie <i>M. claussenni</i> e <i>M. somians</i> .....	18
<b>FIGURA 5</b> - (A) Teste de produção de sideróforos para isolados W21 (positivo) e (B) W8 (negativo). Após 72 horas de incubação a 28° C, o surgimento de halos ao redor dos poços indica produção de Sideróforos .....	29
<b>FIGURA 6</b> - Halo de produção (cm) dos nove isolados testados capazes de produzir sideróforos. Média de três repetições. Barra de erros = desvio padrão .....	27

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1</b> - Origem dos isolados de nódulos de <i>Mimosa</i> spp. oriundos de solo ultramáficos de Barro Alto (GO) utilizados nesse trabalho.....	21
<b>TABELA 2</b> - Produção de AIA por 23 isolados de nódulos de <i>Mimosa</i> spp. oriundos de solos ultramáficos de Barro Alto (GO) .....	24
<b>TABELA 3</b> - Produção de sideróforos por 23 isolados de nódulos de <i>Mimosa</i> spp. oriundos de solos ultramáficos de Barro Alto (GO) .....	26

## LISTA DE SIGLAS

AIA	Ácido Indolacético
Al	Alumínio
°C	Graus Celsius
Ca	Cálcio
CAS	Chromeazurol Agar Assay
cm	Centímetro
Co	Cobalto
Cr	Cromo
Cu	Cobre
D.O.	Densidade óptica
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FBN	Fixação biológica de nitrogênio
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	Cloreto de ferro hexaidratado
Fe	Ferro
GO	Goiás
HClO <sub>4</sub>	Ácido perclórico
h	Hora
K	Potássio
M	Molar
Mg	Magnésio
mL	Milílitro
min	Minuto
mM	Milimolar
Mn	Manganês
N	Nitrogênio
Ni	Níquel
nm	Nanômetro
N <sub>2</sub>	Nitrogênio atmosférico
P	Fósforo
PGPRs	Rizobactérias Promotoras de Crescimento (Plant Growth Promoting Rhizobacteria)
rpm	Rotação por minuto
TSB	Caldo de triptona de soja
µm	Micrometro
µg	Micrograma
µL	Microlitro

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
<b>2 OBJETIVO</b> .....	<b>13</b>
<b>3 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>14</b>
<b>4 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>15</b>
4.1 SOLOS ULTRAMÁFICO .....	15
4.2 PLANTAS NATIVAS DO GENERO <i>MIMOSA</i> (LEGUMINOSAE- MIMOSOIDEAE) .....	16
4.3 BACTÉRIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO ATMOSFERICO.....	18
4.4 A IMPORTANCIA DO ÁCIDO INDOLACÉTICO PARA OS VEGETAIS.....	19
4.5 SIDERÓFOROS.....	19
<b>5 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>21</b>
5.1 PRODUÇÃO DE ÁCIDO INDOLACÉTICO.....	22
5.2 PRODUÇÃO DE SIDERÓFOROS .....	22
<b>6 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>24</b>
6.1 PRODUÇÃO DE HORMÔNIO DE CRESCIMENTO VEGETAL DO TIPO ÁCIDO INDOLACÉTICO .....	24
6.2 PRODUÇÃO DE SIDERÓFOROS .....	25
<b>7 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>29</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>30</b>
<b>ANEXO A</b> Reagentes utilizados para o preparo do meio de cultura 79 (Modificado)	34
<b>ANEXO B</b> Meio de cultura CAS para detectar a produção de Sideróforos .....	35

## 1 INTRODUÇÃO

As características dos solos ultramáficos levam à ocorrência de uma gama de espécies vegetais adaptadas a condições extremas e à presença de mecanismos fisiológicos distintos. A presença dessa flora característica certamente está relacionada a uma associação estreita com os micro-organismos do solo e da rizosfera, o que deve contribuir para o condicionamento de suas características adaptativas. Um grupo particularmente importante desta microbiota e especificamente relacionado ao ciclo do nitrogênio é aquele constituído pelas bactérias diazotróficas (fixadoras do nitrogênio atmosférico). Esses organismos fazem parte do grupo das rizobactérias, um dos mais estudados e com grande potencial para utilização na agricultura e em projetos de recuperação ambiental, representando uma gama diversa de bactérias que coloniza as raízes (ZAGO et al., 2000).

Essas bactérias rizosféricas podem influenciar no crescimento de plantas por contribuírem com a produção de fitohormônios como as auxinas. A principal auxina, o ácido indolacético (AIA), tem aplicação prática como promotora de crescimento vegetal (CHAGAS Jr et al., 2007). Além disso, essas bactérias também podem produzir moléculas orgânicas extracelulares de baixo peso molecular, conhecidas como sideróforos. Essas moléculas secretadas por micro-organismos, embora sejam quelantes específicos de íons férricos, também podem se ligar a outros metais, como os metais pesados divalentes e actinídeos, formando um composto metal-sideróforo de estabilidade constante (ANUPA et al., 2007). Esses compostos podem reduzir a disponibilidade desses metais na rizosfera, diminuindo sua toxicidade para as plantas e os próprios micro-organismos (TANK & SARAF, 2009).

## 2 OBJETIVO

Avaliar a capacidade de produção de AIA e sideróforos por bactérias diazotróficas isoladas de nódulos de duas espécies de *Mimosa* coletadas em áreas de solos ultramáficos localizadas no município de Barro Alto Goiás (GO).

### 3 JUSTIFICATIVA

Diversos projetos estão sendo desenvolvidos pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) Cerrados e por seus parceiros, com foco em plantas do gênero *Mimosa*, as quais são identificadas como pioneiras, com alta rusticidade, boa produção de biomassa e tolerante a altas concentrações de Ni, figurando entre as espécies predominantes nos solos ultramáficos de Barro Alto – GO (ANDRADE, 2011).

Estudos sobre a ocorrência e caracterização de bactérias diazotróficas em simbiose com essas leguminosas, nativas desse ambiente, podem ser, portanto, parte fundamental para o delineamento de metas e estratégias de programas que busquem a conservação ambiental e recuperação de áreas degradadas, a exemplo do que já vem sendo realizado em áreas da floresta amazônica e da mata atlântica.

Para as condições de Cerrado, notadamente em áreas de mineração, praticamente não existem trabalhos nessa linha. Espera-se que os resultados desse trabalho auxiliem no avanço do conhecimento da simbiose entre bactérias diazotróficas e leguminosas presentes nesses solos com altas concentrações de metais, assim como, forneçam subsídios para programas de recuperação de áreas impactadas pela mineração.

## 4 REVISÃO DE LITERATURA

### 4.1 SOLOS ULTAMÁFICOS

Os solos formados sobre maciços ultramáficos são caracterizados, geralmente, por apresentarem teores excessivos de metais (Ni, Cr, Mn, Co), excesso de Mg em relação ao Ca, forte desequilíbrio mineral, e baixo nível de nutrientes N, P, K, Ca, etc.) (REEVES et al., 2007). Por estar em uma região caracterizada por solos derivados de rochas ultramáficas, o município de Barro Alto, em Goiás, possui uma das maiores reservas mundiais de Ni, metal altamente demandado na produção de aço inoxidável (ANGLO AMERICAN BRASIL, 2004). Embora a atividade mineradora tenha elevada importância socioeconômica, os impactos ambientais decorrentes da exploração são intensos e se revelam na supressão da vegetação da área explorada, na degradação do solo, na deposição de diversos rejeitos e na consequente contaminação dos solos e corpos d'água adjacentes (BRADSHAW, 1997). Uma forma de minimizar os impactos ambientais decorrentes da exploração mineral seria a utilização de técnicas de recuperação de áreas degradadas. Na Figura 1 é apresentada a área em processo de exploração de Ni, onde foi realizado esse estudo.



**Figura 1:** Área em processo de exploração de Ni da Mineradora Anglo American do Brasil em Barro Alto, (GO).

**Fonte:** Fábio Bueno dos Reis Junior. Projeto CNPq (2012)

Os programas de recuperação devem apoiar-se, preferencialmente, nos trabalhos de botânica e de ecologia vegetal para propor estratégias de revegetação, assim como, em conhecimentos ligados a biodisponibilidade dos metais e a adaptação dos seres vivos. Utilizar espécies vegetais nativas na recuperação de áreas impactadas pela mineração de Ni parece ser uma estratégia adequada, uma vez que os níveis de metais pesados no solo, notadamente o Ni, afetam o desenvolvimento de espécies não adaptadas a tal ambiente (REEVES et al., 2007).

#### 4.2 PLANTAS NATIVAS DO GENERO *MIMOSA* (LEGUMINOSAE-MIMOSOIDEAE)

O gênero *Mimosa* é amplo e complexo, englobando aproximadamente 500 espécies, a maioria encontrada nas Américas (Dos SANTOS et al. 2008) Para o Brasil, estima-se cerca de 340 espécies, das quais 189 são referidas para o Cerrado por SIMON & PROENÇA (2000).

A presença dessa flora característica certamente está relacionada a uma associação estreita com os micro-organismos do solo e da rizosfera, o que deve contribuir para o condicionamento das características adaptativas. Plantas do gênero *Mimosa spp.* são encontradas em espaços de mineração de Ni. Nesse trabalho de pesquisa foram utilizados isolados oriundos de nódulos de duas espécies de *Mimosa* de ocorrência abundante nas áreas de solos ultramáficos estudadas, *Mimosa somnians* (Figura 2) e *Mimosa Claussenii* (Figura 3).



**Figura 2:** *Mimosa somnias*.

**Fonte:** Fábio Bueno dos Reis Junior. Projeto CNPq (2012)



**Figura 3:** *Mimosa Claussenii*.

**Fonte:** Fábio Bueno dos Reis Junior. Projeto CNPq (2012)

A espécie *Mimosa somnias*, apresenta uma característica de planta rasteira (herbácea) e a espécie *Mimosa claussenii* e um arbusto. Algumas características são peculiares a essas espécies, tais como, o formato das folhas e especialmente, das flores, conhecidas como flor pom-pom, característica destas espécies encontradas no Bioma Cerrado. Na Figura 4 é apresentada outra característica importante dessas espécies, a nodulação por bactérias diazotróficas apresentada

por esta espécie.



**Figura 4:** Nodulação apresentada pela espécie *M. claussenni* e *M. somians*.  
**Fonte:** Fábio Bueno dos Reis Junior. Projeto CNPq (2012)

#### 4.3 BACTÉRIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO ATMOSFÉRICO

Um grupo particularmente importante da microbiota e especificamente relacionado ao ciclo do nitrogênio é aquele constituído pelas bactérias fixadoras do nitrogênio atmosférico (bactérias diazotróficas). A fixação biológica de nitrogênio (FBN), aliada a outros processos mediados por micro-organismos, pode ser fundamental para o sucesso do desenvolvimento vegetal principalmente em ambientes extremos.

O N é o nutriente mineral requerido em maior quantidade pelas plantas. Sua disponibilidade é um fator importante que limita o crescimento tanto em ambientes naturais, como ambientes agrícolas (KRAISER et al., 2011). É constituinte obrigatório de aminoácidos, proteínas e ácidos nucleicos, participando direta e indiretamente de diversos processos bioquímicos das plantas (FAGERIA et al., 2003). Portanto, as bactérias diazotróficas, que são aquelas que conseguem transformar o nitrogênio atmosférico ( $N_2$ ) em uma forma assimilável pelas plantas, podem ser muito importantes para a nutrição e o crescimento vegetal.

#### 4.4 A IMPORTANCIA DO ÁCIDO INDOLACÉTICO PARA OS VEGETAIS

Além da FBN, os micro-organismos podem apresentar uma vasta gama de processos que podem trazer benefícios para os vegetais a eles associados. Os hormônios de crescimento vegetal, como as auxinas, são um bom exemplo. Entre as auxinas, o AIA é o mais estudado e é o mais produzido pelas bactérias (RADWAN et al., 2005), tendo aplicação prática como promotora de crescimento vegetal (CHAGAS Jr. et al., 2007; PATTEN & GLICK, 1996; MARCHIORO, 2005). Essa substância afeta a morfologia das raízes, aumentando o comprimento e o número de pelos radiculares (BARBIERI et al., 1986).

#### 4.5 SIDERÓFOROS

Muitos micro-organismos dispõem de um complexo sistema para obtenção de alguns nutrientes que a eles são necessários, entre eles o Fe. Isso se deve à disponibilidade do mesmo no solo, ou seja, o Fe pode se encontrar em grande quantidade no solo, mas na forma ferrosa indisponível aos micro-organismos, denominada  $Fe^{3+}$ . Para estar disponível o Fe deve estar na forma  $Fe^{2+}$  e muitos micro-organismos desenvolveram mecanismos de quelar o  $Fe^{3+}$ , por meio da produção de sideróforos. Os sideróforos funcionam como quelatos e parecem entrar na célula junto com o metal sem que ele precise ser reduzido (SANTOS, 2004). Sideróforos são ligantes específicos (quelantes) de  $Fe^{3+}$  produzidos em condições de deficiência deste íon por fungos e bactérias, com a função de incorporar este mineral no metabolismo celular (SILVA & OLIVEIRA, 2011).

Embora sejam quelantes específicos de íons férricos, também é demonstrado que os sideróforos podem se ligar a outros metais, como os metais pesados divalentes e actinídeos, formando um composto metal-sideróforo de estabilidade constante (ANUPA et al., 2007). Com isso, a disponibilidade desses metais pode ser reduzida na rizosfera, diminuindo sua toxicidade para as plantas e os próprios micro-organismos (TANK & SARAF, 2009).

Por outro lado, a produção de sideróforos nesse ambiente também pode ser extremamente importante para a nutrição desses organismos, pois, na maioria dos solos ricos em metais pesados, há deficiência de formas biodisponíveis de Fe

(DENTON, 2007). Nessa situação os sideróforos iriam atuar como sequestradores de Fe e disponibiliza-lo para micro-organismos e plantas a eles associados. Portanto, os sideróforos produzidos por Rizobactérias Promotoras de Crescimento (PGPRs) podem reduzir a toxidez de metais pesados por meio da diminuição de sua biodisponibilidade ou incrementar a disponibilidade de metais não tóxicos importantes para a nutrição dos organismos, como o Fe (TANK & SARAF, 2009).

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos foram realizados no Laboratório de Microbiologia do Solo da Embrapa Cerrados, em Planaltina (DF).

Foram avaliados 23 isolados de bactérias (*Burkholderia* spp.) a partir de nódulos de *Mimosa somnians* e *Mimosa clausenii*, provenientes de solo saprolítico e laterítico, com maior e menor biodisponibilidade de Ni, respectivamente. Uma área de cerrado nativo, sob solo não ultramáfico, foi utilizada como um referencial.

Esses isolados foram cedidos pelo banco de germoplasma do Laboratório de Microbiologia do Solo da Embrapa Cerrados.

A origem de cada um dos isolados utilizados nesse estudo é apresentada na Tabela 1.

**Tabela 1:** Origem dos isolados de nódulos de *Mimosa* spp. oriundos de solos ultramáficos de Barro Alto (GO) utilizados nesse trabalho.

Isolados	Espécie de <i>Mimosa</i>	Solo
W1	<i>M. somnians</i>	Latossolo não ultramáfico
W2	<i>M. somnians</i>	Latossolo não ultramáfico
W3	<i>M. somnians</i>	Latossolo não ultramáfico
W5	<i>M. clausenii</i>	Latossolo não ultramáfico
W6	<i>M. clausenii</i>	Latossolo não ultramáfico
W7	<i>M. clausenii</i>	Latossolo não ultramáfico
W8	<i>M. clausenii</i>	Latossolo não ultramáfico
W9	<i>M. clausenii</i>	Latossolo não ultramáfico
W10	<i>M. clausenii</i>	Latossolo não ultramáfico
W11	<i>M. clausenii</i>	Latossolo não ultramáfico
W13	<i>M. clausenii</i>	Latossolo não ultramáfico
W14	<i>M. somnians</i>	Saprolítico
W15	<i>M. somnians</i>	Saprolítico
W16	<i>M. somnians</i>	Saprolítico
W17	<i>M. somnians</i>	Saprolítico
W18	<i>M. somnians</i>	Saprolítico
W20	<i>M. somnians</i>	Saprolítico
W21	<i>M. somnians</i>	Saprolítico
W22	<i>M. clausenii</i>	Laterítico
W23	<i>M. clausenii</i>	Laterítico
W24	<i>M. clausenii</i>	Laterítico
W25	<i>M. clausenii</i>	Laterítico
W26	<i>M. somnians</i>	Saprolítico

## 5.1 PRODUÇÃO DE ÁCIDO INDOLACÉTICO

A capacidade de produção de AIA pelos isolados bacterianos foi estimada utilizando a metodologia colorimétrica descrita por SARWAR & KREMER (1995) com modificações descritas por REIS JUNIOR et al. (2004). As culturas puras de bactérias foram inoculadas e cultivadas por 24 h a 30 °C em meio 79 sem indicador (Anexo A) (VINCENT, 1970). Após o crescimento, foi medida a D.O. e ajustada para 0,5 à 500 nm. Da suspensão resultante foram adicionados 2,0 mL em 28 mL de meio de crescimento, o mesmo 79, acrescido de 100 µg mL<sup>-1</sup> de triptofano filtrado em millipore (0,2 µm), dispostos em erlenmeyers de 50 mL. Os erlenmeyers foram incubados no escuro por 72 h a 30 °C. Após este período, alíquotas de 1,0 mL foram retiradas e colocadas em tubos eppendorf estéreis de 1,5 mL (volume) e centrifugadas a 10.000 rpm por 15 min. Uma alíquota de 150 µL do material centrifugado foi aplicada em placas de poliestireno (capacidade para 300 µL) devendo reagir com 100 µL do reagente de Salkowisk (1,0 mL (FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O) 0,5 M em 50 mL de HClO<sub>4</sub> a 35%) previamente preparado. Após incubação, no escuro, à temperatura ambiente, por 30 min, foi observada a formação de uma cor rósea e as leituras de absorbância foram realizadas utilizando um espectrofotômetro *Labsystem Multiskan Plus* (*Labsystems Oy*, Helsinki, Finlândia) dotado de um filtro de interferência de 492 nm. Os dados foram armazenados e processados pelo programa *Labsystems Transmit Multiskan Plus for Windows*. A concentração de AIA foi estimada com uma curva-padrão previamente preparada com quantidades conhecidas de autêntico AIA (0; 25; 50; 100; 200; 500, 1000 mM).

## 5.2 PRODUÇÃO DE SIDERÓFOROS

A produção de sideróforos foi verificada por meio da utilização de placas de Petri contendo o meio *Chromeazurool Agar Assay* (CAS) (Anexo B) de acordo com o método universal de determinação descrito por Schwyn & Neilands (1987). Para isso, os isolados foram inoculados em tubos de ensaio contendo o meio Caldo Tripton de Soja (TSB) diluído 1/5 (6 g em 1000 ml de água destilada) seguido de incubação a 28°C durante 5 dias. Posteriormente, foram recolhidos 1 mL desse cultivo que foi centrifugado por 15 min a 10.000 rpm. Em seguida o sobrenadante foi

retirado e 250  $\mu$ L foram inoculados em poços feitos nas placas de Petri contendo o meio CAS. As placas foram tapadas com papel alumínio e incubadas por 72 h a 28°C. Posteriormente, ao redor dos poços, foi observada a presença de halos de cor laranja, que indicam a produção de sideróforos. Por fim, os diâmetros dos halos, quando presentes foram medidos.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 PRODUÇÃO DE HORMÔNIO DE CRESCIMENTO VEGETAL DO TIPO ÁCIDO INDOLACÉTICO

Todos os 23 isolados testados foram capazes de produzir AIA. A quantidade de AIA produzida variou de 41  $\mu\text{M}$  a 309  $\mu\text{M}$  (Tabela 2).

**Tabela 2:** Produção de AIA por 23 isolados de nódulos de *Mimosa spp.* oriundos de solos ultramáficos de Barro Alto (GO).

Isolados	Produção de AIA ( $\mu\text{M}$ )
W1	52
W2	45
W3	60
W5	284
W6	73
W7	257
W8	83
W9	87
W10	48
W11	55
W13	38
W14	50
W15	298
W16	62
W17	45
W18	68
W20	47
W21	41
W22	41
W23	240
W24	309
W25	46
W26	56

Dentre esses isolados considera-se que 8 apresentaram baixa produção de AIA ( $< 50 \mu\text{M}$ ), 10 apresentaram produção moderada ( $51 - 100 \mu\text{M}$ ) e 5 produziram alta quantidade ( $> 100 \mu\text{M}$ ) desse hormônio de crescimento vegetal. O AIA afeta a morfologia das raízes, aumentando o comprimento e o número de pelos radiculares (BARBIERI et al., 1986), o que pode aumentar a eficiência das plantas em absorver água e nutrientes. Nenhuma correlação foi encontrada com a origem dos isolados e

a produção de AIA.

RADWAN (1999), também mostrou grande variabilidade entre cepas quanto a produção de AIA, porém, trabalhando com *Azospirillum*. Esse autor observou que a produção de AIA de seus isolados variou de 19 a 432  $\mu\text{M}$ . REIS JUNIOR et al. (2004) menciona que, em testes realizados com *A. amazonense* associados a *Brachiaria* spp., a quantidade de AIA produzida variou de 35 a 110  $\mu\text{M}$ . COATTI et al. (2010) também descrevem, em pesquisa realizada com várias espécies de arroz e estirpes de *Azospirillum*, uma variabilidade entre cepas de 20 a 301  $\mu\text{M}$  na produção de AIA. Analisando resultados encontrados na literatura, a variabilidade na produção de AIA entre bactérias diazotróficas, entre diferentes cepas, pode ser considerada normal.

Os trabalhos citados acima foram realizados com *Azospirillum* spp., que estão entre as bactérias promotoras de crescimento de plantas mais estudadas. Porém, existem diversas informações de que espécies de *Burkholderia* também são capazes de produzir este importante hormônio para o desenvolvimento vegetal. Segundo SABINO et al. (2012), em testes realizados em plantas de arroz, em ambiente estéril, foi observada a produção de AIA pela estirpe M130 de *Burkholderia*. BATISTA (2012) também cita testes realizados com linhagens de *Burkholderia*, isoladas de guaranazeiro e testadas em cultivo de milho, sob condições controladas, onde foi observada produção de AIA. MARCHIORO (2005) comenta que isolados de *Burkholderia* spp., capazes de produzir AIA, foram encontrados em cultivares de abacaxizeiro e bananeiras. OLIVEIRA (2009) menciona que bactérias do gênero *Burkholderia*, que são encontradas em cultivares de cana-de-açúcar, cultivadas sob sistemas convencional e orgânico, são capazes de produzir AIA. MARCONDES et al. (2010) descrevem testes realizados com amendoim (*Arachis hypogaea* L.), inoculado com *Burkholderia* sp. Esses autores mencionam resultados interessantes quanto a FBN e produção de AIA.

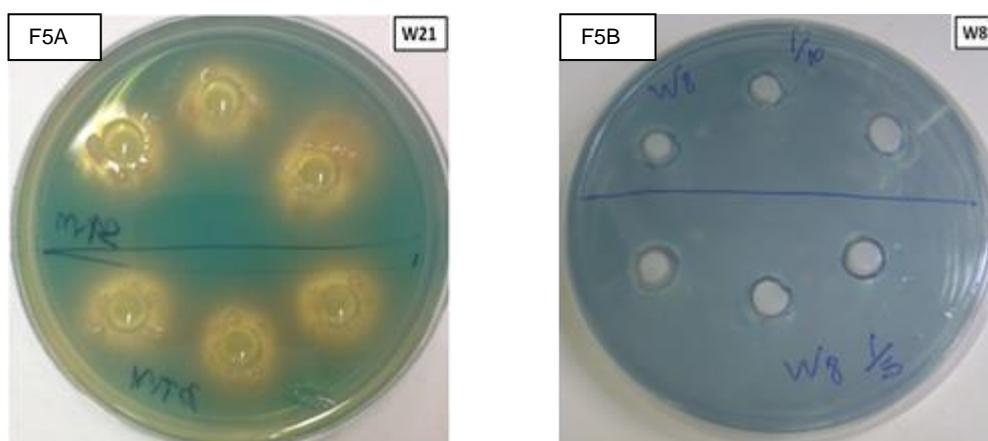
## 6.2 PRODUÇÃO DE SIDERÓFOROS

Dos 23 isolados testados, apenas nove (39%) apresentaram a formação de um halo alaranjado nas placas de meio CAS indicando a produção de sideróforos apresentados na tabela 3.

**Tabela 3:** Produção de sideróforos por 23 isolados de nódulos de *Mimosa spp.* oriundos de solos ultramáficos de Barro Alto (GO).

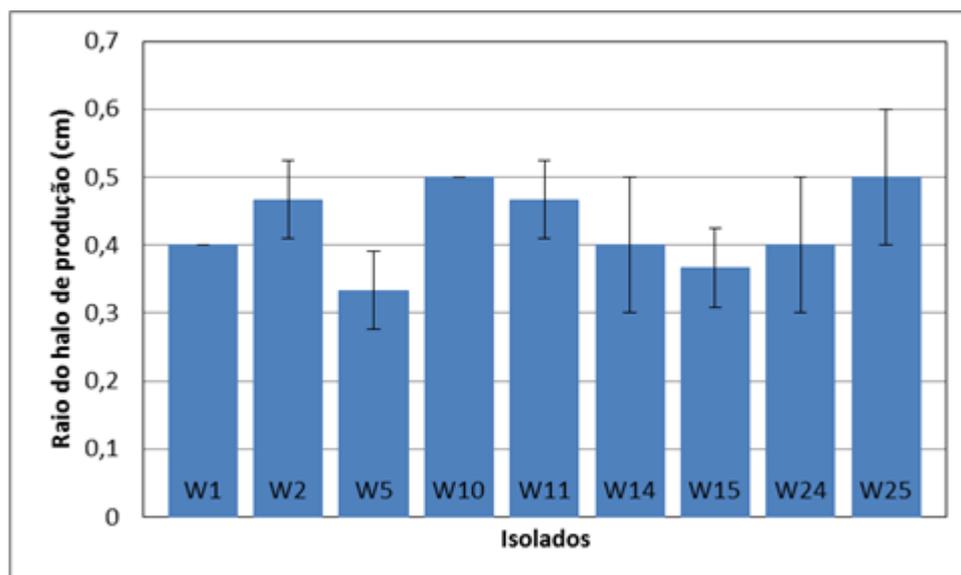
Isolados	Capacidade de Produção de Sideróforos
W1	+
W2	+
W3	-
W5	+
W6	-
W7	-
W8	-
W9	-
W10	+
W11	+
W13	-
W14	+
W15	+
W16	-
W17	-
W18	-
W20	-
W21	-
W22	-
W23	-
W24	+
W25	+
W26	-

Pouca diferença foi observada entre os isolados capazes de produzir sideróforos, cujos halos apresentaram, em média, um raio de 0,43 cm, (Figuras 5A e 5B e Figura 5)



**Figura – 5** (A) Teste de produção de sideróforos para isolados W21 (positivo) e 5 (B) W8 (negativo). Após 72 horas de incubação a 28° C, o surgimento de halos ao redor dos poços indica produção de sideróforos.

**Fonte:** Arquivo pessoal.



**Figura 6** – Halo de produção (cm) dos nove isolados testados capazes de produzir sideróforos. Média de três repetições. Barra de erros = desvio padrão.

De maneira geral, esses resultados são interessantes porque mostram que há diferenças entre os isolados quanto a capacidade de produzir sideróforos, o que deve ser levado em consideração na sua seleção para testes de promoção de crescimento de plantas.

JIANG et al. (2008) trabalharam com isolados bacterianos provenientes de amostras de solos contaminados com metais pesados, com destaque para a estirpe J62 de *Burkholderia*, capaz de produzir sideróforos, dentre outros mecanismos de promoção de crescimento de plantas. Muitos outros estudos com estirpes de *Burkholderia* associadas às plantas têm mostrado que essas bactérias são capazes de produzir esses compostos (CABALLERO-MELLADO et al., 2007; SUÁREZ-MORENO et al., 2012; WEISSKOPF et al., 2011). Com relação às espécies de *Burkholderia* capazes de formar nódulos em leguminosas, objeto desse trabalho de conclusão de curso, também existem relatos na literatura sobre a produção de sideróforos. ANGUS et al. (2013) mostraram que *B. tuberum*, capaz de formar nódulos efetivos em siratro (*Macroptilium atropurpureum*), também pode produzi-los. Esses autores encontraram três receptores de sideróforos no genoma dessa bactéria.

DIMKPA et al. (2009) mostraram que sideróforos possibilitaram a captação de Fe pelas plantas na presença de metais pesados, como Al, Cu, Mn e Ni. Por outro lado, na ausência de sideróforos, esses metais inibiam a absorção de Fe por *Vigna*

*unguiculata*. Além disso, por meio de sua ligação com metais, os sideróforos podem reduzir a formação de radicais livres na região da rizosfera, protegendo a degradação oxidativa de auxinas, permitindo a esses hormônios cumprirem seu papel de promotores de crescimento de plantas. Assim, é possível afirmar que os sideróforos desempenham dupla função, tornando o Fe disponível para as plantas e protegendo-as contra a toxicidade de outros metais (DIMKPA et al., 2009).

A inoculação com rizobactérias promotoras de crescimento, como *Pseudomonas* sp. e *Bacillus megaterium*, que foram isoladas de solos serpentínicos, ricos em Ni, foi estudada em detalhes por RAJKUMAR e FREITAS (2008). Essas bactérias reduziram a toxidez de Ni e promoveram o crescimento de plantas de *Brasica juncea*. Os autores desse trabalho sugeriram que a produção de sideróforos, em conjunto com outros mecanismos, como a produção de fitohormônios e ACC-desaminase, contribuiu para o incremento observado nas plantas inoculadas.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

De maneira geral, pode-se afirmar que, similarmente a outras bactérias, a promoção do crescimento de plantas por *Burkholderia* é resultado de um somatório de mecanismos, que envolve a produção de hormônios (ex.: AIA) e de sideróforos, dentre vários outros, ligados tanto aos macro, quanto aos micro-simbiontes (AHEMAD & KIBRET, 2014).

Dentre os isolados avaliados destacam-se o W5 oriundo da espécie *M. clausenii* de latossolo não ultramáfico, W15 de *M. clausenii* de solo saprolítico e o W24 de *M. clauseni* de solo laterítico, pois, foram capazes de produzir sideróforos e maior quantidade de AIA. Esses três isolados, portanto, seriam candidatos interessantes para testes de avaliação de promoção de crescimento de plantas, visando sua utilização em programas de recuperação de áreas degradadas pela atividade mineradora.

## REFERÊNCIAS

AHEMAD, Munees; KIBRET, Mulugeta. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. **Journal of king Saud University – Science**, 26: 1-20, 2014.

ANDRADE, Leide R.M. Diversidade vegetal, disponibilidade de metais e organismos do solo: Ferramentas para a recuperação de áreas sob mineração de níquel nos complexos ultramáficos de Barro alto, GO. **Relatório Técnico Parcial**, Planaltina, Embrapa Cerrados. 61p. 2011.

ANGLO AMERICAN BRASIL. Contribuição da Anglo American Brasil para o desenvolvimento sustentável. Relatório para a sociedade. **Anglo American Brasil – Metais Básicos**, 2004.

ANGUS, Annette A.; LEE, Andrew; LUM, Michelle R.; SHEHAYEB, Maya; HESSABI, Reza; FUJISHIGE, Nancy A.; YERRAPRAGADA, Shailaja; KANO, Stephanie; SONG, Nannie; YANG, Paul; ESTRADA DE LOS SANTOS, Paulina; MIANA DE FARIA, Sergio; DAKORA, Felix D.; WEINSTOCK, George; HIRSCH, Ann M. Nodulation and effective nitrogen fixation of *Macroptilium atropurpureum* (siratiro) by *Burkholderia tuberum*, a nodulating and plant growth promoting beta-proteobacterium, are influenced by environmental factors **Plant and Soil**, 369: 543 – 562, 2013.

ANUPA, Nair; ASHA, Juwarkar, A.; SANJEEV, Singh K. Production and Characterization of Siderophores and its Application in Arsenic Removal from Contaminated Soil. **Water Air & Soil Pollution**, 180: 199–212, 2007.

BARBIERI, Paola; ZANELLI, Tiziano; GALLI, Enrica; ZANETTI, Giuliana. Wheat inoculation with *Azospirillum brasilense* Sp6 and some mutants altered in nitrogen fixation and indole-3-acetic acid production. **FEMS Microbiology Letters**, 36: 87-90, 1986.

BATISTA, Bruna D. Promoção de crescimento em milho (*Zea mays*) por rizobactérias associadas a cultura do guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*). **Dissertação de mestrado**. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 44p. 2012.

BRADSHAW, Anthony D. Restoration after mining for metals – an ecological view. In: International Conference on Serpentine Ecology, 2, 1995, Nouméa. **Ecologie des milieux sur roches ultramafiques et sur sols métallifères**. Nouméa: ORSTOM, p.239-248. 1997.

CABALLERO-MELLADO, Jesus; ONOFRE-LEMUS, Janette; ESTRADA-DE LOS SANTOS, Paulina; MARTÍNEZ-AGUILAR, Lourdes. The tomato rhizosphere, an environment rich in nitrogen-fixing *Burkholderia* species with capabilities of interest for agriculture and bioremediation. **Appl Environ Microbiol**, 73:5308–5319, 2007.

CHAGAS JR, Aloisio F. Características agronômicas e ecológicas de rizobios isolados de solos ácidos e de baixa fertilidade da Amazônia. **Tese de Doutorado**, Universidade Federal do Amazonas – UFAM / Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA, 157p, 2007.

COATTI, Giuliana C.; ANDRADE, Diva S.; CARDOSO, Juscélio D.; MATOS, Maria A. Produção de AIA e diversidade fenotípica de estirpes elites de rizóbio isoladas de feijoeiro. **UNOPAR Cient., Cienc. Biol. Saúde**. 12: 49- 53, 2010.

DENTON, Brian p. Advances in phytoremediation of heavy metals using plant growth promoting bacteria and fungi MMG 445. **Basic Biotechnology**, 3: 1–5, 2007.

DIMKPA, Christian O.; DIRK, Merten; ALES, Svatos; GEORG, Buchel; ERIKA, Kothe. Metal-induced oxidative stress impacting plant growth in contaminated soil is alleviated by microbial siderophores. **Soil Biol. Biochem.**, 41: 154–162, 2009.

FAGERIA, Nand. K.; SLATON, Nathan A.; BALIGAR, Virupax C. Nutrient management for improving lowland rice productivity and sustainability. **Advances in Agronomy**, 80: 63-152, 2003.

Dos SANTOS, Anderson B; REIS JUNIOR, Fábio B.; LOPES, André A. C.; MENDES, Ieda C.; SIMON, Marcelo F.; De FARIA, Sergio M.; LOUREIRO, Maria F.; GROSS, Eduardo; ELLIOTt, Geoffrey N.; BONTEMPES, Cyril; YONG, J. Petter, W.; SPREND, Janet L.; JAMES, Euan k. Avaliação da capacidade simbiótica de 'beta rizóbios' isoladas de nódulos de diferentes espécies de *Mimosa*. **II Simposio Internacional Savanas Tropicais**. 2008.

JIANG, Chun-yu; SHENG, Xia-fang; QIAN, Meng; WANG, Qing-ya. Isolation and characterization of a heavy metal-resistant *Burkholderia* sp. from heavy metal-contaminated paddy field soil and its potential in promoting plant growth and heavy metal accumulation in metal-polluted soil. **Chemosphere**, 72:157-164, 2008.

KRAISER, Tatiana; GRAS, Diana E.; GUTIÉRREZ, Alvaro G.; GONZÁLES, Bernardo; GUTIÉRREZ, Rodrigo A. A holistic view of nitrogen acquisition in plants. Review paper. **Journal of Experimental Botany**, 62: 1455–1466, 2011.

MARCHIORO, Luiz E. T. Produção de Ácido Indol Acético e Derivados por Bactérias Fixadoras de Nitrogênio. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal do Paraná - UFPR. 75p, 2005.

MARCONDES, Jackson; FERRAUDO, Antonio S; SCAQUITTO, Denilson C; ALVES, Lúcia M. C.; LEMOS, Eliane G. M. Efetividade na fixação biológica do nitrogênio de bactérias nativas isoladas em plantas de amendoim. **Ciência & Tecnologia: FATEC-JB**, 1: 21-32, 2010.

OLIVEIRA, Zilda machado. Rizobacterias promotoras de crescimento vegetal isoladas de cana-de-açúcar sob fertilização orgânica e/ou convencional. **Tese de Doutorado**. Universidade de São Paulo. 164p, 2009.

PATTEN, Cheryl; GLICK, Bernard. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. **Canadian Journal of Microbiology**, 42: 207-220, 1996.

RADWAN, Tharwat S. D.; MOHAMED, Zeinat K.; REIS, Veronica. M. Aeração e adição de sais na produção de ácido indol acético por bactérias diazotróficas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 40: 997-1004, 2005.

RADWAN, Tharwat; EL-SAYED EL-DESOK. Improvement of quality of some crop plants by applying new concepts in biotechnology with *Azospirillum* and *Herbaspirillum* spp. **PhD Thesis**. Cairo University, 1999.

RAJKUMAR, Mani; FREITAS, Helena. Effects of inoculation of plant growth promoting bacteria on Ni uptake by Indian mustard. *Bioresour. Technol.* 99: 3491–3498, 2008.

REEVES, Roger D.; BAKER, Alan J. M.; BECQUER, Thierry; ECHEVARRIA, Guillaume; MIRANDA, Zenilton. J. G. The flora and biogeochemistry of the ultramafics of Goiás State, Brazil. **Plant and Soil**, 290: 107-199, 2007.

REIS JUNIOR, Fábio B.; SILVA, Milton F.; TEIXEIRA, Kátia R. S.; URQUIAGA, Segundo S.; REIS, Veronica M. Identificação de isolados de *Azospirillum* amazonense associados a *Brachiaria* spp., em diferentes épocas e condições de cultivo e produção de fitormônio pela bactéria. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 28: 103-113, 2004.

SABINO, Daniele C. C.; FERREIRA, Joilson S.; GUIMARÃES, Salomão L.; BALDANI, Vera L. Bactérias diazotróficas como promotoras do desenvolvimento inicial de plântulas de arroz. **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA, Centro Científico Conhecer**, 8: 2337-2345, 2012.

SANTOS, Durvalina M. M. **Disciplina de Fisiologia Vegetal**, UNESP, Jaboticabal. 2004. 8p.

SARWAR, Muhammad; KREMER, Robert J. Enhanced suppression of plant growth through production of L-tryptophan-derived compounds by deleterious rhizobacteria. **Plant and Soil**, 172: 261 – 269, 1995.

SCHWYN, Bernhard; NEILANDS, J. B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. **Analytical biochemistry**, v. 160, n. 1, p. 47-56, 1987.

SILVA, Déborah E. S. G.; OLIVEIRA, Luciana G. Avaliação da produção de sideróforos em actinomicetos. **XIX Congresso Interno de Iniciação Científica UNICAMP**, 2011.

Simon, Marcelo F. & Proença, C. 2000. Phylogeographic patterns of *Mimosa* (Mimosoideae, Leguminosae) in the Cerrado biome of Brazil: an indicator genus of high-altitude centers of endemism? *Biological Conservation* 96: 279-296.

SUÁREZ-MORENO, Zulma Rocio; CABELLERO-MELLADO, Jesus; COUTINHO, Bruna G.; MENDONÇA-PREVIATO, Lucia; JAMES, Euan K.; VENTURI, Vittorio. Common features of environmental and potentially beneficial plant-associated *Burkholderia*. **Microb Ecol**, 63:249–266, 2012.

TANK, Neelan; SARAF, Meenu. Enhancement of plant growth and decontamination of nickel-spiked soil using PGPR. **Journal of Basic Microbiology**, 49: 195–204, 2009.

VINCENT, James M. **Manual for the practical study of root nodule bacteria**. Oxford: Blackwell, 164 p., 1970.

WEISSKOPF, Laure; HELLER, Stefanie; EBERL, Leo. *Burkholderia* species are major inhabitants of white lupin cluster roots. **Appl Environ Microbiol**, 77: 7715–7720, 2011.

ZAGO, Valeria C.P.; DE-POLLI, Helvécio; RUMJANEK, Norma G. *Pseudomonas* spp. fluorescentes –Bactérias Promotoras de Crescimento de Plantas e Biocontroladoras de Fitopatógenos em Sistemas de Produção Agrícola Seropédica: **Embrapa Agrobiologia**, 32 p., 2000.

## ANEXO A

Reagentes utilizados para o preparo do meio de cultura 79 (Modificado).

REAGENTES	SOLUÇÃO	1L
Manitol/Glic. (g)		10
$K_2HPO_4$ (g)	Fosfato de potássio dibásico	0.3
$KH_2PO_4$ (g)	Dihidrogenofosfato de potássio	0.2
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (g)	Sulfato de magnésio heptaidratado	0.2
NaCl (g)	Cloreto de sódio	0.1
Extrato de Levedura (g) ou		0.4
Água de Levedura (ml)		100

### Procedimentos

Para o preparo do meio 79 líquido primeiramente pesar os reagentes necessários e adicionar 500 ml de água destilada em um Becker. Diluir os mesmos, seguindo a sequência da tabela (formulação), usando o bastão de vidro para fazer a dissolução por completo dos reagentes. Em seguida distribuir o meio de cultura em tubos de ensaio ou erlenmeyer, sendo os mesmos tampados com algodão e acomodados na bandeja do autoclave e esterilizados em calor úmido.

## ANEXO B

### Meio de cultura CAS para detectar a produção de sideróforos

Para verificar se as bactérias tem a capacidade de produzir sideróforos, as mesmas são cultivadas em meio de cultura CAS. O protocolo para preparar o meio é detalhado abaixo:

#### Parte solida do meio

Para preparar 100 ml do meio adiciona-se:

3.01g de tampão de Pipes dissolvidos em 60 ml de água Mili Q, ajusta-se o pH para 6,8 e completa-se o volume até 80 ml verificando-se o pH não alterou. Adiciona-se 1,5g de ágar bacteriológico ao final e, posteriormente, se esteriliza em autoclave.

#### Solução mãe do meio CAS

Esta solução é composta de três soluções:

- I - Dissolver 60,5 mg de cromoazurolS (CAS) em 50 mL de água Milli Q.
- II - Preparar solução estoque de  $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  100mM. Adicionar 100 $\mu\text{l}$  desse estoque para 9,9 ml de HCl 10 mM preparado a partir de HCl comercial a 37% ( $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  1 mM).
- III - Dissolver 72,9 mg de HDTMA (hexadeciltrimetilamônio de brometo) em 40 ml de água Milli Q.

Depois de preparadas as três soluções são misturadas da seguinte forma (1+2) + 3. É importante adicionar o HDTMA lentamente, pois, por se tratar de um detergente pode ocorrer à formação de espuma. Cobre-se o recipiente com papel alumínio para evitar a degradação do meio CAS e se esteriliza em autoclave conservando-o a 4°C posteriormente.

#### Meio MM9

Para o preparo de 100 ml de MM9 1x adiciona-se em água:

1,28 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ .

0,3 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

0,05 g de  $\text{NaCl}$

0,1 g de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ou 100 $\mu\text{l}$  de extrato de levedura a 10%.

No preparo do meio MM9 é adicionado 20% de glicose esterilizada em filtro milipore (0,2  $\mu\text{m}$ ). Para isso, prepara-se 50 ml de glicose a 40% e mistura-se a 50 ml de 2x MM9 esterilizado em autoclave.

Finalmente, á parte sólida do meio (80 mL de tampão de Pipes mais ágar bacteriológico) adicionam-se 10 ml da solução do meio CAS e 10 ml do meio MM9 1x com 20% de glicose para distribuição em placas de petri.

Uma vez solidificado, é importante tampar as placas de petri com papel alumínio para evitar a degradação do meio CAS.