

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE AGRONOMIA**

CAROLINA DE OLIVEIRA CAMPOS

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA, NUTRICIONAL E MORFOLÓGICA DE
BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DA CULTURA DO ALGODOEIRO**

**Uberlândia – MG
Junho – 2010**

CAROLINA DE OLIVEIRA CAMPOS

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA, NUTRICIONAL E MORFOLÓGICA DE
BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DA CULTURA DO ALGODOEIRO**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Agronomia,
da Universidade Federal de
Uberlândia, para obtenção do grau de
Engenheiro Agrônomo.

Orientador: Adão de Siqueira Ferreira

**Uberlândia – MG
Junho – 2010**

CAROLINA DE OLIVEIRA CAMPOS

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA, NUTRICIONAL E MORFOLÓGICA DE
BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DA CULTURA DO ALGODOEIRO**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Agronomia,
da Universidade Federal de
Uberlândia, para obtenção do grau de
Engenheiro Agrônomo.

Aprovado pela Banca Examinadora em 07 de junho de 2010.

Prof. Dr. Adão de Siqueira Ferreira
Orientador

Prof^a. Dra. Maria Amelia dos Santos
Oliveira
Membro da Banca

Eng. Agr. Reinaldo Silva de
Membro da Banca

AGRADECIMENTOS

Á Deus em primeiro lugar pela oportunidade, pois sem ele não estaria onde estou hoje.

Ao professor Adão Ferreira de Siqueira pela orientação, pelo apoio e paciência, e por toda a ajuda fornecida para a realização deste trabalho.

Aos membros desta banca Maria Amelia dos Santos e Reinaldo Silva de Oliveira, pelo tempo e disposição fornecidos.

Ao meu namorado Jônatas Machado, que sempre esteve ao meu lado, obrigado pelo apoio e companheirismo.

Aos meus pais, Mônica e Airton, obrigado por tudo.

Aos meus amigos de infância que mesmo distantes me apóiam.

Aos amigos da 40ª Turma de Agronomia da Universidade Federal de Uberlândia, que sempre me ajudaram durante a graduação.

RESUMO

A planta do algodão é considerada a mais importante das fibras têxteis. Entre os vários problemas que afetam a produtividade do algodão destaca-se a adubação insuficiente, principalmente a nitrogenada. Devido ao problema da adubação nitrogenada, vem-se buscando formas alternativas que possam fornecer a quantidade de nitrogênio necessário a cultura. Entre essas fontes, temos a fixação biológica do nitrogênio. O presente trabalho teve como objetivo caracterizar isolados de bactérias diazotróficas endofíticas quanto a suas propriedades bioquímicas, nutricionais e morfológicas das colônias de raízes de algodão e compará-las com bactérias diazotróficas de referência. O experimento foi realizado nos laboratórios de Pedologia e Fitopatologia do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Uberlândia, no período de julho de 2009 a janeiro de 2010. Os isolados foram obtidos das raízes da planta do algodão e foram usadas bactérias de referência para comparação. A caracterização bioquímica baseou-se nos testes Citrato-Simmons, Fermentação da glicose, SIM, Urease, NFB e LGI. A caracterização morfológica foi realizada nos meios de culturas sólidos 523, LB, MacConkey, King B modificado com clara de ovo e Batata-P. A caracterização nutricional foi realizada em meio LGI mudando as fontes de carbono, no total foram utilizadas 14 fontes diferentes. Após 24 horas, foi realizada a leitura dos testes da caracterização nutricional em um espectrofotômetro a 600 nm, o dado foi obtido da média de três repetições. Após a realização dos testes, os isolados foram agrupados em um dendograma de similaridade. Os isolados estudados apresentaram diferentes perfis bioquímicos, nutricionais e morfológicos, indicando que as raízes do algodoeiro apresentam uma grande variedade de bactérias endofíticas. O cladograma de similaridade agrupou os isolados entre si e possibilitou uma comparação com os isolados de referência.

Palavras chave: cerrado, ecologia microbiana, fisiologia microbiana, *Gossypium hirsutum*;

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	6
2 REVISÃO DE LITERATURA	8
3.MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.1 Localização do experimento.....	13
3.2 Obtenção dos isolados	13
3.3 Cultivo dos isolados	13
3.4 Caracterização dos isolados	14
3.4.1 Caracterização bioquímica	14
3.4.2 Caracterização morfológica	16
3.4.3 Caracterização nutricional	17
3.5 Análise dos dados	17
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
4.1 Caracterização bioquímica.....	17
4.2 Caracterização morfológica.....	20
4.3 Caracterização nutricional.....	22
4.4 Cladograma.....	23
5 CONCLUSÕES	25
REFERÊNCIAS.....	26
ANEXO	29

1 INTRODUÇÃO

O algodoeiro pertence à família das Malváceas do gênero *Gossypium*, possuindo mais de 50 espécies conhecidas, que em sua maioria são silvestres e não produzem fibras. Dentre as espécies conhecidas, apenas 4 são cultivadas: *G. arbóreo*, *G. herbaceum* L., *G. hirsutum* e *G. barbadense*. A maior parte das variedades cultivadas pertence à espécie *G. hirsutum*, raça *latifolium* Hutch, a qual é originária da América Central (PASSOS, 1980).

A planta do algodão é considerada a mais importante das fibras têxteis, além de fornecer matéria prima para diversos produtos como óleo refinado, azeite comestível, farinha integral e biocombustível (INTERNATIONAL COTTON ADVISORY COMMITTEE, 2002).

Para o sucesso na cultura algodoeira é necessário que o cotonicultor tenha uma visão da cadeia de produção do algodão, bem como uma visão ampla do sistema de agronegócio envolvendo a cultura. No entanto, a produção da cultura necessita, primordialmente, de identificar as melhores e mais adequadas práticas culturais e utilização de insumos a obter a melhor relação custo/benefício. Entre os problemas que afetam a produtividade do algodão, pode-se citar, de modo geral, a dificuldade financeira do algodão nacional em competir com o importado devido, entre outros fatores, ao alto custo de produção em consequência dos preços dos insumos. Na região que compreende os estados de São Paulo, Paraná, Minas Gerais (Triângulo Mineiro) e Mato Grosso do Sul, as adubações insuficientes, principalmente a nitrogenada, estão entre os fatores que limitam a produtividade do algodoeiro.

Devido ao alto custo da adubação nitrogenada, à perda do nitrogênio para o ambiente e aos riscos da aplicação, à busca de organismos capazes de fixar nitrogênio diretamente da atmosfera, torna-se de vital importância, reduzindo perdas para a atmosfera, a poluição de águas, solos e o alto custo de produção. O reconhecimento da importância da microbiologia do solo, visando à diminuição do uso de adubos nitrogenados, leva a intensificação de pesquisas na área de fixação biológica de nitrogênio.

Os estudos de FBN em plantas não-leguminosas (exemplo: arroz, milho, cana-de-açúcar, dendê, capim Brachiaria, banana e abacaxi) iniciaram na década de 1960, e mostraram associações com bactérias fixadoras de nitrogênio, embora, não houvesse a formação de nódulos como acontece nas leguminosas. Nestas plantas, ocorre

a colonização da superfície e/ou interior das raízes bem como o interior da parte aérea por bactérias do solo (destacadamente os gêneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum* e *Gluconacetobacter*) que fixam nitrogênio do ar e disponibilizam às plantas. Neste campo, os resultados de seleção de estirpes inoculantes ainda não atingiram níveis tão elevados quanto à simbiose em leguminosas. Ainda assim, existem pacotes tecnológicos, utilizando variedades de plantas e estirpes bacterianas eficientes, que podem suprir mais de 50% do nitrogênio necessário à planta (ZILLI, 2007).

A inoculação de bactérias diazotróficas que podem associar-se às plantas de algodão para fixar nitrogênio atmosférico é uma alternativa para diminuir os custos econômicos e ambientais relacionadas à fertilização nitrogenada, sem que haja diminuição na produção.

Devido à necessidade de identificar bactérias capazes de realizar a fixação biológica de nitrogênio, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar os isolados de bactérias diazotróficas endofíticas quanto às propriedades bioquímicas, nutricionais e morfológicas das colônias de raízes de algodão e compará-las com isolados de bactérias diazotróficas que são referências.

2 REVISÃO DE LITERATURA

As plantas cultivadas, incluindo a cultura do algodão, necessitam de uma grande demanda de nutrientes para o crescimento e desenvolvimento das plantas com propósito comercial. Na agricultura, alguns nutrientes, a exemplo de nitrogênio, potássio e fósforo, são de fundamental importância para atender as exigências e demandas das culturas. O nitrogênio, junto com o potássio, é o elemento de maior proporção que o algodoeiro absorve do solo. O nitrogênio é fundamental no desenvolvimento da planta, principalmente dos órgãos vegetativos, fazendo parte da constituição das substâncias protéicas, da clorofila e de todos os órgãos de reserva. O nitrogênio é necessário na multiplicação celular e é um fator regulador da formação da matéria seca. Encontra-se mais abundantemente nos tecidos jovens do algodoeiro, sendo que nas folhas depara-se em maior quantidade (PASSOS, 1980).

O N é um dos nutrientes mais importantes para o algodoeiro, que acumula, durante o seu ciclo, o equivalente a 70 kg ha^{-1} de N para a produção de uma tonelada de algodão em caroço. Do total absorvido, entre 48% e 50% é exportado na forma de fibra e sementes de modo que pelo menos a metade do N extraído retorna ao solo nos restos culturais (FERREIRA; CARVALHO, 2005).

Para o algodoeiro, o N é fundamental no desenvolvimento dos órgãos vegetativos e, quando fornecido em doses adequadas, estimula o crescimento e o florescimento, regulariza o ciclo da planta, aumenta a produtividade e melhora o comprimento e resistência da fibra (SAUT et al., 2002).

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é considerada, após a fotossíntese, o mais importante processo biológico do planeta. É baseada no fato de que alguns microrganismos, conhecidos como diazotróficos, são capazes de quebrar a ligação que une os dois átomos de nitrogênio atmosférico (N_2), transformando-o em amônia (NH_3), que é assimilável pelas plantas. Se a associação entre estes microrganismos for eficiente, o N fixado pode suprir as necessidades do vegetal, dispensando o uso de fertilizantes nitrogenados e oferecendo, assim, vantagens econômicas e ecológicas. O exemplo mais conhecido consiste na simbiose de bactérias da ordem Rhizobiales, denominados rizóbios, com planta da família Leguminosae a qual pertencem a soja e o feijão (JUNIOR; MENDES, 2008).

Dentre os nutrientes minerais essenciais às plantas, o nitrogênio (N) é o mais caro, o que consome mais energia para sua produção industrial e, potencialmente, o

mais poluente, sendo geralmente o mais limitante à produção vegetal. O processo industrial que transforma o N_2 atmosférico em NH_3 demanda por volta de seis barris de petróleo por tonelada de N fixado. O papel da FBN é crucial para a busca de produções sustentáveis. (JUNIOR; MENDES, 2009)

O início dos estudos com fixação biológica de nitrogênio (FBN) remota do século XIX, quando Beijerinck observou a formação de nódulos em raízes de plantas de ervilha. Nos anos seguintes, constatou-se que estes nódulos eram colonizados por bactérias e que nessas estruturas se estabelecia uma simbiose, onde supostamente a planta fornecia açúcares para a bactéria e a bactéria fixava o nitrogênio atmosférico e o disponibilizava à planta (ZILLI, 2007).

Na época, estas bactérias receberam o nome de *Bacillus radícola*, sendo alguns anos depois agrupadas no gênero *Rhizobium*, o que permaneceu até o início dos anos 80 do século passado. Atualmente, este grupo de bactérias genericamente chamado de “grupo rizóbio” compreende pelo menos 30 espécies bacterianas distribuídas em seis gêneros: *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium* e *Rhizobium* (ZILLI, 2007).

O problema básico para a fixação do nitrogênio é a presença da tripla ligação $N\equiv N$, o que torna este gás extremamente estável a temperatura ambiente (SPRENT; SPRENT, 1990; EVANS; BURRIS, 1992). Apesar da abundância de N_2 na atmosfera terrestre, os organismos que pertencem ao grupo dos eucariotos (plantas e animais) não conseguem utilizar este elemento diretamente. Apenas uma porção dos organismos do grupo dos procariotos consegue converter ou reduzir enzimaticamente o nitrogênio da atmosfera em amônia, a qual pode ser incorporada para o crescimento e manutenção das células. Estes organismos que conseguem fixar o nitrogênio são denominados diazotróficos (BALDANI et al., 1999).

Embora uma série de sistemas de fixação de nitrogênio já tenham sido descritos, a FBN é restrita aos organismos procariotos. Dentre estes organismos que fixam nitrogênio muitos são heterótrofos, necessitando de um suplemento de carbono reduzido, o que depende indiretamente da energia da luz e em geral requer uma simbiose com um hospedeiro eucarioto; ou são de vida livre, competindo com outros microrganismos pela matéria orgânica disponível no ambiente. Outros são autótrofos, os quais podem reduzir o CO_2 em presença da luz. Em geral, já foram descritas espécies representantes de vários grupos de procariotos que fixam nitrogênio, tais como:

bactérias fotossintéticas (ex.: *Rhodospirillum rubrum*), bactérias anaeróbicas (ex.: *Clostridium* spp.), microaeróbicas (ex.: *Azospirillum* spp., *Herbaspirillum* spp., *Acetobacter diazotrophicus*, *Azorhizobium caulinodans*, *Azoarcus* spp., *Burkholderia* spp., etc), bactérias aeróbicas (ex.: *Azotobacter* spp. e *Derxia* spp.) e também alguns representantes das cianobactérias e actinomicetos (*Frankia*) (SPRENT; SPRENT, 1990).

Segundo Evans e Burris (1992), podemos caracterizar três grupos de bactérias fixadoras de nitrogênio, ou diazotróficos: diazotróficos de vida livre, que fixam o nitrogênio para seu próprio uso; diazotrofos associativos, que contribuem para o crescimento da planta sem a formação de estruturas diferenciadas, não estabelecendo uma simbiose e os diazotróficos simbióticos, que estabelecem uma interação muito estreita entre o macro e microsimbionte, e em alguns casos, são formadas estruturas diferenciadas denominadas nódulos.

Os diazotróficos de vida livre foram os primeiros a serem reconhecidos, como é o caso de *Beijerinckia fluminensis* e *Beijerinckia indica*, isoladas da rizosfera de plantas de cana-de-açúcar crescidas em solos tropicais, sendo demonstrado o seu potencial na associação com gramíneas (DOBEREINER; RUSCHEL, 1958). Estas bactérias colonizam preferencialmente o rizoplane e a rizosfera de plantas de cana-de-açúcar, em que os exudados, principalmente açúcares, estão envolvidos nesta associação, pois as bactérias são encontradas principalmente em áreas onde estes compostos são liberados (DOBEREINER; ALVAHYDO, 1959).

As bactérias diazotróficas associativas podem ser divididas em dois grupos de acordo com a proposição de Baldani et al. (1997): endofíticos facultativos (podem colonizar tanto a rizosfera como o interior das raízes) e os endofíticos obrigatórios (colonizam o interior das raízes).

O gênero *Azospirillum* é um grupo predominantemente de endofíticos facultativos. O isolamento das espécies de *Azospirillum* como fixadores de nitrogênio se deve a introdução de meios semi-sólidos sem N. O desenvolvimento do meio semi-sólido foi um fato muito importante para o isolamento de diazotróficos com caráter microaerofílico. No caso de *Azospirillum* e outros diazotrofos, o crescimento dependente de fixação de N₂ ocorre em regiões do meio de cultura onde a taxa de difusão de O₂ está em equilíbrio com a taxa de respiração das bactérias e, posteriormente, a película formada vai se deslocando até a superfície do gradiente de oxigênio, graças ao fenômeno de aerotaxia (DÖBEREINER et al., 1995).

A distribuição ecológica de *Azospirillum* spp. é extremamente ampla podendo ser considerada uma bactéria universal encontrada colonizando plantas crescidas em diferentes habitats (DOBEREINER et al., 1976; DOBEREINER; PEDROSA, 1987). Estirpes tem sido encontradas em associação com plantas monocotiledôneas, incluindo milho, arroz, cana-de-açúcar, sorgo, gramíneas forrageiras como *Digitaria* e “*Kallar grass*” e com as dicotiledôneas (RAO; VANKATESWARTU, 1982). O gênero foi definido por Tarrand e colaboradores em 1978 e hoje compreende seis espécies, caracterizadas com base fenotípica, análise de DNA:DNA e sequência da 16S rRNA: *A. brasilense* e *A. lipoferum*, *A. amazonense*, *A. halopraeferens*, *A. irakense* e *A. largomobile* (BALDANI et al., 1999)

Entre os diazotróficos endofíticos obrigatórios estão: *Acetobacter diazotrophicus*, *Azoarcus* spp., *Herbaspirillum seropedicae*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans* e *Burkholderia* spp. Essa característica, descoberta recentemente, parece ser a chave para explicar a contribuição de fixação de N₂ muito mais eficiente das associações endofíticas, especialmente nos trópicos, do que das associações rizosféricas (DOBEREINER et al., 1995). Além destas, outros diazotróficos de caráter anaeróbio são capazes de colonizar a endorizosfera e vasos do xilema, como *Alcaligenes faecalis* em arroz e *Pantoea agglomerans* em aveia, além de *Bacillus* spp., *K. pneumoniae*, *Erwinia* ssp., *Enterobacter* ssp. e vários outros diazotrofos. Mas de acordo com Döbereiner e Pedrosa (1987), os diazotrofos anaeróbios apresentam baixa capacidade de conversão da energia a partir de fontes de carbono. Assim, os benefícios dessa associação parecem ser limitados pela disponibilidade de substratos orgânicos (BALDANI et al., 1999).

Diazotróficos simbióticos são observados em vários grupos de microrganismos, e em alguns casos, são observados a formação de estruturas diferenciadas quando ocorre a simbiose do organismo com a planta. Esses microrganismos são tipicamente hábeis para invadir as raízes de plantas leguminosas de zonas temperadas e tropicais, fazendo com que ocorra a formação do nódulo. Atualmente, são conhecidos seis gêneros de diazotrofos da família Rhizobiaceae: *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* e *Allorhizobium* (BALDANI et al., 1999).

A interação de bactérias diazotróficas com diversas culturas tem sido pesquisada, devido ao potencial biotecnológico quanto à produtividade das culturas e à

possibilidade de redução de custos de aplicação de fertilizantes nitrogenados (PENG et al., 2002).

A produtividade agrícola é determinada em parte pela disponibilidade de nitrogênio previamente fixado, seja por processo biológico ou químico industrial. Os microrganismos fixadores de nitrogênio, as bactérias diazotróficas, sejam em simbiose ou vida livre, demonstram grande potencial de reduzir a dependência de fertilizantes nitrogenados sintéticos, reconhecidamente comprometedores da qualidade da água e ar quando usados de forma inadequada (OKON; LABANDERA-GONZALES, 1994).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Localização do experimento

O experimento foi conduzido durante o período de julho de 2009 a janeiro de 2010, no laboratório de Fitopatologia (LAFIP) e no laboratório de Pedologia do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Uberlândia.

3.2 Obtenção dos isolados

Os isolados foram obtidos na execução do projeto “Bactérias diazotróficas endofíticas nas culturas da cana-de-açúcar, do trigo e do algodão cultivadas no cerrado: perspectivas na FBN, como PGPB e na indução do sistema de defesa das plantas”. De um total de 70 isolados, 12 foram escolhidos para a realização dos testes. Três isolados foram fornecidos pela Embrapa Agrobiologia sendo eles: *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Azospirillum lipoferum* e *Azospirillum brasiliense*. Os isolados *Pseudomonas fluorescences*, *Azospirillum* spp e *Bacillus cereus* foram usados como referência nas caracterizações bioquímicas e morfológicas.

3.3 Cultivo dos isolados

Após a obtenção das culturas puras, os isolados foram transferidos para eppendorfs contendo meios líquidos LGI com levedura (5 g de sacarose ou açúcar cristal; 0,6 g de KH_2PO_4 ; 0,2 g de K_2HPO_4 ; 0,2 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,02 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,002 g de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 5 mL de azul de bromotimol (solução 0,5% em 0,2M KOH); 1 mL de solução de vitaminas (10 mg de biotina + 20 mg de piridoxol-HCl); 4 mL de FeEDTA (solução 1,64%); 1000 mL de água destilada; 0,1g de levedura; pH ajustado em 6,0 - 6,2) e meio 523 (10 g de sacarose; 8 g de caseína; 4 g de extrato de levedura; 2 g de K_2HPO_4 ; 0,3 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1000 mL de água destilada; 18 g de ágar) e então incubados na BOD a 30° C por 48 horas. Após esse tempo, os isolados foram armazenados a temperatura de 4°C para preservação.

3.4 Caracterização dos isolados

Os isolados foram caracterizados quanto às suas características bioquímicas, nutricionais e morfológicas.

3.4.1 Caracterização bioquímica

A caracterização bioquímica foi utilizada para avaliar as diferenças existentes entre os isolados da cultura do algodoeiro e os de referências, baseando-se nos Citrato Simmons, Fermentação da glicose, SIM, Uréase, NFB semi-sólido, LGI semi-sólido. Os meios de cultura de cada teste estão contidos no Anexo A.

O teste de utilização do citrato visou identificar microrganismos que utilizam o citrato como fonte de carbono e energia. Após ser o meio o ágar feito foi adicionado e então o meio foi aquecido para a completa dissolução do mesmo seguido da distribuição de 5mL em tubos de ensaio. Após autoclavado, o meio de cultura Citrato-Simmons de coloração verde contido nos tubos de ensaio, foi colocado para solidificar em posição inclinada formando maior superfície para elaboração de estrias. Quando endurecidos fez-se estrias com os isolados e incubou a 30°C por 48 h. Após 48 h, foi observado se houve ou não mudança na coloração do meio de verde para azul, o que indica um resultado positivo. Alguns microrganismos não possuem a permease do citrato, que faz o transporte do citrato para o interior da célula, não conseguindo portanto, crescer no meio contendo como única fonte de carbono o citrato, embora possuam as enzimas intracelulares, que degradam o citrato. A prova foi feita semeando-se a bactéria no meio sólido inclinado de citrato de Simmons, contendo azul de bromotimol como indicador, o qual em pH 6,8 a 7,0 apresentou-se verde. A prova positiva resultou no transporte do citrato pela permease e a sua utilização pela enzima citratase resultou na formação de oxaloacetato e acetato. O consumo do citrato induziu a clivagem do fosfato de amônia, alcalinizando o meio. Também, com o metabolismo do citrato houve formação de carbonatos que alcalinizaram o meio, de modo que a cor do indicador virou para azul. Na prova negativa o meio não se alterou, pois não houve crescimento microbiano.

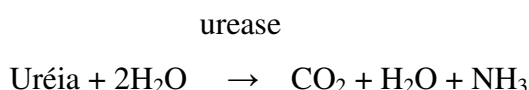
O meio SIM foi utilizado para avaliar a presença ou ausência de H₂S (sulfeto de hidrogênio), a motilidade do isolado e produção ou não de indol. Após o preparo do meio, este foi aquecido para sua completa dissolução e então distribuídos em tubos plásticos de 25 mL, colocando 5 mL em cada tubo, para autoclavar por 30 minutos.

Após autoclavados, os tubos contendo o meio de coloração amarela e textura firme foram inoculados com os isolados através da técnica de punctura. Após 3 dias observou-se os resultados. Para a prova de motilidade, caso ocorresse crescimento fora da linha de inoculação, o resultado é considerado positivo, porém se o crescimento do microrganismo ficou restrito ao local de inoculação, o resultado foi negativo. A produção de H₂S foi indicado através da formação de uma película preta na superfície do meio, o que indica resultado positivo. Esta película preta foi formada, pois o meio SIM contém tiosulfato com fonte de enxofre e o sulfato ferroso como indicador da produção de sulfeto de hidrogênio. O sulfeto de hidrogênio produzido reage com o metal pesado formando sulfetos que apresentam coloração negra (precipitado preto insolúvel). Para avaliação da produção ou não de indol, adicionou-se 2 a 3 gotas do reagente Kovacs. O surgimento de uma coloração avermelhada indicou resultado positivo, pois revelou a presença de indol o qual complexou-se com o aldeído, em meio ácido, formando o composto com coloração diferenciada. O reagente de Kovacs é composto por p-dimetilaminobenzaldeído em solução de HCl e álcool isoamílico. O indol é resultante da degradação do aminoácido triptofano pela enzima triptofanase.

O teste da fermentação da glicose determina a capacidade de um microrganismo em fermentar a glicose incorporada em um meio base, com produção de ácido e/ou gás. A produção de ácido a partir da glicose reduz o pH do meio, fazendo com que este mude a coloração inicial de verde para amarelo, indicando um resultado positivo. Algumas bactérias produzem além de ácido, gás, o que foi indicado pela formação de bolhas dentro dos tubos. Depois de dissolvidos os ingredientes e ajustado o pH para 7,1, colocou-se 5 mL do meio nos tubos de plástico de 25 mL e também o eppendorff tomando-se o cuidado para não deixar bolhas de ar dentro do mesmo. A função dos eppendorfs é coletar os gases produzidos pelos inoculados. Os tubos foram autoclavados por 30 min a 121°C. Depois de esterilizados, adicionou-se 0,5 mL à solução de 10% de glicose previamente filtrada aos tubos. Os isolados devem então ser inoculados e após três dias, observou-se os resultados.

O teste da urease foi realizado no meio uréia-indol e é baseado na enzima urease, responsável pela hidrólise da uréia com obtenção da amônia. Para realização do teste da urease o pH do meio foi corrigido para 6,5 e então foi adicionado o ágar, em seguida aquecido e colocado 4 ml em tubos de plástico de 25 mL. Os tubos foram autoclavados por 30 minutos e em seguida foi adicionado 1 mL do filtrado de uréia diluída em água. O filtrado foi adicionado ao meio ainda líquido e resfriado inclinado,

umentando a superfície do meio. Os isolados foram inoculados no meio através de estrias e incubados 72 horas a 30°C para avaliação. O vermelho de fenol é um indicador de pH, que quando em pH 6,5 é de cor amarelo. No entanto, quando se tem um aumento de pH acima de 8,1 o indicador passa para uma coloração rosa cerise. Organismos que produzem urease irão mudar a coloração do meio devido a amônia produzida pela hidrólise da uréia (resultado positivo) como visto na reação abaixo:



Os microrganismos incapazes de sintetizar urease não produziram amônia e, portanto, não tiveram aumento subsequente do pH. Assim, um teste negativo foi indicado pela continuidade da coloração amarela original do meio.

O teste bioquímico NFB e LGI é baseado no crescimento do isolado abaixo da superfície do meio (5 a 10 mm abaixo da superfície). Após o preparo do meio, colocou-se 5 mL do mesmo em tubos de vidro e autoclavou por 30 min a 121°C. A inoculação foi feita colocando 100 µL do isolado e então os tubos de vidro foram incubados por 7 dias a 30°C para posterior avaliação. O resultado positivo foi verificado pela formação de um véu característico abaixo da superfície, o que indica o crescimento do isolado. Nessa região a taxa de difusão de O₂ está em equilíbrio com a taxa de respiração das bactérias, o que proporciona o crescimento de bactérias microaerófilas.

3.4.2 Caracterização morfológica

A caracterização morfológica das colônias dos isolados foi realizada em meios de culturas sólidos 523 (10 g de sacarose; 8 g de caseína; 4 g de extrato de levedura; 2 g de K₂HPO₄; 0,3 g de MgSO₄.7H₂O; 1000 mL de água destilada; 18 g de ágar), LB (10 g de peptona de caseína; 5 g de extrato de levedura; 10 g de NaCl; 1000 mL de água destilada; 15 g de ágar), MacConkey (17 g de peptona de caseína; 3 g de peptona de carne; 10 g de lactose; 1,5 g de bile bovina; 5 g de NaCl; 0,03 g de vermelho neutro; 0,001 g de cristal de violeta; 1000 mL de água destilada; 15 g de ágar; pH ajustado em 7,1) King B modificado com clara de ovo (250mL de água destilada; 5g de caseína hidrolisada ácida; 4 mL de glicerol; 0,4g K₂HPO₄; 0,4g de Mg.SO₄.7H₂O; 5g de ágar, 1000mL de água destilada e uma clara de ovo pequena batida asepticamente) e Batata-P (200 g de batata; 100 g de açúcar cristal; 1 mL de solução

de vitaminas (10 mg de biotina + 20 mg de piridoxol-HCl); 2 mL de solução de micronutrientes (0,04 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ + 1,2 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ + 1,4 g de H_3BO_3 + 1 g de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ + 1,175 g de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ + 1000 mL de água destilada); 1000 mL de água destilada; 17 g de ágar; pH ajustado em 6,5 - 7). Os isolados foram inoculados na forma de estrias simples e então incubados a 30°C por 24 h e avaliados quanto ao seu crescimento. As morfologias das colônias foram caracterizadas e fotografadas nos diferentes meios de cultura.

3.4.3 Caracterização nutricional

A caracterização nutricional dos isolados foi realizada em meio LGI, alterando a fonte de carbono para o crescimento dos isolados. As fontes incluíram: sacarose, trealose, ácido glutâmico, ácido láctico, ácido maleico, ácido succínico, amido, arabinose, frutose, galactose, inositol, lactose, melibiose e sorbitol. As fontes de carbono foram colocadas a 1% em tubos contendo 15 mL do meio LGI e autoclavado por 30 min a 121°C. Nos tubos, foram inoculados os isolados ativados previamente e cultivados por 24 h sob agitação de 50 rpm. A leitura foi feita em espectrofotômetro a 600 nm e baseado na densidade óptica (DO). Para cada isolado, montou-se três repetições, incluindo os brancos de cada fonte de carbono para a realização da leitura do branco. Os valores das médias acima de 0,050 foram considerados como crescimento positivo.

3.5 Análise dos dados

A caracterização bioquímica, morfológica e nutricional baseou-se na resposta ao crescimento do isolado. Os resultados foram utilizados para medir o perfil metabólico dos isolados e utilizados para formar os grupos de similaridade, com auxílio do programa PC ORD 4.1 (MCCUNE; MEFFORD, 1999).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização bioquímica

Quanto à fermentação da glicose (Tabela 1), observou-se que apenas os isolados 11/92, 11280 (*Acetobacter diazotrophicus*), 11080 (*Azospirillum lipoferum*) e 710 não apresentaram resultados positivos, indicando que não houve produção de ácido pela fermentação da glicose. Os isolados LP8, Rec14b, 705, 708 e 712 além da produção de ácido através da fermentação da glicose também promoveram a produção de gás, indicado pela formação de bolhas de ar dentro dos eppendorfs.

No meio SIM, foram testados a motilidade dos isolados, a presença de H₂S e a produção de Indol, um promotor da auxina em plantas. Os testes que avaliaram a presença do H₂S e a produção de Indol apresentaram resultados negativos para todos os isolados testados. No teste de motilidade, nenhum isolado fornecido pela a Embrapa apresentou resultados positivos, e dos microrganismos de referência apenas o *Azospirillum* spp. mostrou crescimento fora da linha de inoculação.

O teste do citrato indica quais microrganismos utilizam o citrato como fonte de carbono. Dos isolados obtidos das raízes do algodoeiro, LP8, Rec 14b, Rec12.2, 701, 705, 708 e 710 apresentaram resultado positivo, indicando que esses isolados possuem a enzima permease do citrato, conseguindo então utilizar o citrato como fonte de energia. Dos isolados obtidos pela Embrapa, em nenhum foi observado mudança de coloração bem como nenhuma bactéria outra bactéria usada como referencia indicou resultado positivo.

O teste da urease indicou que apenas o isolado 701 é capaz de sintetizar a enzima urease, produzindo amônia, aumentando o pH do meio, o que provoca uma mudança de coloração amarela para rosa.

No teste NFB, do isolados usados como referência, apenas 11080 (*Azospirillum lipoferum*) e *Azospirillum* spp. não apresentaram resultado positivo. Dos isolados obtidos das raízes do algodoeiro, 11/92, 701, 708 e 714 apresentaram resultado positivo, indicado pela formação de um véu característico abaixo da superfície do meio.

No meio semi sólido LGI os isolados de referência 11001 (*Azospirillum brasiliensis*) e *Pseudomonas fluorescences* apresentaram a formação do véu abaixo da superfície, o que indica um resultado positivo, os isolados 11/92, LP8, 706, 710 e 714 também apresentaram um resultado positivo.

Os isolados Rec 14b e 705 apresentaram resultados semelhantes em todos os testes, assim como os isolados 11001BR (*Azospirillum brasiliensis*), *Pseudomonas fluorescences* e 714, o que não indica necessariamente que são o mesmo microrganismos, deve-se para isso observar a caracterização morfológica e a formação das colônias.

Tabela 1 - Testes bioquímicos realizados nos isolados de bactérias diazotróficas, UFU, Uberlândia – MG, 2009.

Isolados	Fermentação da glicose	CO ₂	SIM			Citrato	Urease	NFB	LGI
			H ₂ S	Motilidade	Indol				
L 12.2	+	-	-	+	-	-	-	-	-
11/92	-	-	-	-	-	-	-	+	+
LP8	+	+	-	+	-	+	-	-	+
Rec 14.b	+	+	-	+	-	+	-	-	-
Rec 12.2	+	-	-	+	-	+	-	-	-
<i>P. fluorescences</i>	+	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>Azospirillum</i> spp.	+	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>B. cereus</i>	+	-	-	-	-	-	-	+	-
11280 BR	-	-	-	-	-	-	-	+	-
11080 BR	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11001 BR	+	-	-	-	-	-	-	+	+
701	+	-	-	-	-	+	+	+	-
705	+	+	-	+	-	+	-	-	-
706	+	-	-	-	-	-	-	-	+
708	+	+	-	+	-	+	-	+	-
710	-	-	-	-	-	+	-	-	+
712	+	+	-	+	-	-	-	-	-
714	+	-	-	-	-	-	-	+	+

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que os isolados e os de referências apresentam diferentes características bioquímicas quanto aos testes utilizados. As características bioquímicas são de fundamental importância nos estudos da interação planta/microrganismos. Por exemplo, a produção de AIA por isolados pode atuar na promoção de crescimento das plantas, principalmente nos estádios de germinação e plântula. Em relação a isso, o estudo indicou que os isolados analisados não apresentaram capacidade de produção de indol em meio SIM. Porém, estudos de Junior et al. (2004) com *Azospirillum amazonense* reportaram a produção de AIA em LGI enriquecido de triptofano, o que pode ser explicado devido ao indol ser resultante da degradação do aminoácido triptofano pela enzima triptofanase.

4.2 Caracterização morfológica

Quanto ao crescimento dos isolados em diferentes meios de cultura (Tabela 2), os isolados L12.2, LP8, Rec14b, Rec 12.2, 701, 708 e 712, apresentaram crescimento em todos os meio de cultura. O isolado 11/92 não apresentou crescimento em nenhum meio de cultura, o que pode ter ocorrido devido ao meio de cultura não fornecer os nutrientes necessários ao seu crescimento.

Tabela 2 - Avaliação do crescimento dos isolados nos meios de cultura Mc Conkey, LB, Batata dextrose, 523, King B modificado. UFU, Uberlândia – MG, 2009.

Isolado	Mc Conkey	LB	Batata dextrose	523	King B modificado
L 12.2	+	+	+	+	+
11/92	-	-	-	-	-
LP8	+	+	+	+	+
Rec 14.b	+	+	+	+	+
Rec 12.2	+	+	+	+	+
<i>P. fluorescens</i>	+	+	+	+	-
<i>Azospirillum</i> spp.	-	+	+	+	+
<i>Bacillus cereus</i>	-	+	+	+	+
11280	-	+	+	+	-
11080	+	-	-	+	-
11001	-	+	+	+	+
701	+	+	+	+	+
705	-	+	+	+	+
706	-	+	+	+	-
708	+	+	+	+	+
710	-	+	-	+	-
712	+	+	+	+	+
714	-	+	+	+	+

Os isolados Rec14b e 705 foram comparados pela característica morfológica de suas colônias no meio batata-P (Figura 1). Verifica-se que a formação diferenciada de suas colônias, o que indica que mesmo apresentando os resultados semelhantes nos testes bioquímicos, trata-se de bactérias diferentes.

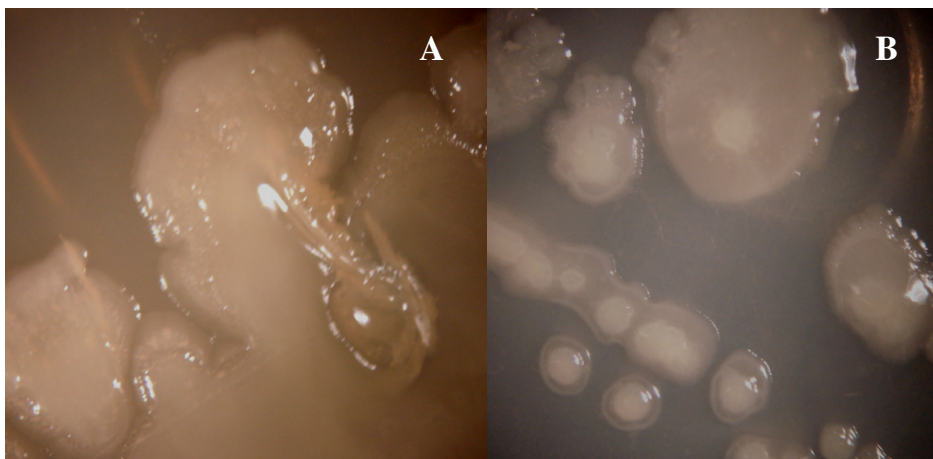


Figura 1. Isolado 705(A) e Rec 14b (B) em meio de cultura batata-P. UFU, Uberlândia – MG, 2009.

O isolado 714 apresentou resultados semelhantes quanto a caracterização bioquímica com os isolados de referência 11001 (*Azospirillum brasiliensis*) e *Pseudomonas fluorescences*. Pela formação das colônias (Figura 2) em meio batata-P, verifica-se que não se trata do mesmo isolado, porém o isolado 714 apresenta uma maior semelhança com a o isolado 11001 (*Azospirillum brasiliensis*) do que com a *Pseudomonas fluorescences*.

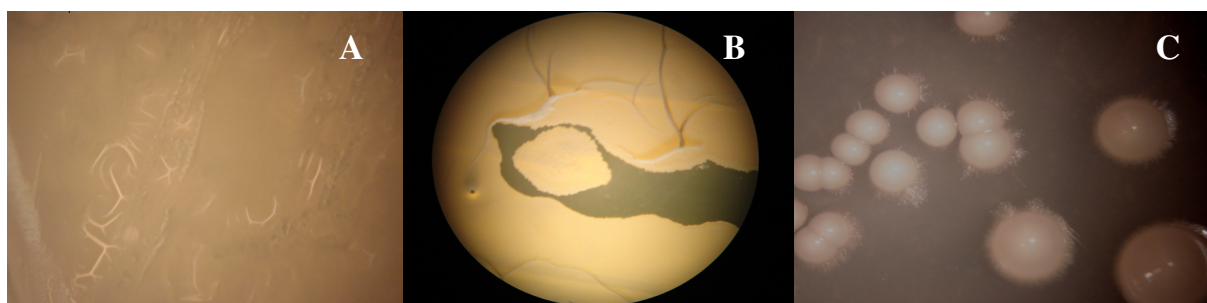


Figura 2. Isolado 11001 (*Azospirillum brasiliensis*) (A), 714 (B) e *Pseudomonas fluorescences* (C) em meio batata-P. UFU, Uberlândia – MG, 2009.

A caracterização morfológica das colônias é de fundamental importância prática no laboratório, pois possibilita reconhecer rapidamente um determinado tipo de bactéria em decorrência das características de crescimentos dos isolados.

4.3 Caracterização nutricional

Observou-se que não houve crescimento de nenhum isolado nos meios contendo as fontes de carbono ácido glutâmico, ácido lático, frutose, lactose e sorbitol, porém quando usadas as fontes galactose, melibiose e trealose, todos os isolados apresentaram crescimento (Figura 3).

O isolado 706 apresentou melhor resposta, crescendo em meios contendo 9 fontes de carbono diferentes, o que indica que esse isolado pode apresentar uma melhor capacidade de adaptação na planta. Os isolados 701, 708, 710 e 714 cresceram com 7 fontes de carbono diferentes, sendo que o isolado 708 diferiu dos demais não apresentando crescimento nos meios que continham amido e sacarose, e apresentando crescimento nos meios contendo ácido maleico e ácido succínico. O isolado 11080 apresentou o pior resultado, crescendo apenas nos meios que continham as fontes galactose, melibiose e trealose.

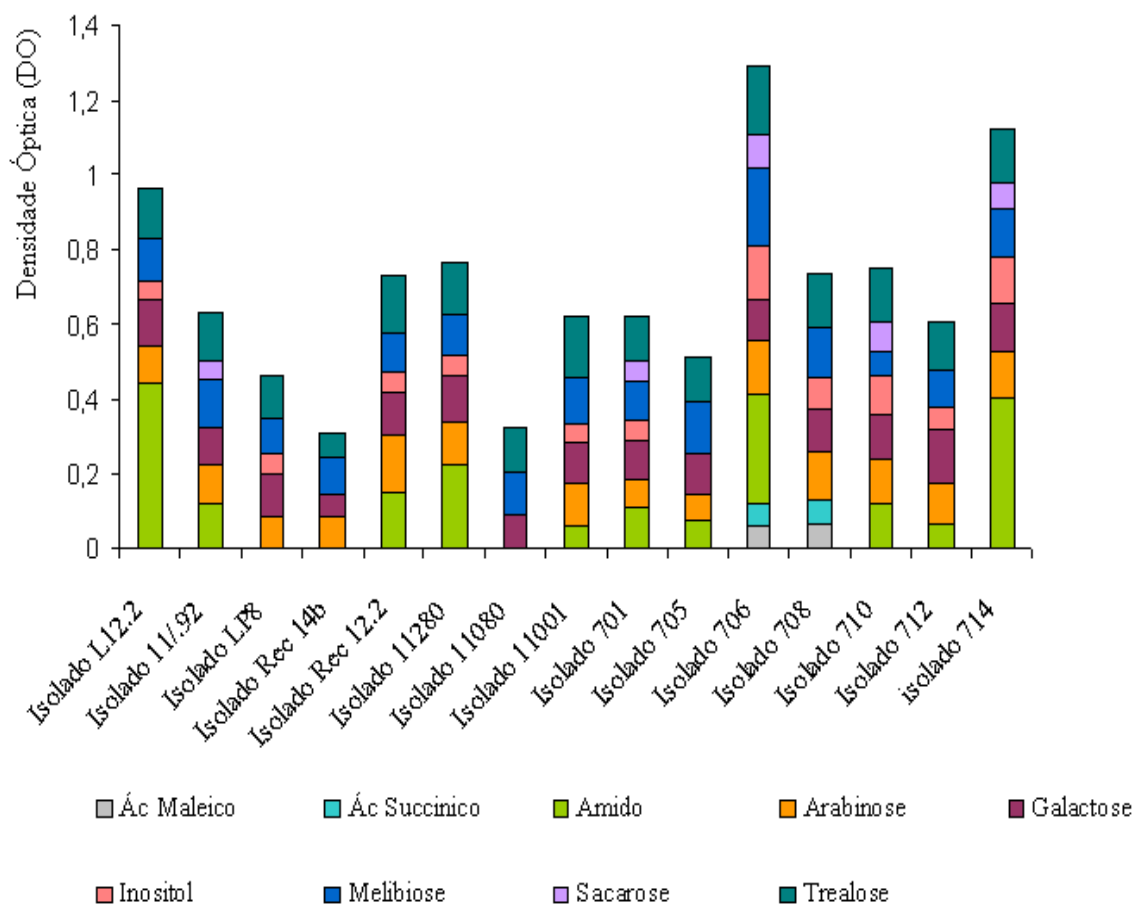


Figura 3. Resposta dos isolados em relação a fonte de carbono no período de 24 h de incubação. UFU, Uberlândia – MG, 2010.

A caracterização nutricional é importante para mostrar a capacidade de adaptação do isolado a diferentes fontes de carbono. Na rizosfera das plantas, devido ao exsudados liberados pelas raízes, existem vários compostos orgânicos, potencialmente energético como glicose, manose, arabinose, frutose e ácidos orgânicos, que servem de fonte de carbono e energia para as bactérias do solo (COMPANT et al., 2010). Assim, o estudo da caracterização nutricional dos isolados certamente irá contribuir nas informações de adaptação de uma determinada estirpe de bactéria como inoculante. Essa caracterização pode ser importante nos estudos das interações planta/microrganismos diazotróficos, os quais necessitam de fonte de carbono potencialmente energético para a fixação de nitrogênio no sistema radicular.

4.4 Cladograma

O cladograma (Figura 4) agrupa os isolados pela sua similaridade. Os resultados obtidos na caracterização bioquímica e nutricional foram usados para agrupar os isolados no dendograma.

Observa-se que os isolados foram separados em dois grupos distintos, com 0% de similaridade, separando os isolados L12.2, Rec12.2, 712, LP8, Rec14b, 705 e 708 dos isolados 11/92, 11280, 11001, 714, 701, 710, 706 e 11080. Os isolados Rec12.2 e L12.2 apresentaram 100% de similaridade, o que indica que se trata do mesmo isolado. Os isolados Rec14b e 705 que apresentaram resultados semelhantes na caracterização bioquímica apresentaram mais de 90% de similaridade, enquanto que o isolado 714 e 11001 (*Azospirillum lipoferum*) também apresentou mais de 90% de similaridade.

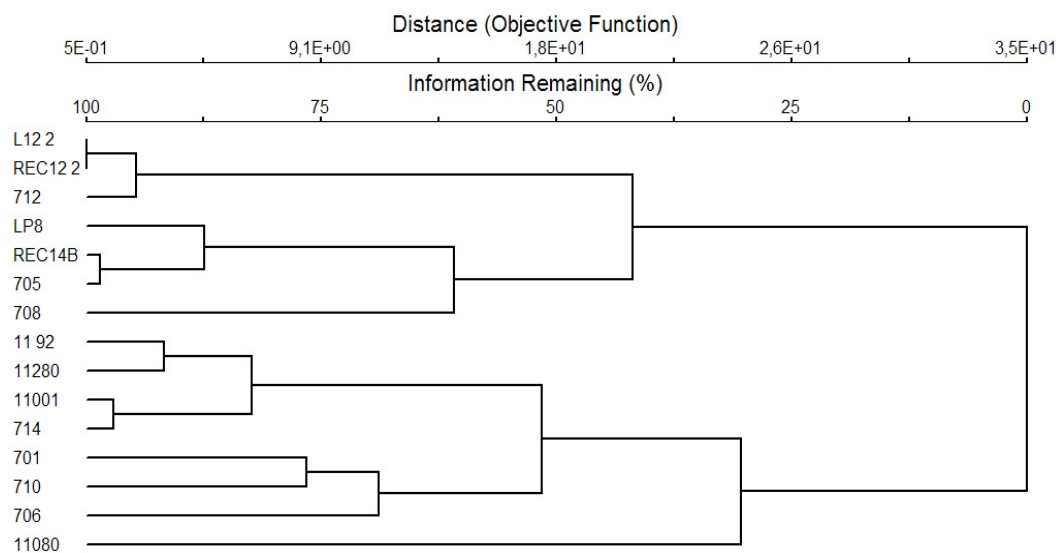


Figura 4. Cladograma de similaridade dos isolados em relação às suas respostas quanto às propriedades bioquímica e nutricionais. UFU, Uberlândia – MG, 2010.

5 CONCLUSÕES

Os isolados estudados apresentaram diferentes perfis bioquímicos, nutricionais e morfológicos, indicando que as raízes do algodoeiro apresentam uma grande variedade de bactérias endofíticas.

Os testes realizados possibilitaram agrupar os isolados quanto à similaridade com os isolados de referência e entre eles.

Pelo cladograma de similaridade conclui-se que os isolados L12.2 e Rec12.2 possuem 100% de similaridade, concluído-se que são os mesmos isolados.

De todos os isolados estudados, o 706 merece destaque devido sua resposta nutricional e separação dos outros isolados no dendograma de similaridade, podendo vir a ser utilizado como inoculante para verificar seu potencial na promoção de crescimento das plantas pela FBN.

REFERÊNCIAS

- BALDANI, I.J.; BALDANI, V.L.D.; MARIN, V.A.; TEIXEIRA K.R.S: **Fixação biológica de nitrogênio: bactérias fixadoras de nitrogênio de importância para a agricultura tropical**, 1999. Disponível em: http://www.cnpab.embrapa.br/publicacoes/fbn_ao_leg.html. Acessado em: 05 de fevereiro de 2010.
- BALDANI, J.I.; CARUSO, L.; BALDANI, V.L.D.; GOI, S.R.; DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v.29, n.5/6, p.911-922, 1997.
- COMPANT, S.; CLÉMENT, C.; SESSITCHH, A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology and Biochemistry*, Amsterdam, v. 42, n.5, p. 669-678, Maio 2010.
- DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Critical Reviews in Plant Sciences*, Boca Raton, v.22, n.2 p.107-149, 2003.
- DÖBEREINER, J.; ALVAHYDO, R. Sobre a influência da cana-de-açúcar na ocorrência de *Beijerinckia* no solo. II-Influência das diversas partes do vegetal. *Revista Brasileira de Biologia*, Rio de Janeiro, v.19, n.4, p.401-412, 1959.
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Itaguaí: Embrapa- CNPAB, 1995, 60p.
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, J.I. Bases científicas para uma agricultura biológica. *Ciência e Cultura*, São Paulo, v.34, n.7, p.869-881, 1982.
- DÖBEREINER, J.; MARRIEL, I.E.; NERY, M. Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v.22, n.10, p.1464-1473, 1976
- DÖBEREINER, J.; RUSCHEL, A.P. Uma nova espécie de *Beijerinckia*. *Revista de Biologia*, Rio de Janeiro, v.1, p.261-272, 1958.
- DÖBEREINER, J.; PEDROSA, F.O. **Nitrogen-fixing bacteria in nonleguminous crop plants**. Madison: Springer-Verlag, 1987. 155p
- 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 (ed). **Biological Nitrogen Fixation**. New York: Chapman and Hall, 1992, p.1-42.

FERREIRA, G.B.; CARVAHO, M.C.S. **Adubação do algodoeiro no cerrado; com resultados de pesquisa em Goiás e Bahia**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2005. (Documentos, N° 138) 47p.

INTERNATIONAL COTTON ADVISORY COMMITTEE. **Cotton: review of world situation**. Washington, USA. v.55, n.3, jan-feb, 2002. 19 p.

MCCUNE, B.; MEFFORD, M.J. **PC-ORD**: multivariate analysis of ecological data, version 4.10. Gleneden Beach: MjM Software Design, 1999.

OKON, Y.; LABANDERA-GONZALEZ, C. A. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.26, p. 1591-1601, 1994.

PASSOS, S.M.G. **Algodão 3**. ed. Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 139p, 1980.

PENG, S.; BISWAS, J.C.; LADHA, J.K. PRASAD, G.; CHEN, Y. Influence of rhizobial inoculation on photosynthesis and grain yield of rice. **Agronomy Journal**, Stanford, n. 94, p. 925 – 929. 2002.

RAO, A.V.; VANKATESWARLU, B. Associative symbiosis of *Azospirillum lipoferum* with dicotyledonous succulent plants of the indian desert. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.28, n.7, p.778-782, 1982.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 906p, 2001.

SAUT, L.A.; LAMAS, F.M.; KURIHARA, C.H.; REIS JÚNIOR, R.A: **Adubação nitrogenada em cobertura na cultura do algodoeiro em sistema de plantio direto**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2002,. (Comunicado Técnico, N°67) 4p.

SIQUEIRA, J. O.; FRANCO, A. A. **Biotecnologia do solo**: fundamentos e perspectivas. Brasília: MEC Ministério da Educação, ABEAS; Lavras: ESAL, FAEPE, 1988. 235p.

SPRENT, J.I.; SPRENT, P. **Nitrogen fixing organisms** 2 ed. London: Chapman and Hall, 256p, 1990.

SUMNER, M.E. Crop responses to *Azospirillum* inoculation. **Advances in Soil Sciences**, New York, v.12, p.54-123, 1990.

VITTI, C.G; HEIRINCHS, R. Formas tradicionais e alternativas de obtenção e utilização do nitrogênio e do enxofre: uma visão holística. In: YAMADA, T; ABDALLA, S.S.R. (ed). **Nitrogênio e enxofre na agricultura brasileira**. Piracicaba-SP: International Plant Nutrition Institute - Brazil, p 109-157, 2007.

ZILLI, J.E.; **Fixação biológica de nitrogênio pode aumentar a competitividade do Agronegócio em RR.**, 2007. Disponível em:
www.floraefauna.com/artigostecnicos/artigo35.doc . Acesso em: 15/03/2010.

ANEXO A - Meios de cultura dos testes bioquímicos utilizados para a caracterização bioquímica.

Testes bioquímicos	Meio de cultura
Citrato Simmons	2 g de citrato de sódio; 1 g de KH_2PO_4 ; 0,2 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 1 g de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$; 5 g de NaCl; 15 mL de azul de bromotimol (solução 0,5% em 0,2M KOH); 1000 mL de água destilada; 20 g de ágar; pH ajustado em 6,8.
Fermentação da glicose	1 g de glicose; 2 g de peptona; 5 g de NaCl; 0,3 g de KH_2PO_4 ; 3 mL de vermelho de metila; 1000 mL de água destilada; 3 g de ágar; pH ajustado em 6,8.
SIM	30 g de peptona; 3 g de extrato de carne; 0,10 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1000 mL de água destilada; 3 g de ágar; pH ajustado em 5,5.
Urease	0,5 g de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$; 0,5 g de K_2HPO_4 ; 0,2 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 5 g de NaCl; 1 g de extrato de levedura; 16 mg de vermelho de cresol; 17 g de ágar; Uréia diluída em água destilada (20 g para 200 mL) e posteriormente filtrada 1000 mL de água destilada pH ajustado em 6,5.
NFB semi-sólido	5 g de ácido málico; 0,5 g de K_2HPO_4 ; 0,2 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,1g de NaCl; 0,02g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$;

continua...

conclusão.

Testes bioquímicos	Meio de cultura
	<p>2mL de solução de micronutrientes (0,04 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 1,2 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,4 g de H_3BO_3; 1 g de $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 1,175 g de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 1000 mL de água destilada);</p> <p>2 mL de azul de bromotimol (solução 0,5% em 0,2N KOH);</p> <p>4mL de FeEDTA (solução 1,64%);</p> <p>1 mL de solução de vitaminas (mg de biotina + 20 mg de piridoxol-HCl);</p> <p>4,5 g de KOH;</p> <p>1000 mL de água destilada;</p> <p>1,75 g a 1,8 g de ágar;</p> <p>pH ajustado para 6,5 – 6,8</p>
LGI semi-sólido	<p>5 g de sacarose ou açúcar cristal;</p> <p>0,6 g de KH_2PO_4;</p> <p>0,2 g de K_2HPO_4;</p> <p>0,2 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$;</p> <p>0,02 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$;</p> <p>0,002 g de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$;</p> <p>5 mL de azul de bromotimol (solução 0,5% em 0,2M KOH);</p> <p>1 mL de solução de vitaminas (10 mg de biotina + 20 mg de piridoxol-HCl);</p> <p>4 mL de FeEDTA (solução 1,64%);</p> <p>1000 mL de água destilada;</p> <p>1,75 g ágar para meio semi-sólido;</p> <p>pH ajustado em 6,0 - 6,2.</p>

Fonte: DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Itaguaí: Embrapa- CNPAB, 1995, 60p.