

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

JOICE APARECIDA DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO ORGÂNICO
POR ACIDOBACTERIA AB23 E AB60**

Patos de Minas - MG

2026

JOICE APARECIDA DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO ORGÂNICO
POR ACIDOBACTERIA AB23 E AB60**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Instituto de Biotecnologia da Universidade
Federal de Uberlândia como requisito parcial
para obtenção do título de bacharel em
Biotecnologia.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dra. Cristine Chaves Barreto

Patos de Minas - MG

2026

JOICE APARECIDA DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO ORGÂNICO
POR ACIDOBACTERIA AB23 E AB60**

Monografia apresentada ao Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia como requisito final para obtenção do título de bacharel em Biotecnologia.

Área de concentração: Microbiologia

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Cristine Chaves Barreto – UFU campus Patos de Minas
Presidente

Maria Wanna Figueiredo Sena Macedo – UCB
Membro

Kamila Barros Lima de Oliveira
Membro

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa que se encontra no Sistema Eletrônico de Informações (SEI) da Universidade Federal de Uberlândia.

Patos de Minas, julho de 2026

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais por sempre me instruírem que a educação é o melhor caminho, por apoiarem os meus sonhos e os tornarem possíveis. Aos meus irmãos, Dieisson e Yasmin, por me incentivarem e estarem ao meu lado quando as coisas ficavam difíceis. À minha cunhada Daiane e meus tios Susana e Tobias, por sempre acreditarem em mim e confiarem de que eu sou capaz. Não chegaria em lugar algum sem a minha família, e meu amor e gratidão são infinitos.

Ao meu namorado, Marco Antônio, que me acompanhou desde o início, segurando a minha mão nos momentos bons e ruins, e por iluminar minha vida, deixando tudo mais leve e feliz. Às minhas amigas Laura e Eduarda, e a todos os amigos que fiz durante a graduação, por dividirem essa experiência comigo e pela parceria tão especial.

À minha orientadora, Cristine, que me deu a oportunidade de realizar este projeto e de viver a pesquisa durante a graduação. Sou grata por todos os ensinamentos, pela paciência e pelo companheirismo. Ao grupo de pesquisa MicroCer, que me transmitiu tantos ensinamentos dentro do laboratório e me auxiliaram ao longo deste trabalho. À Carla, por toda a ajuda no laboratório e por tantas conversas e risadas.

Agradeço ao CNPq, pela concessão da bolsa que permitiu a minha dedicação à este trabalho.

Por fim, mas o mais importante, sou grata a Deus por ter me permitido chegar até aqui, por ter guiado meus passos e sempre estar comigo. Tudo que sou e tudo que faço é graças à Ele, e agradeço imensamente por essa realização.

RESUMO

O fósforo é o segundo macronutriente mais importante para as plantas, estando associado a vários processos biológicos, mas a sua disponibilidade em forma solúvel no solo é reduzida pela sua grande capacidade de quelar outros minerais. Uma maneira sustentável de fornecer fósforo solúvel pelas plantas é através dos microrganismos solubilizadores de fosfato, que possuem mecanismos que transformam o fósforo insolúvel, como é o exemplo da liberação de enzimas fosfatases. Essas enzimas possuem um subgrupo chamado fitases, que realizam o processo de solubilização utilizando como substrato o fitato, uma forma de fósforo orgânico amplamente presente no solo. *Acidobacteria* é um filo descoberto recentemente, presentes em grande quantidade em solos do Cerrado, e a hipótese deste trabalho é que as cepas AB23 e AB60, isoladas desses solos, participem da ciclagem de fósforo por meio da solubilização de fitato através da liberação de fitases. Para isso, as cepas foram cultivadas em meio de cultura VL-55 padrão, sem fósforo e com fitato como fonte de fósforo, utilizando diluições seriadas para análises. Adicionalmente, foi utilizado meio Pikovskaya modificado com fitato, para avaliar a formação de halo de solubilização. As análises estatísticas mostraram que ambas as cepas tiveram crescimento estatisticamente menor em meio com fitato que os seus controles positivos, mas a AB23 teve crescimento maior que o meio sem fósforo, enquanto a AB60 teve crescimento estatisticamente equivalente. Nenhuma das cepas apresentaram crescimento no meio Pikovskaya em nenhuma das concentrações de fitato. O presente estudo demonstrou que as cepas AB60 e AB23 possuem capacidade de solubilizar fósforo orgânico na forma de fitato, a presença de atividade enzimática de fitases necessita de comprovação em futuros experimentos. Os resultados apresentados indicam a participação das duas cepas de *Acidobacteria* na ciclagem de fósforo em solos do Cerrado, e potencial para sua utilização como bioinsumos para disponibilização de fósforo para as plantas.

Palavras-chave: Cerrado; bactéria de solo; fitato.

ABSTRACT

Phosphorus is the second most important macronutrient for plants, being associated with several biological processes, but its availability in soluble form in the soil is reduced due to its great capacity to chelate other minerals. A sustainable way to provide soluble phosphorus to plants is through phosphate-solubilizing microorganisms, which possess mechanisms that transform insoluble phosphorus, such as the release of phosphatase enzymes. These enzymes have a subgroup called phytases, which perform the solubilization process using phytate as a substrate, a form of organic phosphorus widely present in the soil. Acidobacteria is a recently discovered phylum, present in large quantities in Cerrado soils, and the hypothesis of this work is that the AB23 and AB60 strains, isolated from these soils, participate in phosphorus cycling through phytate solubilization by the release of phytases. For this purpose, the strains were cultivated in standard VL-55 culture medium, phosphorus-free medium, and medium containing phytate as a phosphorus source, using serial dilutions for statistical analyses of bacterial growth by colony-forming unit counts. During the work, modifications were made to the experiment to improve the results obtained. Additionally, both strains were also cultivated in modified Pikovskaya medium containing phytate, in order to evaluate the presence of phytases through the formation of a solubilization halo. After cultivation and growth for 4 weeks at 28°C under the presence of light, following the changes made to the methodology, strain AB23 showed growth up to 10^{-8} in the standard medium, 10^{-6} in the modified medium, and 10^{-8} in the negative control, with subsequent cell death. Strain AB60 showed growth up to dilution 10^{-7} in the positive control, 10^{-4} in the modified medium, and 10^{-5} in the negative control. Statistical analyses showed that both strains had statistically lower growth than their positive controls, but AB23 had higher growth than the phosphorus-free medium, while AB60 had statistically equivalent growth. Neither strain showed growth in Pikovskaya medium at any of the phytate concentrations. The present study demonstrated the need for further future experiments to confirm the results regarding strain AB60, and that AB23 has the capacity to solubilize organic phosphorus in the form of phytate, indicating its participation in phosphorus cycling in Cerrado soils and its potential use as a bioinput to make phosphorus available to plants.

Keywords: Acidobacteria; phytate, solubilization.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	7
1.1 Referencial Teórico	8
1.1.1 Fósforo no solo.....	8
1.1.2 Estrutura e importância do fitato.....	9
1.1.3 Enzimas fosfatases e fitases	9
1.1.4 Acidobactérias como disponibilizadoras de fosfato em solos do Cerrado.....	10
1.1.5 Bioinsumos para agricultura	11
1.2 Hipótese.....	11
2 OBJETIVOS	11
2.1 Objetivo Geral.....	11
2.2 Objetivos Específicos	11
3 METODOLOGIA.....	12
3.1 Microrganismos utilizados	12
3.2 Meios de cultura VL-55	12
3.3 Análise qualitativa	13
3.4 Avaliação do crescimento por contagem de colônias viáveis	13
3.5 Análises estatísticas	13
3.6 Avaliação da produção de fitases.....	14
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
5 CONCLUSÃO.....	21
REFERÊNCIAS	23
ANEXOS	27
Anexo A.....	27

1 INTRODUÇÃO

O fósforo (P) é um dos elementos mais dispersos pela natureza apresentando um importante papel nos processos biológicos, sendo muito requerido pelas plantas por ser essencial durante a fotossíntese, floração, frutificação e maturação (RIZWANUDDIN, *et al.*, 2023). Por outro lado, é um dos macronutrientes menos abundantes na Terra e a sua disponibilidade no solo é afetada pela sua reatividade com elementos inorgânicos como cálcio (Ca), Alumínio (Al), Magnésio (Mg) e Ferro (Fe) (CHAGAS, *et al.*, 2010).

A deficiência de P no solo é resolvida convencionalmente através de fertilizantes fosfatados, que são obtidos pela extração de rochas fosfáticas. No entanto, esse método apresenta problemas, como o fato dessas rochas se apresentarem em reservas limitadas, sendo assim uma fonte não renovável (SOUMARE; *et al.*, 2020). Dessa forma, tem-se a necessidade de encontrar maneiras mais sustentáveis e eficientes para fazer com que o fósforo chegue em quantidades suficientes nas plantas.

Existem microrganismos que possuem papéis fundamentais na absorção de nutrientes para as plantas por meio de diferentes mecanismos. Um exemplo são os chamados microrganismos solubilizadores de fosfato (PSM, do inglês *Phosphate Solubilizing Microorganisms*) que têm a capacidade de transformar formas orgânicas e inorgânicas de fósforo do solo em formas disponíveis para o uso de plantas. Alguns exemplos de PSMs são *Escherichia coli*, *Penicillium sp.* e *Saccharomyces cerevisiae* (SHARMA, *et al.*; 2013; SUN, *et al.*; 2026).

As Acidobacterias pertencem a um filo que foi reconhecido recentemente (KIELAK, *et al.*, 2016) e que estão distribuídas em diversos ecossistemas, sendo naturalmente abundantes em solos do Cerrado, que são caracterizados pela sua acidez, baixa fertilidade e baixa quantidade de fósforo disponível. São bactérias de difícil cultivo, portanto ainda não existem muitas informações sobre seus papéis biológicos e possíveis utilizações. Estudos realizados por Alves (2018) utilizando análises genômicas e testes colorimétricos API-ZYM® demonstraram a presença de genes de enzimas fosfatases ácidas e alcalinas em Acidobacteria AB23, que estão envolvidas na disponibilização de fosfato para as plantas.

As fitases são um grupo específico de fosfatases que catalisam a hidrólise de grupos fosfatos ligados ao fitato (PALACIOS; *et al.*, 2005), uma forma de fosfato orgânico, sendo assim fundamentais no processo de solubilização desse nutriente. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade das acidobacterias AB23 e AB60 de solubilizar fosfato orgânico

por meio da liberação de enzimas fitases, sugerindo a sua importância na ciclagem de fósforo em solos do Cerrado.

1.1 Referencial Teórico

1.1.1 Fósforo no solo

Depois do nitrogênio, o fósforo é o segundo macronutriente mais importante para as plantas. Ele é um dos componentes do ATP e ADP, que fazem o armazenamento e transferência de energia necessária para processos metabólicos como fotossíntese e respiração celular. Além disso, o fósforo é um dos constituintes dos ácidos nucleicos, sendo fundamental a sua presença em quantidades suficientes para que ocorra a divisão celular e desenvolvimento dos tecidos (ELHAISSOUFI; *et al*, 2023). A deficiência P em plantas pode resultar em crescimento lento, caules atrofiados e atrasos na floração e frutificação.

No solo, o P está presente em quantidades muito baixas e é submetido a diversos processos biogeoquímicos que afetam a sua disponibilidade. Ele ocorre em formas orgânicas (P_o) e inorgânicas (P_i), e menos de 1% da sua fração total está disponível em seu formato solúvel (HP ; *et al*, 2023). O P_i constitui a maior parte de fósforo no solo e se encontra precipitado com ferro, alumínio ou cálcio; enquanto o P_o é oriundo de matéria orgânica de animais, vegetais e da biomassa bacteriana (PEREIRA; COSTA; CARVALHO, 2021).

Quanto mais ácidos são os solos, maior é a solubilidade dos hidróxidos livres de ferro e alumínio, sendo maior a probabilidade de precipitação de P, formando compostos insolúveis como fosfato de ferro ($FePO_4$) e fosfato de alumínio ($AlPO_4$) (KORNDORFER; SOUSA, 2010). Esse processo é observado em solos do Cerrado brasileiro, que são caracterizados pelo baixo pH e resultam em sua baixa quantidade de fósforo disponível.

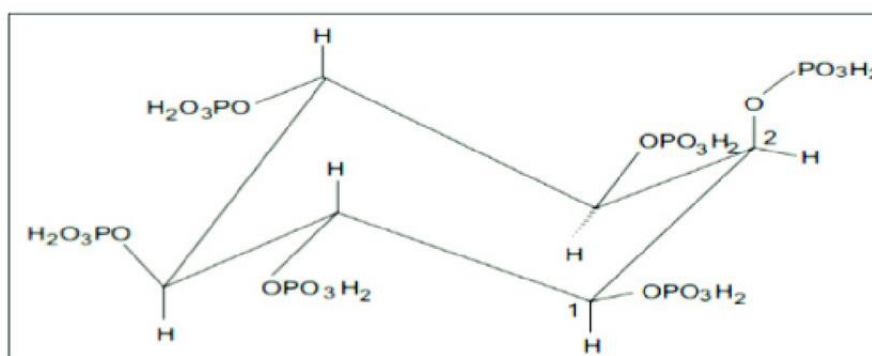
Uma maneira de aumentar a quantidade de P solúvel no solo é a partir da utilização dos microrganismos solubilizadores de P (PSMs), que têm a capacidade de transformar as suas formas insolúveis. Eles podem funcionar como biofertilizantes por meio da sua inoculação em plantas, auxiliando no seu desenvolvimento e crescimento.

1.1.2 Estrutura e importância do fitato

Também conhecido como ácido fítico, o fitato é uma forma de fosfato orgânico encontrado amplamente nos solos. São a principal forma de reserva de fósforo nas plantas e apresenta-se em grandes quantidades em cereais, sementes oleaginosas e legumes. Pode ser derivado tanto de matérias orgânicas de vegetais e de esterco de animais monogástricos, quanto proveniente da conversão microbiana do P_i do solo. A sua estrutura química é formada por um anel de inositol ligado a seis grupos de fosfato, que lhe confere uma grande capacidade de quelar minerais como ferro, zinco, cálcio e magnésio (Figura 1). Pode ser considerado um antinutriente, já que esses complexos fitato-mineral reduzem a biodisponibilidade de ambos.

Para que o fitato consiga contribuir para a nutrição das plantas pela disponibilidade de fósforo, ele primeiro precisa ser desfosforilado por meio de hidrólise mediada pelas enzimas fitases (RIZWANUDDIN, *et al.*, 2023).

Figura 1: Estrutura química do fitato



Fonte: Tsao, Zheng e Lu, 1997

1.1.3 Enzimas fosfatases e fitases

As fosfatases são enzimas produzidas por raízes de plantas ou por microrganismos, as quais têm um grande papel na transformação de compostos orgânicos de fósforo presentes nos solos em formas assimiláveis pelas plantas. Elas formam um amplo grupo de enzimas onde sua função é remover grupos fosfatos de diferentes moléculas, e são divididas de acordo com o pH ótimo que apresentam: ácidas ou alcalinas. Essas enzimas também podem ser subdivididas pelo substratos específicos, como é o caso das fitases, que usam o fitato como substrato para suas reações (VILELA, 2019).

Nas plantas, as enzimas fitases são naturalmente produzidas durante a germinação de sementes e podem ser encontradas principalmente em ervilhas, trigo e cevada. As fitases de origem bacteriana desempenham um papel fundamental no processo de ciclagem de fósforo do solo (TIMOFEEVA; GALYAMOVA; SEDYKH, 2022). Alguns microrganismos produtores de fitases são *Escherichia coli*, *Penicillium sp.* e *Saccharomyces cerevisiae*.

As bactérias secretam fitases no meio extracelular quando há escassez de fósforo solúvel no ambiente. Elas então catalisam a hidrólise das ligações fosfoéster dos fitatos de forma gradual, liberando fósforo inorgânico solúvel, compostos intermediários como o inositol e os minerais quelados.

A utilização de PSMs contendo essas enzimas oferecem uma alternativa sustentável para a disponibilização de fósforo disponível para as plantas em relação aos fertilizantes fosfatados, que possuem baixa eficiência de absorção, custos elevados e são obtidos de fontes não renováveis. (SILVA, 2023).

Os mecanismos utilizados pelos microrganismos para transformação de fósforo insolúvel em formas disponíveis são divididos pelos termos solubilização e mineralização. A mineralização ocorre quando são utilizados fosfatos orgânicos por enzimas, como as fosfatases. Já a solubilização acontece quando são usados fosfatos inorgânicos, geralmente por meio da liberação de ácidos orgânicos (PAN, CAI; 2023). O termo frequentemente utilizado na literatura para se referir aos PSMs é a solubilização (ALORI, GLICK, BABALOLA; 2017), o qual foi utilizado durante o trabalho para representar, de forma geral, o aumento da disponibilidade de fósforo no solo pela ação dos microrganismos.

1.1.4 Acidobactérias como disponibilizadoras de fosfato em solos do Cerrado

Acidobacteria é um dos filos mais abundantes do solo. Abordagens utilizando o gene do RNAr 16S e análises metagenômicas demonstraram que esse filo é altamente diverso e se apresenta em vários habitats diferentes pelo planeta (KALAM, 2020). São recalcitrantes ao cultivo em laboratório e oligotróficas, o que justifica o pouco conhecimento existente acerca dos seus papéis biogeoquímicos. Uma importante característica observada em algumas espécies, como a AB23, AB60 e outras acidobacterias como a *Occallatibacter savannae* é a capacidade de produção de carotenoides, que são pigmentos vermelhos ou alaranjados com a função de aumentar a sua adaptabilidade, usados nesse contexto pelas acidobacterias para se proteger de estresse oxidativo causado pela luz (PINTO, 2021). O sequenciamento do genoma e metagenoma das acidobacterias revelou a presença de vários genes responsáveis pela

regulação de diversas funções fisiológicas e metabólicas, relacionando a sua presença com solos de baixos valores de pH (entre 3,0 e 6,5) (KALAM; *et al*, 2020) justificando sua alta abundância em solos do Cerrado.

Estudos anteriores mostraram que a cepa AB23 não possui capacidade de solubilizar fosfato inorgânico usando $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (RODRIGUES,2020; ALVES, 2018) mas análise do seu genoma, indicou a presença de genes de enzimas fosfatases ácidas e alcalinas, as quais realizam processos de solubilização de fosfatos orgânicos e sugerem a possibilidade de utilização desses microrganismos como bioinsumos. Apesar disso, a presença de tais enzimas em acidobacterias ainda não foi comprovada experimentalmente.

1.1.5 Bioinsumos para agricultura

Os bioinsumos, também chamados de produtos biológicos, são desenvolvidos a partir de organismos vivos, como microrganismos, insetos ou plantas. Eles são utilizados para melhorar a produção agrícola, se mostrando uma alternativa mais sustentável do que alguns métodos convencionais (VIDAL; DIAS, 2023). Alguns exemplos desses produtos são os biofertilizantes, biopesticidas e bioinoculantes.

Os PSMs podem ser utilizados como bioinsumos, funcionando como inoculantes adicionados ao solo ou às sementes para disponibilizar fósforo solúvel para as plantas e estimular o seu crescimento. Os principais PSMs usados são *Bacillus subtilis*, que solubiliza fosfatos por meio da produção de ácidos orgânicos, e *Bacillus megaterium*, eficaz na liberação de fósforo de compostos insolúveis como fosfato de cálcio (ZUTTER; *et al*, 2022).

A presente pesquisa visa avaliar o potencial de uso de acidobacterias AB23 e AB60 como bioinsumos, auxiliando no crescimento das plantas através do fornecimento de fósforo solúvel. Dessa forma, esse estudo se encaixa com vários Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS), como a ODS 2 – Fome Zero e Agricultura Sustentável.

1.2 Hipótese

Acidobacterias AB23 e AB60 são capazes de solubilizar fosfato orgânico.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a capacidade de solubilização de fosfato orgânico pelas Acidobacterias AB23 e AB60.

2.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar a solubilização de fósforo orgânico através de Meio VL-55 modificado com fitato pelas cepas AB23 e AB60;
- b) Avaliar a produção de enzimas fitases por produção de halo de solubilização.

3 METODOLOGIA

3.1 Microrganismos utilizados

O trabalho foi realizado utilizando as acidobacterias AB23 e AB60, cepas isoladas no Cerrado (DE CASTRO et al., 2013) e mantidas em laboratório em meio de cultura VL-55 pelo grupo de pesquisa MicroCer da Universidade Federal de Uberlândia, Patos de Minas, liderado pela Profa. Dra. Cristine Chaves Barreto.

3.2 Meios de cultura VL-55

A avaliação da viabilidade de crescimento dos microrganismos foi feita por meio de um controle positivo, utilizando o meio de cultura-VL-55 (SAIT; HUGENHOLTZ; JANSSEN, 2002), um meio quimicamente definido que é normalmente usado para bactérias de difícil cultivo, como é o caso das acidobacterias. A composição por litro desse meio incluiu MES (3,9 g), MgSO_4 (0,4 mM), CaCl_2 (0,6 mM), $(\text{NH}_4)\text{HPO}_3$ (0,4 mM), solução de elementos traço (2 mL) (Anexo A), solução de tungstato/selenito (20 μL) (Anexo A), lactose 0,05%, solução de vitaminas (200 μL) (Anexo A) e ágar nobre (1,5%) como agente solidificante. O pH foi ajustado para 5,5.

Foram realizadas modificações com o objetivo de avaliar a solubilização de fosfato. A primeira alteração consistiu em acrescentar ácido fítico: $\text{C}_6\text{H}_{18}\text{O}_{24}\text{P}_6$ (PALACIOS *et al.*, 2004) como fonte de fosfato orgânico e retirar $(\text{NH}_4)\text{HPO}_3$ para que o único fósforo disponível no meio seja o presente no ácido fítico. A fonte de nitrogênio também foi substituída de $(\text{NH}_4)\text{HPO}_3$ para $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Dessa forma, a composição final do meio modificado, por litro, foi MES (3,9 g), MgSO_4 (0,4 mM), CaCl_2 (0,6 mM), $\text{C}_6\text{H}_{18}\text{O}_{24}\text{P}_6$ (0,650 g), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,4 mM), solução de elementos traço (2 mL), solução de tungstato/selenito (20 μL), lactose 0,05%, solução de vitaminas (200 μL) e agente solidificante ágar nobre (1,5 %). A quantidade de ácido fítico utilizada foi calculada baseada na concentração molar de fósforo presente no meio original, de forma que permanecesse a mesma apesar de serem usadas fontes diferentes. O pH foi ajustado em 5,5.

3.3 Análise qualitativa

Inicialmente foi realizada uma análise qualitativa para teste de solubilização, utilizando dois meios de VL-55 padrão e VL-55 modificado com fitato. O inóculo foi feito usando bactérias retiradas de um inóculo prévio, em meio VL-55 padrão, somente da cepa AB23, sem diluição e com solução de lavagem padrão – com os mesmos sais minerais do meio VL-55 -, e adicionando 4 gotas de 20 µL em cada placa, sendo feitas triplicatas de ambos os tratamentos. Elas foram incubadas a 28 °C durante 4 semanas sob a presença de luz constante.

3.4 Avaliação do crescimento por contagem de colônias viáveis

O inóculo foi preparado por meio de diluições seriadas. A suspensão de células das acidobactérias AB23 e AB60 foi preparada utilizando-se colônias de uma placa de VL-55 por meio de adição de 1 mL de solução de sais do meio VL-55 e raspando-se as colônias com uma alça de platina. As células suspensas foram adicionadas em um microtubo eppendorf de 1,5 mL. Essa suspensão de células bacterianas foi agitada em vórtex por 1 minuto e centrifugada por 7 minutos a 10.000 x G. O sobrenadante foi retirado deixando as células no fundo do microtubo. A seguir, 1 mL de solução de sais foi adicionado e o procedimento repetido, completando duas lavagens para remoção de resquícios do meio de cultura. Por fim as células foram ressuspensas em 1 mL de solução de sais e diluições seriadas de 1:10 foram realizadas até a diluição de 10^{-8} . Cada diluição foi realizada da seguinte forma: cada tubo conteve 900 µL de solução de sais e 100 µL da suspensão inicial foi adicionada ao primeiro microtubo (diluição 10^{-1}) e após ser levado ao vórtex, 100 µL foram adicionados ao microtubo seguinte (diluição 10^{-2}). Esse procedimento se repetiu até a diluição 10^{-8} .

As placas com diferentes tratamentos do VL-55 foram divididas em 8 setores e cada uma foi feita a inoculação com 3 gotas de 20 µL das respectivas diluições. O crescimento das bactérias foi avaliado pelo surgimento de colônias depois de 4 semanas de crescimento, mantidas a 28 °C e sob a presença de luz constante. Esse teste foi realizado em triplicata.

3.5 Análises estatísticas

As diluições em que foram observados número de colônias entre 2 e 20 foram utilizadas para a contagem e obtenção da média e desvio padrão, e a avaliação foi feita por teste de ANOVA. Essas análises foram realizadas no software GraphPrism.

Para que os dados fossem expressos em UFC/mL, as colônias contadas foram aplicadas na seguinte fórmula:

$$UFC/mL = \frac{\text{Número de colônias} \times \text{Fator de diluição}}{\text{Volume (mL)}}$$

3.6 Avaliação de produção de fitase

Para avaliar a produção das enzimas fitases pela bactéria foi utilizado o meio de cultura Pikovskaya (PIKOVSKAYA, 1948), que é comumente utilizado para selecionar microrganismos solubilizadores de fosfato por meio de formação de halo de solubilização ao redor da colônia. A composição utilizada foi (NH₄)₂SO₄ (0,5 g/L), NaCl (0,2 g/L), KCl (0,2 g/L), MgSO₄.7H₂O (0,1 g/L), MnSO₄ (0,001 g/L), CaCl₂.2H₂O (2,94 g/L), MgCl.6H₂O (1,9 g/L), glicose (10 g/L), ágar nobre (15 g/L) e a fonte de fósforo foi modificada para ácido fítico (5 g/L). O pH foi ajustado para 5,5, e foi realizado em triplicata.

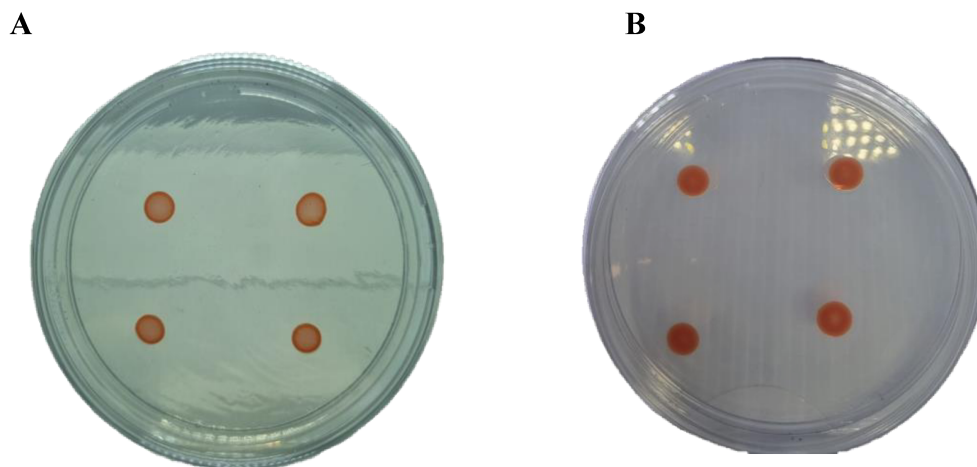
A inoculação foi feita utilizando uma suspensão de células das acidobacterias AB23 e AB60 lavadas com solução de sais de VL-55 modificada sem fonte de fósforo e adicionando 30 µL da suspensão no centro de cada placa. A produção de fitase foi avaliada pela formação de halo de solubilização ao redor da colônia após 4 semanas de crescimento a 28 °C, e sob a presença de luz constante.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a incubação das placas inoculadas com AB23 para teste qualitativo, foi observado crescimento no controle positivo (Figura 2A) em meio contendo (NH₄)HPO₃ como única fonte de nitrogênio, como era esperado (OLIVEIRA, 2023), e crescimento semelhante no meio de fitato (Figura 2B). Dessa forma, conclui-se que a acidobactéria AB23 conseguiu utilizar o ácido fítico como fonte de fósforo para o seu crescimento e desenvolvimento, assim como o fosfato de amônio.

Esse resultado vai de acordo com a expectativa, já que anteriormente foi identificado por análises genômicas e testes colorimétricos, a presença de duas sequências que codificam enzimas fosfatases ácidas, além do gene *phoD*, referente à fosfatases alcalinas (ALVES, 2018).

Figura 2. Análise qualitativa de utilização de fitato em meio VL-55 por AB23. A) Controle positivo contendo fosfato B) Meio contendo fitato.

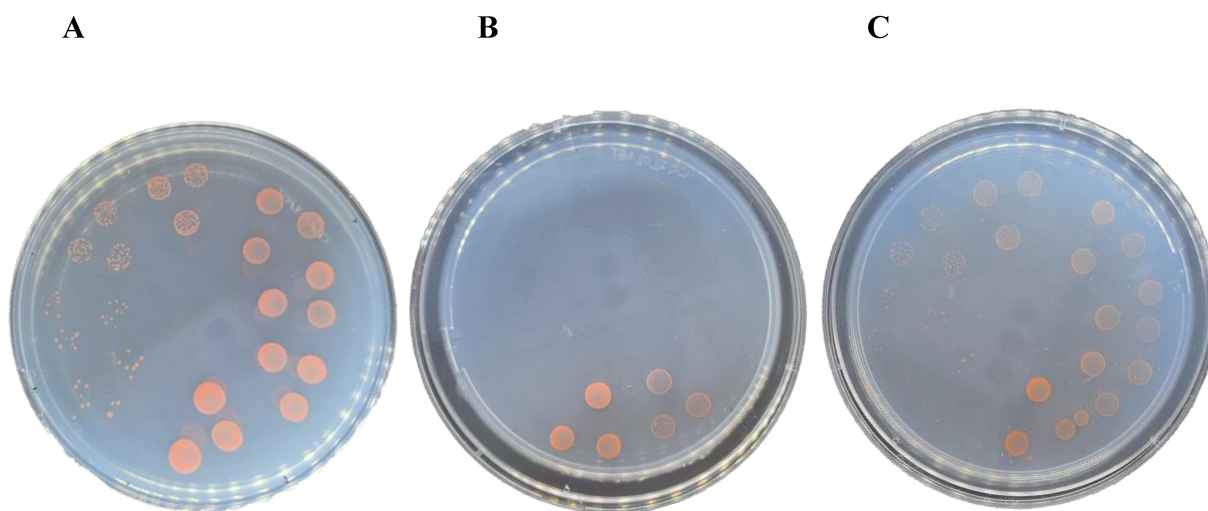


Fonte: a autora

Na primeira análise semiquantitativa realizada (Figura 3), utilizando as três variações do meio de cultura VL-55, houve crescimento até a diluição 10^{-8} dos controles positivo e negativo, que não possuía nenhuma fonte de fósforo, e no meio modificado observou-se crescimento apenas até a diluição 10^{-2} . O pouco crescimento no meio de fitato sugeriu que a concentração de ácido fítico utilizada poderia ser alta e oferecer toxicidade à bactéria, visto que fósforo em excesso no meio pode causar desequilíbrios no metabolismo bacteriano e diminuir a viabilidade celular (BRUNA, et al., 2021). Dessa maneira, a concentração de fitato foi alterada de 0,650 g para 0,044 g/L, valor que fornece a mesma concentração molar de fósforo que o $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, fonte utilizada no meio VL-55 padrão.

Outra hipótese levantada a partir dos resultados obtidos, foi que a acidobactéria AB23 poderia ter reservas de fósforo em suas células (VULLA, et al., 2025), as quais teriam sido usadas no meio de controle negativo e explicaria o seu crescimento equiparável ao controle positivo. Para contornar esse problema, o inóculo dos experimentos seguintes foi feito utilizando as células do controle negativo, com o objetivo de esgotar essa reserva ao longo das passagens.

Figura 3. Análise semiquantitativa de solubilização de fitato em VL-55 por AB23. A) controle positivo, B) meio de fitato a 0,650 g/L e C) controle negativo.

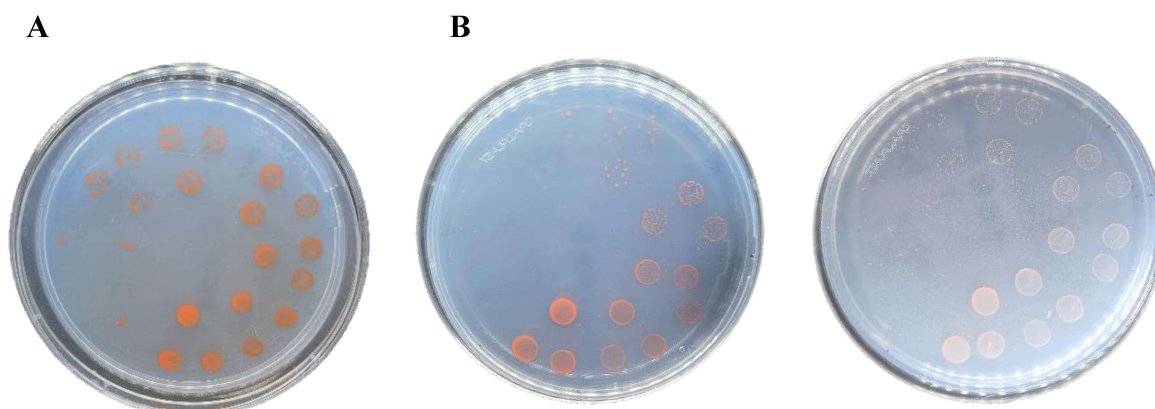


Fonte: a autora

Os resultados em meio VL-55 contendo uma menor concentração de fitato, revelou crescimento nas placas de meio VL-55 modificadas aumentou para a diluição 10^{-6} (Figura 4C), confirmando que o excesso de fósforo havia sido limitante para o crescimento da bactéria no experimento anterior. O fitato, por ser um composto com alta capacidade de quelar minerais, quando em excesso no meio pode se associar com os minerais adicionados para uso da bactéria, como o caso do cálcio e ferro, fazendo com que a bactéria perca o acesso à tais nutrientes e ao fósforo, prejudicando o seu desenvolvimento (ABDULWALIYU, et al; 2019). A quantidade de colônias no controle positivo permaneceu a mesma (Figura 4A), o que também ocorreu no controle negativo (Figura 4B).

A solução de sais utilizada para lavar as células contém todos os sais minerais presentes no meio de cultura VL-55, o que inclui $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. Pensando que as células poderiam estar armazenando o fósforo contido na solução de lavagem e o utilizando no seu desenvolvimento, foi feita uma nova solução de sais modificada, substituindo o sulfato de amônio por fitato, na concentração 0,044 g/L.

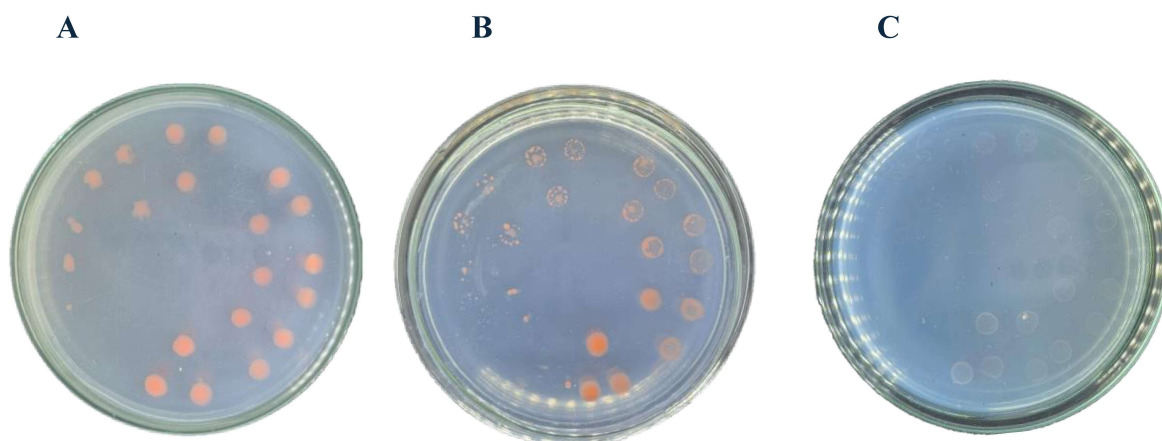
Figura 4. Análise semiquantitativa de solubilização de fitato em VL-55 por AB23. A) controle positivo, B) meio de fitato a 0,044 g/L e C) controle negativo.



Fonte: a autora

Após as modificações na concentração de fitato e na solução de sais, e duas passagens utilizando células do controle negativo do experimento anterior, observou-se o crescimento de colônias no meio sem fontes de fósforo até a diluição 10^{-6} e posterior morte das células. Os carotenoides produzidos pela cepa AB23 estão associados à mecanismos de adaptabilidade para sua sobrevivência quando cultivada em presença de luz, como é o caso do presente experimento (PINTO, 2021), característica que não é apresentada na Figura 5C, indicando a morte das células. A bactéria provavelmente utilizou o restante das suas reservas nutricionais para o seu crescimento, mas ao se esgotarem, não permitiram a sua sobrevivência. O crescimento do controle positivo permaneceu o mesmo, e no meio de fitato houve um aumento de crescimento para 10^{-8} (Figura 5B).

Figura 5. Análise semiquantitativa de solubilização de fitato em VL-55 por AB23. A) controle positivo, B) meio de fitato a 0,044 g/L e C) controle negativo. Células lavadas com solução salina sem fósforo.

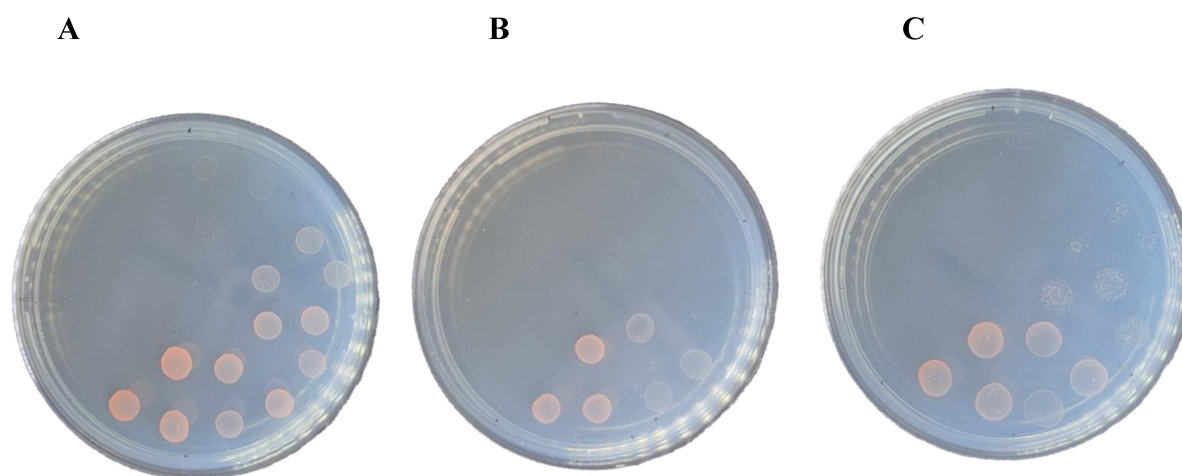


Fonte: a autora

A mudança na quantidade de ácido fítico adicionado ao meio foi benéfico para o seu crescimento, promovendo uma mudança de crescimento na diluição de 10^{-2} para diluição de 10^{-8} , mostrando que excesso de fitato no meio é desfavorável para a bactéria e que o uso da quantidade ideal otimiza o seu crescimento (AUSTIN, MAYER; 2020). O controle negativo, após as modificações realizadas durante o trabalho, permaneceu apresentando crescimento, mas com a morte subsequente das células após o esgotamento das suas reservas de fósforo evidenciada pela perda de carotenoides. Um fator que pode ter colaborado para o desenvolvimento inicial das células no controle negativo é a adição das soluções de vitaminas (Anexo A) no meio VL-55, que possui vitamina B12 e apresenta um átomo de fósforo na sua composição. Algumas bactérias têm capacidade de degradar vitamina B12 e reutilizar os seus componentes (MA, TYRELL, BELD; 2019), o que levanta a hipótese de que isso também possa ser feito pela AB23, utilizando do fósforo presente na sua estrutura. Apesar de ser uma quantidade muito baixa em relação à comumente utilizada no cultivo de acidobactérias, a sua característica oligotrófica faz com que esse filo seja adaptado para crescer em ambientes muito pobres em nutrientes (EICHORST, et al.; 2018). Dessa forma, a bactéria poderia ter priorizado o uso desse fósforo e o de suas reservas para a manutenção de funções essenciais, o qual não teria sido suficiente para a manutenção do seu metabolismo, levando à sua morte.

A acidobactéria AB60 foi cultivada em VL-55 já utilizando a solução de sais sem fósforo, e realizando uma passagem através do controle negativo anterior. O controle positivo confirmou a viabilidade da bactéria apresentando crescimento até a diluição 10^{-7} , já o meio modificado com fitato demonstrou crescimento até 10^{-4} e no controle negativo até 10^{-5} . Tendo em vista que foi realizada somente uma passagem da bactéria, isso poderia ter sido insuficiente para o esgotamento das suas reservas nutricionais, justificando o seu crescimento. Apesar de pouco, a AB60 também foi capaz de crescer em meio com fitato como fonte de fósforo para o seu crescimento, sugerindo a liberação de enzimas fitases para realizar a solubilização desse composto (Figura 6A).

Figura 6. Análise semiquantitativa de solubilização de fitato em VL-55 por AB60. A) controle positivo, B) meio de fitato a 0,044 g/L e C) controle negativo. Células lavadas com solução salina sem fósforo.



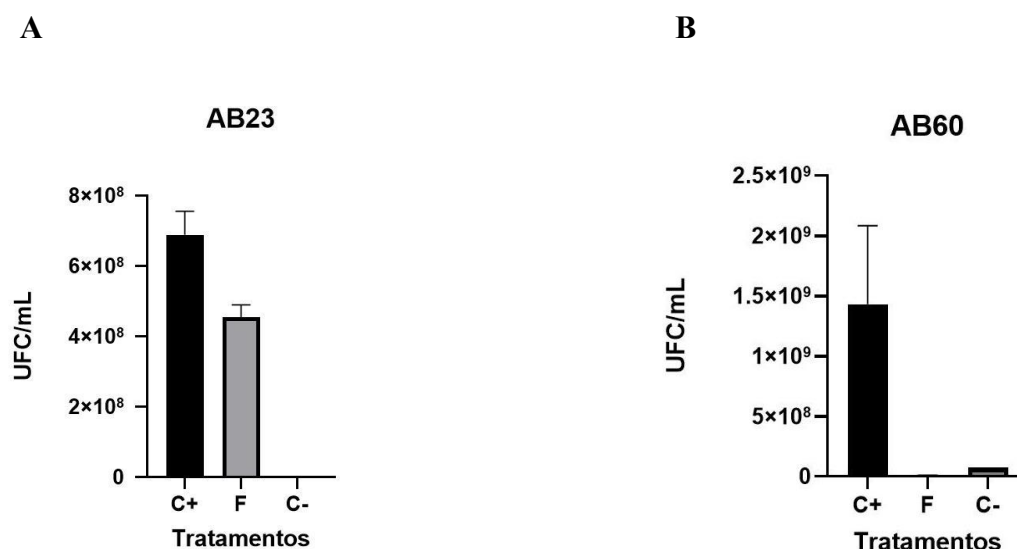
Fonte: a autora

Os crescimento foi avaliado pelo teste de ANOVA, Na cepa AB23, a homogeneidade das variâncias foi avaliada por teste de Brown-Forsythe, que resultou em $p = 0,2371$, permitindo a realização da ANOVA. Os resultados obtidos mostraram que houve diferença estatisticamente significativa entre os três tratamentos ($F=191,7$), apontando que os diferentes meios alteraram significativamente o crescimento da bactéria. O teste de Tukey demonstrou que todos os tratamentos diferiram entre si ($p < 0,0001$), e a ordem de crescimento foi $C+ > F > C-$. Isso indica que o crescimento da AB23 em meio de ácido fítico foi estatisticamente menor do que o controle positivo, mas maior do que no controle negativo, visto que no momento da contagem das colônias as células do meio sem fontes de fósforo estavam mortas. Em resumo, a AB23 foi capaz de utilizar o fitato do meio, mas com menor eficiência em comparação com o fosfato de amônio, fonte padrão (Figura 7A).

A AB60 forneceu $p = 0,0792$ para o teste de Brown-Forsythe, validando o uso da ANOVA, que demonstrou diferença estatisticamente significativa entre os três tratamentos ($F=13,65$). De acordo com o teste de Tukey, o controle positivo apresentou média superior aos outros dois ($p = 0,0086$ para meio modificado com fitato e $p = 0,0106$ para o controle negativo) e não houve diferença estatística entre o meio com fitato e o meio sem fontes de fósforo ($p = 0,9771$). Interpretando esses dados, a cepa AB60 apresentou crescimento significativamente menor no meio com ácido fítico em relação ao controle positivo, e comportamento estatisticamente semelhante ao do controle negativo. Apesar da AB60 ter conseguido crescer

no meio modificado, outras passagens dessa bactéria devem ser realizadas para esgotar as suas reservas nutricionais a fim de confirmar completamente que o seu desenvolvimento se deu em razão do uso do fitato (Figura 7B).

Figura 7. Análise estatística de ANOVA realizados no GraphPad, utilizando a contagem de UFC/mL dos testes semiquantitativos em VL-55. A) cepa AB23 e B) cepa AB60. C+: $(\text{NH}_4)\text{HPO}_3$ como fonte de nitrogênio, F: fitato como fonte de nitrogênio, C-: meio de cultura sem adição de fonte de fósforo.

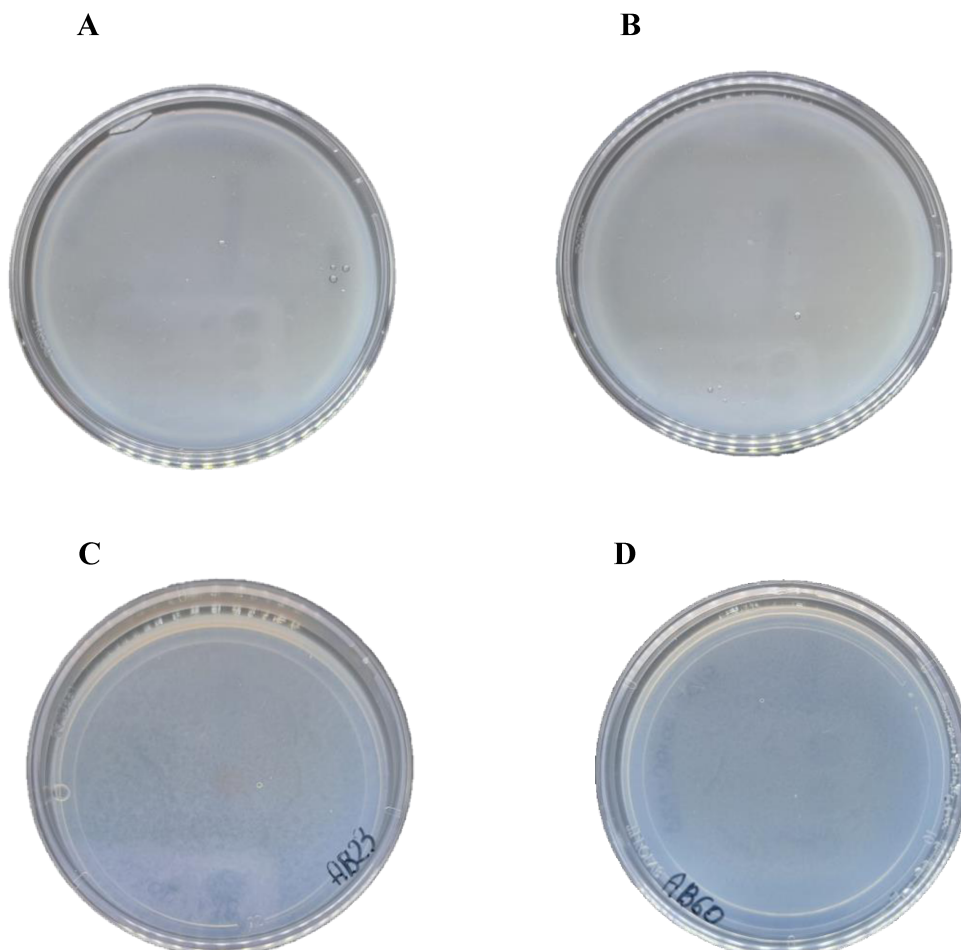


Fonte: a autora

O meio de cultura Pikovskaya (PKV) é um meio diferencial e seletivo produzido com fontes insolúveis de fósforo, com o objetivo de selecionar microrganismos com capacidade de solubilizá-los. Altas concentrações dessas fontes são utilizadas na produção desse meio para que ele apresente uma coloração opaca, o que permite a visualização de um halo ao redor da colônia bacteriana ou fúngica caso elas consigam solubilizar o fósforo presente. Após cultivar as cepas AB23 e AB60 em meio PKV modificado com 5 g/L de fitato, não foi observado nenhum crescimento ou surgimento de halo (Figura 8). Como observado nos experimentos anteriores, altas concentrações de fósforo são limitantes ao crescimento da acidobactéria, o que pode ser o motivo da sua não sobrevivência. Tentando contornar esse problema, o experimento foi repetido diminuindo a concentração de fitato para 1 g/L.

Mesmo após a diminuição do fitato na produção do meio PVK, as duas cepas ainda não apresentaram crescimento, pois a quantidade de fitato ainda permaneceu muito acima do considerado adequado para o seu desenvolvimento.

Figura 8. Resultado do crescimento em meio PKV. A) AB23 à 5 g/L de fitato. B) AB60 à 5 g/L de fitato. C) AB23 à 1g/L de fitato e D) AB60 à 1 g/L de fitato.



Fonte: a autora

5 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos para as cepas AB23 e AB60 no meio de cultura VL-55 mostraram a capacidade da utilização do ácido fítico como fonte de fósforo para o seu desenvolvimento por parte da AB23. Para que se possa afirmar o mesmo sobre a AB60, ainda são necessários experimentos futuros realizando mais passagens com suas células em meios sem fósforo para o esgotamento completo das suas reservas de nutrientes. Os experimentos feitos utilizando meio

Pikovskaya não possibilitaram o crescimento de nenhuma das cepas devido ao alto teor de fitato, que se é desfavorável para seus desenvolvimentos.

Em conclusão, é possível confirmar a hipótese de que a cepa AB23 possui capacidade de solubilizar fósforo orgânico na forma de fitato, sugerindo que, na falta de fontes solúveis de fósforo no meio, ela produza e libere enzimas fitases que vão hidrolisar estes compostos, resultando em fósforo inorgânico solúvel disponível para o uso em seus processos. Isso sugere a sua participação no ciclo biogeoquímico do fósforo em solos do Cerrado, auxiliando na disponibilização de fósforo solúvel que irá estimular o crescimento das plantas, além de evidenciar o seu possível uso como um bioinsumo.

REFERÊNCIAS

- ABDULWALIYU, I., AREKEMASE, S. O., ADUDU, J. A., *et al.* Investigation of the medicinal significance of phytic acid as an indispensable anti-nutrient in diseases. **Clinical Nutrition Experimental**, v. 28, p. 42-61, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.yclnex.2019.10.002>
- ALORI, E.; GLICK, B. R.; BABALOLA, O. O. Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture. *Frontiers in Microbiology*, v. 8, n. 971, 2017. doi: 10.3389/fmicb.2017.00971
- ALVES, L. C. M. Avaliação da capacidade de solubilização de fosfato em bactéria de solo de Cerrado. Trabalho de Conclusão de Curso, Ciências Biológicas. **Universidade Católica de Brasília**, 2018.
- AL-MONOFY, K. B., FARGHALI, M. H., AL-MADBOLY, L. A. *et al.* Advances in biomanufacturing and recent biological applications of the fundamental bacterial carotenoids: a comprehensive review. **Microbial Cell Factories**, v. 24, 225, 2025. <https://doi.org/10.1186/s12934-025-02847-1>
- AUSTIN, S., MAYER, A. Phosphate homeostasis – A vital metabolic equilibrium maintained through the INPHORS signaling pathway. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 2020. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01367>
- BRUNA, R. E., *et al.* Limitation of phosphate assimilation maintains cytoplasmic magnesium homeostasis. **Proceedings of the National Academy of Sciences EUA**, v. 118 (11), 2021. <https://doi.org/10.1073/pnas.2021370118>
- BILLINI, M., HOFFMANN, T., KUHN, J., *et al.* The cytoplasmic phosphate level has a central regulatory role in the phosphate starvation response of *Caulobacter crescentus*. **Communications Biology**, v. 7, 2024. <https://doi.org/10.1038/s42003-024-06469-y>
- CATÃO, E. P.; *et al.* Soil Acidobacterial 16S rRNA gene sequences reveal subgroup level differences between savanna-like Cerrado and Atlantic Forest brazilian biomes. **International Journal of Microbiology**, v. 156341, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/156341>
- CHAGAS, A. J. *et al.* Capacidade de solubilização de fosfatos e eficiência simbiótica de rizóbios isolados de solos da Amazônia. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 32, n. 2, pp. 359-366, 2010. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v32i2.3185>

DE CASTRO, V. H. L.; SCHROEDER, L. F.; QUIRINO, B. F.; KRUGER, R. H.; BARRETO, C. C. Acidobacteria from oligotrophic soil from the Cerrado can grow in a wide range of carbon source concentrations. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 59, n. 11, p. 746–753, 2013. <https://doi.org/10.1139/cjm-2013-0331>

EICHORST, S. A.; TROJAN, D.; ROUX, S.; *et al.* Genomic insights into the acidobacteria reveal strategies for their success in terrestrial environments. **Environmental Microbiology**, v. 30, n. 3, pp. 1041-1063, 2018. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14043>

ELHAISSOUF, W.; *et al.* Phosphate bacterial solubilization: A key rhizosphere driving force enabling higher P use efficiency and crop productivity. **Journal of Advanced Research**, v. 38, p. 13-28, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2021.08.014>

KALAM, S.; *et al.* Recent understanding of soil acidobacteria and their ecological significance: A Critical Review. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 2020. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.580024>

KIELAK, A. A. *et al.* The ecology of acidobacteria: Moving beyond genes and genomes. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 744, 2016. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00744>

KORNDORFER, G. H.; SOUSA, R. X. Recuperação do fósforo aplicado no solo de fontes solúveis e insolúveis em água. **Centro Científico Conhecer**, Goiânia, v. 6, p. 9. 2010. Disponível em: <https://www.conhecer.org.br/enciclop/2010c/recuperacao.pdf>

HP, L.; *et al.* Roles of phosphate-solubilizing bacteria in mediating soil legacy phosphorus availability. **Microbiology Research**, v. 272, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2023.127375>

MA, A. T.; TYRELL, B.; BELD, J. Specificity of cobamide remodeling, uptake and utilization in *Vibrio cholerae*. **Molecular Microbiology**, v. 113, p. 89-102, 2019. <https://doi.org/10.1111/mmi.14402>

OLIVEIRA, C. A., *et al.* Phosphate solubilizing microorganisms isolated from rhizosphere of maize cultivated in an oxisol of the Brazilian Cerrado Biome. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 41, n. 9, p. 1782-1787, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.01.012>

OLIVEIRA, L. C. A. Avaliação do crescimento de acidobacterias do Cerrado em diferentes polissacarídeos. Trabalho de Conclusão de Curso, Biotecnologia. **Universidade Federal de Uberlândia**, 2023.

PALACIOS, M. C.; *et al.* Characterization of an acid phosphatase from *Lactobacillus pentosus*: regulation and biochemical Properties. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, p. 229-237, 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02447.x>

PAN, L.; CAI, B. Phosphate-solubilizing bacteria: advances in their physiology, molecular mechanisms and microbial community effects. **Microorganisms**, v. 11, n. 12, 2023. doi: 10.3390/microorganisms11122904

PEREIRA, D. S.; COSTA, Y. K. S.; CARVALHO, L. B. O elemento P: formas e dinâmica em solos tropicais. **Revista Agronomia Brasileira**, v. 5, 2021. <https://doi.org/10.29372/rab202124>.

PIKOVSKAYA, R. Mobilization of phosphorous in soil connection with the vital activity of some microbial species. **Microbiologiya**, v. 287, p. 77-84, 1948.

PINTO, O.H.B., COSTA, F.S., RODRIGUES, G.R. *et al.* Soil *acidobacteria* strain AB23 resistance to oxidative stress through production of carotenoids. **Microbiology Ecology** v. 81, pp. 169–179, 2021. <https://doi.org/10.1007/s00248-020-01548-z>

RIZWANUDDIN, S. *et al.* Insight into phytase-producing microorganisms for phytate solubilization and soil sustainability. **Frontiers in Microbiology**, 14, 2023. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1127249>

RODRIGUES, D. S.; BARRETO, C. C. Avaliação da Capacidade de Solubilização de Fosfato Inorgânico em Acidobacteria AB60. Trabalho de Conclusão de Curso, Ciências Biológicas. **Universidade Católica de Brasília**, 2020.

SAIT, M.; HUGENHOLTZ, P.; JANSSEN, P. H. Cultivation of globally distributed soil bacteria from phylogenetic lineages previously only detected in cultivation independent surveys. **Environmental Microbiology**, v. 4, n. 11, p. 654-666, 2002. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2002.00352.x>

SILVA, L. I.; *et al.* Microrganismos solubilizadores de fósforo: uma chave para uma agricultura sustentável. **Agricultura**, v. 13(2), 2023. <https://doi.org/10.3390/agriculture13020462>

VIDAL, M. C.; DIAS, R. P. Bioinsumos a partir das contribuições da Agroecologia. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 28, n. 1, 2023. <https://doi.org/10.33240/rba.v18i1.23735>

VULLAM, K. E., *et al.* Polyphosphates: Essential bioenergetic reservoirs and their role as critical nutrient depleters in biological system. **Internacional Journal of life Science Research Archive**, v. 08 (01), p. 019-032, 2025. <https://doi.org/10.53771/ijlsra.2025.8.1.0024>

SAIT, M.; HUGENHOLTZ, P.; JANSSEN, P. H. Cultivation of globally distributed soil bacteria from phylogenetic lineages previously only detected in cultivation-independent surveys. **Environmental Microbiology**, v. 4, n. 11, pp. 654–666, 2002. <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1462-2920.2002.00352.x>.

SHARMA, S. B., *et al.* Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. **SpringerPlus**, v. 2, n. 587, 2013. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-587>

SOUMARE, A. *et al.* From isolation of phosphate solubilizing microbes to their formulation and use as biofertilizers: Status and needs. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v.7, p. 425, 2020. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00425>

SUN, X., TIAN, X., JIA M., *et al.* Phosphate-solubilizing bacteria: a review of diversity, mechanisms, and applications in sustainable agriculture. **Frontiers in Microbiology**, v. 17, 2026. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2026.1778470>

TIMOFEEVA, A.; GALYAMOVA, M.; SEDYKH, S. Prospects for using phosphate-solubilizing microorganisms as natural fertilizers in agriculture. **Plants**, v. 11, n.16, 2022. <https://doi.org/10.3390/plants11162119>

TSAO, G. T.; ZHENG, Y.; LU, J.; GONG, C. S. Adsorption of heavy metal ions by immobilized phytic acid. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 63-65, pp. 731-741, 1997. <https://doi.org/10.1007/BF02920471>

ZUTTER, N. D.; *et al.* Uncovering new insights and misconceptions on the effectiveness of phosphate solubilizing rhizobacteria in plants: A meta-analysis. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, 2022. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.858804>

ANEXOS

Anexo A: Soluções de Tungstato / Selenito, elementos traço e vitaminas (SAIT; HUGENHOLTZ; JANSSEN, 2002).

Solução de Tungstato/Selenito (1000 mL)

NaOH	0,500 g
Na ₂ SeO ₃ x 5 H ₂ O	0,003 g
Na ₂ WO ₄ x 2 H ₂ O	0,004 g
Água destilada	1000,000 mL

Solução de Elemento Traço SL⁻¹⁰ (1000 mL)

HCL (25%; 7.7 M)	10,00 mL
FeCl ₂ x 4 H ₂ O	1,50 g
ZnCl ₂	70,00 mg
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	100,00 mg
H ₃ BO ₃	6,00 mg
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	190,00 mg
CuCl ₂ x 2 H ₂ O	2,00 mg
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	24,00 mg
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	36,00 mg
Água destilada	990,00 mL

Dissolver FeCl₂ em HCl, então diluir em água, adicionar e dissolver os outros sais.

Solução de Vitaminas (1000 mL)

Vitamina B12	17,00 mg
4-aminobenzoato	13,00 mg
Biotina	3,00 mg
Ácido nicotínico	33,00 mg
Hemicálcio D-(+)-pantotenato	17,00 mg
Piridoxamina – HCl	50,00 mg
Tiamina – HCl x 2 H ₂ O	33,00 mg
D, L–6,8–ácido tióctico	10,00 mg
Riboflavina	10,00 mg
Ácido fólico	4,00 mg
Água destilada	1000 mL

Filtrar e esterilizar a solução.