



**Protocolos para Preparo de Meios de Cultura da
Embrapa Agrobiologia**



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Agrobiologia

Ministério da Agricultura e do Abastecimento

República Federativa do Brasil

Presidente

Fernando Henrique Cardoso

Ministério da Agricultura e do Abastecimento

Ministro

Marcus Vinicius Prantini de Moraes

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa

Diretor Presidente

Alberto Duque Portugal

Diretores

Elza Ângela Battaggia Brito da Cunha

Dante Daniel Giacomelli Scolari

José Roberto Rodrigues Peres

Embrapa Agrobiologia

Chefe Geral

Maria Cristina Prata Neves

Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

Sebastião Manhães Souto

Chefe Adjunto Administrativo

Vanderlei Pinto

DOCUMENTO Nº 110

ISSN 0104-6187

Dezembro 1999

**Protocolos para Preparo de Meios de Cultura da
Embrapa Agrobiologia**

Johanna Döbereiner

Vanderlei de Oliveira Andrade

Vera Lúcia Divan Baldani

Seropédica – RJ

1999

Exemplares desta publicação podem ser solicitadas à:

Embrapa Agrobiologia

Caixa Postal: 74505

23851-970 – Seropédica – RJ

Telefone: (021) 682-1500

Fax: (021) 682-1230

e-mail: sac@cnpab.embrapa.br

Expediente:

Revisor e/ou ad hoc: Vera Lúcia Divan Baldani

Normalização Bibliográfica/Confecção/Padronização: Dorimar dos Santos Felix

Tiragem: 50 exemplares

Comitê de Publicações: Sebastião Manhães Souto (Presidente)

Johanna Döbereiner

José Ivo Baldani

Norma Gouvêa Rumjanek

José Antônio Ramos Pereira

Robert Michael Boddey

Dorimar dos Santos Felix (Bibliotecária)

Coordenadora Editorial: Érica Cruz Rosas de Oliveira

DÖBEREINER, J.; ANDRADE, V. de O.; BALDANI, V.L.D. **Protocolos para Preparo de Meios de Cultura da Embrapa Agrobiologia**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, dez. 1999. 38p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 110).

ISSN 0104-6187

1. Cultura de tecido. 2. Meio de cultura. I. Andrade, V. de O., colab. II. Baldani, V.L.D., colab. III. Embrapa. Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia (Seropédica, RJ). IV. Título. V. Série.

CDD 571.538

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	6
1. MEIO DE CULTURA GENERALIZADO.....	6
1.1 MEIO DE CULTURA DIGS	6
1.1.1 <i>Material Necessário</i>	6
1.1.2 <i>Procedimento</i>	7
2. MEIO DE CULTURA PARA APLICAÇÃO EM <i>Rhizobium</i>	8
2.1 MEIO DE CULTURA TY	8
2.1.1 <i>Material Necessário</i>	8
2.1.2 <i>Procedimento</i>	8
2.2 MEIO DE CULTURA 79 BÁSICO E VARIAÇÕES	9
2.2.1 <i>Material Necessário</i>	9
2.2.2 <i>Procedimento</i>	10
2.2.3 <i>Variações</i>	11
2.3 MEIO DE CULTURA HP	11
2.3.1 <i>Material Necessário</i>	11
2.3.2 <i>Procedimento</i>	12
3. MEIO DE CULTURA PARA PURIFICAÇÃO DE <i>Burkholderia brasilensis</i>	13
3.1 MEIO DE CULTURA JMV	13
3.1.1 <i>Material Necessário</i>	13
3.1.2 <i>Procedimento</i>	14
4. MEIO DE CULTURA PARA APLICAÇÃO EM <i>Azospirillum spp.</i>	15
4.1 MEIO DE CULTURA NFB	15
4.1.1 <i>Material Necessário</i>	15
4.1.2 <i>Procedimento</i>	16
4.2 MEIO DE CULTURA NFB GLUCOSE.....	17
4.2.1 <i>Material Necessário</i>	17
4.2.2 <i>Procedimento</i>	18
4.3 MEIO DE CULTURA LGI.....	19
4.3.1 <i>Material Necessário</i>	19
4.3.2 <i>Procedimento</i>	20
4.4 MEIO DE CULTURA NFB NH ₄ NO ₃	21
4.4.1 <i>Material Necessário</i>	21
4.4.2 <i>Procedimento</i>	22
4.5 MEIO DE CULTURA BATATA	22
4.5.1 <i>Material Necessário</i>	23
4.3.2 <i>Procedimento</i>	23
5. MEIO DE CULTURA PARA APLICAÇÃO EM <i>Herbaspirillum spp.</i>	24
5.1 MEIO DE CULTURA JNFB.....	24
5.1.1 <i>Material Necessário</i>	24

5.1.2	<i>Procedimento</i>	25
6.	MEIO DE CULTURA PARA APLICAÇÃO EM <i>Acetobacter sp.</i>	26
6.1	MEIO DE CULTURA BATATA P	26
6.1.1	<i>Material Necessário</i>	26
6.1.2	<i>Procedimento</i>	27
6.2	MEIO DE CULTURA LGI-P	28
6.2.1	<i>Material Necessário</i>	28
6.2.2	<i>Procedimento</i>	29
6.3	MEIO DE CULTURA CALDO DE CANA (LGI-P CALDO)	30
6.3.1	<i>Material Necessário</i>	30
6.3.2	<i>Procedimento</i>	31
6.4	MEIO DE CULTURA LG	31
6.4.1	<i>Material Necessário</i>	32
6.4.2	<i>Procedimento</i>	32
7.	MEIO DE CULTURA PARA APLICAÇÃO EM <i>Derxia</i>	33
7.1	MEIO DE CULTURA LG+79	33
7.1.1	<i>Material Necessário</i>	33
7.1.2	<i>Procedimento</i>	34
8.	MEIO DE CULTURA PARA APLICAÇÃO EM <i>Escherichia coli</i>	35
8.1	MEIO DE CULTURA LB	35
8.1.1	<i>Material Necessário</i>	35
8.1.2	<i>Procedimento</i>	36
9.	FORMULAÇÃO QUÍMICA DAS SOLUÇÕES E REAGENTES	36
10.	DOCUMENTAÇÃO COMPLEMENTAR	37
11.	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	37

Manual de Preparo de Meio de Cultura

Johanna Döbereiner¹

Vanderlei de Oliveira Andrade²

Vera Lúcia Divan Baldani¹

INTRODUÇÃO

Preparar Meios de Cultura em suas diversas formas para o crescimento de diversos tipos de bactérias.

Este manual está organizado nos diferentes tipos de Meios de Culturas em relação ao tipo de microrganismo que pode ser, através dele identificado.

1. MEIO DE CULTURA GENERALIZADO

1.1 Meio de Cultura DIGS

Este meio é considerado um meio rico para favorecer o crescimento de bactérias em menor tempo de incubação.

1.1.1 Material Necessário

1.1.1.1 Reagentes e soluções

- Ácido Glutâmico,
- Ácido Málico,
- Ácido Sulfúrico à 5% V/V,
- Agar,
- Extrato de Levedura,
- Fosfato de Potássio Dibásico,

¹ Pesquisadora, Embrapa Agrobiologia, Caixa postal 74505, CEP 23.851-970, Seropédica - RJ

² Assistente de Operações III, Embrapa Agrobiologia, Caixa postal 74505, CEP 23.851-970, Seropédica - RJ

- Glicose,
- Hidróxido de Potássio à 5% P/V,
- Peptona Bacteriológica,
- Sulfato de Magnésio Heptahidratado.

1.1.1.2 Equipamentos e vidraria

- Algodão,
- Balão de fundo chato de 1000 ml,
- Becher de 500 ml,
- Mamadeiras,
- Pipetas sorológicas,
- Placa de petri,
- Proveta,
- Tubo de ensaio.

1.1.2 Procedimento

- Colocar aproximadamente 500 ml de água destilada, em um balão de fundo chato de 1000 ml
- Adicionar os reagentes abaixo, agitando entre cada adição:
 - 2,0 g de Glicose
 - 2,0 g de Ácido Málico
 - 1,5 g de Peptona Bacteriológica
 - 2,0 g de Extrato de Levedura
 - 0,5 g de Fosfato de Potássio Dibásico
 - 0,5 g de Sulfato de Magnésio Hidratado
 - 1,5 g de Ácido Glutâmico
 - 1000 ml de água destilada
- Completar o volume a 1000 ml com água destilada

- Ajustar pH com KOH solução à 10% e/ou H₂SO₄ solução à 5%

Use: pH. 6,0 p/ *Herbaspirillum*;

pH. 6,8 p/ *Azospirillum*;

pH. 6,0 p/ *Acetobacter* (sem ácido málico) ⁴.

- Preparar o meio sólido: 15 g por litro para meio de cultura DIGS

2. MEIO DE CULTURA PARA APLICAÇÃO EM *Rhizobium*

2.1 Meio de Cultura TY

Este meio é mais utilizado na obtenção de perfil de plamídeos e conjugações com esta bactéria.

2.1.1 Material Necessário

2.1.1.1 Reagentes e soluções

- Cloreto de Cálcio Dihidratado,
- Extrato de Levedura³,
- Triptona.

2.1.1.2 Equipamentos e vidraria

- Balão de fundo chato ou erlenmeyer de 1000 ml,
- Pipeta,
- Placa de petri,
- Proveta de 1000 ml,
- Tubo de ensaio.

2.1.2 Procedimento

³ Ver PO 12.023 – Protocolo Operacional para Preparação de Extrato de Levedura, disponibilizado no Laboratório de Meio de Cultura ou no Controle de Qualidade da Embrapa Agrobiologia.

- Tomar um erlenmeyer ou balão de fundo chato de 1000 ml, colocar 500 ml de água destilada e adicionar os seguintes reagentes:
 - 5 g de Triptona
 - 3 g de Extrato de Levedura
 - 0.9 g de Cloreto de Cálcio Dihidratado
- Completar com água destilada para 1000 ml

2.2 Meio de Cultura 79 Básico e Variações

Este meio é utilizado para o crescimento de *Rhizobium*, porém se for para crescimento lento usar Manitol como fonte de Carbono. E para crescimento rápido usar Açúcar Cristal como fonte de Carbono.

2.2.1 Material Necessário

2.2.1.1 Reagentes e soluções

- Ácido Sulfúrico a 5% ⁴,
- Açúcar Cristal ou Manitol,
- Agar,
- Azul de Bromotimol a 0,5 % em 0,2 N de KOH P/V⁴,
- Cloreto de Sódio a 10% P/V⁴,
- Extrato de Levedura⁵,
- Fosfato de Potássio Dibásico a 10% P/V⁴,
- Fosfato de Potássio Monobásico a 10% P/V⁴,
- Hidróxido de Potássio a 10% P/V⁴,
- Sulfato de Magnésio Heptahidratado a 10% P/V⁴.

Nota: Os reagentes devem ser de qualidade analítica e a água deve ser destilada ou desmineralizada.

2.2.1.2 Equipamentos e vidraria

- Algodão,

- Balão de fundo chato ou erlenmeyer de 1000 ml,
- Erlenmeyer de 125 ml,
- Espátulas,
- Mamadeiras,
- Papel alumínio,
- Pipetas sorológicas (1, 2, 4 e 5 ml),
- Proveta de 1000 ml.

2.2.2 Procedimento

• Adicionar aproximadamente 500 ml de água destilada em um balão de fundo chato ou erlenmeyer de 1000 ml e adicionar os reagentes abaixo relacionados, na ordem que se apresentam, agitando levemente entre uma adição e outra:

- 10 g de Açúcar Cristal ou Manitol
- 1 ml de solução de Fosfato de Potássio Dibásico
- 4 ml de solução de Fosfato de Potássio Monobásico
- 2 ml de solução de Sulfato de Magnésio Heptahidratado
- 1 ml de solução de Cloreto de Sódio
- 0,4 g Extrato de Levedura ou 100 ml de Extrato Líquido de Levedura⁵
- 5 ml de Solução de Azul de Bromotimol
- Transferir para a proveta e completar o volume a 1000 ml com água destilada,
- Retornar para o balão e ajustar o pH para 6,8-7,0 com solução de KOH a 10% e/ou H₂SO₄ a 5%,
- Adicionar agar, nas seguintes quantidades:
- 1 g por litro para meio semi-sólido:
- Distribuir no erlenmeyer, vedar com rolhas de algodão e cobrir com papel alumínio.
- 15 g por litro para meio sólido:

- Distribuir o meio de cultura nas mamadeiras, vedar com rolhas de algodão e cobrir com papel alumínio
- Autoclavar o material preparado por 30 minutos a 120° C.
- Deixar esfriar e reservar para uso em local adequado.

2.2.3 Variações

2.2.3.1 Meio 79 com vermelho congo

- Substituir o azul de bromotimol por vermelho congo solução 0,25 %⁴, usando 10 ml desta solução por litro de meio de cultura.

2.2.3.2 Meio 79 com carbonato de cálcio

- Adicionar 1 g de CaCO₃¹ (bruto ou comercial) por litro de meio de cultura.

Obs₁ - Usado quando a bactéria é forte produtora de ácido.

2.3 Meio de Cultura HP

Este meio é classificado como sendo semi seletivo utilizado para o *Rhizobium*, de crescimento rápido e determinação do perfil de plamídeos em *Burkholderia*.

2.3.1 Material Necessário

2.3.1.1 Reagentes e soluções

- Agar,
- Cloreto de Cálcio Dihidratado a 1% P/V⁴,
- Extrato de Levedura⁵,
- Peptona,
- Sulfato de Magnésio Heptahidratado a 10% P/V⁴,
- Triptona.

2.3.1.2 Equipamentos e vidraria

- Algodão,
- Balão de fundo ou erlenmeyer chato de 1000 ml,
- Becher,
- Pipeta sorológica,
- Placa de petri,
- Proveta,
- Tubo de ensaio,
- Tubo de ensaio rosqueável.

2.3.2 Procedimento

• Colocar 500 ml de água destilada em um erlenmeyer ou balão de fundo chato de 1000 ml e adicionar os seguintes reagentes abaixo:

- 4 g de Peptona
- 0,7 g de Extrato de Levedura
- 0,7 g de Triptona
- 0,2 g de Sulfato de Magnésio Heptahidratado
- 0,3 g de Cloreto de cálcio dihidratado
- Completar para 1000 ml com água destilada.
- Adicionar agar, nas seguintes quantidades:
 - 1,8 g por litro para meio semi sólido (dissolver antes da distribuição).
 - 15 g por litro de meio sólido.

3. MEIO DE CULTURA PARA PURIFICAÇÃO DE *Burkholderia Brasilensis*

3.1 Meio de Cultura JMV

Este meio é utilizado para o isolamento e purificação de bactérias diazotróficas, *Burkholderia brasilensis*.

3.1.1 Material Necessário

3.1.1.1 Reagentes e soluções

- Ácido Sulfúrico a 5% V/V⁴,
- Agar,
- Azul de Bromotimol a 0,5% em 0,2N de KOH⁴,
- Cloreto de Cálcio Dihidratado a 1% P/V⁴,
- Cloreto de Sódio a 10% P/V⁴,
- EDTA de Ferro a 1,64% P/V⁴,
- Extrato de Levedura⁵,
- Fosfato de Potássio Dibásico a 10% P/V⁴,
- Fosfato de Potássio Monobásico a 10% P/V⁴,
- Hidróxido de Potássio a 10% P/V⁴,
- Manitol,
- Solução de Micronutrientes para Meio de Cultura⁴,
- Solução de Vitamina para Meio de Cultura⁵,
- Sulfato de Magnésio Hidratado a 10% P/V⁴.

3.1.1.2 Equipamentos e vidraria

- Algodão,
- Balão de fundo chato ou erlenmeyer de 1000 ml,

⁴ PO 12.027 – Protocolo Operacional para Preparação de Solução de Micronutrientes para Meio de Cultura.

⁵ PO 12.029 – Protocolo Operacional para Preparação de Solução de Vitamina para Meio de Cultura.

- Becher,
- Mamadeira,
- Pipeta sorológica,
- Placa de petri,
- Proveta de 1000 ml,
- Tubo de ensaio,
- Vidro de penicilina.

3.1.2 Procedimento

- Medir em torno de 500 ml de água destilada e transferir para um erlenmeyer ou balão de fundo chato de 1000 ml
- Adicionar os reagentes abaixo relacionados na ordem em que estão apresentados, agitando levemente entre uma adição e outra:
 - 5 g de Manitol
 - 6 ml de Solução de Fosfato de Potássio Dibásico
 - 18 ml de Solução de Fosfato de Potássio Monobásico
 - 2 ml de Solução de Sulfato de Magnésio Hidratado
 - 1 ml de Solução de Cloreto de Sódio
 - 2 ml de Solução de Cloreto de Cálcio
 - 2 ml de Solução de Azul de Bromotimol
 - 2 ml de Solução de Micronutrientes para Meio de Cultura⁶
 - 4 ml de Solução de EDTA de Ferro
 - 1 ml de Solução de Vitamina para Meio de Cultura⁷
 - Adicionar água destilada até completar 1000 ml
- Ajustar o p.H. para 4,2 – 4,5 usando H₂SO₄ a 5% e/ou KOH a 10%

- Adicionar agar, nas seguintes quantidades:
 - 2,1 g por litro para meio semi sólido (dissolver antes da distribuição).
 - 25 g por litro de meio sólido, adicionar 100 mg de extrato de levedura.

Obs 2 - Para meio líquido adicionar 10 mm de glutamato / litro (1,87 g/l), indicador opcional +100mg de extrato de levedura.

Convém usar as placas somente 24h após o preparo.

4. MEIO DE CULTURA PARA APLICAÇÃO EM *Azospirillum spp*

4.1 Meio de Cultura NFB

Este meio semi seletivo é para efetuar o isolamento *Azospirillum spp*.

4.1.1 Material Necessário

4.1.1.1 Reagentes e soluções

- Ácido Málico,
- Ácido Sulfúrico a 5% V/V⁴,
- Agar,
- Azul de Bromotimol a 0,5 % em 0,2 N de KOH⁴,
- Cloreto de Cálcio Dihidratado a 1% P/V⁴,
- Cloreto de Sódio a 10% P/V⁴,
- EDTA de Ferro a 1,64% P/V⁴,
- Extrato de Levedura,
- Fosfato de Potássio Dibásico a 10% P/V⁴,
- Hidróxido de Potássio a 10% P/V⁴,
- Solução de Micronutrientes para Meio de Cultura⁶,
- Solução de Vitamina para Meio de Cultura⁷,

- Sulfato de Magnésio Heptahidratado a 10% P/V⁴.

4.1.1.2 Equipamentos e vidraria

- Algodão,
- Balão de fundo chato de 1000 ml,
- Papel alumínio,
- Pipetas sorológicas,
- Proveta de 500 ml,
- Vidros de penicilina.

4.1.2 Procedimento

• Colocar 500 ml de água destilada em um erlenmeyer ou balão de fundo chato de 1000 ml e adicionar os seguintes reagentes e soluções abaixo nas concentrações indicadas:

- 5 g de Ácido Málico
- 5 ml de Solução de Fosfato de Potássio Dibásico
- 2 ml de Solução de Sulfato de Magnésio Heptahidratado
- 1 ml de Solução de Cloreto de Sódio
- 2 ml de Solução de Cloreto de Cálcio Dihidratado
- 2 ml de Azul de Bromotimol 0,5% em 0,2N de KOH
- 2 ml de Solução de Micronutrientes para Meio de Cultura
- 4 ml de Solução de EDTA de Ferro
- 1ml de Solução de Vitamina para Meio de Cultura
- 4,5 g de Hidróxido de Potássio
- Completar para 1000 ml com água destilada.
- Ajustar o p.H. para 6,5 com solução de KOH a 10% e/ou solução H₂SO₄ a 5%.

- Adicionar agar, nas seguintes quantidades:
 - 1,8 g por litro para meio semi sólido (dissolver antes da distribuição).
 - 15 g por litro de meio sólido, colocando 50 mg de extrato de levedura por litro de meio de cultura.
- Distribuir 5 ml de meio de cultura por frasco de penicilina. Tampar com algodão e autoclavar.

4.2 Meio de Cultura NFB Glucose

Este meio semi seletivo é utilizado para realizar a diferenciação de espécies de *Azospirillum brasiliense* e *A. lipoferum*.

4.2.1 Material Necessário

4.2.1.1 Reagentes e soluções

- Agar,
- Azul de Bromotimol a 0,5% em 0,2N de KOH⁴,
- Cloreto de Cálcio Dihidratado a 1 % P/V⁴,
- Cloreto de Sódio a 10 % P/V⁴,
- EDTA de Ferro a 1,64 % P/V⁴,
- Fosfato de Potássio Dibásico a 10 % P/V⁴,
- Fosfato de Potássio Monobásico a 10 % P/V⁴,
- Solução de Glucose a 12,5% P/V⁴,
- Solução de Hidróxido de Potássio a 10 % P/V⁴,
- Solução de Micronutrientes para Meio de Cultura⁶,
- Solução de Vitamina para Meio de Cultura⁷,
- Sulfato de Magnésio Heptahidratado a 10 % P/V⁴.

4.2.1.2 Equipamentos e vidraria

- Algodão,
- Balão de fundo chato ou erlenmeyer de 1000 ml,

- Balão volumétrico,
- Bastão de vidro,
- Funil,
- Mamadeira,
- Pipeta sorológica,
- Placa de petri,
- Proveta,
- Vidro de penicilina.

4.2.2 Procedimento

• Colocar 500 ml de água destilada em um erlenmeyer ou balão de fundo chato de 1000 ml e adicionar os seguintes reagentes e soluções abaixo nas concentrações indicadas:

- 1 ml de Solução de Fosfato de Potássio Dibásico
- 4 ml de Solução de Fosfato de Potássio Monobásico
- 2 ml de Solução de Sulfato de Magnésio Heptahidratado
- 1 ml de Solução de Cloreto de Sódio
- 2 ml de Solução de Cloreto de Cálcio Dihidratado
- 2 ml de Azul de Bromotimol
- 2 ml de Solução de Micronutrientes para Meio de Cultura
- 4 ml de Solução de EDTA de Ferro
- 1ml de Solução de Vitamina para Meio de Cultura
- Completar para 1000 ml com água destilada.
- Ajustar o p.H. para 6,5 com solução de KOH à 10%
- Esterilizar separado (em filtro millipore) a Solução de Glucose 12,5%, colocando 0.2 ml por frasco com 5 ml de meio de cultura.

- Colocar 1,8 g de agar por litro de meio de cultura semi sólido, misturando bem (Dissolver antes de distribuir o meio de cultura).

4.3 Meio de Cultura LGI

Este meio semi seletivo é para isolamento de *Azospirillum amazonense*.

4.3.1 Material Necessário

4.3.1.1 Reagentes e soluções

- Ácido Sulfúrico a 5 % V/V⁴,
- Açúcar Cristal,
- Agar,
- Azul de Bromotimol a 0,5% em 0,2N de KOH⁴,
- Cloreto de Cálcio Dihidratado a 1 % P/V⁴,
- Cloreto Férrico Hexhidratado a 1 % P/V⁴,
- Extrato de Levedura⁵,
- Fosfato de Potássio Dibásico a 10 % P/V⁴,
- Fosfato de Potássio Monobásico a 10 % P/V⁴,
- Molibdato de Sódio Dihidratado a 0,1 % P/V⁴,
- Nitrato de potássio,
- Solução de Vitamina para Meio de Cultura⁷,
- Sulfato de Magnésio Heptahidratado a 10 % P/V⁴.

4.3.1.2 Equipamentos e vidraria

- Algodão,
- Balão de fundo chato de 1000 ml,
- Papel alumínio,
- Pipeta sorológica,

- Proveta de 500 ml,
- Vidro de penicilina.

4.3.2 Procedimento

• Colocar 500 ml de água destilada em um erlenmeyer ou balão de fundo chato de 1000 ml e adicionar os seguintes reagentes e soluções abaixo nas concentrações indicadas:

- 5 g de Açúcar Cristal
- 2 ml de Solução de Fosfato de Potássio Dibásico
- 6 ml de Solução de Fosfato de Potássio Monobásico
- 2 ml de Solução de Sulfato de Magnésio Heptahidratado
- 2 ml de Solução de Cloreto de Cálcio Dihidratado
- 2 ml de Solução de Molibdato de Sódio Dihidratado
- 1 ml de Solução de Cloreto Férrico Hex hidratado
- 5 ml de Solução de Azul de Bromotimol
- 1 ml de Solução de Vitamina para Meio de Cultura
- Completar para 1000 ml com água destilada.
- Ajustar o p.H. para 6,0 – 6,2, usando solução de Ácido Sulfúrico.
- Adicionar agar nas seguintes quantidades:
 - 15 g por litro de meio de cultura sólido, colocando também 0,02 g de extrato de levedura.
 - 1,8 g por litro de meio de cultura semi sólido (Dissolver antes de distribuir).
 - 1 g por litro de Nitrato de potássio.

4.4 Meio de Cultura NFb NH_4NO_3

Este meio semi seletivo é para verificar a desnitrificação de bactéria *Azospirillum spp.*

4.4.1 Material Necessário

4.4.1.1 Reagentes e soluções

- Ácido Málico,
- Ácido Sulfúrico a 5 % P/V⁴,
- Agar,
- Azul de Bromotimol a 0,5% em 0,2N de KOH⁴,
- Cloreto de Cálcio Dihidratado a 1 % P/V⁴,
- Cloreto de Sódio a 10 % P/V⁴,
- Edta de Ferro a 1,64 % P/V⁴,
- Fosfato de Potássio Dibásico a 10 % P/V⁴,
- Hidróxido de Potássio,
- Hidróxido de Potássio a 10 % P/V⁴,
- Nitrato de Amônia,
- Solução de Micronutrientes para Meio de Cultura⁶,
- Solução de Vitamina para Meio de Cultura⁷,
- Sulfato de Magnésio Heptahidratado a 10 % P/V⁴.

4.4.1.2 Equipamentos e vidraria

- Algodão,
- Balão de fundo chato de 1000 ml,
- Papel Alumínio,
- Pipeta sorológica,
- Proveta de 500 ml,
- Vidro de penicilina.

4.4.2 Procedimento

• Colocar 500 ml de água destilada em um erlenmeyer ou balão de fundo chato de 1000 ml e adicionar os seguintes reagentes e soluções abaixo nas concentrações indicadas:

- 5 g de Ácido Málico
- 25 ml de Solução de Fosfato de Potássio Dibásico
- 2 ml de Solução de Sulfato de Magnésio Heptahidratado
- 1 ml de Solução de Cloreto de Sódio
- 2 ml de Solução de Cloreto de Cálcio Dihidratado
- 2 ml de Azul de Bromotimol
- 2 ml de Solução de Micronutrientes para Meio de Cultura
- 4 ml de Solução de EDTA de Ferro
- 4,5 g de Hidróxido de Potássio
- 1ml de Solução de Vitamina para Meio de Cultura
- 1.6 g Nitrato de Amônia
- Completar para 1000 ml com água destilada.
- Ajustar o p.H. para 6,5 com solução de KOH a 10% e/ou H₂SO₄ a 5%.
- Colocar 1,8 g de agar por litro de meio de cultura semi sólido, misturando bem (Dissolver antes de distribuir o meio de cultura).
- Distribuir 5 ml de meio de cultura por frasco de penicilina. Tampar com algodão e autoclavar.

4.5 Meio de Cultura Batata

Este meio semi seletivo é utilizado para realizar a purificação de bactérias diazotróficas, para o crescimento de *Azospirillum spp* e *Herbaspirillum spp*.

4.5.1 Material Necessário

4.5.1.1 Reagentes e soluções

- Ácido Málico,
- Açúcar Cristal,
- Agar,
- Azul de Bromotimol a 0,5% em 0,2N de KOH⁴,
- Batata Inglesa,
- Hidróxido de Potássio,
- Solução de Micronutriente para Meios de Cultura⁶,
- Solução de Vitamina para Meio de Cultura⁷,
- Vermelho Congo (Kongorot) a 0,25%⁴.

4.5.1.2 Equipamentos e vidraria

- Algodão,
- Balão de fundo chato de 1000 ml,
- Becher,
- Erlenmeyer de 100 ml,
- Espátula,
- Funil,
- Mamadeiras,
- Papel Alumínio,
- Pipetas.

4.3.2 Procedimento

- Colocar aproximadamente 50 ml de água destilada em um erlenmeyer de 100 ml e adicionar 2,5 g de ácido málico e 2 gotas de azul de bromotimol (sol. 0,5% em 0,2 N de KOH).
- Levar o pH da Solução a 6,8-7,0 (verde) utilizando solução de KOH a 10%.

- Adicionar a esta solução 2,5 g de açúcar cristal, 2 ml de solução de micronutrientes para meio de cultura e 1 ml de solução de vitamina para meio de cultura, agitando levemente.
- Pesar 200 g de batata inglesa, descascar, lavar, cortar em pedaços grandes e colocar para cozinhar durante meia hora.
- Depois de cozida, filtrar a batata com algodão, juntando ao filtrado a solução vitaminada de ácido málico recém preparada.
- Completar o volume para 1000 ml com água destilada.

Obs₃ - Para preparar o meio batata com vermelho congo, usar 5 ml de solução de vermelho congo (0,25%) por litro de meio de cultura.

- Colocar agar por último, dissolvendo bem, antes de distribuir.
- Usar as seguintes quantidades:
 - 1,8 g por litro para meio semi-sólido,
 - 15 g por litro para meio sólido.
- Distribuir o meio de cultura nas mamadeiras, vedar com rolhas de algodão e cobrir com papel alumínio.
- Autoclavar as mamadeiras por 30 minutos a 120° C.
- Deixar esfriar e reservar para uso em local adequado.

5. MEIO DE CULTURA PARA APLICAÇÃO EM *Herbaspirillum spp*

5.1 Meio de Cultura JNFb

Este meio é para efetuar o isolamento *Herbaspirillum spp*.

5.1.1 Material Necessário

5.1.1.1 Reagentes e soluções

- Ácido málico
- Ácido Sulfúrico a 5% V/V⁴

- Agar,
- Azul de Bromotimol a 0,5 % em 0,2 N de KOH⁴,
- Cloreto de Cálcio Dihidratado a 1% P/V⁴,
- Cloreto de Sódio a 10% P/V⁴,
- EDTA de Ferro a 1.64% P/V⁴,
- Extrato de Levedura,
- Fosfato de Potássio Dibásico a 10% P/V⁴,
- Fosfato de Potássio Monobásico a 10% P/V⁴,
- Hidróxido de Potássio a 10% P/V⁴,
- Solução de Micronutrientes para Meio de Cultura⁶ ,
- Solução de Vitamina para Meio de Cultura⁷ ,
- Sulfato de Magnésio Heptahidratado a 10% P/V⁴.

5.1.1.2 Equipamentos e vidraria

- Algodão,
- Balão de fundo chato de 1000 ml,
- Becher,
- Mamadeiras,
- Pipetas sorológicas,
- Placa de Petri,
- Proveta de 1000 ml,
- Tubo de ensaio,
- Vidros de penicilina.

5.1.2 Procedimento

- Medir em torno de 500 ml de água destilada e transferir para um erlenmeyer ou balão de fundo chato de 1000 ml

- Adicionar os reagentes abaixo relacionados na ordem em que estão apresentados, agitando levemente entre uma adição e outra:

- 5 g de Ácido Málico
- 6 ml de Solução de Fosfato de Potássio Dibásico
- 18 ml de Solução de Fosfato de Potássio Monobásico
- 2 ml de Sulfato de Magnésio Heptahidratado
- 1 ml de Solução de Cloreto de Sódio
- 2 ml de Solução de Cloreto de Cálcio Dihidratado
- 2 ml de Solução de Azul de Bromotimol
- 2 ml de Solução de Micronutrientes para Meio de Cultura
- 4 ml de Solução de EDTA de erro
- 4,5 g de Hidróxido de Potássio
- 1 ml de Solução de Vitamina para Meio de Cultura
- Adicionar água destilada até completar 1000 ml
- Ajustar o p.H. para 5,8 usando solução de KOH a 10% e/ou solução de Ácido Sulfúrico a 5%
- Adicionar agar, nas seguintes quantidades:
 - 1,9 g por litro para meio semi sólido(dissolver antes da distribuição).
 - 17 g por litro de meio sólido, adicionar 20 mg de extrato de levedura.

6. MEIO DE CULTURA PARA APLICAÇÃO EM *Acetobacter spp*

6.1 Meio de Cultura Batata P

Este meio semi seletivo é para efetuar a purificação de bactérias diazotróficas, *Acetobacter sp.*

6.1.1 Material Necessário

6.1.1.1 Reagentes e soluções

- Açúcar Cristal,
- Agar,
- Batata Inglesa,
- Solução de Ácido Acético a 10% P/V⁶,
- Solução de Micronutrientes para Meio de Cultura⁶,
- Solução de Vitamina para Meio de Cultura⁷.

6.1.1.2 Equipamentos e vidraria

- Algodão,
- Balão de fundo chato de 1000 ml,
- Becher 500 ml,
- Erlenmeyer 1000 ml,
- Funil,
- Mamadeiras,
- Pipetas sorológicas 1 e 2 ml.

6.1.2 Procedimento

- Pesar 200 g de batata, descascar, lavar, cortar e colocar para ferver por meia hora, em 500 ml de água.
- Filtrar a batata com algodão e recolher o filtrado e descartar a batata.
- Colocar 100 g de açúcar cristal, 2 ml de solução de micronutrientes para meio de cultura, e 1 ml de solução de vitamina para meio de cultura.
- Completar para 1000 ml com água destilada.
- Ajustar o pH para 5,5 com ácido acético 10 %.
- Colocar agar por último, dissolvendo bem, antes de distribuir
- Usar a seguinte quantidade:
 - 25 g de agar por litro de meio de cultura .

- Distribuir o meio de cultura nas mamadeiras, vedar com rolhas de algodão e cobrir com papel alumínio.
- Autoclavar as mamadeiras por 30 minutos a 120°C.
- Deixar esfriar e reservar para uso, em local adequado.

6.2 Meio de Cultura LGI-P

Este meio é utilizado como meio semi seletivo na purificação e caracterização de *Acetobacter spp.*

6.2.1 Material Necessário

6.2.1.1 Reagentes e soluções

- Ácido Acético,
- Açúcar Cristal,
- Agar,
- Azul de Bromotimol a 0,5 % em 0,2 N de KOH⁴,
- Cloreto de Cálcio Dihidratado a 1% P/V⁴,
- Cloreto de Férrico Hexhidratado a 1% P/V⁴,
- Fosfato de Potássio Dibásico a 10% P/V⁴,
- Fosfato de Potássio Monobásico a 10% P/V⁴,
- Molibdato de Sódio Dihidratado a 0,1% P/V⁴,
- Solução de Vitamina para Meio de Cultura⁷,
- Sulfato de Magnésio Heptahidratado a 10% P/V⁴.

6.2.1.2 Equipamentos e vidraria

- Balão de fundo chato ou erlenmeyer de 1000 ml,
- Balão volumétrico,
- Bastão de vidro,
- Becher,
- Mamadeiras,

- Pipetas sorológicas,
- Placa de Petri,
- Proveta de 1000 ml,
- Tubo de ensaio,
- Vidros de penicilina.

6.2.2 Procedimento

- Medir em torno de 500 ml de água destilada e transferir para um erlenmeyer ou balão de fundo chato de 1000 ml
- Adicionar os reagentes abaixo relacionados na ordem em que estão apresentados, agitando levemente entre uma adição e outra:
 - 100 g de Açúcar Cristal
 - 2 ml de Solução de Fosfato de Potássio Dibásico
 - 6 ml de Solução de Fosfato de Potássio Monobásico
 - 2 ml de Solução de Sulfato de Magnésio Hidratado
 - 2 ml de Solução de Cloreto de Cálcio Dihidratado
 - 2 ml de Solução de Molibdato de Sódio Dihidratado
 - 1 ml de Solução de Cloreto Férrico Hexahidratado
 - 5 ml de Solução de Azul de Bromotimol
 - 1 ml de Solução de Vitamina para Meio de Cultura
- Adicionar água destilada até completar 1000 ml
- Ajustar o pH para 5,5 usando solução de ácido acético a 10%
- Adicionar agar, nas seguintes quantidades:
 - 1,6 g por litro para meio semi sólido (dissolver, antes da distribuição).
 - 25 g por litro de meio sólido.

6.3 Meio de Cultura Caldo de Cana (LGI-P caldo)

Este meio semi seletivo é para efetuar o isolamento e contagem do número mais provável de *Acetobacter* em plantas.

6.3.1 Material Necessário

6.3.1.1 Reagentes e soluções

- Ácido Acético a 10% P/V⁴,
- Açúcar Cristal,
- Agar,
- Azul de Bromotimol a 0,5 % em 0,2 N de KOH⁴,
- Caldo de Cana em pó,
- Cloreto de Cálcio Dihidratado a 1% P/V⁴,
- Cloreto de Férrico Hexhidratado a 1% P/V⁴,
- Fosfato de Potássio Dibásico a 10% P/V⁴,
- Fosfato de Potássio Monobásico a 10% P/V⁴,
- Molbidoato de Sódio Dihidratado a 0,1% P/V⁴,
- Sulfato de Magnésio Heptahidratado a 10% P/V⁴,

6.3.1.2 Equipamentos e vidraria

- Algodão,
- Balão de fundo chato ou erlenmeyer de 1000 ml,
- Balão volumétrico,
- Bastão de vidro,
- Becher,
- Mamadeiras,
- Pipetas sorológicas,
- Placa de Petri,
- Proveta de 1000 ml,

- Tubo de ensaio,
- Vidros de penicilina.

6.3.2 Procedimento

- Medir em torno de 500 ml de água destilada e transferir para um erlenmeyer ou balão de fundo chato de 1000 ml
- Adicionar os reagentes abaixo relacionados na ordem em que estão apresentados, agitando levemente entre uma adição e outra:
 - 100 g de Açúcar Cristal
 - 2 ml de Solução de Fosfato de Potássio Dibásico
 - 6 ml de Solução de Fosfato de Potássio Monobásico
 - 2 ml de Solução de Sulfato de Magnésio Heptahidratado
 - 2 ml de Solução de Cloreto de Cálcio Dihidratado
 - 2 ml de Solução de Molibdato de Sódio Dihidratado
 - 1 ml de Solução de Cloreto Férrico Hex hidratado
 - 5 ml de Solução de Azul de Bromotimol
 - 5 ml ou 0,8g de Caldo de Cana em pó
- Adicionar água destilada até completar 1000 ml
- Ajustar o p.H. para 5,5 usando solução de ácido acético a 10%
- Adicionar agar, nas seguintes quantidades:
 - 2 g por litro para meio semi sólido(dissolver antes da distribuição).
 - 25 g por litro de meio sólido.

6.4 Meio de Cultura LG

Este é utilizado como meio semi seletivo para isolamento de *Azotobacter*.

6.4.1 Material Necessário

6.4.1.1 Reagentes e soluções

- Ácido Sulfúrico a 5% P/V⁴,
- Açúcar Cristal,
- Agar,
- Azul de Bromotimol a 0,5 % em 0,2 N de KOH⁴,
- Carbonato de Cálcio,
- Cloreto de Cálcio Dihidratado a 1% P/V⁴,
- Cloreto de Férrico Hexhidratado a 1% P/V⁴,
- Fosfato de Potássio Dibásico a 10% P/V⁴,
- Fosfato de Potássio Monobásico a 10% P/V⁴,
- Hidróxido de Sódio a 0,1% P/V⁴,
- Molibdato de Sódio Dihidratado a 0,1% P/V⁴,
- Sulfato de Magnésio Heptahidratado a 10% P/V⁴.

6.4.1.2 Equipamentos e vidraria

- Balão de fundo chato ou erlenmeyer de 1000 ml,
- Bastão de vidro,
- Funil,
- Pipetas sorológicas,
- Proveta de 1000 ml,

6.4.2 Procedimento

• Colocar 500 ml de água destilada em um erlenmeyer ou balão de fundo chato de 1000 ml e adicionar os seguintes reagentes e soluções abaixo nas concentrações indicadas:

- 20 g de Açúcar Cristal
- 0,5 ml de Solução de Fosfato de Potássio Dibásico

- 1,5 ml de Solução de Fosfato de Potássio Monobásico
 - 2 ml de Solução de Sulfato de Magnésio Heptahidratado
 - 2 ml de Solução de Cloreto de Cálcio Dihidratado
 - 2 ml de Solução de Molibdato de Sódio Dihidratado
 - 1 ml de Solução de Cloreto Férrico Hex hidratado
 - 5 ml de Solução de Azul de Bromotimol 0,5% alcóolica
-
- Completar para 1000 ml com água destilada.
 - Ajustar o p.H. para 6,8 – 7,0 com solução de KOH a 10% e/ou solução de H₂SO₄ a 5%.
 - Colocar 15 g de agar por litro de meio de cultura sólido, misturando bem.

Obs₄ - Para fazer LG+ CaCO₃ colocar 1 g de CaCO₃ bruto por litro de meio de cultura (Não é necessário ajustar o pH).

7. MEIO DE CULTURA PARA CRESCIMENTO E ISOLAMENTO DE *Derxia*

7.1 Meio de Cultura LG+79

Este meio semi seletivo é utilizado no crescimento de *Derxia*.

7.1.1 Material Necessário

7.1.1.1 Reagentes e soluções

- Ácido Sulfúrico a 5% V/V⁴,
- Açúcar Cristal,
- Agar,
- Azul de Bromotimol a 0,5 % em 0,2 N de KOH⁴,
- Cloreto de Cálcio Dihidratado a 1% P/V⁴,

- Cloreto de Férrio Hexhidratado a 1% P/V⁴,
- Cloreto de Sódio a 10% P/V⁴,
- Extrato de Levedura⁵,
- Fosfato de Potássio Dibásico a 10% P/V⁴,
- Fosfato de Potássio Monobásico a 10% P/V⁴,
- Hidróxido de Potássio a 10% P/V⁴,
- Molibdato de Sódio Dihidratado a 0,1% P/V⁴,
- Sulfato de Magnésio Heptahidratado a 10% P/V⁴.

7.1.1.2 Equipamentos e vidraria

- Algodão,
- Balão de fundo chato ou erlenmeyer de 1000 ml,
- Balão Volumétrico,
- Bastão de Vidro,
- Becher,
- Funil,
- Mamadeiras,
- Pipeta Sorológica,
- Placa de Petri,
- Proveta de 1000 ml,
- Tubo de ensaio,
- Tubo de ensaio rosqueável.

7.1.2 Procedimento

- Medir em torno de 500 ml de água destilada e transferir para um erlenmeyer ou balão de fundo chato de 1000 ml
- Adicionar os reagentes abaixo relacionados na ordem em que estão apresentados, agitando levemente entre uma adição e outra:
 - 10 g de Açúcar Cristal

- 1 ml de Solução de Fosfato de Potássio Dibásico
- 4 ml de Solução de Fosfato de Potássio Monobásico
- 2 ml de Solução de Sulfato de Magnésio Heptahidratado
- 1 ml de Solução de Cloreto de Sódio
- 2 ml de Solução de Cloreto de Cálcio Dihidratado
- 2 ml de Solução de Molibdato de Sódio Dihidratado
- 1 ml de Solução de Cloreto Férrico Hex hidratado
- 0,4 g de Extrato de Levedura
- 5 ml de Solução de Azul de Bromotimol
- Adicionar água destilada até completar 1000 ml
- Ajustar o pH para 6,8 – 7,0 com solução de KOH a 10% e/ou H₂SO₄ a 5%
- Adicionar agar, nas seguintes quantidades:
 - 1 g por litro para meio semi sólido (dissolver antes da distribuição).
 - 15 g por litro de meio sólido.

8. MEIO DE CULTURA PARA APLICAÇÃO EM *Escherichia Coli*

8.1 Meio de Cultura LB

Este meio de cultura é utilizado no crescimento de *E-coli* e outras bacterias para extração de DNA.

8.1.1 Material Necessário

8.1.1.1 Reagentes e soluções

- Cloreto de Sódio a 10% P/V⁴,
- Extrato de Levedura⁵,
- Triptona.

8.1.1.2 Equipamentos e vidraria

- Algodão,
- Balão de fundo chato ou erlenmeyer de 1000 ml,
- Becher,
- Funil,
- Pipeta Sorológica,
- Placa de Petri,
- Proveta de 1000 ml,
- Tubo de ensaio.

8.1.2 Procedimento

• Tomar um erlenmeyer ou balão de fundo chato de 1000 ml, colocar 500 ml de água destilada e adicionar os seguintes reagentes:

- 10 g Triptona
 - 5 g Extrato de levedura
 - 5 g Cloreto de sódio
-
- Completar para 1000 ml com água destilada.
 - Adicionar agar nas seguintes quantidades:
 - 1,8 g por litro para meio semi-sólido (dissolver antes da distribuição)
 - 15 g por litro de meio sólido.

Obs₅ - Para pesar o Agar, verificar antes a tabela de pesagem, ao qual se refere ao tipo de Ágar – Lote X Marca Y.

9. FORMULAÇÃO QUÍMICA DAS SOLUÇÕES E REAGENTES

Nomenclatura	Fórmula química
--------------	-----------------

Ácido Glutâmico	$C_5H_9NO_4$
Ácido Málico	$C_4H_6O_5$
Ácido Sulfúrico a 5% V/V	H_2SO_4
Cloreto de Cálcio Dihidratado a 1% P/V	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$
Cloreto de Sódio a 10% P/V	NaCl
Cloreto Férrico Hex hidratado 1% P/V	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$
EDTA de Ferro a 1,64 % P/V	FeEDTA
Fosfato de Potássio Dibásico a 10% P/V	K_2HPO_4
Fosfato de Potássio Monobásico a 10 % P/V	KH_2PO_4
Hidróxido de Potássio a 10 % P/V	KOH
Molibdato de Sódio Dihidratado a 0,1% P/V	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$
Nitrato de Amônia	NH_4NO_3
Nitrato de Potássio	KNO_3
Sulfato de Magnésio Heptahidratado a 10 % P/V	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$

10. DOCUMENTAÇÃO COMPLEMENTAR

P.O. 12.023 – Protocolo Operacional para Preparação de Extrato de Levedura

P.O. 12.027 – Protocolo Operacional para Preparação de Solução de Micronutrientes para meio de cultura

P.O. 12.029 – Protocolo Operacional para Preparação de Solução de Vitamina para meio de cultura

11. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS

BALDANI, V. L. D. **Especificidade na infecção de raízes de milho, trigo e arroz por *Azospirillum spp.*** Itaguaí: UFRRJ, 1980. 123p. Tese de Mestrado.

BALDANI, V. L. D.; ANDRADE, V.O.; NEVES, M.C.P.; BARBOSA, A. L., PEIXOTO, R. C.; OLIVEIRA, E.C.R. **Manual de soluções e reagentes da Embrapa Agrobiologia**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, mar. 1999. 16p. (Embrapa CNPAB. Documentos, 86).

BALDANI, V.L.D.; DÓBEREINER, J. Host-plant specificity in the infection of cereals with *Azospirillum* spp. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v.12, n.4, p.433-439, 1980.

FRED, E.B.; WAKSMAN, S.A. **Laboratory manual of general microbiology with special reference to the microorganism of the soil**. New York; Mc-Graw-Hill, 1928. 145p.

MAGALHÃES, F.M.; BALDANI, J.I.; SOUTO, S.M.; KUYENDALL, J.R.; DOBEREINER, J. A new acid tolerant *Azospirillum* species. **Anais da Academia Brasileira de Ciência**, Rio de Janeiro, 55, n.4, p.417-430, 1983.

PEIXOTO, R.C. **Manual de boas práticas para laboratório**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, mar. 1999. 52p. (Embrapa CNPAB. Documentos, 87).