ISSN: 2525-8761

Morfologia das colônias de algumas rizobactérias amazônicas em três meios de cultivo diferentes

Colony morphology of some Amazonian rhizobacteria in three different culture media

DOI:10.34117/bjdv7n11-390

Recebimento dos originais: 12/10/2021
Aceitação para publicação: 22/11/2021

Thaissa Cunha de Oliveira
Mestranda em Biotecnologia pela Universidade Federal do Amazonas
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
Av. André Araújo, 2936 – Petrópolis - Manaus/AM
E-mail: thaissa.olcunha@gmail.com

Cassiane Minelli-Oliveira
Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal do Amazonas
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
Av. André Araújo, 2936 – Petrópolis - Manaus/AM
E-mail: cassyminelli@gmail.com

Nadionara Costa Menezes
Doutoranda pelo PPG Bionorte
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
Av. André Araújo, 2936 – Petrópolis - Manaus/AM
E-mail: nadionaracosta@gmail.com

Suziane Pinto Rodrigues
Mestranda em Biotecnologia pela Universidade Federal do Amazonas
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
Av. André Araújo, 2936 – Petrópolis - Manaus/AM
E-mail: rodrigues.suzi1996@gmail.com

José Carlos Ipuchima da Silva
Mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
Av. André Araújo, 2936 – Petrópolis - Manaus/AM
E-mail: carlos.silva.jcids@gmail.com

Luiz Antonio de Oliveira
Doutor em Solos pela University of Minnesota, USA
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
Av. André Araújo, 2936 – Petrópolis - Manaus/AM
E-mail: luiz.oliveira@inpa.gov.br

ISSN: 2525-8761

RESUMO

A morfologia das colônias das bactérias facilita a sua identificação, reduzindo o tempo de estudos. O uso de meios de cultivos diferentes para facilitar a diferenciação de microrganismos vem sendo feito há décadas, mostrando que pode ser um método que ajuda na separação inicial de microrganismos semelhantes. Foram colocadas 40 rizobactérias em três meios de cultura, onde as diferenças foram apenas quanto à fonte de carbono: manitol, amido e farinha de babaçu. Elas foram crescidas até a geração F3 em cada meio, para avaliar se ocorriam modificações de uma geração para a outra. Cada rizobactéria foi avaliada quanto à forma da colônia, borda, elevação, transparência, cor, aparência da colônia e aparência do muco. Além disso, foi realizado o teste de Gram e observadas as formas das células bacterianas no meio contendo manitol. A morfologia das células e das colônias das 40 rizobactérias apresentaram diferenças entre si ao crescerem nos meios, facilitando suas diferenciações e essas diferenças podem ser usadas para facilitar estudos mais detalhados com essas rizobactérias. Essas mudanças devem ser vistas com mais cuidado, para evitar que sejam confundidas com contaminantes no meio de cultura. As mudanças das características morfológicas das colônias quando cultivadas nesses meios sugerem que pode haver alterações em suas propriedades biotecnológicas, sendo um assunto para futuros estudos.

Palavras-chave: metabolismo microbiano, Biotecnologia, Morfologia bacteriana, Microbiota amazônica.

ABSTRACT

The morphology of bacterial colonies facilitates their identification, reducing the time for studies. The use of different culture media to facilitate the differentiation of microorganisms has been carried out for decades, showing that it can be a method that helps in the initial separation of similar microorganisms. Forty rhizobacteria were placed in three culture media, where the differences were only regarding the carbon source: mannitol, starch and babassu flour. They were grown to the F3 generation on each medium to assess whether changes occurred from one generation to the next. Each rhizobacteria was evaluated for colony shape, border, elevation, transparency, color, colony appearance and mucus appearance. In addition, the Gram test was performed, and the forms of bacterial cells observed in the medium containing mannitol. The morphology of cells and colonies of 40 rhizobacteria showed differences among themselves when growing in the media, facilitating their differentiation and these differences can be used to facilitate more detailed studies with these rhizobacteria. These changes must be seen more carefully, to avoid being confused with contaminants in the culture medium. Changes in the morphological characteristics of colonies when cultivated in these media suggest that there may be changes in their biotechnological properties, being a matter for future studies.

Keywords: Microbial metabolism, Biotechnology, Bacterial morphology, Amazonian microbiota.

ISSN: 2525-8761

1 INTRODUÇÃO

Estudos das morfologias das colônias de bactérias em meios de cultivo em condições de laboratório podem ser úteis para um melhor entendimento da fisiologia desses microrganismos, uma vez que eles se comportam diferentemente em resposta às fontes de nitrogênio, carbono, pH, temperatura, pressão de oxigênio e outros fatores (PAYNE; MORTON, 1992; SON et al., 2002; CHO; GIOVANNONI, 2004; OLIVEIRA et al., 2004; LEITE, 2012; MINELLI-OLIVEIRA et al., 2020).

Essas diferentes respostas às condições de cultivo permitiram, ao longo do tempo, identificar com mais precisão, diferentes grupos de microrganismos (ZIMBRO et al., 2009; ATLAS, 2010), facilitando seus isolamentos, caracterizações e seleções, além de indicar os meios que mantêm com mais facilidade, suas características e os que induzem mais modificações, o que pode ser útil nos estudos de taxonomia e, manutenção e/ou alterações de suas propriedades biotecnológicas. Por metabolizar os nutrientes do meio de cultura de forma diferenciada, é possível identificar, às vezes, até ao nível de espécie, além de selecionar aqueles de interesse econômico ou ecológico, dependendo do seu manancial enzimático e metabólico.

Pensando nisso, foram avaliadas algumas características morfológicas das colônias de 40 rizobactérias isoladas de nódulos de leguminosas de solos amazônicos usando três meios de cultivo diferentes, contendo manitol, amido ou farinha do mesocarpo do babaçu (*Attalea speciosa* Mart. Ex Spreng), visando identificar quais dessas características foram mantidas e quais foram modificadas ao longo de três gerações de crescimento em cada um dos meios. Avaliou-se também, o formato das células no meio contendo manitol como fonte de carbono.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram escolhidas 40 rizobactérias (Tabela 1) pertencentes à coleção bacteriana do Laboratório de Ecologia e Biotecnologia de Microrganismos da Amazônia (LEBMAM), localizado no Campus III do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia-INPA.

ISSN: 2525-8761

Tabela 1. Culturas de rizobactérias selecionadas para as avaliações morfológica e fisiológica

Nº de registro da cultura	**Local de coleta**	**Planta hospedeira**
INPA_R001		
INPA_R012		
INPA_R014		
INPA_R015		
INPA_R028	Novo Ayrão	Solo floresta
INPA_R034		
INPA_R046		
INPA_R178	Brasileirinho	*Inga edulis* (Ingá)
INPA_R233		
INPA_R236		
INPA_R262	Rio Preto da Eva	*Rhynchosia macrocarpum*
INPA_R266	Rio Preto da Eva	*Inga* sp. (Ingá)
INPA_R268	Rio Preto da Eva	*Inga* sp. (Ingá)
INPA_R269	Rio Preto da Eva	*Mimosa pudica*
INPA_R276	Rio Preto da Eva	*Inga edulis* (Ingá)
INPA_R285	Rio Preto da Eva	trevinho
INPA_R287		
INPA_R288		
INPA_R292	Rio Preto da Eva	*Inga edulis* (Ingá)
INPA_R296	Rio Preto da Eva	*Inga* sp. (Ingá)
INPA_R297	Rio Preto da Eva	*Mimosa pudica*
INPA_R298	Rio Preto da Eva	*Mimosa pudica*
INPA_R318	Rio Preto da Eva	*Indigosfera* sp.
INPA_R325	Rio Preto da Eva	
INPA_R548	Ramal do Caldeirão, Km3 S 3º12'26" W60º12'2,5"	*Pueraria phaseoloides* (Feijão Bravo)
INPA_R689	Manacapuru; Lago do Paru S 3°15'24,7" W 60°32'3,4"	*Inga edulis* (Ingá)
INPA_R721	Manacapuru; Lago do Paru S 3°15'24,7" W 60°32'3,4"	*Inga edulis* (Ingá)
INPA_R722	Manacapuru; Lago do Paru S 3°15'24,7" W 60°32'3,4"	*Inga edulis* (Ingá)
INPA_R739	Manacapuru; Estrada do Acajatuba S 3°13'36,1" W 60°34'20,5"	*Pueraria phaseoloides* (Feijão Bravo)
INPA_R761	Manacapuru; Estrada do Acajatuba S 3°13'36,1" W 60°34'20,5"	*Pueraria phaseoloides* (Feijão Bravo)
INPA_R781	Balbina, Km 2 S 2°4'3,7" W 60°0'7,7"	*Desmodium triflorum* (Amor-do-campo)
INPA_R783	Balbina, Km 2 S 2°4'3,7" W 60°0'7,7"	*Desmodium triflorum* (Amor-do-campo)
INPA_R792	Balbina; Km 42 Sítio Marisa S 2°3'5,2"W 59°40'11,1"	*Inga edulis* (Ingá)
INPA_R961		
INPA_R976	Itacoatiara; Novo Remanso S 03^0 38,8" W 058^0 58' 31,9"	*Inga edulis* (Ingá)
INPA_R1001		
INPA_R1060		
INPA_R1062	Manacapuru; Lago do Paru S 3°15'24,7" W 60°32'3,4"	*Inga edulis* (Ingá)
INPA_R1065	Manacapuru; Lago do Paru S 3°15'24,7" W 60°32'3,4"	*Inga edulis* (Ingá)
INPA_R1069	Manacapuru; Ramal do Laranjal S 3°16'35,6" W 60°30'6,9"	*Pueraria phaseoloides* (Feijão Bravo)

ISSN: 2525-8761

As rizobactérias foram reativadas em erlenmeyers contendo 50 mL de Yeast Mannitol Broth – YMB (VINCENT, 1970) (10g de manitol, 0,5g de K_2HPO_4, 0,2g de $MgSO_4$, 0,1g de NaCl, 0,5g de extrato de levedura, 1000 mL de água destilada – pH 6,8). As amostras foram incubadas à temperatura ambiente (28°C), em agitação a 150 rpm, até o crescimento microbiano.

Após o crescimento microbiano, as rizobactérias foram semeadas em placas de Petri contendo o meio de cultivo Yeast Manitol Ágar – YMA (YMB contendo 15 g de agar em 1000mL de meio), à temperatura ambiente (28°C). Estas condições também foram utilizadas para manutenção das bactérias durante os experimentos.

Após a reativação das rizobactérias, foi realizada a confirmação de pureza dos isolados através da técnica de coloração de Gram. As lâminas foram preparadas colocando-se 10 µL de água destilada esterilizada no centro da lâmina e em seguida uma alçada de uma colônia bacteriana. A bactéria foi homogeneizada na água, deixada secar ao ar e fixada na chama do bico de Bunsen.

A coloração foi realizada utilizando o kit coloração de Gram Laborclin®, onde a lâmina foi coberta com violeta de genciana por 60 segundos. Após esse tempo, foi lavada em água corrente e coberta com lugol por 60 segundos. O corante foi removido em água corrente, adicionando a solução descorante por 15 segundos e mais uma vez lavada em água corrente. Por último foi colocada a fucsina por 30 segundos, lavada em água corrente e deixada secar ao ar. Todas as lâminas foram observadas em microscópio óptico usando a objetiva de imersão (100x de aumento).

As rizobactérias que apresentaram a coloração azul violeta foram consideradas Gram positivas e as coradas de vermelho foram consideradas Gram negativas.

Para confirmação da coloração de Gram foi realizado o teste Gram direto de Gregersen (1978). Assim, uma colônia de rizobactéria foi retirada com auxílio de palitos de dente esterilizados e transferida para uma lâmina adicionando 20 µL de KOH 3%. A rizobactéria foi homogeneizada. Foi realizada a leitura visual. Onde houve formação de um fio viscoso, a rizobactéria foi considerada Gram negativa e se não houve a formação do fio viscoso a rizobacteria foi considerada Gram positiva.

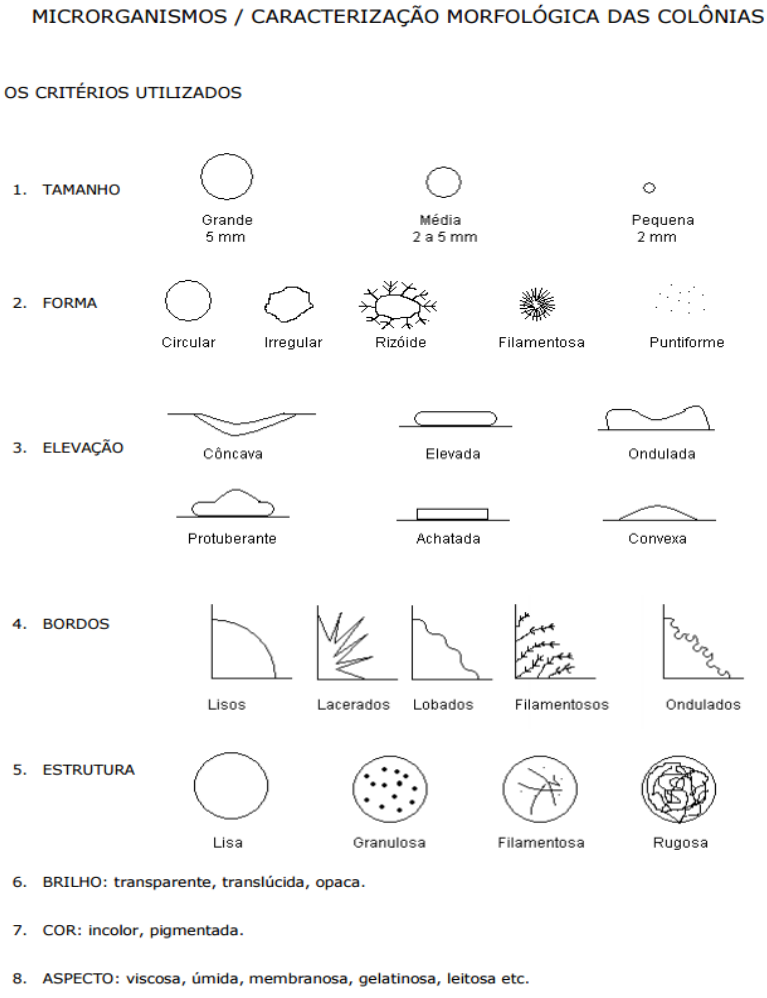
A fim de conhecer melhor o perfil fenotípico dessas rizobactérias, foi realizada a caracterização morfológica das colônias dos isolados nos três diferentes meios de cultura.

ISSN: 2525-8761

Primeiramente, todos os isolados foram semeados em triplicata em placas de Petri contendo os meios YMA, YMA modificado, substituindo o manitol pela farinha de babaçu (10 g farinha de babaçu) e YMA modificado substituindo o manitol por amido de milho (10 g de amido de milho). As placas foram cultivadas em BOD a 28°C por 48h. Este cultivo foi chamado de geração F1. A partir da geração F1 foram realizados novos cultivos nas mesmas condições, sendo chamado de geração F2 e posteriormente mais um cultivo chamado de geração F3. Em todas as placas foram realizadas as caracterizações morfológicas das colônias.

Cada rizobactéria foi avaliada quanto à forma, borda, elevação, transparência, cor, aparência da colônia e aparência do muco. Para isso, as colônias bacterianas foram inoculadas nos três meios diferentes previamente citados, com incubação a 27 ºC. A caracterização das colônias foi realizada de acordo com as metodologias de Vincent (1970), Hungria e Araújo (1994), Prescott et al., (2004) e Malajovich (2015) (Figura 1).

Figura 1. Caracterização morfológica de colônias bacterianas segundo Malajovich (2015).



ISSN: 2525-8761

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao se observar as formas das 40 rizobactérias usadas no presente estudo, verificou-se que 29 são bacilos e 11 cocobacilos (Tabela 1).

Usando-se o teste de Gram tradicional foi possível detectar que 37 são Gram-negativas e 3 são Gram-positivas. Esse método de coloração diferencia as bactérias de acordo com os constituintes das suas paredes celulares. As bactérias contendo pequenas quantidades de peptideoglicanos e caracteristicamente lipopolissacarídeos são Gram-negativas, enquanto as que contêm grandes quantidades de peptideoglicanos e nenhum lipopolissacarideos são consideradas Gram-positivas (ROBERTS; SANDLE, 2008).

No entanto, quando ocorre alguma perda da integridade da parede celular, algumas bactérias Gram-positivas acabam sendo interpretadas erradamente como Gram-negativas pelo método de Gram tradicional, usando-se nesses casos, o teste de Gram com KOH a 3 % como complemento ao tradicional (GREGERSEN, 1978; HALEBIAN et al., 1981; SANDLE, 2005; ROBERTS; SANDLE, 2008).

Ao se realizar o teste de Gram com KOH a 3 % para confirmação dos resultados obtidos com o teste de Gram tradicional, observou-se que sete das consideradas negativas eram Gram-positivas (INPA R014, INPA R266, INPA R298, INPA R739, INPA R792, INPA R976 e INPA R1069), comprovando que esse método foi útil para evitar erros ocasionados pelo método de Gram tradicional.

Tabela 1. Forma das células e teste de Gram das rizobactérias crescidas em meio YMA (manitol como fonte de carbono).

Bactéria	Forma	Gram convencional	Gram em KOH 3%
INPA R001	Cocobacilos	Negativa	Negativa
INPA R012	Bacilos	Negativa	Negativa
INPA R014	Bacilos	Negativa	Positiva
INPA R015	Bacilos	Negativa	Negativa
INPA R028	Bacilos	Negativa	Negativa
INPA R034	Bacilos	Negativa	Negativa
INPA R046	Cocobacilos*	Negativa	Negativa
INPA R178	Cocobacilos	Negativa	Negativa
INPA R233	Bacilos	Positiva	Positiva
INPA R236	Bacilos	Negativa	Negativa
INPA R262	Bacilos	Negativa	Negativa
INPA R266	Bacilos	Negativa	Positivo
INPA R268	Bacilos	Negativa	Negativa
INPA R269	Bacilos	Negativa	Negativa
INPA R276	Bacilos*	Negativa	Negativa
INPA R285	Bacilos	Negativa	Negativa

INPA R287	Bacilos	Negativa	Negativa
INPA R288	Bacilos	Negativa	Negativa
INPA R292	Bacilos	Positiva	Positiva
INPA R296	Bacilos	Positiva	Positiva
INPA R297	Bacilos	Negativa	Negativa
INPA R298	Bacilos	Negativa	Positiva
INPA R318	Cocobacilos	Negativa	Negativa
INPA R325	Bacilos	Negativa	Negativa
INPA R548	Bacilos*	Negativa	Negativa
INPA R689	Bacilos	Negativa	Negativa
INPA R721	Cocobacilos	Negativa	Negativa
INPA R722	Cocobacilos	Negativa	Negativa
INPA R739	Bacilos	Negativa	Positiva
INPA R761	Bacilos	Negativa	Negativa
INPA R781	Bacilos	Negativa	Negativa
INPA R783	Cocobacilos	Negativa	Negativa
INPA R792	Bacilos	Negativa	Positiva
INPA R961	Cocobacilos	Negativa	Negativa
INPA R976	Cocobacilos*	Negativa	Positiva
INPA R1001	Cocobacilos	Negativa	Negativa
INPA R1060	Bacilos	Negativa	Negativa
INPA R1062	Bacilos	Negativa	Negativa
INPA R1065	Cocobacilos	Negativa	Negativa
INPA R1069	Bacilos	Negativa	Positiva

*Apresentaram formas semelhantes a esporos.

Ao se analisar a forma das colônias dessas rizobactérias, observou-se que não houve mudança nos meios com manitol ou babaçu ao se comparar as gerações F1, F2 e F3 (Tabela 2). Apenas no meio com amido houve uma modificação relacionada com a geração na INPA R292, que mostrou forma rizóide na F1 e irregular nas F2 e F3.

Ao se comparar suas formas nos três meios, observou-se algumas variações de formatos. No meio com manitol, as formas foram irregulares e circulares, enquanto nos outros dois meios, além dessas, apareceu algumas rizobactérias com o formato de rizóides.

Quanto à aparência das colônias, não se observou um efeito das gerações crescidas nos três meios (Tabela 2), mas houve algumas diferenças ao se comparar seus crescimentos nesses meios. A INPA R001 por exemplo, mostrou-se homogênea nos três meios, mas a INPA R012 apresentou-se com aparência heterogênea no meio com manitol e homogênea nos meios com amido e com a farinha do babaçu. Do total das 40 rizobactérias, 16 se comportaram do mesmo jeito nos três meios e 24 apresentaram modificações relacionadas com a fonte de carbono dos meios onde foram cultivadas.

ISSN: 2525-8761

Tabela 2. Forma e aparência das colônias de rizobactérias crescidas em diferentes meios de cultura por três gerações.

	Forma das colônias					Aparência das colônias		
Bactéria	Manitol	Amido			Babaçu	Manitol	Amido	Babaçu
INPA	F1 a F3	F1	F2	F3	F1 a F3	F1 a F3	F1 a F3	F1 a F3
R_001	irregular	irregular	irregular	irregular	irregular	homogênea	homogênea	homogênea
R_012	irregular	rizoide	rizoide	rizoide	irregular	heterogênea	homogênea	heterogênea
R_014	irregular	irregular	irregular	irregular	irregular	heterogênea	homogênea	homogênea
R_015	irregular	rizoide	rizoide	rizoide	irregular	homogênea	homogênea	homogênea
R_028	irregular	rizoide	rizoide	rizoide	irregular	homogênea	homogênea	homogênea
R_034	irregular	irregular	irregular	irregular	irregular	heterogênea	homogênea	homogênea
R_046	irregular	irregular	irregular	irregular	irregular	homogênea	homogênea	heterogênea
R_178	irregular	irregular	irregular	irregular	irregular	homogênea	homogênea	homogênea
R_233	irregular	irregular	irregular	irregular	rizoide	homogênea	homogênea	heterogênea
R_236	circular	irregular	irregular	irregular	circular	homogênea	homogênea	homogênea
R_262	irregular	irregular	irregular	irregular	irregular	homogênea	homogênea	heterogênea
R_266	irregular	irregular	irregular	irregular	irregular	homogênea	homogênea	heterogênea
R_268	irregular	irregular	irregular	irregular	irregular	heterogênea	homogênea	heterogênea
R_269	circular	irregular	irregular	irregular	irregular	heterogênea	homogênea	homogênea
R_276	irregular	irregular	irregular	irregular	irregular	homogênea	homogênea	homogênea
R_285	circular	irregular	irregular	irregular	irregular	homogênea	homogênea	homogênea
R_287	irregular	irregular	irregular	irregular	irregular	heterogênea	homogênea	heterogênea
R_288	circular	irregular	irregular	irregular	irregular	homogênea	homogênea	homogênea
R_292	irregular	rizoide	irregular	irregular	irregular	heterogênea	homogênea	homogênea
R_296	circular	circular	circular	circular	irregular	heterogênea	homogênea	homogênea
R_297	circular	irregular	irregular	irregular	irregular	heterogênea	homogênea	heterogênea
R_298	irregular	irregular	irregular	irregular	irregular	heterogênea	homogênea	heterogênea
R_318	irregular	irregular	irregular	irregular	irregular	homogênea	homogênea	homogênea
R_325	irregular	irregular	irregular	irregular	irregular	homogênea	homogênea	heterogênea
R_548	irregular	irregular	irregular	irregular	irregular	homogênea	homogênea	homogênea
R_689	irregular	irregular	irregular	irregular	irregular	homogênea	heterogênea	heterogênea
R_721	circular	irregular	irregular	irregular	irregular	homogênea	homogênea	homogênea
R_722	circular	irregular	irregular	irregular	irregular	homogênea	homogênea	homogênea
R_739	circular	irregular	irregular	irregular	irregular	heterogênea	homogênea	homogênea
R_761	irregular	irregular	irregular	irregular	irregular	homogênea	homogênea	homogênea
R_781	circular	irregular	irregular	irregular	irregular	homogênea	homogênea	homogênea
R_783	irregular	irregular	irregular	irregular	irregular	homogênea	homogênea	heterogênea
R_792	circular	irregular	irregular	irregular	irregular	homogênea	homogênea	heterogênea
R_961	irregular	irregular	irregular	irregular	irregular	homogênea	homogênea	heterogênea
R_976	circular	irregular	irregular	irregular	irregular	heterogênea	homogênea	homogênea
R_1001	irregular	irregular	irregular	irregular	irregular	homogênea	homogênea	homogênea
R_1060	circular	irregular	irregular	irregular	irregular	homogênea	homogênea	heterogênea
R_1062	circular	irregular	irregular	irregular	irregular	heterogênea	heterogênea	homogênea
R_1065	irregular	irregular	irregular	irregular	irregular	homogênea	homogênea	homogênea
R_1069	irregular	irregular	irregular	irregular	circular	homogênea	homogênea	heterogênea

Minelli-Oliveira et al. (2020) também observaram variações em bactérias isoladas de queijos e iogurtes quando avaliaram seus crescimentos em meios contendo lactose ou glúten. Eles mencionam que essas pequenas diferenças podem ajudar na separação das bactérias antes de testes de identificação taxonômica.

Ao se analisar as formas de elevações das colônias dessas rizobactérias nos três meios, predominou a forma de elevação plana nas colônias dessas bactérias, mas sendo observadas também, as formas elevadas e côncavas (Tabela 3). Observou-se que apenas no meio com manitol não houve mudança do formato ao longo das três gerações. Nos

ISSN: 2525-8761

meios com amido e farinha de babaçu o tempo de geração resultou em modificações. Essas mudanças foram observadas em 19 das 40 bactérias no meio com amido e em 18 delas no meio com farinha de babaçu. Dessas que mostraram diferentes formatos de elevação das colônias, apenas 10 apresentaram modificações nos dois meios de cultura, que são as INPA R028, INPA R034, INPA R236, INPA R262, INPA R296, INPA R548, INPA R722, INPA R792, INPA R1060 e INPA R1065 (Tabela 3).

Tabela 3. Formatos da elevação das colônias de 40 rizobactérias crescidas em diferentes meios de cultura por três gerações

	Elevação das colônias						
Bactéria	Manitol		Amido			Babaçu	
INPA	F1 a F3	F1	F2	F3	F1	F2	F3
R_001	plana	plana	côncava	plana	plana	plana	plana
R_012	elevada	côncava	plana	côncava	côncava	côncava	côncava
R_014	plana	plana	plana	plana	plana	plana	plana
R_015	plana	plana	elevada	plana	plana	plana	plana
R_028	plana	elevada	côncava	elevada	elevada	plana	plana
R_034	plana	côncava	plana	côncava	côncava	plana	plana
R_046	plana	plana	plana	plana	plana	elevada	elevada
R_178	plana	plana	plana	plana	plana	plana	plana
R_233	plana	plana	plana	plana	plana	plana	plana
R_236	plana	plana	elevada	plana	plana	elevada	elevada
R_262	elevada	elevada	plana	elevada	elevada	plana	plana
R_266	plana	plana	plana	plana	plana	plana	plana
R_268	plana	plana	plana	plana	plana	plana	plana
R_269	plana	plana	plana	plana	plana	plana	plana
R_276	plana	plana	plana	plana	plana	plana	plana
R_285	plana	plana	plana	plana	plana	plana	plana
R_287	plana	plana	plana	plana	plana	plana	plana
R_288	elevada	plana	plana	plana	plana	côncava	côncava
R_292	plana	plana	plana	plana	plana	plana	plana
R_296	plana	plana	elevada	plana	plana	elevada	elevada
R_297	plana	elevada	elevada	elevada	elevada	plana	plana
R_298	plana	elevada	elevada	elevada	elevada	côncava	côncava
R_318	elevada	elevada	elevada	elevada	elevada	elevada	elevada
R_325	elevada	elevada	elevada	elevada	elevada	plana	plana
R_548	elevada	elevada	plana	elevada	elevada	plana	plana
R_689	plana	plana	plana	plana	plana	elevada	elevada
R_721	plana	plana	elevada	plana	plana	plana	plana
R_722	plana	elevada	plana	elevada	elevada	plana	plana
R_739	plana	plana	elevada	plana	plana	plana	plana
R_761	plana	elevada	elevada	elevada	elevada	plana	plana
R_781	elevada	elevada	plana	elevada	elevada	elevada	elevada
R_783	elevada	plana	elevada	plana	plana	plana	plana
R_792	plana	elevada	plana	elevada	elevada	plana	plana
R_961	plana	plana	plana	plana	plana	elevada	elevada
R_976	plana	plana	plana	plana	plana	plana	plana
R_1001	plana	plana	côncava	plana	plana	plana	plana
R_1060	plana	côncava	plana	côncava	côncava	plana	plana
R_1062	plana	plana	elevada	plana	plana	plana	plana
R_1065	plana	elevada	plana	elevada	elevada	plana	plana
R_1069	plana	plana	plana	plana	plana	elevada	elevada

Predominou a ocorrência de bordas lisas nas colônias das 40 rizobactérias após crescimento nos meios contendo manitol, amido ou farinha de babaçu como fontes de

ISSN: 2525-8761

carbono, mas sendo observadas também, as formas ondulada, filamentosa e lobada (Tabela 4).

Somente no meio contendo manitol se observou alguma modificação das bactérias quando se compara as gerações F1, F2 e F3. Nos meios com amido e farinha de babaçu os formatos das bordas das colônias não se alteraram até a geração F3.

No entanto, houve modificações das bordas de acordo com a fonte de carbono presente nos meios em um grande número de rizobactérias. Das 40 testadas, apenas sete (INPA R014, INPA R046, INPA R266, INPA R276, INPA R325, INPA R1001 e INPA R1065). As INPA R325 e INPA R1065 mostraram bordas lisas em todos os meios e gerações, enquanto as outras cinco mostraram bordas onduladas.

Tabela 4. Formatos das bordas das colônias de 40 rizobactérias crescidas em diferentes meios de cultura por três gerações.

	Forma das bordas das colônias				
Bactéria		Manitol		Amido	Babaçu
INPA	F1	F2	F3	F1 aF3	F1 a F3
R_001	ondulada	ondulada	ondulada	ondulada	lisa
R_012	ondulada	filamentosa	ondulada	filamentosa	lisa
R_014	ondulada	ondulada	ondulada	ondulada	ondulada
R_015	ondulada	filamentosa	ondulada	filamentosa	ondulada
R_028	lisa	filamentosa	lisa	filamentosa	ondulada
R_034	lisa	filamentosa	lisa	filamentosa	ondulada
R_046	ondulada	ondulada	ondulada	ondulada	ondulada
R_178	lisa	lisa	lisa	lisa	ondulada
R_233	filamentosa	ondulada	filamentosa	ondulada	filamentosa
R_236	lisa	ondulada	lisa	ondulada	lisa
R_262	lisa	lisa	lisa	lisa	lobada
R_266	ondulada	ondulada	ondulada	ondulada	ondulada
R_268	lisa	filamentosa	lisa	filamentosa	lisa
R_269	ondulada	ondulada	ondulada	ondulada	filamentosa
R_276	ondulada	ondulada	ondulada	ondulada	ondulada
R_285	lisa	ondulada	lisa	ondulada	ondulada
R_287	ondulada	ondulada	ondulada	ondulada	lobada
R_288	ondulada	lisa	ondulada	lisa	ondulada
R_292	lisa	filamentosa	lisa	filamentosa	lobada
R_296	lisa	ondulada	lisa	ondulada	ondulada
R_297	filamentosa	filamentosa	filamentosa	filamentosa	ondulada
R_298	filamentosa	filamentosa	filamentosa	filamentosa	lisa
R_318	lisa	lobada	lisa	lobada	lobada
R_325	lisa	lisa	lisa	lisa	lisa
R_548	lisa	ondulada	lisa	ondulada	lobada
R_689	lisa	lisa	lisa	lisa	lobada
R_721	ondulada	ondulada	ondulada	ondulada	lisa
R_722	lisa	ondulada	lisa	ondulada	ondulada
R_739	lisa	ondulada	lisa	ondulada	lisa
R_761	filamentosa	ondulada	filamentosa	ondulada	lisa
R_781	lisa	ondulada	lisa	ondulada	lisa
R_783	lisa	lobada	lisa	lobada	ondulada
R_792	lisa	ondulada	lisa	ondulada	lisa
R_961	ondulada	ondulada	ondulada	ondulada	lobada
R_976	lisa	ondulada	lisa	ondulada	lisa
R_1001	ondulada	ondulada	ondulada	ondulada	ondulada
R_1060	lisa	lisa	lisa	lisa	lobada
R_1062	lisa	ondulada	lisa	ondulada	ondulada
R_1065	lisa	lisa	lisa	lisa	lisa
R_1069	ondulada	ondulada	ondulada	ondulada	lisa

ISSN: 2525-8761

Ao se analisar a estrutura das colônias e a aparência do muco, observou que não houve influência do tempo de geração nessas características das rizobactérias (Tabela 5). A estrutura das colônias apresentou as formas lisas e rugosas, predominando a lisa e havendo também, influência do meio de cultura nessa característica. Das 40 bactérias, 23 apresentaram mudança dessa característica conforme o meio onde foram cultivadas. Os meios onde as bactérias mostraram menos colônias rugosas foram os com manitol com seis e o com amido, com sete e, o com maior número de colônias rugosas foi o com farinha de babaçu com 17.

Por outro lado, observou-se duas aparências do muco das colônias: homogênea e heterogênea, não havendo influência da geração nessa característica, mas observando novamente o efeito das fontes de carbono. Predominou a aparência homogênea, principalmente no meio contendo farinha de babaçu, com um total de 38 das 40 rizobactérias avaliadas. O meio onde houve maior ocorrência de mucos com aparência heterogênea foi o contendo amido com 20. No meio com manitol foram observadas 16 com o aspecto heterogêneo.

Tabela 5. Estrutura e aparência de muco das colônias de 40 rizobactérias crescidas em diferentes meios de cultura por três gerações.

Bactéria	Estrutura das colônias			Aparência do muco das colônias		
INPA	Manitol	Amido	Babaçu	Manitol	Amido	Babaçu
	F1 a F3	F1 a F3	F1 a F3	F1 a F3	F1 a F3	F1 a F3
R_001	lisa	lisa	lisa	homogênea	homogênea	homogênea
R_012	lisa	lisa	lisa	heterogênea	heterogênea	homogênea
R_014	lisa	lisa	lisa	homogênea	heterogênea	homogênea
R_015	rugosa	lisa	rugosa	homogênea	heterogênea	homogênea
R_028	lisa	lisa	rugosa	homogênea	heterogênea	homogênea
R_034	lisa	lisa	rugosa	homogênea	heterogênea	homogênea
R_046	lisa	lisa	lisa	heterogênea	homogênea	homogênea
R_178	lisa	lisa	rugosa	homogênea	heterogênea	homogênea
R_233	rugosa	lisa	rugosa	heterogênea	heterogênea	heterogênea
R_236	lisa	lisa	lisa	homogênea	heterogênea	homogênea
R_262	lisa	lisa	rugosa	heterogênea	homogênea	homogênea
R_266	rugosa	lisa	lisa	heterogênea	homogênea	homogênea
R_268	lisa	rugosa	lisa	heterogênea	heterogênea	homogênea
R_269	rugosa	lisa	lisa	homogênea	heterogênea	homogênea
R_276	lisa	rugosa	lisa	homogênea	homogênea	homogênea
R_285	lisa	lisa	lisa	homogênea	homogênea	heterogênea
R_287	rugosa	rugosa	rugosa	heterogênea	heterogênea	homogênea
R_288	lisa	lisa	rugosa	homogênea	homogênea	homogênea
R_292	lisa	lisa	rugosa	homogênea	heterogênea	homogênea
R_296	lisa	rugosa	lisa	homogênea	heterogênea	homogênea
R_297	lisa	rugosa	rugosa	heterogênea	heterogênea	homogênea
R_298	lisa	lisa	lisa	heterogênea	heterogênea	homogênea
R_318	lisa	lisa	lisa	homogênea	homogênea	homogênea
R_325	lisa	lisa	lisa	heterogênea	homogênea	homogênea
R_548	lisa	lisa	lisa	homogênea	homogênea	homogênea
R_689	lisa	rugosa	lisa	heterogênea	heterogênea	homogênea

ISSN: 2525-8761

R_721	lisa	lisa	lisa	homogênea	homogênea	homogênea
R_722	lisa	lisa	rugosa	homogênea	homogênea	homogênea
R_739	lisa	lisa	lisa	homogênea	heterogênea	homogênea
R_761	lisa	lisa	lisa	homogênea	homogênea	homogênea
R_781	lisa	lisa	lisa	homogênea	homogênea	homogênea
R_783	lisa	lisa	rugosa	heterogênea	homogênea	homogênea
R_792	lisa	lisa	lisa	heterogênea	homogênea	homogênea
R_961	lisa	lisa	rugosa	heterogênea	homogênea	homogênea
R_976	lisa	lisa	lisa	homogênea	homogênea	homogênea
R_1001	lisa	lisa	rugosa	homogênea	homogênea	homogênea
R_1060	rugosa	lisa	rugosa	heterogênea	heterogênea	homogênea
R_1062	lisa	lisa	rugosa	homogênea	heterogênea	homogênea
R_1065	lisa	lisa	lisa	homogênea	homogênea	homogênea
R_1069	lisa	rugosa	rugosa	heterogênea	heterogênea	homogênea

Ao se analisar a cor e brilho das colônias (Tabela 6), observou-se que apresentaram cores amarela, branca e incolor, também sem efeito das gerações, mas sendo afetadas pelo meio de cultura onde cresceram. A cor branca foi a que predominou, sendo que do total de 40, 17 foram influenciadas pelo meio de crescimento.

Quanto ao brilho das colônias (Tabela 6), foram observados brilhos opacos, transparentes, translúcidos e brilhosos. Também não houve influência das gerações das colônias cultivadas nesses meios, mas houve modificação em algumas delas dependendo do meio onde foram cultivadas.

Tabela 6. Cor e brilho das colônias de 40 rizobactérias crescidas em diferentes meios de cultura por três gerações.

	Cor das colônias			Brilho das colônias		
Bactéria	Manitol	Amido	Babaçu	Manitol	Amido	Babaçu
INPA	F1 a F3	F1 a F3	F1 a F3	F1 a F3	F1 a F3	F1 a F3
R_001	branca	branca	branca	brilhosa	opaca	opaca
R_012	branca	incolor	branca	brilhosa	transparente	translúcida
R_014	branca	branca	branca	brilhosa	brilhosa	opaca
R_015	branca	branca	branca	brilhosa	opaca	opaca
R_028	incolor	incolor	branca	opaca	transparente	opaca
R_034	incolor	incolor	branca	opaca	transparente	opaca
R_046	amarela	branca	branca	translúcida	brilhosa	translúcida
R_178	branca	incolor	branca	translúcida	transparente	opaca
R_233	branca	branca	branca	opaca	translúcida	opaca
R_236	branca	branca	branca	translúcida	translúcida	translúcida
R_262	branca	amarela	incolor	translúcida	translúcida	transparente
R_266	amarela	incolor	branca	translúcida	transparente	translúcida
R_268	incolor	branca	incolor	translúcida	translúcida	transparente
R_269	branca	branca	branca	brilhosa	brilhosa	opaca
R_276	branca	branca	incolor	translúcida	opaca	transparente
R_285	branca	branca	branca	brilhosa	opaca	translúcida
R_287	branca	branca	branca	opaca	brilhosa	opaca
R_288	branca	branca	branca	translúcida	translúcida	translúcida
R_292	branca	branca	branca	opaca	opaca	opaca
R_296	branca	branca	branca	brilhosa	opaca	brilhosa
R_297	branca	branca	branca	brilhosa	opaca	opaca
R_298	branca	branca	branca	translúcida	translúcida	brilhosa

ISSN: 2525-8761

R_318	branca	branca	branca	translúcida	translúcida	translúcida
R_325	branca	branca	branca	translúcida	translúcida	translúcida
R_548	branca	branca	branca	translúcida	translúcida	translúcida
R_689	branca	branca	branca	brilhosa	opaca	brilhosa
R_721	branca	branca	branca	brilhosa	translúcida	translúcida
R_722	branca	incolor	incolor	brilhosa	transparente	transparente
R_739	branca	branca	incolor	opaca	translúcida	transparente
R_761	branca	branca	branca	opaca	brilhosa	translúcida
R_781	branca	branca	branca	opaca	translúcida	brilhosa
R_783	branca	incolor	branca	brilhosa	transparente	brilhosa
R_792	incolor	branca	incolor	translúcida	translúcida	transparente
R_961	branca	incolor	branca	translúcida	transparente	brilhosa
R_976	branca	branca	incolor	translúcida	translúcida	transparente
R_1001	branca	incolor	branca	brilhosa	transparente	opaca
R_1060	branca	incolor	branca	translúcida	transparente	opaca
R_1062	branca	branca	branca	brilhosa	brilhosa	opaca
R_1065	branca	branca	branca	brilhosa	translúcida	translúcida
R_1069	branca	branca	branca	opaca	brilhosa	translúcida

O uso de meios de cultivos diferentes para facilitar a diferenciação de microrganismos vem sendo feito há décadas, mostrando que pode ser um método que ajuda na separação inicial de microrganismos semelhantes (LEE et al., 1974; PAYNE; MORTON, 1992; SHAPIRO, 1996; BERESWILL et al., 1998; SOUSA et al., 2013; MINELLI-OLIVEIRA et al., 2020).

Não se imaginava encontrar diferenças ao se comparar as gerações F1, F2 e F3 cultivadas em cada um desses meios, mas os resultados indicam que mudanças podem ocorrer na fisiologia das bactérias quando cultivadas frequentemente nos meios de cultivo de rotina em laboratórios, o que pode ser confundido com contaminantes. Essas mudanças das características das colônias merecem ser melhor estudadas, pois podem refletir também, em seus potenciais biotecnológicos.

4 CONCLUSÕES

A morfologia das células e das colônias das 40 rizobactérias apresentaram diferenças entre si ao crescerem nos meios contendo manitol, amido ou farinha de babaçu, facilitando suas diferenciações.

Essas diferenças podem ser usadas para facilitar estudos mais detalhados com essas rizobactérias.

Essas mudanças devem ser vistas com mais cuidado, para evitar que sejam confundidas com contaminantes no meio de cultura.

ISSN: 2525-8761

As mudanças das características morfológicas das colônias quando cultivadas nesses meios sugerem que pode haver alterações em suas propriedades biotecnológicas, sendo um assunto para futuros estudos.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e à FAPEAM (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas), pelo apoio financeiro que permitiu realizar essa pesquisa.

ISSN: 2525-8761

REFERÊNCIAS

ATLAS, R.M. Handbook of Microbiological media, Fourth Edition, CRC Press, Boca Raton, 2043p. 2010.

BERESWILL, S.; JOCK, S.; BELLEMANN, P.; GEIDER, K. Identification of *Erwinia amylovora* by growth morphology on agar containing copper sulfate an by capsule staining with lectin. Plant Disease, v.82, p. 158-164. 1998.

CHO, J. C.; GIOVANNONI, S. J. Cultivation and growth characteristics of a diverse group of oligotrophic marine *Gammaproteobacteria.* Appl. Environ. Microbiol., v. 70, n.1, p. 432-440. doi: 10.1128/AEM.70.1.432-440. 2004

GREGERSEN, T. Rapid method for distinction of Gram-negative from Gram-positive bacteria. European J. Appl. Microbiol. Biotechnol. v. 5, p.123-127, 1978.

HALEBIAN, S.; FINEGOLD, S.M.; ROLFE, R.D. Rapid method that aids in distinguishing Gram-positive from Gram-negative anaerobic bacteria, Journal of Clinical Microbiology, v. 13, No.3, p. 444-448, 1981. doi: 10.1128/jcm.13.3.444-448.1981

HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R.S. Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola. Brasília: EMBRAPA. 1994.

LEE, S. Y.; VEDAMUTHU, E. R.; WASHAM, C. J.; REINBOLD, G. W. An agar medium for the differential enumeration of yogurt starter bacteria. J. Milk Food Technol., v. 37, n. 5. p. 272-276. 1974.

LEITE S. S. 2012. Influência de fatores abióticos no crescimento e esporulação de isolados geneticamente distintos de *Trichoderma stromaticum.* Bahia, Brasil. (Msc. Dissertação. Universidade Estadual de Santa Cruz). 68p. 2012.

MALAJOVICH, M.A. www.bteduc.bio.br/guias/ 58_Caracterizacao_ morfologica_ de_colonias_microbianas.pdf. 2015.

MINELLI-OLIVEIRA, C.; OLIVEIRA, N.F.; MIYAMOTO, M.S.F.; OLIVEIRA, L.A. Influência do meio de cultura nas características morfológicas das colônias de algumas bactérias capazes de degradarem a lactose e o glúten. Braz. J. of Develop., v.6, n. 6, p.37017-37030, 2020.

OLIVEIRA, W. F.; CARDOSO, W. M.; MARQUES, L. C. L.; SALLES, R. P. R.; AGUIAR FILHO, J. L. C.; TEIXEIRA, R. S. C.; ROMÃO, J. M.; LIMA, A. C. P. 2004. Utilização de diferentes meios de cultura para o isolamento de enterobactérias em amostras fecais de frangos de corte procedentes de explorações industriais do Estado do Ceará, Brasil. Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias, v. 99, n. 552, p. 211-214. 2004.

PAYNE, M. P.; MORTON, R.J. Effect of culture media and incubation temperature on growth of selected strains of *Francisella tularensis*. J. Vet. Diagn. Invest., v. 4, p. 264-269. 1992.

PRESCOOT, L.M.; HARLEY, J.P.; KLEIN, D.A. Microbiology 6th edition. Published by McGraw-Hill Science/Engineering/Math Hardcover Unknown Binding – March 2, 2004

ROBERTS, J.; SANDLE, T. Assessment of the potassium hydroxide test as a complimentary test for the Gram-stain. PharMIG News, https://www.researchgate.net/publication/322197966, 2008.

SANDLE, T. (2005): 'Gram's Stain: History and explanation of the fundament technique of determinative bacteriology', PharMIG News, Issue 18, January 2005, p.5-6, 2005.

SHAPIRO, J. A. The significances of bacterial colony patterns. BioEssays, v. 17, n.7, p. 597-607. 1995.

SON, C.; CHUNG, S.; LEE, J.; KIM, S. Isolation and cultivation characteristics of *Acetobacter xylinum* KJ-1 producing bacterial cellulose in shaking cultures. J. Microbiol. Biotechnol., v. 12, n. 5, p. 722–728. 2002.

SOUSA, A. M.; MACHADO, I.; NICOLAU, A.; PEREIRA, M.O. Imoprovements on colony morphology identification towards bacterial profiling. Journal Microbiological Methods, v. 95, p. 327-335. 2013.

VINCENT, J. M. A Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria. Oxford: Blackwell Scientific Publications (International Biology Program Handbook, 15. London), 164 p., 1970.

ZIMBRO, M. J.; POWER, D. A.; MILLER, S. M.; WILSON, G. E.; JOHNSON, J. A. Difco & BBL Manual: Manual of Microbiological Culture Media Second Edition, Becton Dickinson and Co., Sparks, Maryland, 686p. 2009.