

The background of the entire cover is a microscopic image of various bacteria, primarily rod-shaped, rendered in a monochromatic cyan/blue color. The bacteria are scattered across the frame, with some in sharp focus and others blurred in the background, creating a sense of depth and scientific focus.

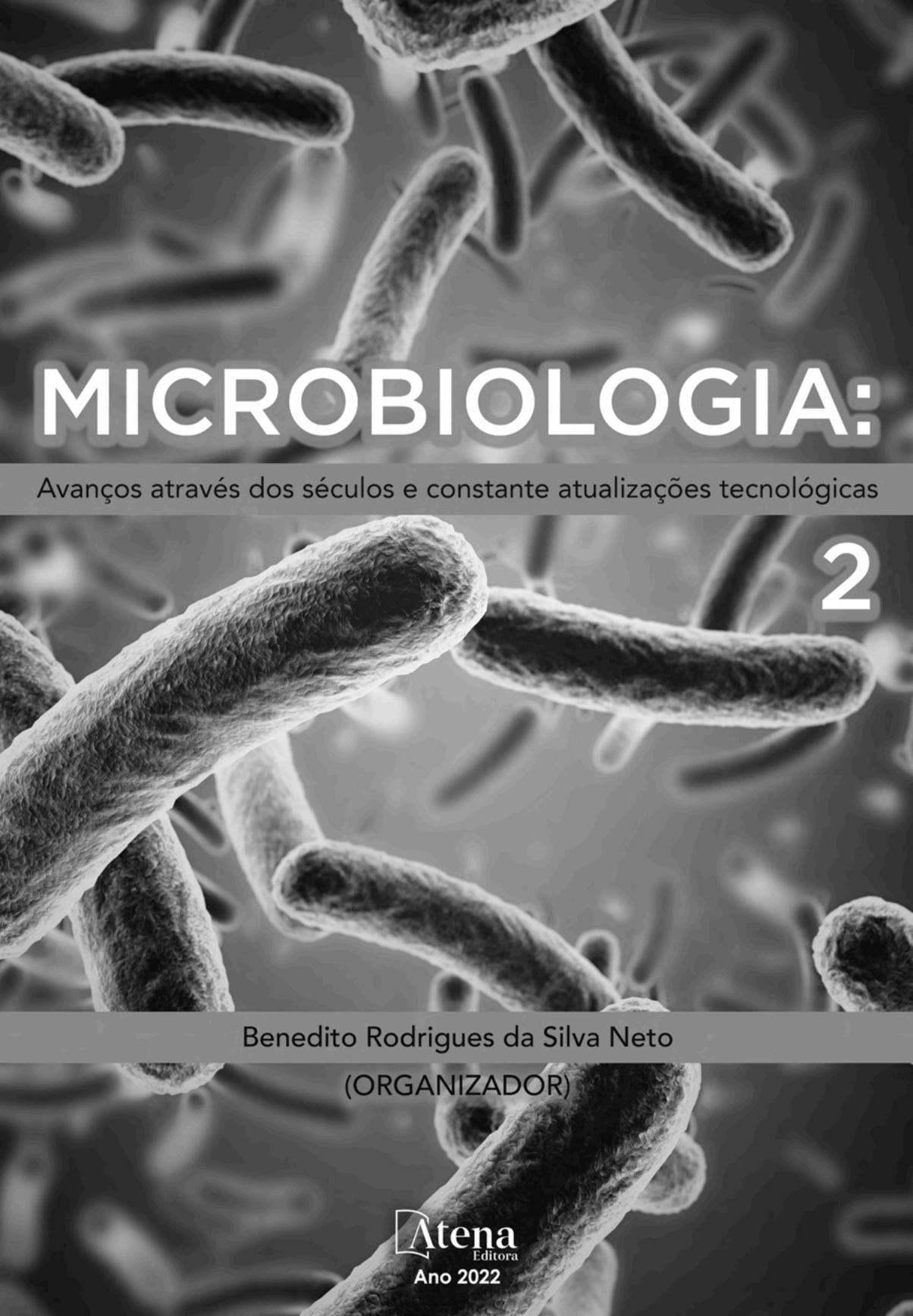
MICROBIOLOGIA:

Avanços através dos séculos e constante atualizações tecnológicas

2

Benedito Rodrigues da Silva Neto
(ORGANIZADOR)

 **Atena**
Editora
Ano 2022



MICROBIOLOGIA:

Avanços através dos séculos e constante atualizações tecnológicas

2

Benedito Rodrigues da Silva Neto
(ORGANIZADOR)

 **Atena**
Editora
Ano 2022

Editora chefe

Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira

Editora executiva

Natalia Oliveira

Assistente editorial

Flávia Roberta Barão

Bibliotecária

Janaina Ramos

Projeto gráfico

Bruno Oliveira

Camila Alves de Cremona

Daphynny Pamplona

Luiza Alves Batista

Natália Sandrini de Azevedo

Imagens da capa

iStock

Edição de arte

Luiza Alves Batista

2022 by Atena Editora

Copyright © Atena Editora

Copyright do texto © 2022 Os autores

Copyright da edição © 2022 Atena Editora

Direitos para esta edição cedidos à Atena Editora pelos autores.

Open access publication by Atena Editora



Todo o conteúdo deste livro está licenciado sob uma Licença de Atribuição Creative Commons. Atribuição-Não-Comercial-Não-Derivativos 4.0 Internacional (CC BY-NC-ND 4.0).

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores, inclusive não representam necessariamente a posição oficial da Atena Editora. Permitido o *download* da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

Todos os manuscritos foram previamente submetidos à avaliação cega pelos pares, membros do Conselho Editorial desta Editora, tendo sido aprovados para a publicação com base em critérios de neutralidade e imparcialidade acadêmica.

A Atena Editora é comprometida em garantir a integridade editorial em todas as etapas do processo de publicação, evitando plágio, dados ou resultados fraudulentos e impedindo que interesses financeiros comprometam os padrões éticos da publicação. Situações suspeitas de má conduta científica serão investigadas sob o mais alto padrão de rigor acadêmico e ético.

Conselho Editorial**Ciências Biológicas e da Saúde**

Profª Drª Aline Silva da Fonte Santa Rosa de Oliveira – Hospital Federal de Bonsucesso

Profª Drª Ana Beatriz Duarte Vieira – Universidade de Brasília

Profª Drª Ana Paula Peron – Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof. Dr. André Ribeiro da Silva – Universidade de Brasília

Profª Drª Anelise Levay Murari – Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Benedito Rodrigues da Silva Neto – Universidade Federal de Goiás



Prof. Dr. Cirênio de Almeida Barbosa – Universidade Federal de Ouro Preto
Prof^o Dr^a Daniela Reis Joaquim de Freitas – Universidade Federal do Piauí
Prof^o Dr^a Débora Luana Ribeiro Pessoa – Universidade Federal do Maranhão
Prof. Dr. Douglas Siqueira de Almeida Chaves – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Prof. Dr. Edson da Silva – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri
Prof^o Dr^a Elizabeth Cordeiro Fernandes – Faculdade Integrada Medicina
Prof^o Dr^a Eleuza Rodrigues Machado – Faculdade Anhanguera de Brasília
Prof^o Dr^a Elane Schwinden Prudêncio – Universidade Federal de Santa Catarina
Prof^o Dr^a Eysler Gonçalves Maia Brasil – Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira
Prof. Dr. Ferlando Lima Santos – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Prof^o Dr^a Fernanda Miguel de Andrade – Universidade Federal de Pernambuco
Prof. Dr. Fernando Mendes – Instituto Politécnico de Coimbra – Escola Superior de Saúde de Coimbra
Prof^o Dr^a Gabriela Vieira do Amaral – Universidade de Vassouras
Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria
Prof. Dr. Helio Franklin Rodrigues de Almeida – Universidade Federal de Rondônia
Prof^o Dr^a Iara Lúcia Tescarollo – Universidade São Francisco
Prof. Dr. Igor Luiz Vieira de Lima Santos – Universidade Federal de Campina Grande
Prof. Dr. Jefferson Thiago Souza – Universidade Estadual do Ceará
Prof. Dr. Jesus Rodrigues Lemos – Universidade Federal do Piauí
Prof. Dr. Jônatas de França Barros – Universidade Federal do Rio Grande do Norte
Prof. Dr. José Aderval Aragão – Universidade Federal de Sergipe
Prof. Dr. José Max Barbosa de Oliveira Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará
Prof^o Dr^a Juliana Santana de Curcio – Universidade Federal de Goiás
Prof^o Dr^a Lívia do Carmo Silva – Universidade Federal de Goiás
Prof. Dr. Luís Paulo Souza e Souza – Universidade Federal do Amazonas
Prof^o Dr^a Magnólia de Araújo Campos – Universidade Federal de Campina Grande
Prof. Dr. Marcus Fernando da Silva Praxedes – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Prof^o Dr^a Maria Tatiane Gonçalves Sá – Universidade do Estado do Pará
Prof. Dr. Maurilio Antonio Varavallo – Universidade Federal do Tocantins
Prof^o Dr^a Mylena Andréa Oliveira Torres – Universidade Ceuma
Prof^o Dr^a Natiéli Piovesan – Instituto Federaci do Rio Grande do Norte
Prof. Dr. Paulo Inada – Universidade Estadual de Maringá
Prof. Dr. Rafael Henrique Silva – Hospital Universitário da Universidade Federal da Grande Dourados
Prof^o Dr^a Regiane Luz Carvalho – Centro Universitário das Faculdades Associadas de Ensino
Prof^o Dr^a Renata Mendes de Freitas – Universidade Federal de Juiz de Fora
Prof^o Dr^a Sheyla Mara Silva de Oliveira – Universidade do Estado do Pará
Prof^o Dr^a Suely Lopes de Azevedo – Universidade Federal Fluminense
Prof^o Dr^a Vanessa da Fontoura Custódio Monteiro – Universidade do Vale do Sapucaí
Prof^o Dr^a Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Prof^o Dr^a Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande
Prof^o Dr^a Welma Emídio da Silva – Universidade Federal Rural de Pernambuco



Microbiologia: avanços através dos séculos e constante atualizações tecnológicas 2

Diagramação: Camila Alves de Cremo
Correção: Maiara Ferreira
Indexação: Amanda Kelly da Costa Veiga
Revisão: Os autores
Organizador: Benedito Rodrigues da Silva Neto

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

M626 Microbiologia: avanços através dos séculos e constante atualizações tecnológicas 2 / Organizador Benedito Rodrigues da Silva Neto. – Ponta Grossa - PR: Atena, 2022.

Formato: PDF

Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader

Modo de acesso: World Wide Web

Inclui bibliografia

ISBN 978-65-258-0395-1

DOI: <https://doi.org/10.22533/at.ed.951221108>

1. Microbiologia. I. Silva Neto, Benedito Rodrigues da (Organizador). II. Título.

CDD 579

Elaborado por Bibliotecária Janaina Ramos – CRB-8/9166

Atena Editora

Ponta Grossa – Paraná – Brasil

Telefone: +55 (42) 3323-5493

www.atenaeditora.com.br

contato@atenaeditora.com.br



Atena
Editora
Ano 2022

DECLARAÇÃO DOS AUTORES

Os autores desta obra: 1. Atestam não possuir qualquer interesse comercial que constitua um conflito de interesses em relação ao artigo científico publicado; 2. Declaram que participaram ativamente da construção dos respectivos manuscritos, preferencialmente na: a) Concepção do estudo, e/ou aquisição de dados, e/ou análise e interpretação de dados; b) Elaboração do artigo ou revisão com vistas a tornar o material intelectualmente relevante; c) Aprovação final do manuscrito para submissão.; 3. Certificam que os artigos científicos publicados estão completamente isentos de dados e/ou resultados fraudulentos; 4. Confirmam a citação e a referência correta de todos os dados e de interpretações de dados de outras pesquisas; 5. Reconhecem terem informado todas as fontes de financiamento recebidas para a consecução da pesquisa; 6. Autorizam a edição da obra, que incluem os registros de ficha catalográfica, ISBN, DOI e demais indexadores, projeto visual e criação de capa, diagramação de miolo, assim como lançamento e divulgação da mesma conforme critérios da Atena Editora.



DECLARAÇÃO DA EDITORA

A Atena Editora declara, para os devidos fins de direito, que: 1. A presente publicação constitui apenas transferência temporária dos direitos autorais, direito sobre a publicação, inclusive não constitui responsabilidade solidária na criação dos manuscritos publicados, nos termos previstos na Lei sobre direitos autorais (Lei 9610/98), no art. 184 do Código Penal e no art. 927 do Código Civil; 2. Autoriza e incentiva os autores a assinarem contratos com repositórios institucionais, com fins exclusivos de divulgação da obra, desde que com o devido reconhecimento de autoria e edição e sem qualquer finalidade comercial; 3. Todos os e-book são *open access*, *desta forma* não os comercializa em seu site, sites parceiros, plataformas de *e-commerce*, ou qualquer outro meio virtual ou físico, portanto, está isenta de repasses de direitos autorais aos autores; 4. Todos os membros do conselho editorial são doutores e vinculados a instituições de ensino superior públicas, conforme recomendação da CAPES para obtenção do Qualis livro; 5. Não cede, comercializa ou autoriza a utilização dos nomes e e-mails dos autores, bem como nenhum outro dado dos mesmos, para qualquer finalidade que não o escopo da divulgação desta obra.



APRESENTAÇÃO

Sabemos que a microbiologia é um vasto campo que inclui o estudo dos seres vivos microscópicos nos seus mais variados aspectos como morfologia, estrutura, fisiologia, reprodução, genética, taxonomia, interação com outros organismos e com o ambiente além de aplicações biotecnológicas. A microbiologia como ciência iniciou a cerca de 200 anos, entretanto os avanços na área molecular, como a descoberta do DNA, elevaram a um novo nível os estudos desse contexto, além de abrir novas frentes de pesquisa e estudo. Como ciência básica a microbiologia utiliza células microbianas para analisar os processos fundamentais da vida, e como ciência aplicada ela é praticamente a linha de frente de avanços importantes na medicina, agricultura e na indústria.

Deste modo, mais uma vez, temos o prazer de abordar o contexto da microbiologia, agora, dando continuidade ao tema correlacionando os avanços através dos séculos e consequentemente as constantes atualizações tecnológicas observadas nos últimos anos. Assim, apresentamos aqui o novo volume deste contexto denominado: "Microbiologia: Avanços através dos séculos e constante atualizações tecnológicas, volume 2" que compreende trabalhos e pesquisas desenvolvidas em diversos institutos contendo análises de processos biológicos embasados em células microbianas ou estudos científicos na fundamentação de atividades microbianas com capacidade de interferir nos processos de saúde/doença.

Mais uma vez a Atena Editora demonstra seu comprometimento com um dos alicerces do desenvolvimento científico em nosso país e a capacidade de enxergar importantes temas tais como os avanços no campo da microbiologia. Parabenizamos, desde já, cada autor, e convidamos o leitor para aprofundar seus conhecimentos neste campo tão promissor.

Desejo a todos uma ótima leitura!

Benedito Rodrigues da Silva Neto

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1..... 1

EVALUACIÓN DE LA CALIDAD SENSORIAL Y MICROBIOLÓGICA DE UNA MAYONESA DE SOYA (*Glycine max*) CON TRES CONCENTRACIONES DE CULANTRO DE POZO (*Eryngium foetidum* L)

Jordan Javier García Mendoza
José Patricio Muñoz Murillo
Virginia Estefanía Zambrano Rodríguez
Omar Octavio Zambrano Chica

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.9512211081>

CAPÍTULO 2..... 12

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO GLICOLICO DE ROMÃ EM MICROORGANISMOS DO SÍTIO ORAL

Barbara Letícia Souza Moreira
Lucas de Paula Ramos

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.9512211082>

CAPÍTULO 3..... 19

BIOPOLÍMEROS CONSERVAÇÃO DE CÉLULAS DE RIZOBACTÉRIAS EM MEIOS DE CULTURA ALTERNATIVOS

Manuella Costa Sousa
Lillian França Borges Chagas
Kellen Ângela Oliveira de Sousa
Celso Afonso Lima
Gabriel Soares Nobrega
Ana Lícia Leão Ferreira
Milena Barreira Lopes
Dalilla Moreira de Oliveira Moura
Adriana Santos Neves Ribeiro
Aloísio Freitas Chagas Junior

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.9512211083>

CAPÍTULO 4..... 39

CONTROLE DE *Aedes aegypti* no DISTRITO FEDERAL

Rosilene Gomes Sousa
Lucas Santos de Sousa
Ana Cristina Rodrigues da Cruz
Lana Cristina Evangelista Ferreira de Sá
Michellen Maria Gomes Resende
Larissa Leite Barbosa
Joselita Brandão de Sant'Anna
Raphael da Silva Affonso
Eleuza Rodrigues Machado

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.9512211084>

CAPÍTULO 5	65
DETECÇÃO VIRAL AMBIENTAL EM ÁGUAS NO BRASIL: REVISÃO SISTEMÁTICA DA LITERATURA	
Andrea Carvalho da Cruz	
Sylvia de Fátima dos Santos Guerra	
 https://doi.org/10.22533/at.ed.9512211085	
CAPÍTULO 6	76
A PROTEÔMICA COMO FERRAMENTA PARA O DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO	
Benedito Rodrigues da Silva Neto	
 https://doi.org/10.22533/at.ed.9512211086	
CAPÍTULO 7	84
DOENÇA DE CHAGAS E OS MICRORNAS	
Larissa Rodrigues de Sousa	
Alania Frank Mendonça	
Ana Carla Silva Jansen	
Francisca de Brito Souza Araújo	
Antonia Claudia da Conceição Palmeira	
Vanilza da Silva	
Eldevan da Silva Barbosa	
Ana Gabrielly de Melo Matos	
Ygor Victor Ferreira Pinheiro	
Juliana Maria Trindade Bezerra	
Andréa Pereira da Costa	
Jaqueline Diniz Pinho	
 https://doi.org/10.22533/at.ed.9512211087	
SOBRE O ORGANIZADOR	97
ÍNDICE REMISSIVO	98

CAPÍTULO 3

BIOPOLÍMEROS CONSERVAÇÃO DE CÉLULAS DE RIZOBACTÉRIAS EM MEIOS DE CULTURA ALTERNATIVOS

Data de aceite: 01/08/2022

Data de submissão: 02/06/2022

Manuella Costa Sousa

Universidade Federal do Tocantins
Gurupi – TO
<http://lattes.cnpq.br/0256046793020150>

Lillian França Borges Chagas

Universidade Federal do Tocantins
Gurupi – TO
<http://lattes.cnpq.br/6412767227344500>

Kellen Ângela Oliveira de Sousa

Universidade Federal do Tocantins
Gurupi -TO
<http://lattes.cnpq.br/5604850625107241>

Celso Afonso Lima

Universidade Federal do Tocantins
Gurupi – TO
<http://lattes.cnpq.br/0782819751659217>

Gabriel Soares Nobrega

Universidade Federal do Tocantins UFT
Gurupi – TO
<http://lattes.cnpq.br/0870938234878939>

Ana Licia Leão Ferreira

Universidade Federal do Tocantins UFT
Gurupi – TO
<http://lattes.cnpq.br/8744647007023408>

Milena Barreira Lopes

Universidade Federal do Tocantins UFT
Gurupi – TO
<http://lattes.cnpq.br/7450218592360093>

Dalilla Moreira de Oliveira Moura

Universidade Federal do Tocantins UFT
Gurupi – TO
<http://lattes.cnpq.br/1195107964910353>

Adriana Santos Neves Ribeiro

Universidade Federal do Tocantins UFT
Gurupi – TO
<http://lattes.cnpq.bb/1020515710111294>

Aloísio Freitas Chagas Junior

Universidade Federal do Tocantins
Gurupi – TO
<http://lattes.cnpq.br/9286795171322846>

RESUMO: Os inoculante são formulados com microrganismos de ação benéfica para plantas numa composição simples e acessível economicamente, sendo alguns empregados na fixação biológica de nitrogênio. Os inoculantes necessitam de um transportador de qualidade que garante a concentração de células ativas, além de tolerar variações de temperatura, umidade, aeração e tempo de armazenamento sem que apresente altos níveis de contaminantes, tornando necessário o uso de conservantes. Polímeros como carboximetilcelulose (CMC) e goma xantana (GX) têm sido usados para a fabricação de inoculantes relacionado à sua capacidade de limitar a transferência de calor, e às suas propriedades reológicas, que é a medida da viscosidade e tensão de escoamento. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência destes biopolímeros na preservação de células de *Bradyrhizobium elkanii* *Bradyrhizobium diazoefficiens*, *Azospirillum* sp. e *Pseudomonas*

fluorescens em meios de cultura alternativos (MS1, MS2 e MS3) com 7, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180 e 210 dias a 5 °C. Os inoculantes foram avaliados por 210 dias, aferindo o pH e realizando contagem de UFC mL⁻¹ a partir do plaqueamento pela técnica Spread Plate. Foi possível concluir que a utilização dos biopolímeros foi eficiente na conservação e viabilidade de células dos microrganismos durante o período de armazenamento a 5 °C, sendo o meio de cultura MS2 o que obteve melhores resultados em UFC mL⁻¹ para os microrganismos nos quais foi testado, obtendo aos 210 dias 3,0 x10⁸ UFC mL⁻¹ com a utilização de CMC e 1,4 x10⁸ UFC mL⁻¹ com GX para *B. elkanii*, 1,3 x10⁷ UFC mL⁻¹ com CMC e 6,0 x10⁶ UFC mL⁻¹ com GX para *B. diazoefficiens*, 8,5 x10⁸ UFC mL⁻¹ com GX para *Azospirillum* sp. e que o meio MS3 foi viável para a conservação de *Pseudomonas fluorescens*, mantendo 1,5 x10⁸ UFC mL⁻¹ quando conservado com CMC.

PALAVRAS-CHAVE: Inoculante, Microrganismo, Conservante.

BIOPOLYMERS IN THE CONSERVATION OF RIZOBACTERIA CELLS IN ALTERNATIVE CULTURE MEDIA

ABSTRACT: The inoculants are formulated with microorganisms of beneficial action for plants in a simple and affordable composition; some being employed in biological nitrogen fixation. Inoculants need a quality carrier that guarantees the concentration of active cells, in addition to tolerating variations in temperature, humidity, aeration and storage time without presenting high levels of contaminants, making it necessary to use preservatives. Polymers such as carboxymethylcellulose (CMC) and xanthan gum (GX) have been used for the manufacture of inoculants related to their ability to limit heat transfer, and to their rheological properties, which is the measure of the viscosity and flow strain. Thus, the objective of this work was to evaluate the efficiency of these biopolymers in the preservation of *Bradyrhizobium elkanii*, *Bradyrhizobium diazoefficiens*, *Azospirillum* sp. e *Pseudomonas fluorescens* in alternative culture media (MS1, MS2 and MS3) with 7, 15, 30 45, 60, 90, 120, 150, 180 and 210 days at 5 °C. The inoculants were evaluated at 210 days, measuring pH and CFU mL⁻¹. It was concluded that the use of biopolymers was efficient in the conservation and viability of microorganism cells during the storage period at 5 °C, being the culture medium MS2 that obtained the best results in UFC mL⁻¹ for the microorganisms in which it was tested, obtaining at 210 days 3,0 x10⁸ CFU mL⁻¹ with use of CMC e 1,4 x10⁸ CFU mL⁻¹ with GX for *B. elkanii*, 1,3 x10⁷ CFU mL⁻¹ with CMC, and 6,0 x10⁶ CFU mL⁻¹ with GX for *B. diazoefficiens*, 8,5 x10⁸ CFU mL⁻¹ with GX for *Azospirillum* sp. and that the medium MS3 was feasible for the conservation of *Pseudomonas fluorescens*, keeping 1,5 x10⁸ CFU mL⁻¹ when preserved with CMC.

KEYWORDS: Inoculant, Microorganism, Preservative.

1 | INTRODUÇÃO

Inoculante é um produto formulado com uma ou diversas linhagens ou espécies de microrganismos de ação benéfica para o desenvolvimento de plantas em uma solução utilizada para transportá-los direto da fabricação numa determinada composição que seja de simples manuseio e acessível economicamente, podendo ser de origem inorgânica, orgânica ou até mesmo sintética (XAVIER et al., 2020). Alguns dos inoculantes mais utilizados são

os rizobiais, empregados principalmente para fixação biológica de nitrogênio, em culturas como soja e feijão (SILVA et al., 2013). As chamadas rizobactérias são promotoras de crescimento em plantas, atuam diretamente na supressão de doenças, na produção de fitormônios, solubilização de nutrientes do solo, aumento da permeabilidade das raízes e fixação de nitrogênio (MONCADA et al., 2020). São bactérias gram-negativas capazes de criar uma relação simbiótica de fixação de nitrogênio nas raízes de leguminosas, garantindo o desenvolvimento na ausência de fertilizante nitrogenado, além de diminuir as taxas de óxido nitroso (N_2O) no solo (RAMONGOLALAINA, 2020).

O processo de simbiose ocorre quando os rizóbios se diferenciam em bacteroides, os quais formam nódulos radiculares fixadores de nitrogênio intracelulares, que transformam moléculas de nitrogênio em amônio, aprimorando o crescimento vegetal, além de fazer com que a planta forneça ácidos dicarboxílicos para os rizóbios como fonte de carbono, energia e redutores (LIU, 2017).

O grande desafio da produção de inoculantes é ajustar as formulações para que tenha em campo o mesmo desempenho que no laboratório, garantindo a longevidade e estabilidade do microrganismo, com a capacidade de mantê-los viáveis após meses de armazenagem, sem a presença de contaminantes e mutações (SILVA et al., 2013). Há poucos estudos realizados na área de conservantes para inoculantes agrícolas, porém alguns autores apostam no uso de polímeros utilizados na indústria alimentícia e farmacêutica, como por exemplo o uso de amido e carboximetilcelulose (CMC) para avaliar o armazenamento de rizóbios (FERNANDES JÚNIOR et al., 2009).

Diversos tipos de polímeros como carboximetilcelulose, goma arábica, polivinilpirrolidona e alginato, têm sido usados para a fabricação de inoculantes relacionado à sua capacidade de limitar a transferência de calor, e às suas propriedades reológicas, sendo normalmente utilizados como compostos adesivos quando aplicados em sementes, e protegendo contra dessecação durante a secagem à vácuo (SILVA et al., 2010).

Alguns microrganismos produzem exopolímeros que são biopolímeros produzidos pelo metabolismo do próprio fungo ou bactéria, e até algas, e são importantes para a proteção das células microbianas contra substâncias antimicrobianas, dessecação, bacteriófagos e estresse osmótico (HUSSAIN et al., 2017). Alguns veículos a base de polímeros vêm sendo testados em rizobactérias, como por exemplo a goma xantana e a carboximetilcelulose testadas como adjuvantes em *Pseudomonas fluorescens* (PRAVEEN BIRADAR & SANTHOSH, 2018).

O polímero carboximetilcelulose é fisiologicamente inerte e atóxico, sendo muito aplicado em indústrias alimentícias e farmacêuticas em virtude de sua viscosidade (SANZ et al., 2005). Já para o uso em inoculantes, é devido sua propriedade adesiva que melhora a fixação em sementes de leguminosas, protegendo-as de bactérias nocivas durante o armazenamento, além de promover o encapsulamento das células prevenindo contra estresses ambientais (REIS & ALVES, 2015).

Goma xantana é um biopolímero natural biodegradável, de baixo custo, capaz de promover o encapsulamento de células bacterianas e liberá-las no ambiente após a degradação do material no ambiente (SILVA et al., 2010).

Neste estudo é abordado a utilização de carboximetilcelulose e goma xantana como conservante para inoculantes a base de *Bradyrhizobium elkanii*, *Bradyrhizobium diazoefficiens*, *Azospirillum* sp. e *Pseudomonas fluorescens*, em diferentes meios de cultura, com o objetivo de manter a concentração adequada de células bacterianas por um longo período de prateleira.

2 | METODOLOGIA

Os experimentos foram realizados no laboratório de Agromicrobiologia Aplicada e Biotecnologia, da Universidade Federal do Tocantins – Campus de Gurupi, no período de abril de 2019 a setembro de 2020. As cepas dos microrganismos utilizados foram de *Bradyrhizobium elkanii*, *Bradyrhizobium diazoefficiens*, *Azospirillum* sp. e *Pseudomonas fluorescens*, todas obtidas do banco de cepas do laboratório, armazenadas a 5 °C em tubos de conservação com meios específicos para cada microrganismo.

Foram testados três meios de cultura, MS1, MS2, e MS3 cuja formulação está especificada na tabela 1. Os meios foram formulados no intuito de utilizar reagentes menos onerosos a fim de tornar a formulação simples, porém com nutrientes necessários aos microrganismos. Os meios de cultura foram preparados em Erlenmeyer de 1 L, devidamente identificados, e o pH foi ajustado para 6,0. Em seguida esterilizou-se o meio de cultura em autoclave a 121°C durante 30 minutos.

MS1	MS2	MS3
1000 mL H ₂ O (destilada)	1000 mL H ₂ O (destilada)	1000 mL H ₂ O (destilada)
10 mL de melão de soja	16 mL de melão de soja	5,0 g de peptona
0,50 g de fosfato de potássio	4,0 g de extrato de levedura	5,0 g de extrato de levedura
5,0 g de sulfato de magnésio		3,0 g de cloreto de sódio
2,5 g de extrato de levedura		3,0 g de sulfato de magnésio
		0,5 g de sulfato de potássio
		16 mL de melão de soja

Tabela 1: Composição do Meio de cultura MS1, MS2 e MS3

Fonte: Autor

Após o meio de cultura atingir temperatura ambiente, os Erlenmeyers foram inoculados com os microrganismos transferindo as cepas com o auxílio de uma alça de inoculação estéril, em cabine de fluxo laminar. Para o *Bradyrhizobium elkanii*, *Bradyrhizobium diazoefficiens* e *Azospirillum* sp. foram realizadas as fermentações nos

meios de cultura MS1 e MS2, e para o *Pseudomonas fluorescens* foi utilizado apenas o meio de cultura MS3, visto que para a fermentação deste microrganismo, é necessário um meio de cultura mais rico em nutrientes. Logo após a inoculação os Erlenmeyers foram colocados em incubadora Shaker (Novatecnica®) a 28°C, e 120 rpm por 96 horas.

Logo após a inoculação, retirou-se uma amostra de cada Erlenmeyer, aferiu-se o pH e realizou-se o plaqueamento por superfície pela técnica *Spread Plate* para a quantificação de microrganismo em unidades formadoras de colônia (UFC mL⁻¹) no tempo 0 h, nas diluições 10⁴, 10⁶ e 10⁸, e incubou-se as placas de Petri em estufa bacteriológica a 28 °C por 72 horas para que fosse possível fazer a contagem das colônias. O mesmo procedimento foi realizado com 24, 48, 72 e 96 h para controle da fermentação. O controle do pH foi realizado a partir das amostras retiradas em cada tempo de fermentação, a cada 24 horas, utilizando pHmetro digital de bolso (Hanna Instruments®).

As soluções conservantes foram preparadas adicionando 0,1 g do biopolímero em 100 mL de água destilada, e em seguida foi esterilizado a 121 °C por 30 minutos. Para cada meio de cultura, foi adicionado, após as 96 horas de fermentação, 15 mL da solução conservante em 150 mL de inóculo fermentado, fazendo a homogeneização, e depois transferindo para tubos de polipropileno do tipo Falcon de 15 mL, devidamente identificados, e armazenados em geladeira a 5 °C. Foram armazenados 10 tubos Falcon para cada tratamento, sendo um tratamento a testemunha sem o biopolímero, outro o inóculo com solução conservante de goma xantana, e inóculo com solução conservante de carboximetilcelulose.

Os tratamentos foram armazenados em geladeira a 5 °C, a fim de garantir melhor preservação do microrganismo, e foi retirado uma amostra a cada período de avaliação, sendo eles: 0, 7, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, e 210 dias.

Para cada avaliação foi realizado o plaqueamento pela técnica *Spread Plate*, em meio de cultura CCY, nas diluições 10⁴, 10⁶ e 10⁸, em triplicatas, incubando as placas em estufa bacteriológica a 28 °C, por 72 horas para que fosse realizada a contagem das colônias. Também foi realizado a aferição do pH das amostras utilizando-se pHmetro digital de bolso (Hanna Instruments®).

Os dados do experimento foram avaliados em fatorial duplo em delineamento inteiramente casualizado, sendo um fator o meio de cultura, e outro os biopolímeros. Os experimentos foram submetidos à análise de variância e teste de médias por meio do software estatístico Rstudio versão 1.3. As avaliações em plaqueamento pela técnica *Spread Plate* foram realizadas em triplicata, e os dados foram submetidos ao teste de Tukey a 5% de significância. Os gráficos foram confeccionados utilizando o software SigmaPlot versão 12.0.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Bradyrhizobium elkanii

Para a fermentação com *Bradyrhizobium elkanii* foi possível observar que desde o início o microrganismo adaptou-se melhor ao meio de cultura MS2, visto que no tempo zero obteve $1,0 \times 10^{10}$ UFC mL⁻¹ no meio MS1, e $4,5 \times 10^{10}$ UFC mL⁻¹ no meio MS2 (Tabela 2), o que pode ser explicado devido a composição, que tornou o meio MS1 mais ácido, impossibilitando que o ambiente estivesse adequado para o metabolismo deste microrganismo, que segundo Martins et al. (1997), considera que o pH ideal para *Bradyrhizobium* sp. seja entre 6,8 a 7,0.

Unidades Formadora de Colônias (UFC mL ⁻¹)						
Tempo (dias)	MS1			MS2		
	testemunha	CMC	GX	testemunha	CMC	GX
0	$1,0 \times 10^{10}$ a	$1,0 \times 10^{10}$ a	$1,0 \times 10^{10}$ a	$4,5 \times 10^{10}$ a	$4,5 \times 10^{10}$ a	$4,5 \times 10^{10}$ a
7	$2,5 \times 10^9$ b	$7,0 \times 10^9$ a	$8,0 \times 10^9$ a	$2,3 \times 10^{10}$ a	$3,6 \times 10^{10}$ a	$3,7 \times 10^{10}$ a
15	$1,5 \times 10^9$ b	$3,0 \times 10^9$ a	$2,0 \times 10^9$ ab	$1,6 \times 10^{10}$ b	$1,9 \times 10^{10}$ ab	$2,5 \times 10^{10}$ a
30	$1,3 \times 10^8$ c	$2,6 \times 10^8$ b	$7,0 \times 10^8$ a	$7,0 \times 10^9$ b	$8,0 \times 10^9$ b	$2,5 \times 10^{10}$ a
45	$3,0 \times 10^7$ c	$2,4 \times 10^8$ b	$7,0 \times 10^8$ a	$1,8 \times 10^9$ c	$3,5 \times 10^9$ b	$1,4 \times 10^{10}$ a
60	$2,3 \times 10^7$ b	$1,6 \times 10^8$ a	$3,2 \times 10^8$ a	$5,3 \times 10^8$ b	$8,7 \times 10^8$ b	$1,2 \times 10^{10}$ a
90	$5,2 \times 10^6$ b	$1,6 \times 10^8$ a	$2,9 \times 10^8$ a	$2,7 \times 10^8$ b	$8,0 \times 10^8$ a	$1,0 \times 10^9$ a
120	$4,7 \times 10^6$ c	$5,0 \times 10^7$ b	$1,3 \times 10^8$ a	$2,1 \times 10^8$ b	$5,2 \times 10^8$ a	$8,4 \times 10^8$ a
150	$3,6 \times 10^6$ c	$4,0 \times 10^7$ b	$1,0 \times 10^8$ a	$1,7 \times 10^8$ b	$4,6 \times 10^8$ a	$5,5 \times 10^8$ a
180	$1,0 \times 10^6$ b	$3,0 \times 10^7$ a	$3,0 \times 10^7$ a	$1,5 \times 10^8$ b	$3,7 \times 10^8$ a	$2,0 \times 10^8$ ab
210	$0,0 \times 10^0$ b	$2,0 \times 10^5$ a	$2,0 \times 10^5$ a	$3,0 \times 10^7$ c	$3,0 \times 10^8$ a	$1,4 \times 10^8$ b
CV(%) ⁽²⁾		2,45			1,53	

⁽¹⁾ Médias seguidas de mesma letra minúscula, nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. ⁽²⁾ CV: Coeficiente de Variação.

Tabela 2: Influência da utilização de carboximetilcelulose (CMC) e goma xantana (GX) na preservação de células de *Bradyrhizobium elkanii* durante 210 dias de armazenamento a 5 °C.⁽¹⁾

Fonte: Autor

Segundo Romeiro (2001), um método de preservação ideal deve ser simples, barato, e não demandar equipamento sofisticado, complementando o que diz Mariano, Assis e Silveira (2005), que cada microrganismo deveria ter seu próprio método de conservação já que cada um se comporta de uma determinada maneira quando exposto a diferentes condições. Para que ocorra a multiplicação de um microrganismo para a produção de inoculante é necessário realizar processos fermentativos utilizando um meio de cultura adequado para o metabolismo do microrganismo de interesse (VOSS et al., 2013). De acordo com Woiciechowski et al. (2013), a utilização do melaço de soja é uma alternativa

devido à redução de custos com matéria prima já que este composto é rico em açúcares, nitrogênio e outros macronutrientes.

A utilização dos biopolímeros carboximetilcelulose (CMC) e goma xantana (GX) garantiram maior número de UFC mL⁻¹ durante os 210 dias de armazenamento em relação ao tratamento sem conservante, para os dois meios de cultura testados. Na tabela 2 é possível observar que a partir do sétimo dia de conservação as médias dos tratamentos com conservante foram superiores nas avaliações no meio MS1. Para a fermentação no meio MS2, houve diferença estatística a partir dos 15 dias de armazenamento, sendo que desta data até 60 dias, os tratamentos com GX apresentaram maior número de unidades formadoras de colônias, e a partir dos 90 dias até o último dia de avaliação, os tratamentos com GX e CMC foram estatisticamente iguais, e superiores à testemunha.

De acordo com o Ministério da Agricultura, a concentração mínima em inoculantes deve ser de 10⁸ unidades formadoras de colônia, entretanto, conforme a “INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 13”, de 24 de março de 2011, os inoculantes para leguminosas devem conter pelo menos 1,0x10⁹ UFC por grama ou mililitro (MAPA, 2011), tornando o meio MS2 com adição de conservante a melhor opção, visto que alcançou valores mais próximos ao recomendado.

Goma xantana foi testada por Tumelero e Denardin (2008) com o objetivo de avaliar preservação das bactérias *Ralstonia solanacearum* e *Pectobacterium atrosepticum* por um longo período em diferentes formas de armazenamento, sendo em temperatura ambiente, refrigerador e freezer, e em todas as condições houve decréscimo na concentração de células viáveis.

Nas figuras 1 e 2 é possível observar que o pH das amostras aumentou, o que pode ser devido às características do microrganismo, já que segundo Lima et al. (2012), espécies de *Azorhizobium* e *Bradyrhizobium* tem a tendência de alcalinizar o meio de cultura, enquanto *Mesorhizobium*, *Rhizobium* e *Sinorhizobium* tendem a acidificar o meio.

A diferença da UFC inicial do meio MS1 pode ser devido ao pH do meio ter iniciado um pouco mais ácido, e segundo Perez et al. (1994), microrganismos simbióticos fixadores de nitrogênio são sensíveis à pH ácido, o que pode limitar o crescimento. Dentre os polímeros analisados por Denardin e Freire (2000) está a goma xantana, que foi empregada no intuito de acondicionar células de *Bradyrhizobium elkanii* durante oito meses, porém também se constatou o decréscimo da concentração de células viáveis.

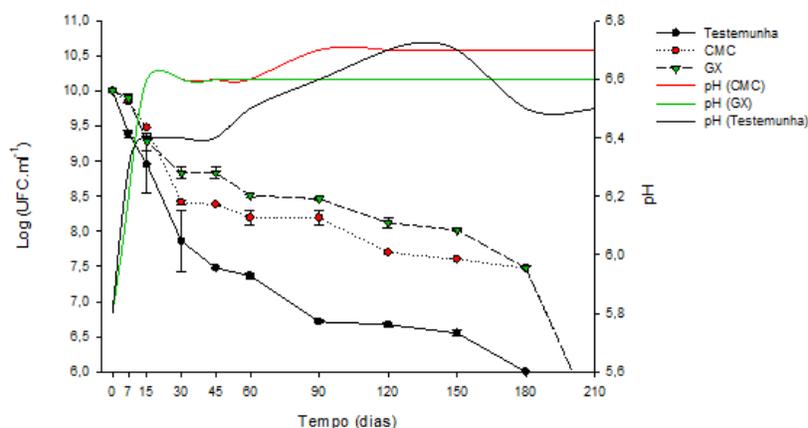


Figura 1: Relação da sobrevivência (UFC mL⁻¹) e o potencial hidrogeniônico (pH) de *Bradyrhizobium elkanii*, no meio MS1 durante 210 dias de conservação a 5 °C.

Fonte: Autor

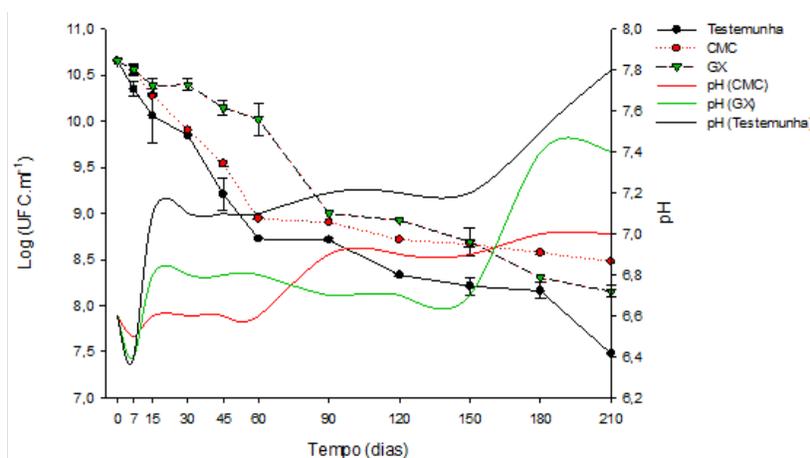


Figura 2: Relação da sobrevivência (UFC mL⁻¹) e o potencial hidrogeniônico (pH) de *Bradyrhizobium elkanii*, no meio MS2 durante 210 dias de conservação a 5 °C.

Fonte: Autor

A preservação de *Bradyrhizobium elkanii* e *Bradyrhizobium diazoefficiens* foi avaliada por Schuh (2005), e este alega que biopolímeros como goma xantana, goma jataí e goma guar, podem ser empregados como base para formulação de inoculantes.

Bradyrhizobium diazoefficiens

Para a fermentação com *Bradyrhizobium diazoefficiens*, foi possível observar que o microrganismo se adaptou bem nos dois meios de cultura, visto que ambos apresentaram $1,00 \times 10^{10}$ UFC mL⁻¹ inicialmente (Tabela 3), diferindo pouco o valor do pH inicial, que para o meio MS1 foi de 7,0 e 7,3 para o MS2. A utilização dos bipolímeros carboximetilcelulose

(CMC) e goma xantana (GX) garantiram maior número de UFC mL⁻¹ durante os 210 dias de armazenamento em relação ao tratamento sem conservante, para os dois meios de cultura testados.

Observando a tabela 3, é possível concluir que para o meio MS1, os tratamentos com conservantes garantiram maior número de colônias a partir do décimo quinto dia de armazenamento, e nas duas últimas avaliações, 180 e 210 dias, os valores de UFC mL⁻¹ foram respectivamente melhores no tratamento com goma xantana. Já para a fermentação no meio MS2, apesar de ter apresentado diferença estatística entre quinze e quarenta e cinco dias, onde o tratamento com goma xantana foi melhor, nas avaliações de 60, 150 e 180 dias, não diferiram estatisticamente, porém com 210 dias o tratamento com carboximetilcelulose foi o melhor, seguido do tratamento com goma xantana que também foi superior à testemunha.

De acordo com Mohamed, Hassan e Abdelgain (2019), inoculantes líquidos com aditivos poliméricos foram capazes de colaborar na sobrevivência de inoculantes rizobiais por até sessenta dias em temperatura ambiente e a 4 °C, enfatizando que a sobrevivência celular depende tanto do tipo de aditivo quanto do microrganismo utilizado. Para sobrevivência de *Rhizobium leguminosarum* em diferentes materiais transportadores testados por Argal et al. (2015), foi constatado que a população diminuiu gradativamente em todos os testes nos 180 dias de armazenamento.

Nas figuras 3 e 4 é possível observar o comportamento do microrganismo em relação ao pH do meio de cultura e ao tempo, que diminui a quantidade de células ao longo dos 210 dias, porém os resultados dos tratamentos com conservantes foram superiores à testemunha sem conservante. Na figura 3 é possível observar que entre trinta e sessenta dias a quantidade de UFC mL⁻¹ teve redução no declínio de células, e pode ser relacionado com os valores de pH, que ficaram entre valores de 6,8 e 7,1, e segundo Oliveira e Magalhães (1999), estirpes de *Bradyrhizobium* spp. têm crescimento melhor em pH mais básico a neutro do que ácido, explicando a manutenção da viabilidade das colônias no meio MS2 com CMC e GX.

Unidades Formadora de Colônias (UFC mL ⁻¹)						
Tempo (dias)	MS1			MS2		
	testemunha	CMC	GX	testemunha	CMC	GX
0	1,0x10 ¹⁰ a					
7	2,0x10 ⁹ a	3,5x10 ⁹ a	3,5x10 ⁹ a	6,0x10 ⁹ a	7,5x10 ⁹ a	8,0x10 ⁹ a
15	1,0x10 ⁹ b	2,5x10 ⁹ ab	3,0x10 ⁹ a	2,5x10 ⁹ b	5,0x10 ⁹ ab	6,5x10 ⁹ a
30	2,9x10 ⁸ b	1,0x10 ⁹ a	1,0x10 ⁹ a	5,9x10 ⁸ b	1,1x10 ⁹ b	5,5x10 ⁹ a
45	2,5x10 ⁸ b	5,8x10 ⁸ ab	1,1x10 ⁹ a	2,2x10 ⁸ b	3,5x10 ⁸ b	1,0x10 ⁹ a
60	6,0x10 ⁷ b	2,1x10 ⁸ a	3,9x10 ⁸ a	2,0x10 ⁸ a	2,5x10 ⁸ a	4,0x10 ⁸ a
90	2,5x10 ⁷ b	1,2x10 ⁸ a	1,5x10 ⁸ a	1,0x10 ⁸ b	2,3x10 ⁸ a	2,4x10 ⁸ a
120	9,8x10 ⁶ b	7,0x10 ⁷ a	1,5x10 ⁸ a	5,0x10 ⁷ b	2,0x10 ⁸ a	2,0x10 ⁸ a
150	7,0x10 ⁶ a	9,3x10 ⁸ a	1,5x10 ⁷ a	4,0x10 ⁷ a	6,5x10 ⁷ a	7,0x10 ⁷ a
180	9,0x10 ⁵ c	3,4x10 ⁶ b	1,0x10 ⁷ a	1,0x10 ⁷ a	1,5x10 ⁷ a	1,5x10 ⁷ a
210	6,0x10 ⁵ c	7,0x10 ⁵ b	1,4x10 ⁶ a	2,3x10 ⁵ c	1,3x10 ⁷ a	6,0x10 ⁶ b
CV (%) ⁽²⁾	2,07			1,84		

⁽¹⁾ Médias seguidas de mesma letra minúscula, nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. ⁽²⁾ CV: Coeficiente de Variação.

Tabela 3: Influência da utilização de carboximetilcelulose (CMC) e goma xantana (GX) na preservação de células de *Bradyrhizobium diazoefficiens* durante 210 dias de armazenamento a 5 °C ⁽¹⁾

Fonte: Autor

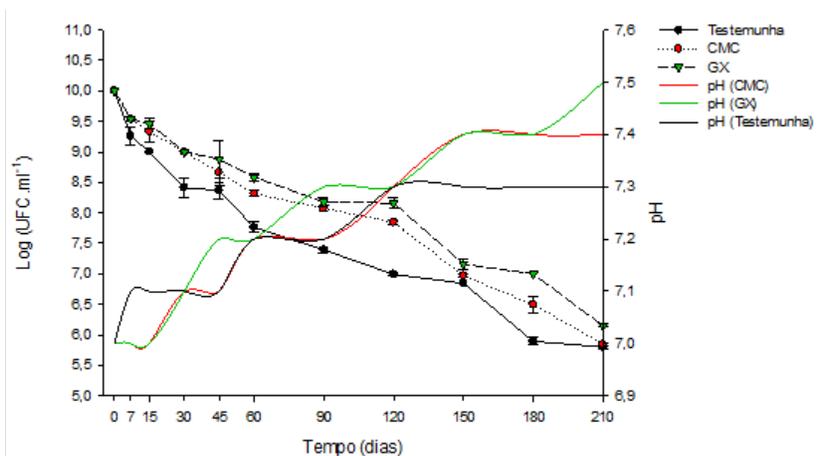


Figura 3: Relação da sobrevivência (UFC mL⁻¹) e o potencial hidrogeniônico (pH) de *Bradyrhizobium diazoefficiens*, no meio MS1 durante 210 dias de conservação a 5 °C.

Fonte: Autor

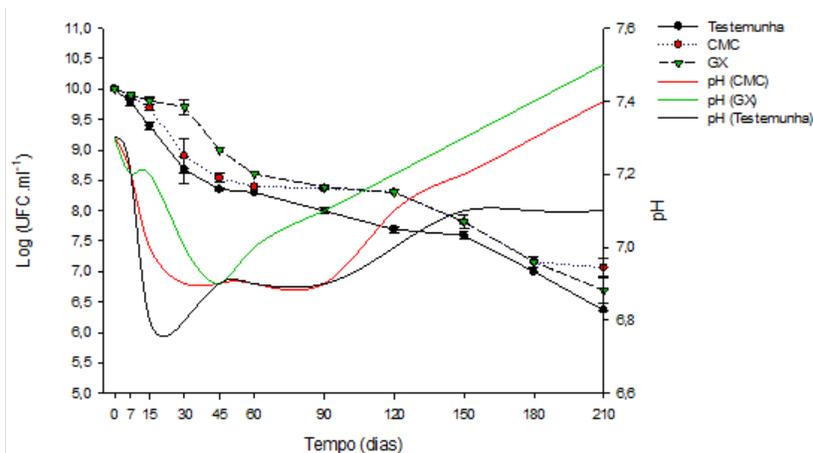


Figura 4: Relação da sobrevivência (UFC mL⁻¹) e o potencial hidrogeniônico (pH) de *Bradyrhizobium diazoefficiens*, no meio MS2 durante 210 dias de conservação a 5 °C.

Fonte: Autor

Rohr (2007) estudou a sobrevivência de células de *Bradyrhizobium japonicum*, armazenado por três meses a temperatura ambiente, adicionadas a misturas poliméricas de carboximetilcelulose e amido, em diferentes proporções, e pode concluir que a utilização destes polímeros contribuiu para a sobrevivência do microrganismo apresentando excelentes resultados, alcançando 8,64 log de células mL⁻¹ utilizando a proporção 50/50 de cada biopolímero.

Nas figuras 1, 2, 3, e 4 é possível observar a relação de aumento do pH em todos os tratamentos, com a queda no número de colônias, e segundo Somasegaran e Hoben (1994), como o pH ótimo para *Bradyrhizobium* é 6,8 ± 02, em pH de valores superiores a 7 ocorre a diminuição da taxa de crescimento bacteriano, que segundo Prescott, Harley e Klein (2002), se deve ao fato da presença de produtos de degradação de proteínas alcalinas durante o metabolismo, que modificam o estado de ionização das moléculas de nutrientes, diminuindo a disponibilidade para o microrganismo.

Azospirillum sp.

A fermentação com *Azospirillum sp.* foi realizada utilizando os meios de cultura MS1 e MS2, porém o microrganismo não se adaptou bem ao meio MS1 e foi constatado a morte celular 24 horas o início do cultivo, mas já em relação ao meio MS2, este foi eficaz no processo fermentativo, visto que alcançou 1,1x10¹⁰ em 96 horas de fermentação, com pH em torno de 6,5, muito próximo do pH ideal para este microrganismo, que segundo Romero-Perdomo et al. (2015) seria de 6,8.

Na tabela 4, é possível observar comportamento do *Azospirillum sp.* durante o período de prateleira com a adição dos biopolímeros, e perceber a influência destes na

manutenção das células viáveis.

Tempo (dias)	Unidades Formadora de Colônias (UFC mL ⁻¹)		
	testemunha	CMC	GX
0	1,1x10 ¹⁰ a	1,1x10 ¹⁰ a	1,1x10 ¹⁰ a
7	8,5x10 ⁹ a	1,1x10 ¹⁰ a	1,1x10 ¹⁰ a
15	5,5x10 ⁹ b	1,0x10 ¹⁰ a	1,0x10 ¹⁰ a
30	4,0x10 ⁹ b	9,0x10 ⁹ a	9,0x10 ⁹ a
45	2,5x10 ⁹ b	6,5x10 ⁹ a	7,5x10 ⁹ a
60	1,0x10 ⁹ c	2,5x10 ⁹ b	5,0x10 ⁹ a
90	1,9x10 ⁹ a	2,9x10 ⁹ a	3,0x10 ⁹ a
120	1,2x10 ⁹ b	2,2x10 ⁹ a	2,8x10 ⁹ a
150	1,0x10 ⁹ b	1,8x10 ⁹ a	2,1x10 ⁹ a
180	5,9x10 ⁸ b	7,2x10 ⁸ ab	1,0x10 ⁹ a
210	3,0x10 ⁷ c	5,3x10 ⁸ b	8,5x10 ⁸ a
CV (%) ⁽²⁾		1,12	

⁽¹⁾ Médias seguidas de mesma letra minúscula, nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. ⁽²⁾ CV: Coeficiente de Variação.

Tabela 4: Influência da utilização de carboximetilcelulose (CMC) e goma xantana (GX) na preservação de células de *Azospirillum* sp. durante 210 dias de armazenamento a 5 °C ⁽¹⁾ no meio de cultura MS1.

Fonte: Autor

Conforme visto na tabela, a partir de 15 dias de armazenamento houve diferença estatística entre os tratamentos, e a UFC mL⁻¹ apresentou melhores valores com a presença dos biopolímeros, dando destaque para a goma xantana, a qual obteve melhor resultado tanto ao longo do período de armazenamento como com 210 dias. De acordo com Bashan e De-Bashan (2015), apesar de existirem muitos meios de cultura para *Azospirillum* spp., a maioria deles não é considerada vantajosa devido a baixa quantidade de células e aos altos custos de produção, sendo então vantajoso a produção com meio de cultura MS2.

Na figura 5 está representado o comportamento do inoculante a base de *Azospirillum* armazenado durante 210 dias e sua relação com o pH do meio, podendo afirmar que entre 15 e 150 dias o pH se manteve dentro da faixa ideal para o microrganismo, que segundo Contreras-Ângulo et al. (2019), o meio de cultura para *Azospirillum* deve estar ajustado em torno de 7.

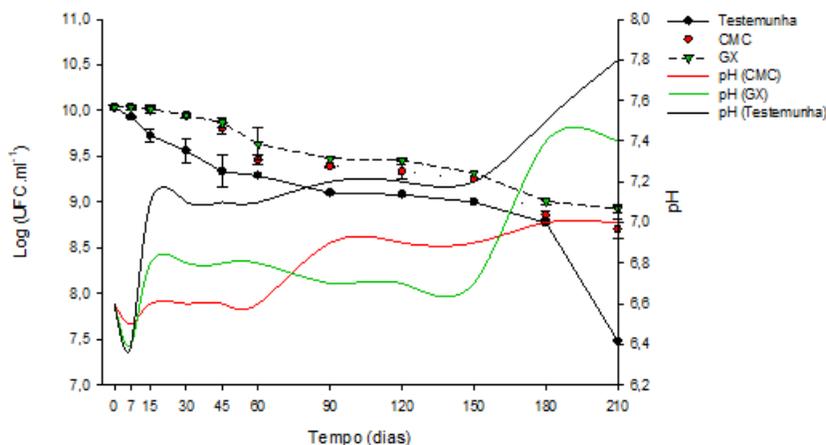


Figura 5: Relação da sobrevivência (UFC mL⁻¹) e o potencial hidrogeniônico (pH) de *Azospirillum* sp., no meio MS2 durante 210 dias de conservação a 5 °C.

Fonte: Autor

Alguns autores sugerem que um bom inoculante deva conter entre 10⁸ e 10⁹ UFC mL⁻¹, enquanto outros afirmam ser necessário apenas valores entre 10⁶ e 10⁷ UFC mL⁻¹, e com isso pode ser considerado que o inoculante produzido com meio de cultura MS2 adicionado de carboximetilcelulose ou goma xantana seja um produto eficiente para ser comercializado, visto que a matéria prima utilizada para a formulação do meio de cultura não é onerosa e os resultados de UFC mL⁻¹ conseguiram alcançar 10⁸ mesmo após 210 dias de armazenamento (GARCIA-FRAILE et al., 2015).

Reetha et al. (2014) observaram a sobrevivência de *Azospirillum lipoferum* utilizando o encapsulamento de células com alginato de sódio aditivado com ácido húmico, porém esta é uma alternativa dispendiosa em relação à adição dos biopolímeros diretamente no inoculante.

Outro fator relacionado ao período de armazenamento é a baixa oxigenação, uma vez que o recipiente fica fechado durante todo o período, e isso pode não ter prejudicado o *Azospirillum* sp., pois são microrganismos microaerófilos, e segundo Alexandre et al. (2000), a concentração ideal de oxigênio para o *Azospirillum brasiliense* é em torno de 4 μM.

Pseudomonas fluorescens

Para fermentação com *Pseudomonas fluorescens* foi utilizado o meio de cultura MS3, visto que este meio contém os reagentes mais adequados para o melhor desenvolvimento do microrganismo, e com ele foi possível obter 6,0x10⁹ UFC mL⁻¹ após 96 horas de fermentação. O meio MS3 foi elaborado visando suprir as necessidades nutricionais da *Pseudomonas fluorescens*, a qual é geralmente cultivada em meio King's B, porém ele não

garante longos períodos de prateleira, e segundo Biniarz et al. (2018) já foram testadas outras possíveis formulações otimizando este meio, o que levou a necessidade de desenvolver um meio alternativo que suplementasse a composição do melaço de soja, componente testado com outros microrganismos. Na tabela 5 pode-se observar como a adição dos biopolímeros a este meio após a fermentação foi eficiente para manter a viabilidade das células, onde já com 7 dias após o início do período de prateleira pode ser observado diferença entre os tratamentos.

Durante as avaliações foi constatado que a utilização de goma xantana garantiu maior UFC mL⁻¹ em todos os tempos, e que após os 7 dias, apenas entre 45 e 90 dias a utilização de carboximetilcelulose foi estatisticamente igual tanto ao tratamento sem conservação quanto com goma xantana, mas que após 90 dias apresentou valores superiores de UFC mL⁻¹ em relação à testemunha.

Unidades Formadora de Colônias (UFC mL ⁻¹)				
Tempo (dias)	testemunha	CMC	GX	
0	6,0x10 ⁹ a	6,0x10 ⁹ a	6,0x10 ⁹ a	
7	5,0x10 ⁹ c	1,3x10 ⁹ b	6,3x10 ⁹ a	
15	2,5x10 ⁸ b	7,5x10 ⁸ a	5,0x10 ⁸ a	
30	2,0x10 ⁸ a	3,6x10 ⁸ a	3,9x10 ⁸ a	
45	1,7x10 ⁸ b	2,1x10 ⁸ ab	3,7x10 ⁸ a	
60	1,2x10 ⁸ b	2,1x10 ⁸ ab	3,7x10 ⁸ a	
90	1,0x10 ⁸ b	1,9x10 ⁸ ab	3,4x10 ⁸ a	
120	9,0x10 ⁷ b	1,8x10 ⁸ a	2,5x10 ⁸ a	
150	7,5x10 ⁷ b	1,8x10 ⁸ a	1,6x10 ⁸ a	
180	6,5x10 ⁷ b	1,7x10 ⁸ a	1,3x10 ⁸ a	
210	5,0x10 ⁷ b	1,5x10 ⁸ a	1,0x10 ⁸ a	
CV (%) ⁽²⁾	1,75			

⁽¹⁾ Médias seguidas de mesma letra minúscula, nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. ⁽²⁾ CV: Coeficiente de Variação.

Tabela 5: Influência da utilização de carboximetilcelulose (CMC) e goma xantana (GX) na preservação de células de *Pseudomonas fluorescens* durante 210 dias de armazenamento a 5 °C (1) no meio de cultura MS3.

Fonte: Autor

De acordo com Biniarz et al. (2018) e Scales et al. (2014), o pH ideal para o crescimento de *Pseudomonas* é entre 4 e 8, porém foi observado que em pH muito baixo ocorre a inibição do microrganismo e de acordo com a figura 6, é notável que o pH entre 7,3 e 7,5 obteve melhores resultados na preservação do número de células.

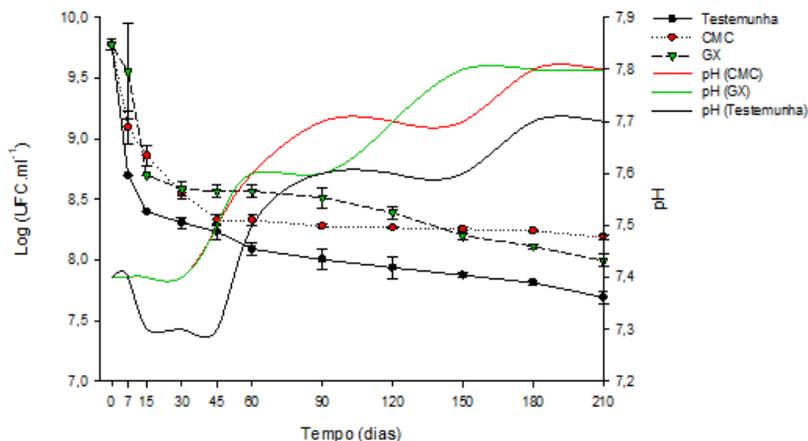


Figura 6: Relação da sobrevivência (UFC mL⁻¹) e o potencial hidrogeniônico (pH) de *Pseudomonas fluorescens*, no meio MS3 durante 210 dias de conservação a 5 °C.

Fonte: Autor

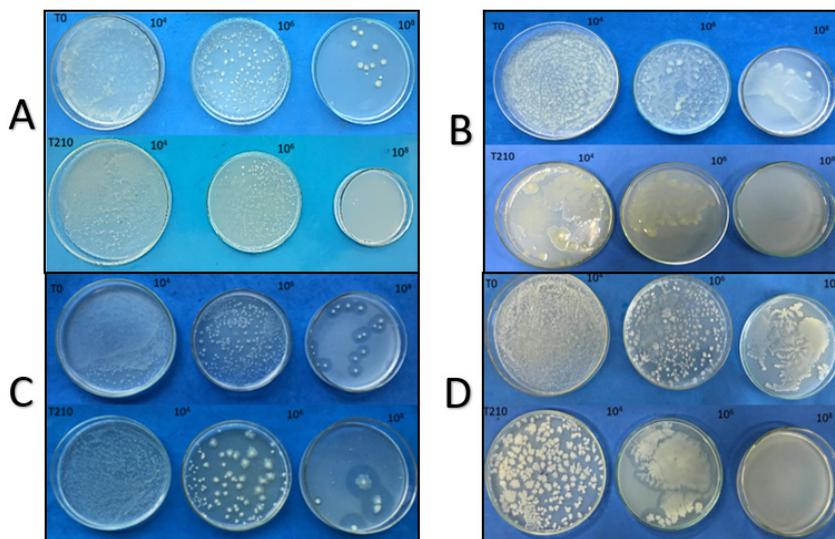
Em estudo feito por Gonçalves et al. (2017), foi notado que o crescimento de *Pseudomonas fluorescens* se deu melhor em condições de pH mais próximo ao neutro, o que pode comprovar o bom resultado obtido na fermentação com o meio MS3 que alcançou 10⁹ UFC mL⁻¹ em pH igual a 7,3.

Foi comprovado por Trivedi et al. (2005) que a utilização de alginato na formulação de inoculante com *Pseudomonas corrugata* garantiu resultados superiores em relação a inoculantes líquidos ou a base de carvão para inoculação de plantas de milho.

A conservação de inoculantes, segundo Balatti (1992) tem como característica indispensável a manutenção da viabilidade das células microbianas sem a presença de contaminantes, e que o método de preservação não cause mutações ou variação das características funcionais do microrganismo. Sendo assim, foi possível concluir com os dados apresentados que a utilização de carboximetilcelulose e goma xantana foram eficazes na manutenção das características primárias dos microrganismos nos meios de cultura testados.

Nas figuras 7A, 7B, 7C e 7D estão representadas respectivamente as unidades formadoras de colônia (UFC mL⁻¹) de *Bradyrhizobium elkanii*, *Bradyrhizobium diazoefficiens* e *Azospirillum* sp. no meio de cultura MS2, e *Pseudomonas fluorescens* no meio de cultura MS3, resultado do plaqueamento pela técnica Spread Plate, sendo as placas superiores referentes ao tempo 0, nas diluições 10⁴, 10⁶ e 10⁸, respectivamente, e nas placas inferiores está representado da mesma maneira o plaqueamento do tempo 210 dias, sendo que nas figuras 7A e 7C, as placas com 210 dias é resultado da conservação com o biopolímero goma xantana, e nas figuras 7B e 7D com carboximetilcelulose. confirmando a eficácia destes biopolímeros em manter a viabilidade celular da bactéria, sem a presença de

contaminantes, e sem alteração em suas características morfológicas.



A: *Bradyrhizobium elkanii*, B: *Bradyrhizobium diazoefficiens*, C: *Azospirillum* sp., D: *Pseudomonas fluorescens*.

Figura 7: Unidade formadora de colônia (UFC mL⁻¹) de *Bradyrhizobium elkanii*, *Bradyrhizobium diazoefficiens* e *Azospirillum* sp. nos tempos zero (T0) e 210 dias (T210), no meio MS2, e *Pseudomonas fluorescens* no meio MS3.

Fonte: Autor

Nestas figuras foi observado o decréscimo do número de colônias após os 210 dias de armazenamento, porém foi satisfatório pelo fato de não ter a presença de microrganismos contaminantes, o que poderia influenciar na competição por nutrientes entre o microrganismo e algum possível contaminante, acarretando na diminuição de células viáveis, e conseqüente ineficiência do inoculante, estando de acordo com o que diz Deaker et al. (2004) que consideram o número de células viáveis e o número máximo de contaminantes toleráveis, como sendo os parâmetros necessários para classificar um inoculante.

Confrontando os resultados obtidos nesta pesquisa de que o meio de cultura MS2, e MS3 com adição de biopolímero goma xantana ou carboximetilcelulose foram eficientes na manutenção de células viáveis das rizobactérias testadas, e a ausência de contaminantes, com os resultados de uma pesquisa realizada por Herrmann e Lesueur (2013) na qual foram avaliados 65 inoculantes comerciais, sendo que destes, somente 37% estavam puros e 63% apresentavam contaminação por uma ou mais estirpes bacterianas, o inoculante produzido pode ser considerado de boa qualidade.

4 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização de biopolímeros como goma xantana (GX) e carboximetilcelulose (CMC) foi eficiente na conservação e viabilidade de células de *Bradyrhizobium elkanii*, *Bradyrhizobium diazoefficiens*, *Azospirillum* sp. e *Pseudomonas fluorescens* durante 210 dias de armazenamento a 5 °C.

O meio de cultura MS2 composto por melão de soja e extrato de levedura foi mais eficiente do que o meio MS1 na manutenção de UFC mL⁻¹.

REFERÊNCIAS

ALEXANDRE, G.; GREER, S. E.; ZHULIN, I.B. Energy taxis is the dominant behavior in *Azospirillum brasilense*. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 21, p. 6042-6048, 2000.

ARGAL, M. S.; RAWAT, A. K.; AHER, S. B.; RAJPUT, P. S. Bioefficacy and shelf life of *Rhizobium leguminosarum* loaded on different carriers. **Applied Biological Research**, v. 17, n. 2, p. 1-7, 2015.

BALATTI, A. P. Producción de inoculantes para Leguminosas: tecnología de las fermentaciones aplicada a los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*. Santa Rosa, Argentina. **Ediciones Trabuco Editorial**. 152 p., 1992.

BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L. E. Inoculant Preparation and Formulations for *Azospirillum* spp. In: **Handbook for Azospirillum**. Springer, Cham, 2015. p. 469-485.

BINIARZ, P.; COUTTE, F.; GANCEL, F.; LUKASZEWICZ, M. High-throughput optimization of medium components and culture conditions for the efficient production of a lipopeptide pseudofactin by *Pseudomonas fluorescens* BD5. **Microbial cell factories**, v. 17, n. 1, p. 121, 2018.

CONTRERAS-ANGULO, J. R.; MATA, T. M.; CUELLAR-BERMEDEZ, S. P.; CAETANO, N. S.; CHANDRA, R. GARCIA-PEREZ, J. S.; MUJLAERT, K.; PARRA-SALDIVAR, R. Symbiotic co-culture of *Scenedesmus* sp. and *Azospirillum brasilense* on N-deficient media with biomass production for biofuels. **Sustainability**, v. 11, n. 3, p. 707, 2019.

DEAKER, R.; ROUGHLEY, R.; KENNEDY, I. R. Legume seed inoculation technology: a review. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 36, n. 8, p. 1275-1288, 2004

DENARDIN, N. D.; FREIRE, J. R. J. Assessment of polymers for the formulation of legume inoculants. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 16, n. 3, p. 215-217, 2000.

FERNANDES JÚNIOR, P. I.; ROHR, T. G.; OLIVEIRA, P. J. D.; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G. Polymers as carriers for rhizobial inoculant formulations. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 9, p. 1184-1190, 2009.

GARCÍA-FRAILE, P.; MENÉNDEZ, E.; RIVAS, R. Role of bacterial biofertilizers in agriculture and forestry. **AIMS Bioeng**, v2, p.183–205, 2015.

GONÇALVES, L. D. D. A.; PICCOLI, R. H.; PERES, A. D. P.; SAÚDE, A. V. Predictive modeling of *Pseudomonas fluorescens* growth under different temperature and pH values. *Brazilian journal of microbiology*, v. 48, n. 2, p. 352-358, 2017.

HERRMANN, L.; LESUEUR, D. Challenges of formulation and quality of biofertilizers for successful inoculation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 97, n. 20, p. 8859-8873, 2013.

HUSSAIN, A.; ZIA, K. M.; TABASUM, S.; NOREEN, A.; ALI, M.; LQBAL, R.; ZUBER, M. Blends and composites of exopolysaccharides; properties and applications: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 94, p. 10–27, 2017.

LIMA, A. A.; FERNANDES JÚNIOR, P. I.; PASSOS, S. R.; PAULO, F. S.; NOSOLINE, S. M.; FARIA, S. M.; GUERRA, J. G. M.; RUMJANEK, N. G.; XAVIER, G. R. Diversidade e capacidade simbiótica de rizóbios isolados de nódulos de *Mucuna-Cinza* e *Mucuna-Anã*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 36, n. 2, p. 337-348 2012.

LIU, Y.; JIANG, X.; GUAN, D.; ZHOU, W.; MA, M.; ZHAO, B.; CAO, F. LI, L.; LI, J. Transcriptional analysis of genes involved in competitive nodulation in *Bradyrhizobium diazoefficiens* at the presence of soybean root exudates. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-11, 2017.

MARIANO, R. L. R.; ASSIS, S. M. P.; SILVEIRA, E. Preservação de bactérias fitopatogênicas. **Manual de Práticas em Fitobacteriologia**. 2a. ed. Recife. UFRPE, p. 35-45, 2005.

MARTINS, L. M. V.; XAVIER, G. R.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. Características relativas ao crescimento em meio de cultura e a morfologia de colônias de "rizóbio". **Embrapa Agrobiologia-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 1997.

MAPA - **MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO**. Instrução Normativa Nº 13, de 24/03/2011. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis/>> Acesso em: 6 jun. 2020.

MOHAMED, S. S.; HASSAN, M. A.; ABDELGANI, M.E. The shelf life of Rhizobial liquid inoculants amended with diferente polymeric additives. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**. P 28-36, 2019.

MONCADA, A.; MICELI, A.; VETRANO, F. Use of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and organic fertilization for soilless cultivation of basil. **Scientia Horticulturae**, v. 275, p. 109733, 2020.

OLIVEIRA, L.A.; MAGALHÃES, H.P. de. Quantitative evaluation of acidity tolerance of root nodule bacteria. **Revista de Microbiologia**. v. 30: 203–208, 1999.

PEREZ-GALDONAF, R.; KAHN, M. L. Effects of organic acids and low pH on *Rhizobium meliloti* 104A14. **Microbiology**, v. 140, n. 5, p. 1231-1235, 1994.

PRESCOTT, L. M., HARLEY, J. P., KLEIN D. A., **Microbiology, McGraw-Hill**, New York, 2002.

PRAVEEN BIRADAR, B.J.; SANTHOSH, G.P., Cell Protectants, Adjuvants, Surfactant and Preservative and their Role in Increasing the Shelf Life of Liquid Inoculant Formulations of *Pseudomonas fluorescens*. **International Journal of Pure e Applied Bioscience**. V. 6, n. 4, p. 116-122, 2018.

RAMONGOLALAINA, C. Dual-luciferase assay and siRNA silencing for nodD1 to study the competitiveness of *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA110 in soybean nodulation. **Microbiological Research**, p. 126488, 2020.

REIS, V. M.; ALVES, G. C. Inoculantes contendo bactérias fixadoras de nitrogênio para aplicação na cultura do milho. **Ciências Agrárias: Tecnologias e Perspectivas**. p. 82 – 97, 2015.

REETHA, D.; KUMARESAN, G.; JOHN MILTON, D. Studies to improve the shelf life of *Azospirillum lipoferum* immobilized in alginate beads. **International Journal of Recent Scientific Research**, v. 5, p. 2178-2182, 2014.

ROHR, T.G. **Estudo reológico da mistura carboximetilcelulose/ amido e sua utilização como veículo de inoculação bacteriano**. 2007. 113f. Dissertação (Mestrado em Ciências), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2007.

ROMEIRO, R. S. Preservação de bactérias fitopatogênicas. 1.ed. Viçosa. **UFV**, 2001. Pp. 87-96.

ROMERO-PERDOMO, F.; CAMELO-RUSINQUE, M.; CRIOLLO-CAMPOS, P.; BONILLA-BUITRAGO, R. Efecto de la temperatura y el pH en la producción de biomasa de *Azospirillum brasilense* C16 aislada de pasto guinea. **Pastos y Forrajes**, v. 38, n. 3, p. 171-175. 2015.

SANZ, T.; FERNÁNDEZ, M. A.; SALVADOR, A.; MUNOZ, J.; FISZMAN, S. M. Thermogelation properties of methylcellulose (MC) and their effect on a batter formula. **Food Hydrocolloids**, v. 19, n. 1, p. 141-147, 2005.

SCALES, B. S.; DICKSON, R. P.; LIPUMA, J. J.; HUFFNAGLE, G. B. Microbiology, genomics, and clinical significance of the *Pseudomonas fluorescens* species complex, an unappreciated colonizer of humans. **Clinical microbiology reviews**, v. 27, n. 4, p. 927-948, 2014.

SILVA, M. F.; OLIVEIRA, P. J.; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G.; REIS, V. M. Inoculantes formulados com polímeros e bactérias endofíticas para a cultura da cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 11, p. 1437-1443, 2010.

SILVA, C. R. R.; JUNIOR, M. A. L.; FIGUEIREDO, M. V. B.; STAMFORD, N. P.; ALVES, G. Viabilidade de conservação de rizóbios por condicionadores líquidos. **Revista Ciência Agronômica**, v. 44, n. 4, p. 661-668, 2013.

SOMASEGARAN, P., HOBEN, H. J. Handbook for rhizobia: methods in legume-Rhizobium technology. **Springer Science & Business Media**, 1994.

TRIVEDI, P.; PANDEY, A.; PALNI, L. M. S. Carrier-based preparations of plant growth-promoting bacterial inoculants suitable for use in cooler regions. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 6-7, p. 941-945, 2005.

TUMELERO, A. I.; DENARDIN, N. D. Uso de polímeros em formulações para preservação de *Pectobacterium atrosepticum* e *Ralstonia solanacearum*. **Summa phytopathol.** Botucatu, v. 34, n. 1, p. 58-61. 2008.

VOSS, G. B. **Produção de *Bacillus subtilis* em biorreator airlift e sua aplicação no controle de nematoide de galhas do tomateiro**. 2013. 115f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

XAVIER, G.R.; RUMJANEK, N. G.; GUEDES, R. E. Inoculante. **Agência EMBRAPA de Informação Tecnológica**, Brasília. Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br>>. Acesso em: 19 jun. 2020.

WOICIECHOWSKI, A. L.; CARVALHO, J. C.; SPIER, M. R.; SOCCOL, C. Emprego de resíduos agroindustriais em bioprocessos alimentares. **Biotecnologia de alimentos**, coleção Ciência, tecnologia, engenharia de alimentos e nutrição, editora Atheneu, São Paulo, Rio de Janeiro e Belo Horizonte, v. 1, p. 143-172, 2013.

ÍNDICE REMISSIVO

A

A. aegypti 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 54, 57, 58, 59

Água 23, 43, 44, 45, 47, 57, 60, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75

Água ambiental 65, 67, 71

Análisis sensorial 1, 5, 7

B

Bacteriologia 65, 76, 77, 83, 97

C

Conservante 20, 22, 23, 25, 27

Controle 14, 23, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 75, 83, 88, 89, 90, 91, 92

Culantro de pozo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9

D

Diagnóstico clínico 76, 77

Distrito Federal 39, 40, 41, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64

Doença de Chagas 84, 86, 87, 88, 89, 91, 93, 94, 95, 96

Doenças parasitárias 84, 85, 86, 92

E

Eryngium foetidum L 1, 2, 3, 9, 10

Extrato de *Punica granatum* 12, 17

F

Fitoterápicos 12, 17

G

Gastroenterites 65, 73

Grasa 1, 3, 6, 8, 9, 10

I

Inoculante 19, 20, 24, 30, 31, 33, 34, 38

M

Mayonesa de soya 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9

Microorganismo 13, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 78, 82

N

ncRNAs 84, 85, 89

P

Proteômica 76, 78, 81, 82, 83, 97

R

Resistência bacteriana 12, 13, 17, 18

V

Vírus 15, 42, 60, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75



MICROBIOLOGIA:

Avanços através dos séculos e constante atualizações tecnológicas

2

-  www.atenaeditora.com.br
-  contato@atenaeditora.com.br
-  [@atenaeditora](https://www.instagram.com/atenaeditora)
-  www.facebook.com/atenaeditora.com.br



MICROBIOLOGIA:

Avanços através dos séculos e constante atualizações tecnológicas

2

-  www.atenaeditora.com.br
-  contato@atenaeditora.com.br
-  [@atenaeditora](https://www.instagram.com/atenaeditora)
-  www.facebook.com/atenaeditora.com.br