

CARLA REGINE REGES SILVA FRANÇA

**VIABILIDADE DA CONSERVAÇÃO DE ESTIRPES DE RIZÓBIO POR
DIFERENTES CONDICIONADORES LÍQUIDOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciência do Solo.

Orientador: Prof^o. Mario de Andrade Lira Junior, PhD.

Co-orientadores:

Prof^a. Márcia do Vale Barreto Figueiredo, PhD.

Prof^o. Newton Pereira Stamford, Dr.

**RECIFE
2009**

CARLA REGINE REGES SILVA FRANÇA

**VIABILIDADE DA CONSERVAÇÃO DE ESTIRPES DE RIZÓBIO POR
DIFERENTES CONDICIONADORES LÍQUIDOS**

Dissertação defendida e aprovada em 27 de maio de 2009 pela banca examinadora:

ORIENTADOR:

Mario de Andrade Lira Junior, Dr.

EXAMINADORES:

Elineide Barbosa da Silveira, Dr^a.

Karina Patrícia Vieira da Cunha, Dr^a.

Maria do Carmo Catanho Pereira Lyra, Dr^a.

Ficha catalográfica
Setor de Processos Técnicos da Biblioteca Central – UFRPE

XXX França, Carla Regine Reges Silva

Viabilidade da Conservação de Estirpes de Rizóbio por Diferentes
Condicionadores Líquidos – 2009.

XXXp.: il.

Orientador: Mario de Andrade Lira Júnior
Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Universidade
Federal Rural de Pernambuco. Departamento de Agronomia.
Inclui Bibliografia e apêndice.

xxx 000.00

- 1 *Bradyrhizobium*
- 2 *Rhizobium*
- 3 Conservação
- 4 Condicionadores
- I Lira Junior, Mario de Andrade
- II Título

**Tu és o lugar onde me escondo; tu me
preservas da angústia; tu me cinges de
alegres cantos de livramento.**

**Instruir-te-ei, e ensinar-te-ei o caminho
que deves seguir; guiar-te-ei
com os meus olhos.**

Salmo 32: 7-8.

Esta dissertação é dedicada com muito amor às pessoas mais brilhantes da minha vida:

Aos meus pais **Carlos dos Santos Silva** e **Elisabeth Reges Silva** por me ensinarem os primeiros passos e me acompanharem em todos os outros. Ao meu irmão **Ernâne Augusto Reges Silva** pelo amor e companheirismo. Ao meu querido esposo **Afonso Rodrigues França** pelo amor, apoio e paciência. Ao meu amado filho **Arthur**, presente de Deus na minha vida, simplesmente por existir e deixar meus dias mais felizes.

DEDICO

Agradecimentos

A Deus e a Nossa Senhora por ter suavizado a canção, por terem me lapidado a cada manhã, proporcionando inconformismo construtivo, mantendo os meus pés no chão e também por não terem me deixado fugir nenhuma vez do caminho por mim escolhido.

A minha família e a minha cunhada Aída Costa pela presença e pelo apoio.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo da Universidade Federal Rural de Pernambuco pela oportunidade e condições concedidas para a realização do Curso.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos fomentando o meu desenvolvimento profissional.

Ao meu orientador, Professor Ph. D. Mario de Andrade Lira Junior por ter me ensinado que limitações foram feitas para serem superadas. Obrigada!

Aos meus co-orientadores Professora Dr^a. Márcia do Vale Barreto Figueiredo e Professor Dr. Newton Pereira Stamford.

Aos coordenadores do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo Professor Dr. Clístenes Williams Araújo do Nascimento e Dr. Mateus Rosas R.Filho.

Ao Instituto Agrônomo de Pernambucano – IPA, na pessoa de Márcia do Vale Barreto Figueiredo pela concessão das sementes de feijão para a realização do experimento.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo da Universidade Federal Rural de Pernambuco pelos ensinamentos transmitidos ao longo do curso.

Aos responsáveis pelos Laboratórios de Física do Solo, de Química do Solo, de Microbiologia do Solo e de Fertilidade do Solo da Universidade Federal Rural de Pernambuco pela oportunidade concedida para a realização de todas as análises.

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciência do solo Maria do Socorro de Santana (Socorrinho), Severino dos Ramos Basto (Seu Noca) e Josué Camilo de Melo por estarem sempre prontos a nos atender, pelo carinho e apoio.

Ao Anacleto José da Fonseca Junior, Iraci Maria de Mendonça Bastos Vieira, e a professora Dr^a. Carolina Etienne de Rosália e Silva Santos pela atenção e disponibilidade para ajudar em todos os momentos que precisei.

A todos da Embrapa Semi-árido, em especial à pesquisadora Alineaurea Florentino Silva, pela amizade, confiança e por incentivar meus passos na pesquisa.

As minhas queridas e adoráveis amigas Maria Goretti e Eliane Carmina por tudo que sempre me ensinaram, por tudo que vivemos, enfrentamos, superamos e aprendemos juntas. Hoje, apesar de quilômetros de distância nos separarem, a presença de vocês em minha vida não deixou de ser marcante.

Aos colegas de turma: Maria da Conceição, Marise, Terezinha, Thais, Carol, Welka, Luiz Guilherme, Rosemberg, Luciana, André, Rômulo, Patrick, Laerte, Suzy, Tâmara, Edivam, Feliz, Leila, Fátima e Michelangelo.

A todos os meus amigos, à Alba Valéria, por tantos aperreios e emoções vividas.

A todos da equipe do Profº Mario, ao apoio prestado desde o início do experimento até a conclusão deste, em especial aos que participaram diretamente deste projeto: Carla Costa, Nelson, Lígia, Viviane, Tatyana, Diogo e Rafaela. Sem a ajuda de vocês, paciência, coragem e dedicação este trabalho teria sido muito mais difícil. A todos serei eternamente grata.

Sumário

	Pg
1. Introdução.....	1
2. Revisão Bibliográfica.....	3
2.1. Fixação biológica de nitrogênio.....	3
2.2. Preservação de microrganismos.....	5
3. Material e Métodos.....	9
3.1. Seleção e preparação dos condicionadores Líquidos.....	9
3.2. Estirpes bacterianas.....	9
3.3. Condições de crescimento e estoque.....	10
3.4. Sobrevivência de células rizobianas em diferentes condicionadores.....	10
3.5. Caracterização morfológica dos isolados.....	11
3.6. Experimento em condições de casa de vegetação.....	12
4. Resultados e Discussão.....	14
4.1. Sobrevivência de células rizobianas em diferentes condicionadores.....	14
4.2. Caracterização morfológica dos isolados.....	19
4.3. Experimento em condições de casa de vegetação.....	21
4.3.1. Experimento feijão (<i>Phaseolus vulgaris</i>) cv Carioca.....	21
4.3.2. Experimento soja (<i>Glycine max</i>) cv. Sambaíba.....	28
5. Conclusões.....	32
6. Referências Bibliográficas.....	33
7. Anexos.....	41

Lista de figuras

Figura 1. Sobrevivência das estirpes de <i>Rhizobium tropici</i> (SEMIA 4077 – SEMIA 4080) e <i>Bradyrhizobium japonicum</i> (SEMIA 5079 – SEMIA 5080) conservadas em NaCl 0,1% em temperatura ambiente.....	15
Figura 2. Sobrevivência das estirpes de <i>Rhizobium tropici</i> (SEMIA 4077 – SEMIA 4080) e <i>Bradyrhizobium japonicum</i> (SEMIA 5079 – SEMIA 5080) conservadas em Glicerol 20% em temperatura ambiente.....	17
Figura 3. Sobrevivência das estirpes de <i>Rhizobium tropici</i> (SEMIA 4077 – SEMIA 4080) e <i>Bradyrhizobium japonicum</i> (SEMIA 5079 – SEMIA 5080) conservadas em carboximetilcelulose (CMC) 0,2% em temperatura ambiente.....	18
Figura 4. Números de nódulos em plantas de feijão (<i>Phaseolus vulgaris</i>), obtidos a partir da conservação de estirpes de rizóbio por diferentes condicionadores líquidos aos 15 dias de conservação.....	25
Figura 5. Teor de N da parte aérea de plantas de feijão (<i>Phaseolus vulgaris</i>), obtido a partir da conservação de estirpes de rizóbio por diferentes condicionadores líquidos aos 15 dias de conservação.....	25
Figura 6. Massa seca de nódulos em plantas de feijão (<i>Phaseolus vulgaris</i>), obtidos a partir da conservação de estirpes de rizóbio por diferentes condicionadores líquidos aos 120 dias de conservação.....	26
Figura 7. Número de nódulos em plantas de feijão (<i>Phaseolus vulgaris</i>), obtidos a partir da conservação de estirpes de rizóbio por diferentes condicionadores líquidos aos 120 dias de conservação.....	26
Figura 8. Matéria seca da parte aérea de plantas de feijão (<i>Phaseolus vulgaris</i>), obtida a partir da conservação de estirpes de rizóbio por diferentes condicionadores líquidos aos 15 dias de conservação.....	27

Lista de tabelas

Tabela 1. Identificação das estirpes utilizadas no experimento.....	9
Tabela 2: Efeito da conservação de duas estirpes de <i>Rhizobium tropici</i> (SEMIA 4077 e SEMIA 4080) na capacidade de nodulação, produção de matéria seca de raiz e parte aérea, N-total e teor de N em plantas de feijão (<i>Phaseolus vulgaris</i>) após conservação das estirpes.....	23
Tabela 3: Efeito dos diferentes condicionadores líquidos na capacidade de nodulação, produção de matéria seca de raiz e parte aérea, N-total e teor de N em plantas de feijão (<i>Phaseolus vulgaris</i>) após conservação das estirpes.....	24
Tabela 4: Efeito da conservação de duas estirpes de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> (SEMIA 5079 e SEMIA 5080) na capacidade de nodulação, produção de matéria seca de raiz e parte aérea, N-total e teor de N em plantas de soja (<i>Glycine max</i>) após a conservação das estirpes	30
Tabela 5: Efeito dos diferentes condicionadores líquidos na capacidade de nodulação, produção de matéria seca de raiz e parte aérea, N-total e teor de N em plantas de soja (<i>Glycine max</i>) após a conservação das estirpes	31

Lista de anexos

Anexo 1. Análise da variância inicial relacionada à massa seca de nódulos e número de nódulos em plantas de feijão.....	41
Anexo 2. Análise da variância inicial relacionada à matéria seca de raiz e parte aérea em plantas de feijão.....	42
Anexo 3. Análise da variância inicial relacionada a N-total e teor de nitrogênio em plantas de feijão.....	42
Anexo 4. Análise da variância inicial relacionada à massa seca e número de nódulos em plantas de soja.....	43
Anexo 5. Análise da variância inicial relacionada a matéria seca de raiz e parte aérea em plantas de soja.....	43
Anexo 6. Análise da variância inicial relacionada a N-total e teor de nitrogênio em plantas de soja.....	44
Anexo 7. Resumo da análise de fatorial com os valores das probabilidades para as variáveis analisadas no desenvolvimento de feijão (<i>Phaseolus vulgaris</i>) após conservação das estirpes.....	45
Anexo 8. Resumo da análise de fatorial com os valores das probabilidades para as variáveis analisadas no desenvolvimento de soja (<i>Glycine max</i>) após conservação das estirpes.....	46

Resumo

Este estudo visou avaliar a cinética de crescimento e características morfofisiológicas e simbiótica de quatro estirpes de rizóbio, frente a diferentes condicionadores líquidos. O experimento foi composto de quatro estirpes (sendo duas de *Rhizobium tropici* (SEMIA 4077 – SEMIA 4080) e duas de *Bradyrhizobium japonicum* (SEMIA 5079 – SEMIA 5080), recomendadas respectivamente para feijão (*Phaseolus vulgaris*) e soja (*Glycine max*), três condicionadores líquidos (NaCl 0,1 % , glicerol 20 % e carboximetilcelulose 0,2 %). Após cultivo em meio líquido YM 0,5 mL do caldo bacteriano de cada estirpe foi transferido para tubos com capacidade para 2 mL, contendo 1,5 mL de cada condicionador líquido e mantidas em temperatura ambiente por 180 dias. Em seguida, fez-se a contagem utilizando diluições seriadas e o método da gota das UFC que foi de aproximadamente 10^8 células. Durante o experimento, foram realizadas determinações da população bacteriana aos 0, 1, 7, 15, 21 dias após a conservação, seguido por amostras aos 30, 60, 90, 120, 150, 180 dias. A eficiência simbiótica foi avaliada nos períodos de 15, 60 e 120 dias após a conservação em plantas de feijão e soja. Os resultados permitem observar que a concentração de células viáveis variou entre os preservantes. O preservante NaCl 0,1% manteve a concentração de células viáveis entre 10^7 e 10^8 UFC mL⁻¹ para as estirpes SEMIA 4077, 5080 e 5079 por até 180 dias de conservação e produziu efetiva nodulação aos 15 e 120 dias de conservação para as estirpes SEMIA 4077 e SEMIA 4080, quando inoculados em sementes de feijão. O preservante Glicerol 20%, não apresentou características desejáveis para um bom método de preservação com as estirpes SEMIA 4080, SEMIA 5079 e SEMIA 5080. O carboximetilcelulose foi promissor para a conservação das estirpes SEMIA 4077 e SEMIA 5079 em temperatura ambiente. A nodulação foi influenciada pelo preservante utilizado. Em todos os preservantes houve diminuição no número de nódulos durante o período de conservação. Com base nos resultados osxii

condicionadores líquidos NaCl 0,1 % e Carboximetilcelulose 0,2 % foram os que conseguiram manter as células das estirpes por um período de curto prazo, além de preservar as características morfofisiológicas das estirpes de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*.

Palavras-chave: Conservação, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e condicionadores líquidos.

Abstract

This study had for objective to evaluate the growth kinetics and characteristics morphophysiological and symbiotic strains of rhizobia of four, from the conditioning different liquids. The experiment was composed of four strains (two of the strains of *Rhizobium tropici* (SEMIA 4077-SEMIA 4080) and two of *Bradyrhizobium japonicum* (SEMIA 5079-SEMIA 5080), respectively for bean (*Phaseolus vulgaris*) and soybean (*Glycine max*), three conditioning (NaCl 0,1%, glicerol 20% and carboximetilcelulose 0,2%) more fresh bacteria, that you/they were grown close to each evaluation period. After the growth period in liquid middle YM 0,5 mL of the bacterial broth of each strains was transferred for tubes with capacity for 2 mL, containing 1,5 mL of each conditioning liquid and maintained in room temperature by 180 days. After the accomplishment of the different formulations for the conservation of the strains, it was made the counting of UFC that contained 10^8 cells of the rhizobia culture approximately using serial dilutions and the method of the drop. During the experiment, readings were accomplished in the time 0, 1, 7, 15, 21 days after the conservation, following for monthly samples 30, 60, 90, 120, 150, 180 days. The efficiency symbiotic was evaluated in the periods of 15, 60 and 120 days after the conservation in bean plants and soy. The results allow to observe that the concentration of viable cells varied among the preservantes. The preservante NaCl 0,1% maintained the concentration of viable cells around 10^7 and 10^8 UFC mL⁻¹ for the strains SEMIA 4077, 5080 and 5079 for up to 180 days of conservation and it nodulation to the 15 and 120 days of conservation for the strains SEMIA 4077 and SEMIA 4080, when inoculated in bean seeds. The conditioning Glicerol 20%, didn't present desirable characteristics for a good conservation method with the strains SEMIA 4080, SEMIA 5079 and SEMIA 5080. The carboximetilcelulose was promising for the conservation of the ancestries SEMIA 4077 and SEMIA 5079 in room temperature. Nodulation was influenced by the preservative used. In all of the

preservantes there was decrease in the number of nodules during the conservation period. With base in the results the conditioning liquids NaCl 0,1% and Carboximeticeulose 0,2% were the one that got maintain the cells of the strains for a period of short period, besides preserving the characteristics morfofisiológicas of the strains of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*.

Key Words: Conservation, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* and conditioning liquids.

1 Introdução

Os inúmeros organismos que se multiplicam e habitam o solo são responsáveis, direta ou indiretamente, por processos bioquímicos diversos que controlam as transformações dos elementos químicos e as transferências de energia e nutrientes no sistema solo-planta-atmosfera, constituindo a base de sustentação e produtividade dos ecossistemas terrestres. Dentre esses processos destacam-se a decomposição da matéria orgânica e a Fixação Biológica do Nitrogênio (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

As leguminosas e gramíneas que constituem famílias botânicas com diversas espécies com importante papel na alimentação, e no paisagismo. As leguminosas destacam-se por representar uma importante fonte de proteína, principalmente para regiões mais carentes do globo. Por esse motivo, é de fundamental importância explorar o potencial que essas plantas apresentam para a fixação biológica de nitrogênio atmosférico (FBN) (FERNANDES JÚNIOR, 2006).

As culturas bacterianas do Laboratório de Microbiologia do Solo da Universidade Federal Rural de Pernambuco são conservadas pelos métodos de repicagem periódica, sílica-gel, conservação em óleo mineral, glicerol e congelamento. Essas técnicas por muitas vezes fazem com que haja perda da viabilidade das estirpes, promovendo assim a busca por outras metodologias que promovam a manutenção das culturas.

A importância da preservação de culturas bacterianas e da necessidade de se poder dispor do organismo para fins experimentais, de rotina, atendimento a solicitações de outros pesquisadores para fins didáticos.

A conservação de bactérias em nitrogênio líquido ou liofilizadas são os métodos que mais se destacam para a maioria das linhagens microbianas, por garantir a identidade original da célula, por longos períodos. Porém, nem todos os laboratórios dispõem dos equipamento necessários para a aplicação de tais

métodos (TUMELERO & DENARDIN, 2008). O uso da tecnologia com condicionadores líquidos, abre o caminho para o desenvolvimento de um bom método de conservação, requerendo baixo custo, rapidez de execução e tenha um grau elevado de eficiência.

É nesse contexto que este trabalho se insere, com o objetivo de avaliar a cinética de crescimento e características morfofisiológicas e simbiótica de quatro estirpes de rizóbio, frente a diferentes condicionadores líquidos.

2. Revisão de Literatura

2.1. Fixação Biológica do Nitrogênio.

As principais reações bioquímicas em plantas e microrganismos envolvem a presença do N, que o torna um dos elementos absorvidos em maiores quantidades por plantas cultivadas (NOVAIS et al., 2007).

O nitrogênio atmosférico pode ser transformado em NH_3 através de processos industriais, como o Haber-Bosch, que produzem parte significativa dos fertilizantes nitrogenados. Como a ligação tripla que une os dois átomos de nitrogênio é muito forte, a fixação industrial precisa de temperatura ($> 400^\circ \text{C}$) e pressões elevadas ($>10^7$ Pascal) (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). Como alternativa ao método existe a fixação biológica de N_2 (FBN), um processo essencial para transformar o N_2 , em formas reativas. A reação de redução do N_2 a NH_3 é realizada por microrganismos que contém a enzima nitrogenase e que são conhecidos como fixadores de N_2 ou diazotróficos (NOVAIS et al., 2007).

A família das leguminosas compreende de 16000 a 19000 espécies, divididas em aproximadamente 750 gêneros, com distribuição global. Embora não seja uma característica comum a todas as espécies, a grande particularidade ecológica das leguminosas é a sua capacidade de nodular e fixar nitrogênio atmosférico em simbiose com bactérias do grupo dos rizóbios (SANTOS et al., 2008).

Para que o N proveniente da fixação biológica possa suprir todas as necessidades da planta, o processo precisa ser eficiente, o que resulta, principalmente, da escolha adequada dos parceiros simbióticos, ou seja, estirpes de bactérias mais eficientes e competitivas e genótipos de plantas que respondam ao microsimbionte (HUNGRIA et al., 1994).

A simbiose rizóbio-leguminosa é o mais importante sistema simbiótico entre microrganismos e plantas graças à eficiência do processo de fixação de N_2 , à amplitude e distribuição geográfica dos hospedeiros e ao impacto econômico para a

agricultura, uma vez que permite substancial economia de fertilizantes nitrogenados (SANTOS et al., 2008; NOVAIS et al., 2007).

A importância social e econômica da cultura do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L) no Brasil é evidenciada, principalmente, pelo contingente de pequenos produtores e por representar a principal fonte protéica da dieta alimentar da população (MERCANTE et al., 1992), enquanto a cultura da soja (*Glycine max* (L.) Merrill) apresenta grande interesse devido ao seu teor protéico elevado (NISHI & HUNGRIA, 1996). Segundo CHUEIRE et al., (2003) as culturas da soja e do feijoeiro podem ter seu requerimento de nitrogênio suprido pela simbiose com bactérias da ordem Rhizobiales. No Brasil, a FBN se constitui na fonte mais viável economicamente e ecologicamente para a cultura da soja permitindo alta produtividade (ZILLI et al., 2005).

WEIR (2009) apresenta a seguinte relação de gêneros de bactérias capazes de formar nódulos em leguminosas: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Ensifer* (*Sinorhizobium*), *Mesorhizobium*, *Methylobacterium*, *Burkholderia*, *Cupriavidus*, *Devosia*, *Herbaspirillum*, *Ochrobactrum* e *Phyllobacterium*.

Em 1992, a Embrapa Cerrados lançou as estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* CPAC 15 (= SEMIA 5079, variante natural do sorogrupo da SEMIA 566) e CPAC 7 (= SEMIA 5080, variante natural do sorogrupo da CB 1809) para a cultura da soja, que, por resultarem em maiores rendimentos de grãos, deram grande impulso ao uso de inoculantes (HUNGRIA et al., 2007). Para a cultura da soja atualmente é recomendada, a utilização de inoculantes com a combinação de duas das quatro estirpes: *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA 587 e SEMIA 5019 (29w) e *japonicum* SEMIA 5079 (CPAC 15) e SEMIA 5080 (CPAC 7) (ZILLI et al., 2005). Por outro lado para a cultura do feijoeiro, são recomendadas duas estirpes de *Rhizobium tropici*, a SEMIA 4077 (=CIAT 899) e a SEMIA 4080 (=PRF 81), esta última isolada de um solo do Paraná e recomendada desde 1988, tendo comprovado alta capacidade de fixação de N₂ e competitividade contra rizóbios nativos em

diversos ensaios realizados no Brasil (HUNGRIA et al., 2000).

2.2. Preservação de microrganismos

A manutenção dos cultivos é um problema comum às diversas áreas da microbiologia. Para muitos laboratórios o mais difícil é estabelecer um método mais adequado que assegure uma prolongada viabilidade da estirpe em um determinado estado fisiológico. O principal objetivo da preservação é manter a estirpe com vida, sem a presença de contaminantes, nem de variações e mutações (BALATTI, 1992). O organismo deve ser mantido vivo pelo maior período possível e por um método que não permita ou minimize a ocorrência de mutações ou de variabilidade quanto à patogenicidade, virulência ou características básicas da cultura original (ROMEIRO, 2001).

A curto ou longo prazo, as técnicas de armazenamento são empregadas rotineiramente porque células bacterianas perdem freqüentemente suas propriedades ou características desejadas, após a transferência repetida em meio de cultura (SUSLOW & SCHROTH, 1981). Em todos os casos o custo de preservação, manutenção e o tempo prolongado de permanência das culturas viáveis determinam a técnica de preservação escolhida (HAYS et al., 2005).

Os microrganismos preservados devem ser testados para verificar a viabilidade a intervalos regulares e os dados dos testes de viabilidade são úteis para selecionar uma técnica de preservação adequada para uma nova estirpe a ser depositada (NAGAI et al., 2005).

Assim, para preservação desse patrimônio biológico por longos períodos de tempo, tornou-se necessário desenvolver outros métodos que fossem menos dependentes do trabalho humano e que mantivessem as culturas viáveis e menos sujeitas a variações (FIGUEIREDO, 2001).

Vários métodos são utilizados para preservação de bactérias, tais como: repicagem periódica, preservação por secagem, preservação em órgãos vegetais

dessecação em papel filtro, óleo mineral, preservação em solo, contas de vidro ou porcelana (MARIANO & ASSIS, 2005; ROMEIRO, 2001), água destilada esterilizada (MARIANO & ASSIS, 2005; ROMEIRO, 2001; CRIST et al., 1984; IACOBELLIS & DEVAY, 1986; PERIN & REIS, 1999), glicerol (ROMEIRO, 2001; SILVA & OLIVEIRA, 1994; CAMPOS et al., 2004), congelamento (MARIANO & ASSIS, 2005; DYE, 1982; SUSLOW & SCHROTTTH, 1981), nitrogênio líquido (MARIANO & ASSIS, 2005; SAFRONOVA & NOVIKOVA, 1996), polímeros sintéticos (DENARDIN, 2000; FERNANDES JÚNIOR, 2006; TUMELERO & DENARDIN, 2008; SUSLOW & SCHROTTTH, 1981) e liofilização (MARIANO & ASSIS, 2005; SAFRONOVA & NOVIKOVA, 1996; PEREIRA et al., 2002). Teoricamente, seria necessário desenvolver um método específico para cada organismo, devido às suas peculiaridades intrínsecas (ROMEIRO, 2001; MARIANO & ASSIS, 2005; SILVA & OLIVEIRA, 1994).

Características adicionais de um bom método de preservação seriam sua simplicidade, não requerer equipamento sofisticado, baixo custo e rapidez de execução (ROMEIRO, 2001).

PERIN & REIS (1999) em estudo sobre água como veículo de preservação, verificaram a eficácia desse método em *Acetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum* e *Azospirillum* de 1995 a 1999 em ambiente seco e escuro. CRIST et al., (1984), examinando as espécies de *Rhizobium*, constataram que estas são capazes de sobreviver por longos períodos em suspensão de água purificada e temperatura ambiente.

Na preservação de bactérias, leveduras e actinomicetos, NAGAI et. al, (2005), utilizaram a técnica de secagem e congelamento das estirpes e puderam observar que este método de preservação foi suficiente para conservar estes microrganismos por um período de um ano.

A preservação de bactérias em nitrogênio líquido e/ou liofilizadas são os métodos que mais se destacam para a maioria das linhagens microbianas, por

garantir a identidade original da célula, por longos períodos. Porém, nem todos os laboratórios dispõem dos equipamentos necessários para a aplicação de tais métodos (TUMELERO & DENARDIN, 2008).

Assim, várias substâncias vêm sendo testadas como acondicionadores de microrganismos. As misturas poliméricas estão sendo usadas para inúmeras aplicações, como por exemplo na agricultura, como veículo de inoculação de rizóbio em leguminosas (FERNANDES JÚNIOR, 2006; JAWSON et al., 1989). Acondicionadores assumem grande importância para preservação de bactérias, sendo desejável que assegurem a viabilidade das células bacterianas, sejam de fácil manipulação, atuem como agente protetor e não possuam toxicidade à bactéria(TUMELERO & DENARDIN, 2008).

O carboximetilcelulose (CMC) é derivado da celulose da madeira e do algodão, constitui um polímero aniônico solúvel em água obtido através da introdução de grupos de carboxi metil juntamente com a cadeia de celulose. Inodoro, atóxico e biodegradável, o CMC de grau purificado apresenta-se como uma pó de coloração de branco a creme, higroscópico, inodoro e insípido. É fisiologicamente inerte, não tóxico e não sensibilizante, tendo muitas aplicações nas indústrias alimentícias e farmacêuticas devido às suas importantes propriedades de viscosidade (SCHUH, 2005).

O glicerol é um condicionador bastante utilizado para a conservação das culturas. Segundo CAMPOS et al., (2004), o glicerol age como um crioprotetor muito utilizado nos processos de congelamento, pois impede a difusão da água no interior das células e reduz a formação de cristais de gelo, além de estabilizar alguns componentes da membrana celular, impedindo alterações celulares. Outra característica do glicerol é seu papel como osmorregulador, importante mecanismo que ocorre nas células como reação a fatores ambientais, como por exemplo, o aumento da pressão osmótica, o NaCl também atua como agente regulador da atividade osmótica das células, dessa forma também pode ser utilizado como um

condicionador líquido (RODRIGUES et al., 1992).

TUMELERO & DENARDIN, (2008) avaliando eficiência de acondicionadores à base de polímeros, sendo um deles goma xantana (GX), um biopolímero extraído da bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, e outro polivinilpirrolidona (PVP), um polímero sintético (os tratamentos foram: temperatura ambiente (GX-A; GX+PVP-A), refrigerador (GX-G; GX+PVP-G) e freezer (GX-F; GX+PVP-F) para as bactérias *Ralstonia solanacearum* e *Pectobacterium atrosepticum*, verificaram decréscimo na concentração de células viáveis em ambas as formulações e condições de armazenamento.

DENARDIN (2000) que avaliou os mesmos polímeros para acondicionar células de *Bradyrhizobium elkani*, constatou que a concentração de células viáveis, diminuíram ao longo de oito meses de armazenamento de 10^{10} ufc mL⁻¹ no início, enquanto aos oito meses de armazenamento, em temperatura ambiente, permaneceu na faixa de 10^9 ufc mL⁻¹.

Já SUSLOW & SCHROTH (1981) relatam o desenvolvimento de métodos usando freezer e membrana-seca com metilcelulose para a preservação de culturas bacterianas como *Pseudomonas*, *Xantomonas*, *Erwinia*, *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Serratia*, *Klebsiella* e *Escherichia*. Os resultados mostraram que esses métodos são efetivos para a preservação das estirpes testadas por 38 meses.

A utilização de diferentes composições para a conservação de estirpes de rizóbio, pode representar o desenvolvimento de produtos de baixo custo, práticos e, além disso, permitem o armazenamento em temperatura ambiente. Desta forma, a pesquisa para obtenção de novas formulações que possam atuar como conservantes, com eficiência, torna-se de extrema importância.

3. Material e Métodos

3.1. Seleção e preparação dos condicionadores líquidos

Na elaboração dos condicionadores, prepararam-se formulações à base de NaCl a 0,1 % em água destilada, Glicerol a 20 % em água destilada e Carboximetilcelulose (CMC) a 0,2 % em água destilada. Foram preparados 1 L de cada preservante e transferidos para frascos seguido por esterilização em autoclave por 20 minutos a 121° C e 1,0 atm.

3.2. Estirpes Bacterianas

As estirpes foram fornecidas pelo Laboratório de Fixação Biológica de Nitrogênio – MIRCEN da FEPAGRO-RS, conforme recomendação oficial para uso na produção de inoculantes (DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO, 2006), sendo utilizadas duas estirpes de *Rhizobium tropici* (SEMIA 4077 – SEMIA 4080), e duas de *Bradyrhizobium japonicum* (SEMIA 5079 – SEMIA 5080), respectivamente para feijão (*Phaseolus vulgaris*) e soja (*Glycine max*). Na tabela 1 estão às identificações para as estirpes utilizadas nos experimentos.

Tabela 1. Identificação das estirpes de rizóbio utilizadas no experimento.

Identificação	Designação	Designação	Designação	Espécie leguminosa
	Original	SEMIA*	BR**	
<i>Rhizobium tropici</i>	CIAT 899	4077	322	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>Rhizobium tropici</i>	PRF81	4080	520	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	CPAC15	5079	85	<i>Glycine max</i>
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	CPAC7	5080	86	<i>Glycine max</i>

*Acrônimo para a coleção de culturas do MIRCEN/FEPAGRO/UFRGS; ** Acrônimo para a coleção de culturas da EMBRAPA-Agrobiologia.

MOREIRA & SIQUEIRA, 2006.

Estirpes foram cultivadas em meio de cultura líquido YM (manitol extrato de levedura) (VINCENT, 1970) por 72 ou 168 horas, para SEMIA 4077 e SEMIA 4080 e

SEMIA 5079 e SEMIA 5080, respectivamente, para realização da coloração de Gram e testes morfológicos .

3.3. Condições de crescimento e estoque

As estirpes foram inoculadas em meio YM líquido com pH 6,8, colocadas para crescer sob agitação orbital, a 120 rpm por três dias para as estirpes SEMIA 4077 – SEMIA 4080 e sete dias para SEMIA 5079 – SEMIA 5080 . Após o período de crescimento 0,5 mL da suspensão de cada estirpe foi transferido para tubos com capacidade para 2 mL, contendo 1,5 mL de cada preservante (NaCl 0,1 % , glicerol 20 % e carboximetilcelulose 0,2 %) e agitados manualmente para incorporação das células aos conservantes. Após a realização das diferentes formulações para a conservação das estirpes, fez-se a contagem das UFC (VINCENT, 1970), considerando-se como a primeira contagem o tempo zero. Os inoculantes, formados pelas misturas de preservantes e células rizobianas foram incubados à temperatura ambiente, por até 180 dias. Cada formulação (conservante + estirpe) foi mantida separadamente, sendo considerado um experimento independente. Durante o tempo de incubação foram realizadas contagens utilizando diluições seriadas de 10^{-5} a 10^{-10} em placas de petri contendo o meio da cultura YM (VINCENT, 1970).

3.4. Sobrevivência de células rizobianas em diferentes condicionadores

Após 0, 1, 7, 15, 21, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias foram retirados três tubos independentes de cada combinação conservante x estirpe para avaliar a sobrevivência das estirpes. Esses tubos eram retirados dos racks e colocados em câmara de fluxo laminar, para realização das diluições seriadas. Eram pipetados 1,0 mL do inóculo e adicionado em tubo de ensaio contendo 9 mL de solução fisiológica autoclavada para obtenção da diluição 10^{-1} , em seguida a solução era colocada para homogeneizar em agitador do tipo vórtex, seguido por diluições seqüenciais até a diluição 10^{-10} .

As contagens foram feitas pelo método da gota (MILES E MISRA, 1938), sendo retiradas alíquotas de 20 µL das diluições 10^{-5} a 10^{-10} , que foram colocadas em placas de Petri contendo o meio YM e divididas previamente em seis setores utilizando-se três setores da placa por diluição. Esse procedimento foi realizado em número de três repetições. Após a inoculação e secagem da alíquota à temperatura ambiente, as placas foram colocadas invertidas e incubadas a $\pm 28^{\circ}$ C, quando, então, foi efetuada a contagem das UFC da diluição que apresentou de 6 a 50 colônias por gota de 20 µL. Dessas diluições, foram retiradas as médias das contagens das três repetições e, os dados foram transformados em logaritmo de base 10 para serem construídas as curvas de crescimento.

A cada determinação da população, características morfológicas das estirpes, e acompanhamento da presença de contaminantes também foram realizadas.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e análise de regressões para cada estirpe, tendo população como dependente e tempo como variável independente, utilizando o programa estatístico SAS.

3.5. Caracterização morfológica dos isolados

A caracterização das estirpes de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* foi realizada em meio YM, com azul de bromotimol em pH de 6,8. A caracterização foi feita a partir do aparecimento de colônias isoladas nos diferentes tratamentos. Para as estirpes de *Rhizobium* (SEMIA 4077 – SEMIA 4080) as avaliações eram realizadas três dias após o plaqueamento, já as estirpes de *Bradyrhizobium* (SEMIA 5079 – SEMIA 5080) eram avaliadas sete dias depois de plaqueadas.

As características culturais observadas foram: tempo de crescimento, tamanho da colônia, forma da colônia, elevação da colônia, transparência da colônia, cor da colônia, presença de muco, quantidade de muco, aparência do muco, elasticidade e tipo de muco sendo também realizado o teste de coloração de gram.

3.6. Experimento em condições de casa de vegetação

Para avaliar a eficiência simbiótica das estirpes nos diferentes tratamentos, foram realizados dois experimentos em condições de casa de vegetação nos períodos de 15, 60 e 120 dias após a conservação.

O primeiro experimento seguiu um arranjo fatorial 2 X 4 sendo duas estirpes (SEMIA 4077 – SEMIA 4080) e quatro preservantes (NaCl 0,1 % , glicerol 20 % , carboximetilcelulose 0,2 % e bactérias frescas) inoculadas em feijão cv. Carioca e obedeceu ao delineamento inteiramente casualizado, com 4 repetições.

Para o segundo experimento o procedimento foi o mesmo, mudando somente as estirpes (SEMIA 5079 – SEMIA 5080) e a espécie vegetal a ser inoculada que foia soja cv. Sambaíba.

Nos experimentos foram utilizados vasos de Leonard, tendo como substrato areia autoclavada por 1 hora, a 120° C e 1,0 atmosfera e os vasos receberam solução nutritiva de Norris (VINCENT, 1970) isenta de nitrogênio.

As sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris*) cv. Carioca e de soja (*Glycine max*) cv. Sambaíba foram desinfestadas por imersão em álcool 96 %, durante 1 minuto, e em solução de hipoclorito de sódio comercial (3%) durante 1 minuto, sendo em seguida lavadas dez vezes em água destilada esterilizada. Inicialmente, foi realizada uma pré-germinação e após 4 dias procedeu-se ao transplante, colocando-se quatro plântulas por vaso. Sete dias após o transplante, foi efetuado o desbaste, deixando-se duas plantas por vaso.

Nos períodos definidos, após a diluição seriada e o plaqueamento os tubos que continham a diluição 10^{-6} de cada tratamento, eram reservados, levados para casa de vegetação, para posterior inoculação nas plântulas. A suspensão de cada tubo foi inoculada para dois vasos de Leonard.

As bactérias frescas eram obtidas próximo ao período de avaliação. Para esse procedimento foi retirada dos tubos de ensaio, uma amostra da estirpe pura conservada de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* em meio de cultura sólido YM. Com a

ajuda de uma alça de platina, essa amostra foi colocada em meio líquido YM (VINCENT, 1970) com pH ajustado para 6,8 por um período de 96 horas, a $\pm 28^{\circ}$ C, sob agitação de 120 rpm. No dia da avaliação as diluições seriadas para as bactérias frescas era procedida da seguinte maneira: 1 mL do caldo bacteriano era retirado e adicionado em tubo de ensaio contendo 9 mL de solução fisiológica autoclavada para realização das diluições seriadas de 10^{-1} a 10^{-10} , logo em seguida era retirada a diluição 10^{-6} com aproximadamente 10^8 células mL da cultura de rizóbio para a inoculação nas plantas.

A colheita foi realizada 25 dias após o plantio para feijão cv. Carioca e 30 dias para soja cv. Sambaíba, os parâmetros avaliados foram: matéria seca da parte aérea, matéria seca radicular, matéria seca e número dos nódulos. A parte aérea foi submetida à secagem em estufa também a 60° C até massa constante, sendo em seguida, seca, pesada e moída para a determinação química do teor de nitrogênio total, Kjeldahl (SILVA, 1999). As raízes também foram colocadas em estufa a 60° C até massa constante, para posterior pesagem. Os nódulos foram separados das raízes, armazenados em sacos de papel, colocados em estufa a 60° C até massa constante e depois contados.

Os resultados obtidos com a nodulação, produção de matéria seca e N-total acumulado na parte aérea foram analisados no programa estatístico SAS.

Os experimentos com planta foram submetidos à análise de variância, adotando o arranjo fatorial 2 x 4 de estirpes x preservantes, sendo duas estirpes (SEMIA 4077, SEMIA 4080 e quatro preservantes (NaCl, Glicerol, carboximetilcelulose e bactérias frescas). O mesmo esquema foi feito para as estirpes SEMIA 5079 – SEMIA 5080 e os dados foram analisados independentemente.

4. Resultados e Discussão

4.1. Sobrevivência de células rizobianas em diferentes condicionadores

Os valores de contagens das unidades formadoras de colônias em placas, que originaram as curvas de sobrevivência das estirpes ao longo do tempo, nos diferentes condicionadores líquidos, NaCl 0,1%, Glicerol 20% e carboximetilcelulose 0,2% (Figuras 1, 2 e 3) , revelaram um perfil bastante heterogêneo, com relação a manutenção de células viáveis, indicando que o efeito do preservante dependeu da estirpe utilizada.

Verificou-se que no NaCl 0,1% (Figura 1) as estirpes SEMIA 4077, 5080 e 5079 mantiveram a concentração de células viáveis entre 10^7 e 10^8 UFC mL⁻¹. A estirpe SEMIA 4080 apresentou uma concentração inicial de 10^7 decresceu para 10^4 UFC mL⁻¹ e aos 90 e 120 dias de preservação não apresentou crescimento, voltando a mostrar células viáveis em torno de 10^7 UFC mL⁻¹ nos dois últimos períodos de avaliações.

BOIARDI et al., (1988), avaliando a sobrevivência de *Rhizobium meliloti*, hoje *Sinorhizobium meliloti*, (B 323) mantida em água deionizada e diferentes tampões, observaram que houve um declínio constante no número de células durante o estoque em água deionizada e tampão de fosfato em pH 5,5, chegando a zero ao dez meses de conservação.

A concentração inicial de células da estirpe SEMIA 4077 foi de 10^8 UFC mL⁻¹. Após 180 dias de conservação em NaCl 0,1% decresceu para 10^7 UFC mL⁻¹. Os resultados mostrados pela estirpe SEMIA 4080 são diferentes dos apresentados pela SEMIA 4077, ambas pertencentes ao grupo de *Rhizobium tropici* e recomendadas para fabricação de inoculantes comerciais. A estirpe SEMIA 4077 é a estirpe padrão, classificada como *Rhizobium tropici* tipo IIB. Já a SEMIA 4080, também classificada como *R. tropici* apresenta propriedades mistas entre o tipo IIA e IIB (CHUEIRE et

al., 1998).

As duas estirpes de crescimento lento, *Bradyrhizobium japonicum* (SEMIA 5079 – SEMIA 5080) mostraram população inicial de aproximadamente 10^7 UFC mL⁻¹, seguido da manutenção da população das células após 180 dias de preservação em NaCl 0,1%. CRIST et al., (1984), avaliaram a preservação de *Rhizobium* em suspensão de água e observou que cada uma das estirpes de crescimento lento avaliadas foi capaz de sobreviver por um ano preservada em água purificada à temperatura ambiente. De acordo com os mesmos autores o número de células viáveis dessas estirpes mantidas em água aumentou substancialmente durante o período de armazenamento, o que não ocorreu no nosso caso.

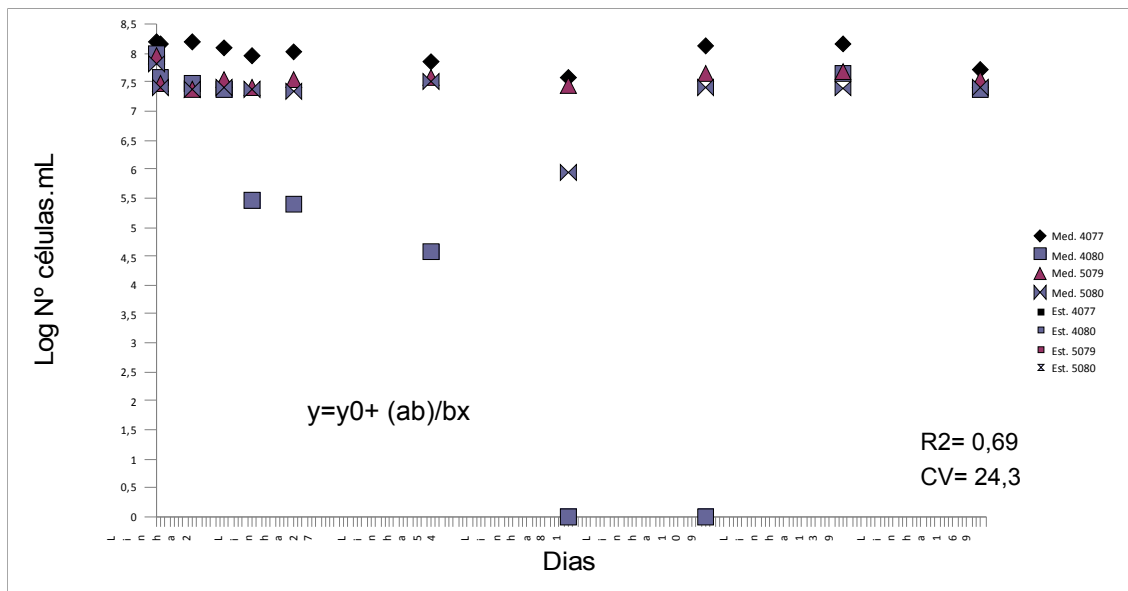


Figura 1. Sobrevivência das estirpes de *Rhizobium tropici* (SEMIA 4077 - SEMIA 4080) e *Bradyrhizobium japonicum* (SEMIA 5079 - SEMIA 5080) conservadas em NaCl 0,1% em temperatura ambiente.

O glicerol 20 % teve efeito positivo com a estirpe SEMIA 4077, ao longo dos 180 dias, a concentração inicial de células foi de 10^8 UFC mL⁻¹, mantendo-se à aproximadamente 10^7 UFC mL⁻¹. As demais estirpes apresentaram decréscimo na concentração de células viáveis. A partir de 21 dias após a conservação a estirpe SEMIA 4080 perdeu a viabilidade celular (Figura 2), mais cedo do que comparado

com a queda das células no NaCl 0,1% (Figura 1).

PEREIRA et al., (2002), verificaram que a trealose proporcionou uma proteção superior à combinação de sacarose e peptona aos 12 dias de conservação após liofilização de estirpes de *Rhizobium tropici* e *Rhizobium etli*. E a estirpe CFN 42 foi mais sensível em relação ao tipo de agente usado do que a estirpe CIAT 899 = (SEMIA 4077), provavelmente porque a estirpe CIAT 899 produz β (1-2) glucano, que parece ter também um efeito protetor. β (1-2) glucano combinado com sacarose protege mais os lipossomas liofilizados de perdas do que a trealose. Entretanto, β (1-2) glucano, isoladamente, não têm capacidade de proteção. A diferença entre CIAT 899 e CFN 42 na sensibilidade para o conservante utilizado, poderá parcialmente ser explicada por evidências que indicam que *Rhizobium tropici* é relativamente resistente a estresse ambiental, altas temperaturas e acidez.

Para a estirpe SEMIA 5079 a sobrevivência das células foi observada até os 60 dias de preservação, ficando em torno de 10^3 UFC mL⁻¹. Por outro lado a estirpe SEMIA 5080 aos 30 dias perdeu sua viabilidade celular.

SOSA et al., (2004) usando o método de conservação de rizóbio em sílica gel a 4° C, observaram que as estirpes utilizadas mantiveram suas características micromorfológicas e simbióticas por o período de um ano de conservação.

Os resultados do efeito do Glicerol como conservante de estirpes bacterianas não foram satisfatórios, a única estirpe que se manteve até os 180 dias de preservação foi a SEMIA 4077. As demais estirpes SEMIA 4080, SEMIA 5079 e SEMIA 5080, perderam a viabilidade celular. Isso mostra que para estas estirpes esse método de conservação não é indicado.

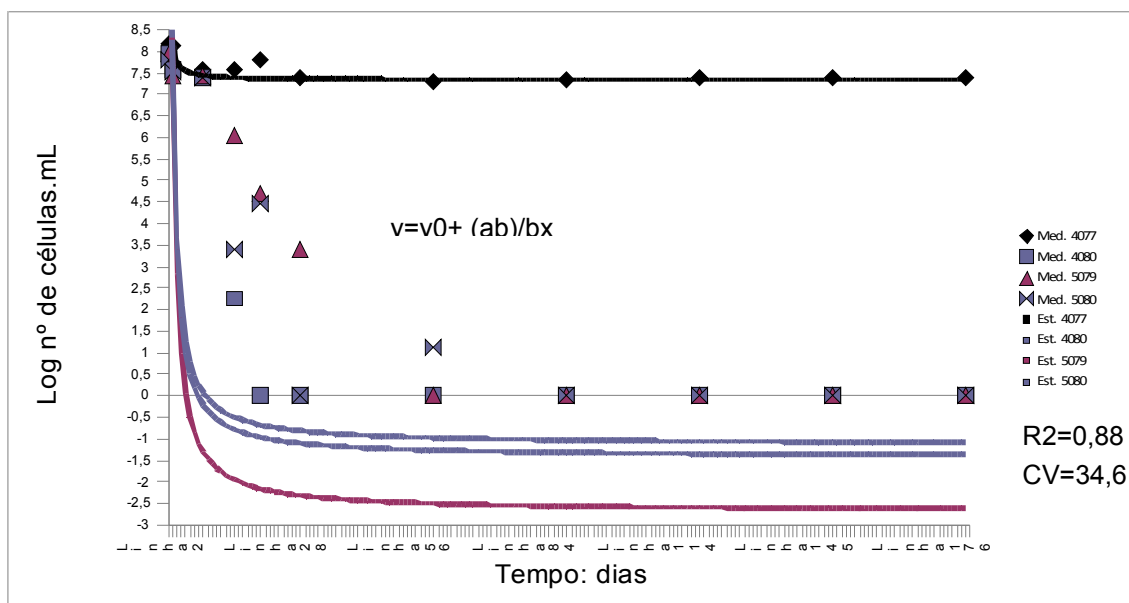


Figura 2. Sobrevivência das estirpes de *Rhizobium tropici* (SEMIA 4077 - SEMIA 4080 -) e *Bradyrhizobium japonicum* (SEMIA 5079 – SEMIA 5080) conservadas em Glicerol 20% em temperatura ambiente.

Os resultados mostram que as estirpes SEMIA 4077 e 5079 apresentaram melhor padrão de sobrevivência em CMC 0,2% durante os 180 dias de preservação em temperatura ambiente, o número de células viáveis variou entre 10^7 e 10^8 UFC mL^{-1} (Figura 3).

A capacidade do CMC em sustentar elevada concentração de células quando armazenadas em temperatura ambiente, foi observada por FERNANDES JÚNIOR (2006) que utilizou a estirpe BR 3267 de *Bradyrhizobium japonicum*.

TUMELERO & DENARDIN (2008) avaliando eficiência de acondicionadores desenvolvidas formulações à base de polímeros nos períodos de 0, 1, 2 e 3 anos estocadas em freezer, verificaram que ao fim de três anos, para *Ralstonia solanacearum*, preservada em GX + PVP-Freezer, houve morte celular. O limite de preservação para este tratamento foi de dois anos, com concentração de 10^4 ufc mL^{-1} . Nos demais tratamentos, a concentração de células bacterianas permaneceu em torno de 10^3 ufc mL^{-1} . O comportamento de *Pectobacterium atrosepticum* foi o mesmo verificado para *Ralstonia solanacearum*, sob o mesmo tratamento e condições de armazenamento. Por outro lado SCHUH (2005), avaliando o uso de biopolímeros como suporte para inoculantes (estirpes SEMIA 587 – *Bradyrhizobium*

elkanii e SEMIA 5079 - *Bradyrhizobium japonicum*), afirma que os biopolímeros, contendo goma xantana, goma jataí e goma guar, podem ser utilizados como suportes para a formulação de inoculantes para leguminosas.

A estirpe SEMIA 4080, manteve a faixa de células viáveis em torno de 10^7 ufc mL⁻¹ até os 120 dias de preservação, mas após 150 dias de conservação não foi detectada viabilidade das células. FERNANDES JÚNIOR (2006) utilizou composições poliméricas (carboximetilcelulose+amido) compatibilizadas com ZnO e MgO, como veículo de inoculante rizobiano (BR 3267) durante 30 dias de armazenamento, verificando que a concentração bacteriana presente no inóculo compatibilizado com ZnO foi de $1,5 \times 10^9$ UFC/mL de inóculo, o que resultou numa concentração de $4,5 \times 10^8$ UFC/ mL de inoculante incubado. Quando foi utilizado o MgO a concentração de células presentes na suspensão bacteriana foi de $1,4 \times 10^9$ UFC/mL. Após a inoculação, a concentração foi de $4,2 \times 10^8$ UFC/ mL de inoculante.

A estirpe SEMIA 5080 teve um fase inicial de 10^7 ufc mL⁻¹, essa concentração decresceu a 10^3 ufc mL⁻¹ e aos 120 dias ocorreu a perda de viabilidade celular. Neste preservante, apesar de ter ocorrido perda celular para as estirpes SEMIA 4080 e 5080, as demais estirpes se mantiveram por até 6 meses de conservação em temperatura ambiente.

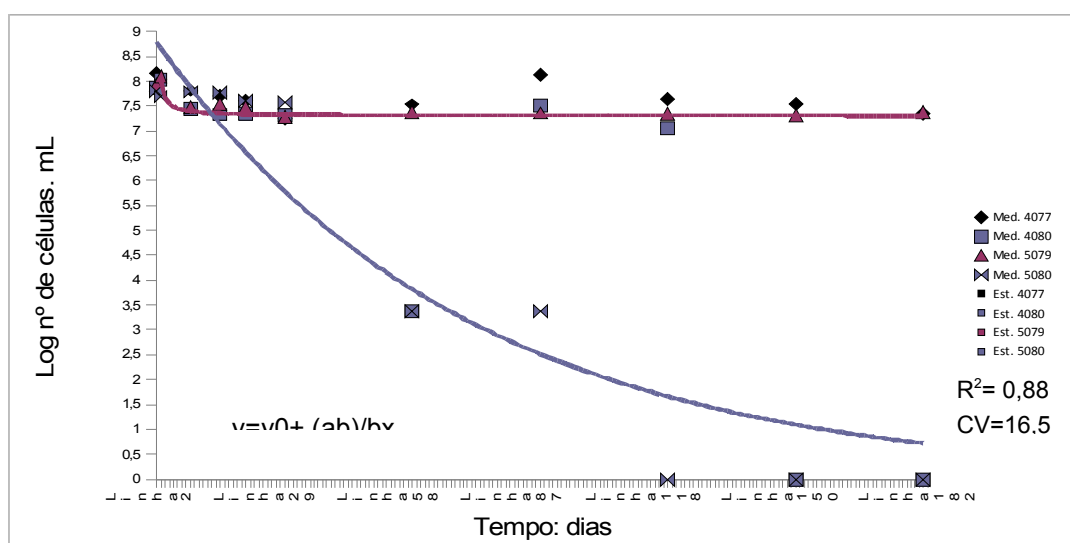


Figura 3. Sobrevivência das estirpes de *Rhizobium tropici* (SEMIA 4077 - SEMIA 4080 -) e *Bradyrhizobium japonicum* (SEMIA 5079 – SEMIA 5080) conservadas em carboximetilcelulose 0,2% em temperatura ambiente.

4.2. Caracterização morfológica dos isolados

Não houve variação quanto à morfologia das colônias durante os períodos de avaliações para todos os condicionadores líquidos. As colônias das estirpes SEMIA (4077 e 4080) em todos os tratamentos apresentavam tempo de crescimento rápido, tamanho > 1 mm, forma circular, com elevação, eram semitranslúcidas e tinham cor branca.

Algumas colônias apresentaram durante as avaliações um tom amarelado no centro da colônia, isso pode ter ocorrido devido à absorção do indicador de pH (azul de bromotimol) presente no meio de cultura YM. Estas estirpes produziam muito muco, com elasticidade, aparência homogênea e viscosa. Estes resultados são confirmados por MOREIRA & SIQUEIRA (2006), que relatam as mesmas características para as estirpes estudadas.

Da mesma forma as estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* (SEMIA 5079 e SEMIA 5080) em todos os tratamentos não apresentaram mudanças em relação à morfologia. Para a formação das colônias foram necessários de 7 a 8 dias, tempo de crescimento lento. As colônias eram circulares, não excediam 1 mm quando isoladas, apresentavam elevação, tom branco e sem transparência. Estas estirpes produziam pouco muco, de aparência heterogênea, com pouca elasticidade e eram do tipo butírico.

Observações feitas por HUNGRIA et al., (2007) em isolados dos sorogrupos CPAC 15 (= SEMIA 5079) e CPAC 7 (= SEMIA 5080), mostram variabilidade elevada em propriedades morfológicas, sorológicas, fisiológicas, genéticas e simbióticas. A plasticidade genômica elevada da CPAC 7 também tem resultado em alterações nas propriedades morfológicas e fisiológicas *in vitro*, inclusive causando dúvidas sobre a presença de contaminantes nos inoculantes.

As duas estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* (SEMIA 5079 e SEMIA 5080) apresentavam crescimento lento, e foi verificada presença de contaminantes nas placas a partir dos 2 meses de conservação, verificado até os 3 meses nos preser-

vantes Glicerol 20% e CMC 0,2% e dos 4 meses até o final do experimento não foram observadas contaminações, já as estirpes SEMIA 4077 e SEMIA 4080 não apresentaram contaminantes durante o experimento .

4.3. Experimento em condições de casa de vegetação

4.3.1. Experimento com feijão, cultivar Carioca (*Phaseolus vulgaris*)

Os resultados da análise da variância dos tratamentos estudados nos experimentos a partir da conservação de estirpes de rizóbio (SEMIA 4077 e SEMIA 4080) por diferentes condicionadores líquidos para a cultivar Carioca e seus níveis de significância são apresentados. Houve efeito significativo pelo teste de F ao nível de 5% de probabilidade entre os tratamentos para massa seca de nódulos, número de nódulos, matéria seca de raiz e parte aérea, N-total e teor de N em todos os períodos de avaliações, exceto para matéria seca de raiz aos 60 dias após a conservação.

Observando os tratamentos , verificamos que as análises dos resultados de número de nódulos e teor de N indicam efeito da interação estirpe x preservante aos 15 dias após a conservação, e enquanto não houve diferença significativa entre condicionadores para SEMIA 4077, para SEMIA 4080 foram encontrados mais nódulos no NaCl 0,1% (245 nódulos) e o menor valor foi para o Glicerol (24 nódulos) (Figura 4). Com relação ao teor de N (Figura 5) a estirpe SEMIA 4077 obteve a maior percentagem na cultura fresca, diferindo somente do glicerol 20%. O menor teor de N para a estirpe SEMIA 4080 foi encontrado no glicerol 20%, seguindo do carboximetilcelulose 0,2%, nos outros tratamentos os valores foram maiores, mas não apresentaram diferenças entre si. Para as demais variáveis, (massa seca de nódulos, matéria seca de raiz e parte aérea, e nitrogênio total) a interação não foi significativa.

Já aos 60 dias, as análises de massa seca de nódulos, número de nódulos, matéria seca de parte aérea, N-total e teor de N, revelaram que a estirpe SEMIA 4077 diferiu significativamente da estirpe SEMIA 4080, não sendo encontrada diferença somente para matéria seca de raiz (Tabela 2).

A tabela 3 mostra que a massa seca e número de nódulos, matéria seca de raiz e parte aérea e N-total não apresentaram diferenças entre os condicionadores.

Já aos 120 dias após a conservação das estirpes de rizóbio, verifica-se

significância para o efeito da interação estirpe x preservante para massa seca (Figura 6) e número de nódulos (Figura 7), e matéria seca de parte aérea (Figura 8).

Em geral nesse período de avaliação o comportamento das duas estirpes é observado de forma distinta, à medida que o número de nódulos aumenta, há também um aumento na produção de matéria seca da parte aérea.

Tabela 2: Efeito da conservação de duas estirpes de *Rhizobium tropici* (SEMIA 4077 e SEMIA 4080) na capacidade de nodulação, produção de matéria seca de raiz e parte aérea, N-total e teor de N. em plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris*) após conservação das estirpes. Os espaços vazios na tabela, indicam a presença de interações.

15 DIAS						
Estirpe	MSN mg vaso ⁻¹		MSR mg vaso ⁻¹	MSPA mg vaso ⁻¹	N-TOTAL g vaso ⁻¹	
SEMIA 4077	144,78 a		267,9 a	631,48 a	41,46 a	
SEMIA 4080	103,57 b		305,01 a	408,9 b	23,46 b	
Pr > t	0.0361		0.2322	0.0024	<.0001	
60 DIAS						
Estirpe	MSN mg vaso ⁻¹	NN	MSR mg vaso ⁻¹	MSPA mg vaso ⁻¹	N-TOTAL g vaso ⁻¹	TEOR DE N %
SEMIA 4077	410.89 a	293 a	601.00 a	1183.00 a	47.52 a	0.48 a
SEMIA 4080	184.69 b	146 b	573.31 a	547.13 b	38.42 b	0.38 b
Pr > t	0.0003	0.0008	0,9707	<.0001	<.0001	0.0002
120 DIAS						
Estirpe			MSR mg vaso ⁻¹		N-TOTAL g vaso ⁻¹	TEOR DE N %
SEMIA 4077			521.56 a		25.17 a	0.25 a
SEMIA 4080			616.63 a		18 b	0.18 b
Pr > t			0.1568		0.0006	0.0019

MSN(massa seca de nódulos),NN(número de nódulos),MSR(matéria seca de raiz,MSPA(matéria seca de parte aérea). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Tabela 3: Efeito dos diferentes condicionadores líquidos na capacidade de nodulação, produção de matéria seca de raiz e parte aérea, N-total e teor de N em plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris*) após conservação das estirpes. Os espaços vazios na tabela, indicam a presença de interações.

15 DIAS						
Condicionadores	MSN -1 mg vaso		MSR mg vaso ⁻¹	MSPA mg vaso ⁻¹	N-TOTAL g vaso ⁻¹	
NaCl 0,1%	174,63 a		291 b	590,13 a	38,69 a	
Glicerol 20%	100,63 b		365,75 a	559,63 a	24,36 b	
CMC 0,2%	117,50 b		252,50 b	577,50 a	29,68 a	
Bactérias frescas	103,88 b		236,63 b	353,38 b	37,17 a	
60 DIAS						
Condicionadores	MSN mg vaso ⁻¹	NN	MSR mg vaso ⁻¹	MSPA mg vaso ⁻¹	N-TOTAL g vaso ⁻¹	TEOR DE N %
NaCl 0,1%	287.00 a	270 a	450.38 a	889.9 a	43.77 a	0.44 b
Glicerol 20%	262.88 a	214 a	692.75 a	791.63 a	41 a	0.41 b
CMC 0,2%	338.88 a	214 a	581.38 a	866.75 a	49.37 a	0.49 a
Bactérias frescas	301.00 a	180 a	624.13 a	912 a	37.84 a	0.38 b
120 DIAS						
Condicionadores			MSR mg vaso ⁻¹		N-TOTAL g vaso ⁻¹	TEOR DE N
NaCl 0,1%			607.38 a		27.35 a	0.27 a
Glicerol 20%			571.13 ab		17.47 b	0.17 b
CMC 0,2%			670.88 a		23.10 a	0.23 ab
Bactérias frescas			427.00 b		18.45 b	0.18 b

MSN(massa seca de nódulos),NN(número de nódulos),MSR(matéria seca de raiz,MSPA(matéria seca de parte aérea).Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

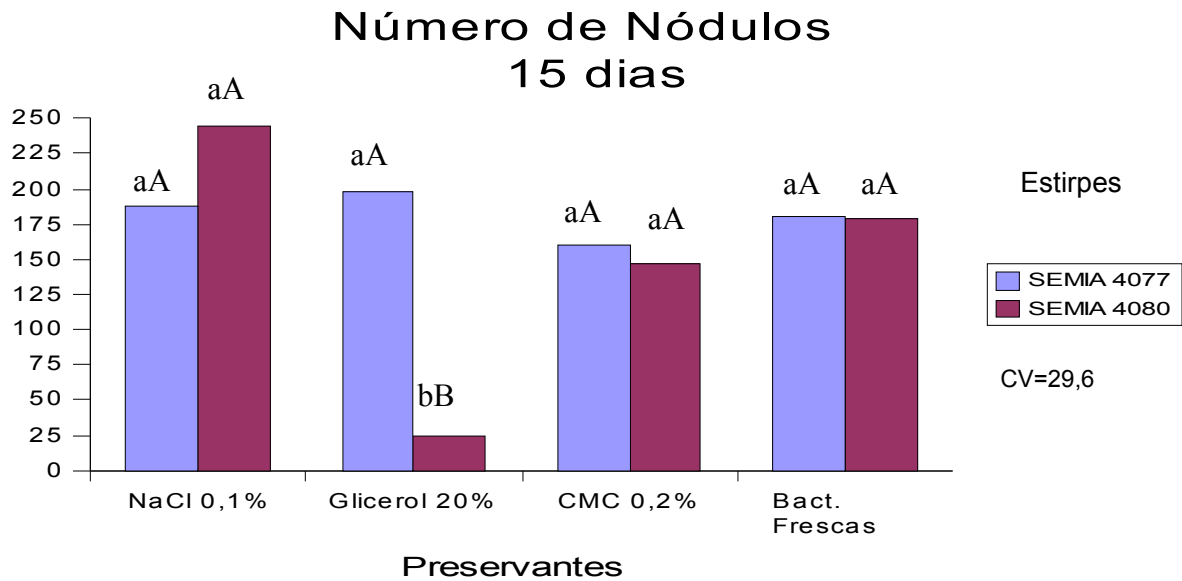


Figura 4. Números de nódulos em plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris*), obtidos a partir da conservação de estirpes de rizóbio por diferentes condicionadores líquidos aos 15 dias de conservação. Letra minúscula compara estirpes e letra maiúscula compara entre preservantes.

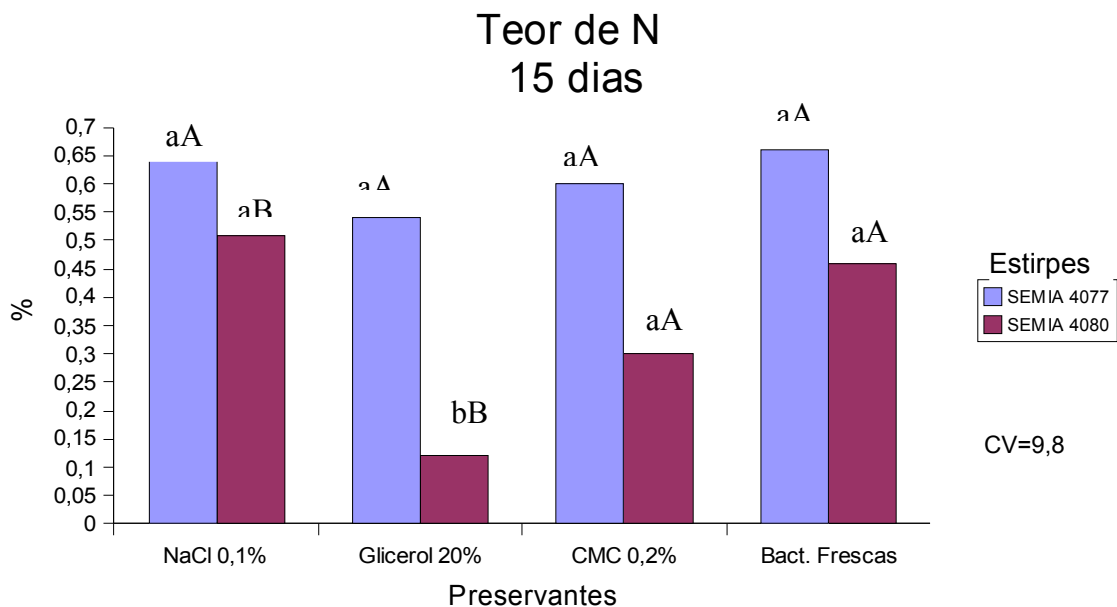


Figura 5. Teor de N da parte aérea de plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris*), obtidos a partir da conservação de estirpes de rizóbio por diferentes condicionadores líquidos aos 15 dias de conservação. Letra minúscula compara estirpes e letra maiúscula compara entre preservantes.

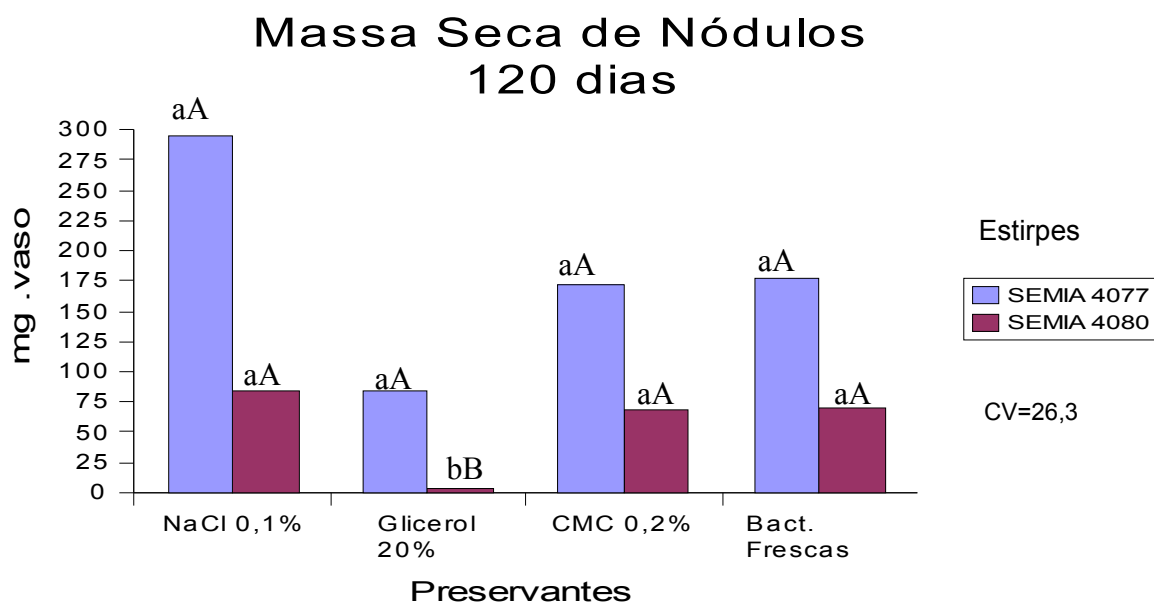


Figura 6. Massa seca de nódulos em plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris*), obtidos a partir da conservação de estirpes de rizóbio por diferentes condicionadores líquidos aos 120 dias de conservação. Letra minúscula compara estirpes e letra maiúscula compara entre preservantes.

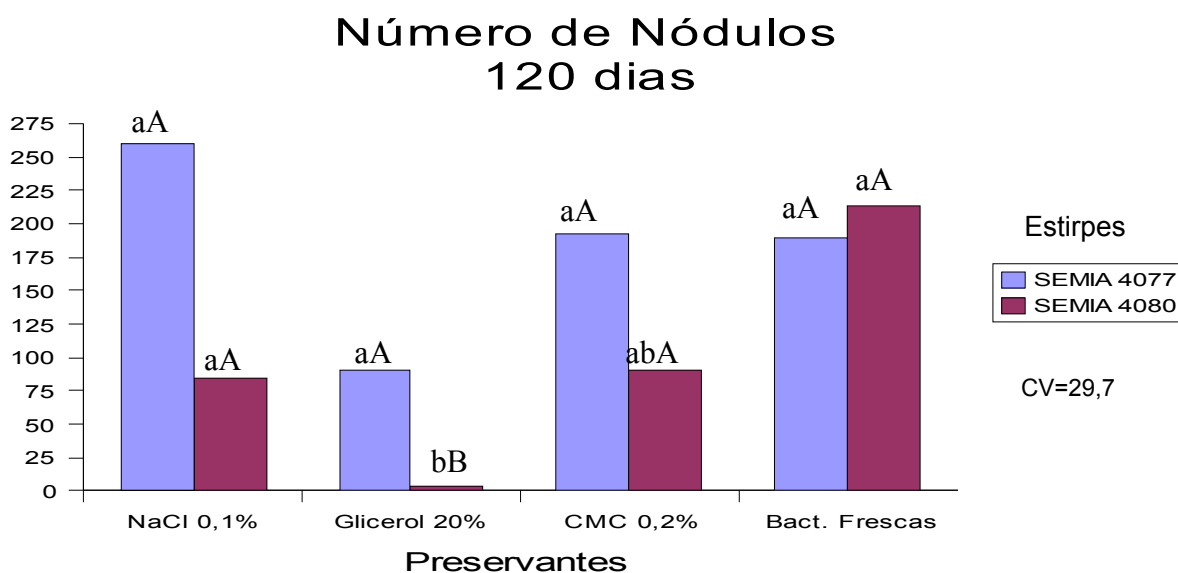


Figura 7. Número de nódulos em plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris*), obtidos a partir da conservação de estirpes de rizóbio por diferentes condicionadores líquidos aos 120 dias de conservação. Letra minúscula compara estirpes e letra maiúscula compara entre preservantes.

Matéria Seca de Parte Aérea 120 dias

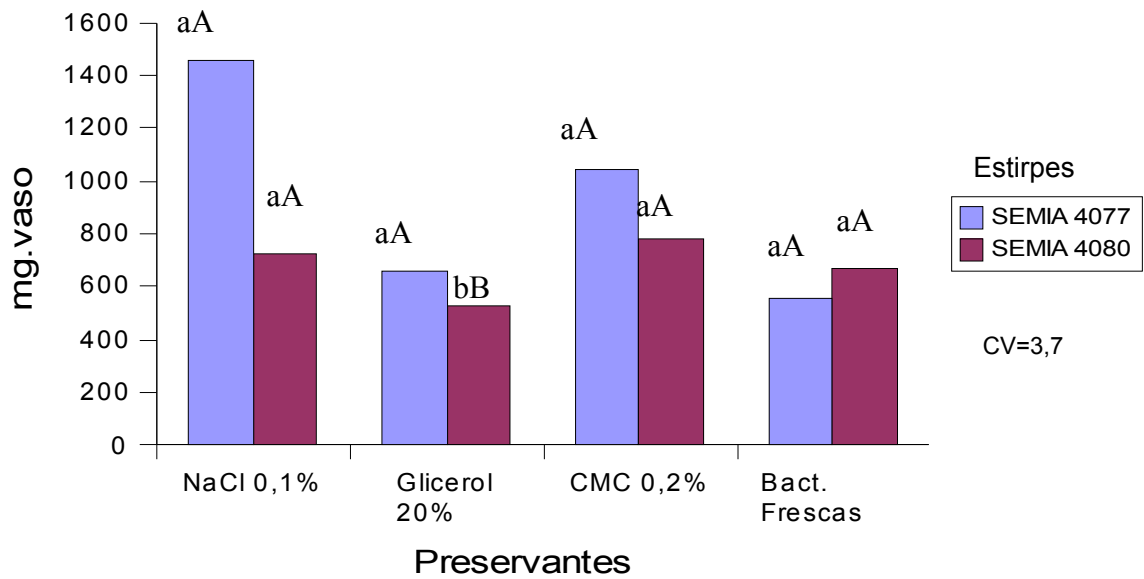


Figura 8. Matéria seca da parte aérea de plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris*), obtida a partir da conservação de estirpes de rizóbio por diferentes condicionadores líquidos aos 120 dias de conservação. Letra minúscula compara estirpes e letra maiúscula compara entre preservantes.

4.3.2. Experimento com soja, cultivar Sambaíba (*Glycine max*)

Os resultados da análise da variância dos tratamentos estudados nos experimentos a partir da conservação de estirpes de rizóbio (SEMIA 5079 e SEMIA 5080) por diferentes condicionadores líquidos para a cultivar Sambaíba e seus níveis de significância são apresentados. Houve efeito significativo ao nível de 5% de probabilidade entre os tratamentos massa seca de nódulos e número de nódulos aos 15, 60 e 120 dias após a conservação. Para matéria seca de raiz somente houve diferença com 60 dias de conservação, já a variável matéria seca de parte aérea obteve significância aos 15 e 60 dias de conservação das estirpes, para N-total em todos os períodos de avaliações houve efeito significativo. O teor de N mostrou diferença nos períodos de 15 e 120 dias das estirpes conservadas.

Para às interações estirpes x preservantes nas determinações de massa seca de nódulos (MSN), número de nódulos (NN), matéria seca de raiz (MSR), matéria seca de parte aérea (MSPA) e N-total, observou-se que não houve interação para qualquer variável em todos os experimentos (Tabela 4).

Aos 15, 60 e 120 de conservação das estirpes não houve diferenças significativas para número de nódulos entre a SEMIA 5079 e SEMIA 5080.

SCHUH (2005), testando biopolímeros como suporte para inoculantes, verificou que os inoculantes formulados a base de biopolímeros, tanto quanto a base de turfa foram capazes de manter as estirpes de *Bradyrhizobium* durante o período de um ano sem perdas significativas na sobrevivência das células e produzir efetiva nodulação, quando inoculadas em sementes de soja em casa de vegetação e em condições normais de cultivo.

Aos 15, 60 e 120 dias após a conservação das estirpes, massa seca e número nódulos apresentaram diferenças significativas quanto aos preservantes (Tabela 5). Com 15 dias de conservação das estirpes todos os preservantes apresentaram nodulação variando de 2 (Bactérias frescas) a 15 nódulos (carboximetilcelulose) por vaso. O número de nódulos obtidos nesse experimento foi

superior aos obtidos por CRIST et al., (1984), que encontraram número de nódulos variando entre 2 e 6, com as estirpes USDA 110, USDA 122. Para massa seca de nódulos também foram verificados diferenças entre os condicionadores, onde o CMC 0,2% obteve o maior valor para essa variável (31 mg vaso⁻¹).

Nos períodos de 60 e 120 dias após a conservação, houve variação no número e massa seca de nódulos, as bactérias frescas promoveram as maiores taxas de massa seca e número nódulos. Verifica-se que aos 60 dias de conservação as bactérias frescas possuem o maior valor para número de nódulos, proporcionando assim altas taxas para o N-total fixado (Tabela 5). Os demais parâmetros (matéria seca de raiz (MSR), matéria seca de parte aérea (MSPA) e N-total) para todos os períodos e avaliações não foram significativos pelo teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade.

Tabela 4: Efeito da conservação de duas estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* (SEMIA 5079 e SEMIA 5080) na capacidade de nodulação, produção de matéria seca de raiz e parte aérea, N-total e teor de N em plantas de soja (*Glycine max*) após conservação as estirpes.

15 DIAS						
Estirpe	MSN mg vaso ⁻¹	NN	MSR mg vaso ⁻¹	MSPA mg vaso ⁻¹	N-TOTAL g vaso ⁻¹	TEOR DE N
SEMIA 5079	13.69 a	6 a	528.69 a	577.88 a	17.78 a	0.20 a
SEMIA 5080	22.44 a	8 a	489.13 a	586.38 a	19.90 a	0.18 b
Pr > F	0.0666	0.1077	0.0870	0.7983	0.0630	0.0016
60 DIAS						
Estirpe	MSN mg vaso ⁻¹	NN	MSR mg vaso ⁻¹	MSPA mg vaso ⁻¹	N-TOTAL g vaso ⁻¹	TEOR DE N %
SEMIA 5079	9 a	4 a	338.88 a	324.06 a	25 a	0.25 a
SEMIA 5080	9 a	5 a	319.31 a	277.69 a	24 a	0.24 a
Pr > t	-	0.9646	0.5594	0.3651	0.3388	0.6141
120 DIAS						
Estirpe	MSN mg vaso ⁻¹	NN	MSR mg vaso ⁻¹	MSPA mg vaso ⁻¹	N-TOTAL g vaso ⁻¹	TEOR DE N
SEMIA 5079	5.0 a	3 a	496.19 a	1187.00 a	16.46 a	0.16 a
SEMIA 5080	4.0 a	3 a	454.56 a	1159.13 a	14.59 a	0.14 a
Pr > t	0.4423	0.5496	0.3866	0.7076	0.9424	0.4729

MSN(massa seca de nódulos),NN(número de nódulos),MSR(matéria seca de raiz,MSPA(matéria seca de parte aérea).Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Tabela 5: Efeito dos diferentes condicionadores líquidos na capacidade de nodulação, produção de matéria seca de raiz e parte aérea, N-total e teor de N em plantas de soja (*Glycine max*) após conservação as estirpes.

15 DIAS						
Condicionadores	MSN mg vaso ⁻¹	NN	MSR mg vaso ⁻¹	MSPA mg vaso ⁻¹	N-TOTAL g vaso ⁻¹	TEOR DE N
NaCl 0,1%	24 ab	7 b	469.50 a	557.00 a	19.13 a	0.19 a
Glicerol 20%	10 bc	5 bc	526.75 a	552.00 a	18.27 a	0.18 a
CMC 0,2%	31 a	15 a	525.86 a	608.50 a	18.48 a	0.18 a
Bactérias frescas	7 c	2 c	513.50 a	611.00 a	19.48 a	0.19 a
60 DIAS						
Condicionadores	MSN mg vaso ⁻¹	NN	MSR mg vaso ⁻¹	MSPA mg vaso ⁻¹	N-TOTAL g vaso ⁻¹	TEOR DE N %
NaCl 0,1%	3.0 b	2 bc	277.63 a	262.38 a	23 a	0.23 b
Glicerol 20%	-	1 c	335.75 a	332.25 a	22 a	0.22 b
CMC 0,2%	7.0 a	3 b	413.88 a	297.88 a	24 a	0.24 ab
Bactérias frescas	25.6 a	14 a	289.13 a	311.00 a	30 a	0.30 a
120 DIAS						
Condicionadores	MSN mg vaso ⁻¹	NN	MSR mg vaso ⁻¹	MSPA mg vaso ⁻¹	N-TOTAL g vaso ⁻¹	TEOR DE N
NaCl 0,1%	1.87 a	1 b	463.50 a	1164.62 a	17.22 a	0.17 a
Glicerol 20%	-	-	473.25 a	1179.25 a	13.51 a	0.14 a
CMC 0,2%	2.25 a	3 b	492.25 a	1256.50 a	15.59 a	0.16 a
Bactérias frescas	14 a	7 a	422.00 a	1091.88 a	15.78 a	0.16 a

MSN(massa seca de nódulos),NN(número de nódulos),MSR(matéria seca de raiz,MSPA(matéria seca de parte aérea).Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Conclusões

1. Para o condicionador líquido NaCl 0,1%, as estirpes SEMIA 4077, 5080 e 5079 apresentaram bom comportamento até 180 dias de conservação e produziu efetiva nodulação aos 15 e 120 dias para as estirpes SEMIA 4077 e SEMIA 4080, quando inoculados em sementes de feijão.
2. O condicionador Glicerol 20%, foi viável apenas para a estirpe SEMIA 4077, mas não é recomendado para SEMIA 4080, SEMIA 5079 e SEMIA 5080 devido ao alto grau de queda na viabilidade das células.
3. As características morfológicas não foram alteradas durante a conservação das estirpes.
4. O preservante, o carboximetilcelulose foi promissor para a conservação das estirpes SEMIA 4077 e SEMIA 5079 em temperatura ambiente.
5. A nodulação foi influenciada pelo preservante utilizado. Em todos os preservantes houve diminuição no número de nódulos durante o período de conservação.
6. Para um período de conservação de curto prazo podemos utilizar os condicionadores líquidos NaCl 0,1 % e Carboximetilcelulose 0,2 %.

Referências Bibliográficas

ALBAREDA, M.; RODRIGUÉZ-NAVARRO, D. N. ; CAMACHO, M.; TEMPRANO, J. Alternatives to peat as carrier for rhizobia inoculants: solid and liquid formulations. **Soil Biology & Biochemistry**, 40 (2008) 2771-2779.

BALATTI, A. P. **Producción de Inoculantes para Leguminosas: Tecnología de las fermentaciones aplicada a los generos rhizobium y bradyrhizobium**. 1992. Argentina.

BOIARDI, J.L.; MORENI, N.; GALAR, M. L. Survival and infectivity of a *Rhizobium meliloti* strain maintained in water and buffer suspensions. **Journal of Applied Bacteriology**, 65, 189-193, 1988.

CAMPO, J.; HUNGRIA, M. **Anais da XIII Reunião da Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola (RELARE)**. Londrina: Embrapa Soja, 2007. 212 p.- (Documentos/ Embrapa Soja, ISSN 1516-781X: n. 290).

CAMPOS, A. K.; MOTA, M. A. ; ARAÚJO, J. V.; CECON, P. R. Atividade predatória, crescimento radial e esporulação de fungos predadores de nematóides *Monacrosporium* ssp, submetidos a criopresevação. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.2, p.465-469, mar-abr, 2004.

CHUEIRE, L.M. de O.; NISHI, C.Y.M.; HUNGRIA, M. **Identificação das estirpes de bradyrhizobium e rhizobium utilizadas em inoculantes comerciais para as culturas da soja e do feijoeiro pela técnica de pcr com "primers" aleatórios ou**

específicos. In: reuniao brasileira de fertilidade do solo e nutricao de plantas, 23.; reuniao brasileira sobre micorrizas, 7.; simposio brasileiro de microbiologia do solo, 5.; reuniao brasileira de biologia do solo, 2., 1998, Caxambu. FERTBIO.

CHUEIRE, L. M. O .; BANGEL, E. V.; MOSTASSO, F. L.; CAMPO, R. J.; PEDROSA, F. O .& HUNGRIA, M. Classificação taxonômica das estirpes de rizóbio recomendadas para as culturas da soja e do feijoeiro baseada no sequenciamento do gene 16S rRNA. **Revista Brasileira de Ciência do Solo.** v.27: 833-840, 2003.

CRIST, D. K.; WYZA, R. E.; MILLS, K. K.; BAUER, W. D.; EVANS, W. R. Preservation of Rhizobium Viability and Symbiotic Infectivity by Suspension in Water. **Applied and Environmental Microbiology**, American Society for Microbiology, May 1984, p. 895-900, Vol. 47, No. 5.

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

DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO-Seção1. Nº 58, sexta-feira, 24 de março de 2006- ISSN 1677-7042. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Instrução Normativa Nº 10**, de 21 de março de 2006.

DYE, M. A note some factors affecting the survival of *Rhizobium* cultures during freeze drying and subsequent storage. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 52, 461-464, 1981.

FERNANDES JÚNIOR, P. I. **Composições poliméricas à base de**

carboximetilcelulose (CMC) e amidos como veículos de inoculação de rizóbio em leguminosas. Seropédica, RJ. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 2006. 55 p. (Tese de mestrado).

FERNANDES, M.F.; FERNANDES, R.P.M.; HUNGRIA, M. **Seleção e caracterização de rizóbios para guandu, caupi e feijão-de-porco nativos dos tabuleiros costeiros de Sergipe.** In: XXIX Congresso Brasileiro de Ciência do Solo, Ribeirão Preto, São Paulo. 2003. (CD Room).

FIGUEIREDO, M. B. **Métodos de preservação de fungos patogênicos.** *Biológico*, São Paulo, v.63, n.1/2, p.73-82, jan./dez., 2001.

HAYS, H. C.W.; MILLNER, P. A.; JONES, J. K.; RAYNER-BRANDES, M. H. **A novel and convenient self-drying system for bacterial preservation.** *Journal of Microbiological Methods*, 63 (2005) 29– 35 p.

HUNGRIA, M. Coleta de Nódulos e Isolamento de Rizóbio. In: HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R. S. (Eds). **Manual de Métodos Empregados em Estudos de Microbiologia Agrícola.** Brasília: Embrapa, 1994. p. 45-59.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T.; SUHET, A. R.; PERES, J. R. R. Fixação Biológica do Nitrogênio em Soja. In: ARAÚJO, R. S.; HUNGRIA, M. (Eds). **Microrganismos de Importância Agrícola.** Brasília: Embrapa – Documentos,44, 1994. p. 9-90.

HUNGRIA, M. MENDES, I. C. BATISTA, J. S. BARCELLOS, F. G. CHUEIRE, L. M. O . CAMPO, R. J. CPAC 15 OU CPAC 7? EIS A QUESTÃO. In: **Anais da XIII**

Reunião da Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola (RELARE). Londrina: Embrapa Soja, 2007. p.24 - (Documentos/ Embrapa Soja, ISSN 1516-781X: n. 290).

HUNGRIA, M.; ANDRADE, D. S.; CHUEIRE, L. M. O .; PROBANZA, A .; GUTTIERRZ-MAÑERO, F. J. & MEGÍAS, M. Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. **Soil Biol. Biochem.**, 32:1515-1528, 2000.

IACOBELLIS, N. S.; DEVAY, J. E. Long-Term Storage of Plant- pathogenic Bacteria in Sterile Distilled Water. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 52, n. 2, p. 388-389, 1986.

JAWSON, M. D.; FRANZLUEBBERS, A . J.; BERG, R. K. *Bradyrhizobium japonicum* Survival in and Soybean Inoculation with Fluid Gels. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 55, N. 3, P. 617–622, 1989.

KOBER, M. de V.; SÁ, E. L. S. de ; FREIRE, J. R. J.; GIONGO, A. Characterization of variants of *Bradyrhizobium elkanii* and *B. japonicum* and symbiotic behaviour in soybeans. **Ciência Rural**, v.34, n.5, set-out, 2004.

MARIANO, R.L.R. ; ASSIS, S.M.P. Preservação de bactérias fitopatogênicas. In: Mariano, R.L.R. & Silveira, E.B. (Coords.). **Manual de Práticas em Fitobacteriologia**. 2a.ed. Recife. UFRPE.2005. p.35-45.

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”. Seropédica: Embrapa-CNPBS, 1997. 1-14. (Comunicado Técnico, 19).

MERCANTE, F. M.; STRALIOTTO, R.; DUQUE, F. F.; FRANCO, A. A. **A inoculação do feijoeiro comum com rizóbio**. Seropédica: Embrapa-CNPBS, 1992. 1-8. (Comunicado Técnico, 10).

MILES, A. A.; MISRA, S. S. The estimation of the bacterial power of the blood. **Journal of Hygiene**. v.38: 732-740, 1938.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras, MG: UFLA, 2006. 729p.

Nagai, T., Tomioka, K., Takeuchi, K., Iida, M., Kawada, M., Sato, T. Evaluation of preservation techniques of microorganism resources in the MAFF Genebank. **Japan Agricultural Research Quarterly**, 39 (1),p.19-27, 2005.

NISHI, C. Y. M.; HUNGRIA, M. Efeito da reinoculação na soja (*Glycine max* (L.) Merrill) em um solo com população estabelecida de *Bradyrhizobium* com as estirpes SEMIA 566, 586, 587, 5019, 5079 e 5080. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 31, n. 5 , p. 359-368, 1996).

NOVAIS, R. F.; ALVAREZ V., V. H.; BARROS, N. F. de; FONTES, R. L. F.;

CANTARUTTI, R. B.; NEVES, J. C. L. Editores. **Fertilidade do Solo**. Viçosa, MG; Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2007. 1017p.

PEREIRA, P. A . A .; OLIVER, A .; BLISS, F. A .; CROWE, L.; CROWE, J. Preservation of rhizobia by lyophilization with trehalose. **Pesq. agropec. Bras.**, Brasília, v. 37, n. 6, p. 831-839, jun. 2002.

PERIN, L. ; REIS, V. M. **Água como veículo de preservação de isolados de bactérias diazotróficas**. Comunicado Técnico: Embrapa Agrobiologia -CNPAB. Nº 32, out/ 1999, p. 1-2.

RODRIGUES, R. G.; LÍRIO, V. S.; LACAZ, C. de S. Preservação de fungos e actinomicetos de interesse médico em água destilada. **Rev. Inst. Med.Trop.** São Paulo, 34 (2): 159-165, 1992.

ROMEIRO, R. da S. **Preservação de culturas de bactérias fitopatogênicas**. Departamento de Fitopatologia, Laboratório de Bacteriologia de plantas, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2001.

SAFRONOVA, V. I. ; NOVIKOVA, N. I. Comparasion of two methods for root nodule bactéria preservation: Lyophilization and liquid nitrogen freezing. **Journal of Microbiological Methods**, 24, 231-237, 1996.

SANTOS, C. E. R. S.; FREITAS, A . D. S. de.; VIEIRA, I. M. M. B.; COLAÇO, W. **Fixação simbiótica de N₂ em leguminosas tropicais**. In: FIGUEIREDO, M. V. B.; BURITY, H. A.; STAMFORD, N. P.; SANTOS, C. E. R. S. (Eds). **Microrganismos e Agrobiodiversidade: o novo desafio para a agricultura**. Guaíba: Agrolivros, 2008. 568p.

SAS INSTITUTE. **Statistical analysis system**. Procedure guide for personal computer. Cary, 1999.

SCHUH, C. A . **Biopolímeros como suporte para inoculantes**. Porto Alegre, RS, 2005, 81 p. (Tese de mestrado).

SCHUH, C. A.; ALVES, J. B.; FREIRE, J. R. J.; SÁ, E, L. S. de. UTILIZAÇÃO DE FORMULAÇÕES À BASE DE BIOPOLÍMEROS COMO SUPORTE PARA INOCULANTES DE LEGUMINOSAS. In: **Anais da XIII Reunião da Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola (RELARE)**. Londrina: Embrapa Soja, 2007. p.24 - (Documentos/ Embrapa Soja, ISSN 1516-781X: n. 290).

SILVA, F. C. da. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. Brasília: Embrapa Comunicação para transferência de Tecnologia, 1999.

SILVA, L. F. & OLIVEIRA, M. S. Preservação de culturas de Rizóbios. In: HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R. S. (Eds). **Manual de Métodos Empregados em Estudos de Microbiologia Agrícola**. Brasília: Embrapa, 1994. p. 45-59.

SILVA, V. N.; SILVA, L. E. S. F.; FIGUEIREDO, M. V. B.; CARVALHO, F. G.; SILVA, M. L. R. B.; SILVA, A. J. N. Caracterização e seleção de população nativas de rizóbios de solo da região semi-árida de Pernambuco. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, 37 (1): 16-21, 2007.

SOSA, A.; BOCOURT, R.; SARMIENTO, M.; NODA, A. Evaluation of the method of

rhizobia conservation in silica gel for native strains isolated from creeping legumes. **Cuban Journal of Agricultural Science**, v. 38, n. 4, 2004.

SUSLOW, T. V.; SCHROTH, M. N.. **Bacterial Culture Preservation in Frozen and Dry-Film Methylcellulose**. Applied and environmental microbiology, Nov. 1981, Vol. 42, No. 5 p. 872-877.

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

VINCENT, J. M. **A manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria**. Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1970, 164 p. (IBP Handdbook, 15).

Weir, B. S. (2009) The current taxonomy of rhizobia. New Zealand rhizobia website. <http://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia.html>. Last updated: february, 2009.

ZILLI, J. E. CAMPO, R. J. RIBEIRO, K. G. GIANIUPPI, V. SMIDERLER, O . J. HUNGRIA, M. **Utilização de Inoculantes de Bradyrhizobium no Cultivo de Soja nos Cerrados de Roraima**. Boa Vista: Embrapa Roraima, 2005. 9p. (Embrapa Roraima. Circular Técnica, 02).

Anexos

Resultados da análise da variância

Anexo 1. Análise da variância inicial relacionada à massa seca de nódulos e número de nódulos em plantas de feijão.

Feijão		Massa Seca de nódulos									
		15 dias					60 dias				
Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F	Pr > F	GL	SQ	QM	F	Pr > F	
Tratamentos	9	6.26	0.70	10301.3	<.0001	9	1013644.4	112627.2	6.87	<.0001	
Resíduo	30	0.002	0.00007			30	491945.5	16398.2			
Total	39	6.26				39	1505589.9				
		120 dias									
Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F	Pr>F						
Tratamentos	9	29.13	3.24	19.10	<.0001						
Resíduo	29	4.91	0.17								
Total	38	34.05									

Feijão		Número de nódulos									
		15 dias					60 dias				
Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F	Pr > F	GL	SQ	QM	F	Pr > F	
Tratamentos	9	103.89	11.54	103.30	<.0001	9	527439.9	58604.4	6.28	<.0001	
Resíduo	28	3.13	0.11			30	260032.5	9334.4			
Total	37	107.02				39	807472.4				
		120 dias									
Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F	Pr > F						
Tratamentos	9	33.76	3.75	21.42	<.0001						
Resíduo	29	5.08	0.17								
Total	38	38.8									

Anexo 2. Análise da variância inicial relacionada à matéria seca de raiz e parte aérea em plantas de feijão.

Feijão		Matéria Seca de Raiz									
		15 dias					60 dias				
Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F	Pr > F	GL	SQ	QM	F	Pr > F	
Tratamentos	9	389495.23	43277.25	10.60	<.0001	9	0.32	0.04	1.63	0.1519	
Resíduo	30	122466.75	4082.23			30	0.65	0.02			
Total	39	511961.97				39	0.97				
		120 dias									
Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F	Pr > F						
Tratamentos	9	0.39	0.04	3.69	0.0035						
Resíduo	29	0.34	0.01								
Total	38	0.73									

Feijão		Matéria Seca de Parte aérea									
		15 dias					60 dias				
Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F	Pr > F	GL	SQ	QM	F	Pr > F	
Tratamentos	9	1.07	0.12	10.96	<.0001	9	2.33	0.26	7.84	<.0001	
Resíduo	29	0.31	0.01			29	0.96	0.03			
Total	38	1.38				38	3.29				
		120 dias									
Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F	Pr > F						
Tratamentos	9	0.91	0.10	9.79	<.0001						
Resíduo	29	0.30	0.01								
Total	38	1.21									

Anexo 3. Análise da variância inicial relacionada a N-total e teor de nitrogênio em plantas de feijão.

Feijão		N- total									
		15 dias					60 dias				
Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F	Pr > F	GL	SQ	QM	F	Pr > F	
Tratamentos	9	3.06	0.34	14.28	<.0001	9	4.36	0.48	11.61	<.0001	
Resíduo	30	0.71	0.02			29	1.21	0.042			
Total	39	3.78				38	5.56				
		120 dias									
Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F	Pr > F						
Tratamentos	9	2.94	0.33	10.65	<.0001						
Resíduo	29	0.89	0.03								
Total	38	3.83									

Feijão		Teor de N									
		15 dias					60 dias				
Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F	Pr > F	GL	SQ	QM	F	Pr > F	
Tratamentos	9	1.13	0.13	125.29	<.0001	9	68318.8	7590.9	8.65	<.0001	
Resíduo	29	0.03	0.001			30	26336.5	877.9			
Total	38	1.16				39	94655.3				
		120 dias									
Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F	Pr > F						
Tratamentos	9	17.64	1.96	6.09	<.0001						
Resíduo	29	9.33	0.32								
Total	38	26.98									

Anexo 4. Análise da variância inicial relacionada à massa seca e número de nódulos em plantas de soja.

Soja		Massa Seca de nódulos									
		15 dias					60 dias				
Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F	Pr > F	GL	SQ	QM	F	Pr > F	
Tratamentos	9	11.64	1.29	7.93	<.0001	9	9.94	1.10	11.29	<.0001	
Resíduo	30	4.89	0.16			30	2.93	0.09			
Total	39	16.53				39	12.87				
		120 dias									
Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F	Pr > F						
Tratamentos	9	4.44	0.49	9.40	<.0001						
Resíduo	29	1.52	0.05								
Total	38	5.96									

Soja		Número de nódulos									
		15 dias					60 dias				
Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F	Pr > F	GL	SQ	QM	F	Pr > F	
Tratamentos	9	7.57	0.84	17.05	<.0001	9	6.28	0.69	12.29	<.0001	
Resíduo	30	1.48	0.05			30	1.70	0.06			
Total	39	9.05				39	7.98				
		120 dias									
Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F	Pr > F						
Tratamentos	9	4.02	0.45	7.87	<.0001						
Resíduo	29	1.65	0.06								
Total	38	5.67									

Anexo 5. Análise da variância inicial relacionada a matéria seca de raiz e parte aérea em plantas de soja.

Soja		Matéria Seca de Raiz									
		15 dias					60 dias				
Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F	Pr > F	GL	SQ	QM	F	Pr > F	
Tratamentos	9	82822.13	9202.5	01/01/83	0.1043	9	0.76	0.08	4.93	0.0004	
Resíduo	30	151115.3	5037.2			30	0.51	0.02			
Total	39	233937.4				39	1.27				
		120 dias									
Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F	Pr > F						
Tratamentos	9	218152.6	24239.8	1.29	0.2823						
Resíduo	29	543287.0	18734.0								
Total	38	761439.6									

Soja		Matéria Seca de Parte aérea									
		15 dias					60 dias				
Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F	Pr > F	GL	SQ	QM	F	Pr > F	
Tratamentos	9	2163391.3	240376.8	27.27	<.0001	9	2.33	0.26	10.60	<.0001	
Resíduo	29	255663.8	8815.9			30	0.73	0.02			
Total	38	2419055.1				39	3.06				
		120 dias									
Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F	Pr > F						
Tratamentos	9	0.38	0.04	2.03	0.0719						
Resíduo	29	0.60	0.02								
Total	38	0.98									

Anexo 6. Análise da variância inicial relacionada a N-total e teor de nitrogênio em plantas de soja.

Soja						N- total				
						15 dias				
Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F	Pr > F	60 dias				
						GL	SQ	QM	F	Pr > F
Tratamentos	9	6239.58	693.29	126.35	<.0001	9	3.23	0.36	10.21	<.0001
Resíduo	30	164.61	5.49			30	1.06	0.04		
Total	39	6404.19				39				
						120 dias				
Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F	Pr > F					
Tratamentos	9	1.84	0.20	6.17	<.0001					
Resíduo	29	0.96	0.03							
Total	38	2.80								

Soja						Teor de N				
						15 dias				
Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F	Pr > F	60 dias				
						GL	SQ	QM	F	Pr > F
Tratamentos	9	15.83	1.76	62.94	<.0001	9	0.16	0.02	2.11	0.0612
Resíduo	30	0.84	0.03			30	0.26	0.009		
Total	39	16.67				39	0.43			
						120 dias				
Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F	Pr > F					
Tratamentos	9	0.68	0.08	8.49	<.0001					
Resíduo	29	0.26	0.009							
Total	38	0.93								

Anexo 7. Resumo da análise de fatorial com os valores das probabilidades para as variáveis analisadas no desenvolvimento de feijão (*Phaseolus vulgaris*) após conservação das estirpes.

15 DIAS						
Fonte de variação	MSN	N N	MSR	MSPA	N-TOTAL	TEOR DE N
	Pr > F	Pr > F	Pr > F	Pr > F	Pr > F	Pr > F
Estirpe	0.0361	0.0711	0.2322	0.0024	<.0001	<.0001
Preservante	0.0006	0.0022	<.0001	0.0228	0.0227	<.0001
Estirpe X Preservantes	0.3619	0.0006	0.1181	0.1806	0.3657	<.0001
R ²	0.59	0.67	0.69	0.54	0.75	0.95
CV	31,7	29.6	18,07	5,19	14,01	9,77
60 DIAS						
Fonte de variação	MSN	N N	MSR	MSPA	N-TOTAL	TEOR DE N
	Pr > F	Pr > F	Pr > F	Pr > F	Pr > F	Pr > F
Estirpe	0.0003	0.0008	0.9707	<.0001	<.0001	0.0002
Preservante	0.6886	0.4278	0.1970	0.0852	0.0454	0.0015
Estirpe X Preservantes	0.9099	0.6863	0.1930	0.1966	0.2197	0.8612
R ²	0.46	0.44	0.3	0.75	0.77	0.63
CV	9.9	49.21	5.45	34	14	36
120 DIAS						
Fonte de variação	MSN	N N	MSR	MSPA	N-TOTAL	TEOR DE N
	Pr > F	Pr > F	Pr > F	Pr > F	Pr > F	Pr > F
Estirpe	<.0001	<.0001	0.1568	0.0071	0.0006	0.0019
Preservante	0.0011	0.0001	0.0271	0.0002	0.0001	0.0080
Estirpe X Preservantes	0.0324	0.0302	0.1867	0.0206	0.1343	0.7879
R ²	0.71	0.73	0.43	0.68	0.69	0.54
CV	26.33	29.7	4.2	3.69	15.42	28.8

Anexo 8. Resumo da análise de fatorial com os valores das probabilidades para as variáveis analisadas no desenvolvimento de soja (*Glycine max*) após preservação das estirpes.

15 DIAS						
Fonte de variação	MSN	N N	MSR	MSPA	N-TOTAL	TEOR DE N
	Pr > F	Pr > F	Pr > F	Pr > F	Pr > F	Pr > F
Estirpe	0,0666	0,1077	0,0870	0,7983	0,0630	0,0016
Preservante	0,0020	<.0001	0,2456	0,4346	0,3576	0,4600
Estirpe X Preservantes	0,8657	0,1143	0,0876	0,5342	0,7070	0,8563
R ²	0,50	0,76	0,38	0,18	0,26	0,40
CV	40,58	24,24	12,32	15,98	19,27	8,9
60 DIAS						
Fonte de variação	MSN	N N	MSR	MSPA	N-TOTAL	TEOR DE N
	Pr > F	Pr > F	Pr > F	Pr > F	Pr > F	Pr > F
Estirpe	0,9104	0,9646	0,5594	0,3651	0,3388	0,6141
Preservante	0,0018	<.0001	0,0711	0,8896	0,3605	0,0103
Estirpe X Preservantes	0,8061	0,4560	0,3969	0,0976	0,1642	0,4647
R ²	0,62	0,72	0,32	0,26	0,29	0,41
CV	45,23	50,25	5,11	6,75	24,45	18,81
120 DIAS						
Fonte de variação	MSN	N N	MSR	MSPA	N-TOTAL	TEOR DE N
	Pr > F	Pr > F	Pr > F	Pr > F	Pr > F	Pr > F
Estirpe	0,4423	0,5496	0,3866	0,7076	0,9424	0,4729
Preservante	<.0001	<.0001	0,9762	0,9331	0,4824	0,0569
Estirpe X Preservantes	0,7051	0,7465	0,6472	0,8193	0,5183	0,1755
R ²	0,72	0,68	0,1	0,06	0,18	0,39
CV	35,96	37,13	27,36	27,24	40,2	48,31

