

SOBREVIVÊNCIA DO *BRADYRHIZOBIUM* SP. QUANDO SUBMETIDO A DIFERENTES TEMPERATURAS DE CRESCIMENTO¹

MÁRCIA DO VALE BARRETO FIGUEIREDO², ANTONIO PEDRO BALATTI³,
FRANCISCA PESSÔA DE FRANÇA⁴ e HÉLIO ALMEIDA BURITY⁵

RESUMO - Com o objetivo de avaliar a sobrevivência do *Bradyrhizobium* sp. em diferentes temperaturas de crescimento e a efetividade da estirpe em relação à longevidade do inoculante, foi estudado, através do crescimento celular da bactéria, e da evolução do pH do meio, o comportamento da estirpe BR-2001. A suspensão bacteriana foi cultivada em fermentador nas temperaturas de 28 °C e 37 °C, com meio YEMA modificado. Os substratos foram: diatomita, diatomita + solo 20% e turfa. As células viáveis foram avaliadas por contagem em placas e infecção em plantas, amostragens com 0, 15, 30, 60, 120 e 240 dias de armazenamento a 5 °C. A estirpe multiplicada a 28 °C apresentou população de 10⁹ cels/ml em 72 horas de processo, e permaneceu constante até 240 dias, em todos os substratos. Na temperatura de 37 °C em 72 horas de processo, a população foi 10⁵-10⁶ cels/ml. Na turfa, ocorreu excelente sobrevivência, mesmo em baixa concentração inicial, tendo-se detectado em menos de 30 dias 10⁹ cels/g, mantendo-se até 240 dias. Nos demais veículos, os valores alcançados foram 10⁷-10⁸ cels/g.

Termos de indexação: fixação de N₂, estirpe, inoculante.

SURVIVAL OF *BRADYRHIZOBIUM* SP. UNDER DIFFERENT GROWTH TEMPERATURES

ABSTRAT - The survival of *Bradyrhizobium* sp. under different growth temperatures, as well as the effectiveness of that strain in relationship to the longevity of the inoculant were evaluated through the study of the behaviour of the strain *Bradyrhizobium* by observing the cellular growth and the pH evolution. The bacterial suspension was multiplied in fermentator at the temperatures of 28 °C and 37 °C in YEMA medium. The substrates were: diatomite, diatomite + soil 20% and peat. The evaluation of viable cells was carried out by the methods of plate dilution and plant infection, with sampling at the intervals of 0, 15, 30, 60, 120 e 240 days of storage at a temperature of 5 °C. The strain grown under 28 °C showed a population of 10⁹ cells/ml after 72 hours of process, and remained constant up to 240 days in all of the substrates. Under the temperature of 37 °C, within 72 hours of process the population was 10⁵-10⁶ cells/ml. For the peat, excellent survival was observed even at this low initial concentration, detected in less than 30 days of storage. Concentrations of 10⁹ cells/g of peat remained constant up to 240 days. In the other vehicles the values reached 10⁷-10⁸ cells/g.

Index terms: N₂ fixation, stirp, inoculant.

INTRODUÇÃO

A qualidade dos inóculos para leguminosas depende da quantidade de bactérias viáveis que contêm e de sua eficiência em fixar N₂ com o hospedeiro específico. A capacidade de determinada estirpe em formar nódulos e fixar N₂ em condições específicas é uma exigência importante na qualidade do inóculo (Roughley, 1970). Outros fatores, como a pureza da cultura usada na inoculação, a eficiência da estirpe empregada, o número de bactérias viáveis e o tipo de veículo, podem contribuir para

¹ Aceito para publicação em 29 de agosto de 1995.

Trabalho financiado pela Secretaria de Ciência e Tecnologia de Pernambuco e pelo CNPq.

² Bióloga, M.Sc., Lab. Microbiol. do Solo - Empresa de Pesquisa Agropec. do Estado de Alagoas, EPEAL, CEP 57018-330 Maceió, AL. Doutorando no IM - UFRJ.

³ Prof. Tit., Fac. de Ciências Exatas y Naturales de La Pampa, Dep. Tecno. Química - Santa Rosa, Provincia de La Pampa, Argentina.

⁴ Química, Dr.^a. Prof.^a. Adj., Dep. Engen. Bioq. da UFRJ, CEP 21949-900 Rio de Janeiro, RJ.

⁵ Eng. Agr., Ph.D., Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropec. - IPA/EMBRAPA, Caixa Postal 1022, CEP 50761-000 Recife, PE.

promover grandes variações na eficiência do inóculo (Hiltbold et al., 1980; Skipper et al., 1980).

Em relação ao crescimento de culturas bacterianas, observou-se que, usando o meio de cultivo tradicional (ágar-manitol extrato de levedura) e trabalhando sob ótimas condições de cultivo, a quantidade máxima de crescimento pode ser obtida entre 45 e 75 horas para as estirpes de crescimento rápido (Date, 1975). Em relação ao efeito da aeração, as referências parecem ser conflitantes. Apesar de o *Rhizobium* ser considerado aeróbio, foi relatado que o bom crescimento pode ser obtido a uma muito baixa tensão de oxigênio (Burton, 1967). Usando estirpe de *Rhizobium meliloti* crescido em meio sintético em fermentador, Dudman (1964) menciona que a baixa aeração deu melhor aproveitamento de células do que o meio altamente aerado. Por outro lado, Leitas (1964) relatou o uso de oxigênio puro no início do processo.

Tem-se estabelecido que, em condições adequadas de aeração, temperatura, conteúdo de umidade e pH em um adequado tipo de veículo para inoculação, podem-se obter altas concentrações de biomassa ou metabolitos de interesse industrial (Cannel & Moo-Young, 1980; Avellá et al., 1987; Balatti et al., 1990; Balatti et al., 1991).

O presente trabalho foi realizado para verificar a sobrevivência do *Bradyrhizobium* sp. (Vigna) em diferentes temperaturas de crescimento em fermentador, como, também, avaliar a efetividade da estirpe em relação à longevidade do inoculante.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi usada a estirpe de *Bradyrhizobium* sp. isolada de *Vigna unguiculata* L. Walp (caupi), originária da EMBRAPA/Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia (CNPAB), cedida pelo IPAGRO - Seção de Microbiologia do Solo - MIRCEN, Porto Alegre, RS. A bactéria foi transferida do meio sólido inclinado para o meio líquido com glicerol e extrato de levedura, incubando-se em agitador rotativo a 250 rpm e 2,5 cm de excentricidade. Foram usados 100 ml de meio de cultivo, a uma temperatura de 28 °C, por 72 horas. Após esse período, o inóculo apresentou uma riqueza de 10⁹ células bacterianas por centímetro cúbico, avaliada por contagem direta em microscópio, por diluição em placas e medições de pH do meio. A seguir, o inóculo foi transferido para um fermentador monitor "nível" 3,0 litros de volume útil com uma taxa de

aeração de 250 rpm e 1,5 litro 0₂/l. min. O coeficiente volumétrico de transferências de oxigênio (K_{La}) do fermentador a 250 rpm foi de 60,43 h⁻¹ e a velocidade de absorção do oxigênio foi determinada pelo método do sulfito (Cooper et al., 1944), cujo valor foi de 270,72 ml 0₂/l. min. (Fig. 1). A concentração inicial de células do inóculo no processo foi de 0,35 g/l.

A origem dos substratos usados foi: diatomita (Carro Quebrado, RN); diatomita+solo 20% e turfa (Tierra del Fuego, Argentina). Estes materiais foram secados e passados em peneira de 200 mesh (0,074 mm). A seguir, procedeu-se às análises físicas e químicas (Tabela 1), de acordo com o método do Ministério da Agricultura (Brasil, 1983).

O pH dos diferentes materiais foi corrigido para 6,8 a 7,0, através da adição de carbonato de cálcio.

No preparo do inoculante, os substratos foram acondicionados em sacos de polipropileno (0,05 mm), com 40 g de material por pacote do inoculante. Após o fechamento dos pacotes, efetuaram-se as esterilizações, por autoclavagem a 121 °C, por uma hora, com intervalos de 24 horas, durante três dias consecutivos, totalizando três horas de esterilização. O volume do caldo a acrescentar foi baseado no potencial matricial (Ψ_m-3,0 bar), com base nos resultados de Figueiredo et al. (1992). Estes foram injetados assepticamente através de uma seringa hipodérmica esterilizada (Roughley & Vincent, 1967). Imediatamente após, fez-se a limpeza com álcool, no local da perfuração, e em seguida foi feita a vedação com fita adesiva esterilizada. O conteúdo de cada pacote foi homogeneizado com manipulações vigorosas, e a seguir as amostras foram colocadas em maturação a 28 °C (Date, 1976); após doze dias, foram armazenadas a 5 °C.

Foram efetuadas contagens em placas, infecções em plantas (NMP), nos períodos de 0, 15, 30, 60, 120 e 240 dias. Para contagem em placas, usou-se o meio YEMA modificado, usando-se glicerol como fonte de carbono, e vermelho Congo, como indicador. As diluições e infecções em plantas seguiram o método do número mais provável - NMP -, descrito por Vincent (1970), e utilizou-se como planta-teste o siratro (*Macroptilium* sp.). Neste experimento, empregou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, com duas repetições e oito subamostragens. Índices de correlação, assim como modelos de regressão do tipo linear simples, foram calculados para obter informações sobre o grau de associação entre NMP e contagem em placas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 mostram-se as análises efetuadas sobre os substratos utilizados na preparação dos inoculantes, na qual ambos apresentam alta reten-

ção de água. O substrato diatomita teve comportamento diferenciado, apresentando alta retenção à mais baixa tensão (potencial elevado), conseguindo ainda mantê-lo superior aos demais nas respectivas faixas estudadas. Portanto, torna-se importante relacionar a sobrevivência da bactéria com a energia da água retida no substrato, e não com o teor de umidade, que varia de substrato para substrato.

A Tabela 2 mostra o resultado do efeito da temperatura na sobrevivência da bactéria nos diferentes substratos, nos quais pode-se verificar claramente que a bactéria multiplicada a 28 °C apresenta uma população de 10^9 células viáveis/g de inoculante em todos os substratos, não apresentando diferença significativa a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey, mas a 37 °C a sobrevivência da bactéria na turfa foi superior à dos demais substratos.

Na avaliação da população bacteriana nas diferentes temperaturas de multiplicação no processo

(fermentador), foi verificado que a 28 °C apresentou uma população de 10^9 células viáveis/ml em 72 horas de processo, enquanto, a 37 °C, no mesmo intervalo de tempo, a população foi de 10^5 - 10^6 células viáveis/ml (Fig. 1).

Em relação ao efeito do tempo na sobrevivência da bactéria nos diferentes substratos (Tabela 3), pode-se observar claramente que a turfa apresenta excelente sobrevivência, sendo detectada em 30 dias de armazenamento uma população de 10^9 células viáveis/g de inoculante, e mantendo-se constante até 240 dias de armazenamento, mesmo sendo impregnada ao substrato em baixas concentrações iniciais (10^5 - 10^6 cel/ml), resultados concordantes com os obtidos foi observado por Avellá et al. (1987), estudando o crescimento e a sobrevivência do *Rhizobium meliloti* em turfa estéril, porém os valores alcançados foram de 10^{10} células viáveis por grama de turfa. Este valor superior pode ser devido à estirpe de *Rhizobium* empregada.

TABELA 1. Análise física e química dos substratos utilizados na preparação de inoculantes.

Substrato	pH(H ₂ O)	C	N	UR*	Ψ _m (bar)**		
					-0,10	-0,33	-3,00
	1:10	— % —		g/g	---- g/g ----		
Turfa	4,2	40,2	1,3	0,16	1,87	1,28	0,66
Diatomita	4,3	11,01	0,49	0,07	1,61	1,50	0,68
Diatomita + Solo 20%	5,4	7,30	0,34	0,04	1,10	0,98	0,55

* Umidade residual.

** Potencial matricial.

TABELA 2. Efeito da temperatura na sobrevivência do *Bradyrhizobium* sp. nos diferentes substratos utilizados como inoculante.

Substrato	Temperatura	
	28° C	37° C
Turfa	9,126a	9,003a
Diatomita	9,073a	8,047 b
Diatomita + Solo 20%	9,015 b	8,040 b

C.V. 1,315%.

Log do número de bactéria/g inoculante.

Na coluna, as médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

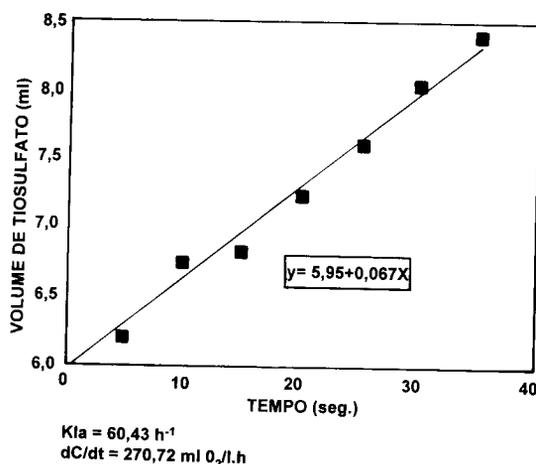


FIG. 1. Determinação de K_{la} do fermentador, para 250 rpm. Condições: 28°C e 1l/l. min.

TABELA 3. Efeito do tempo na sobrevivência de *Bradyrhizobium* sp. nos diferentes substratos, em função da temperatura.

Substrato	Tempo (dias)					
	0	15	30	60	120	240
Turfa	7,590a	8,893a	9,150a	9,478a	9,184a	9,094a
Diatomita	7,530a	8,325 b	8,773 b	9,178 b	8,899 b	8,640 b
Diatomita + Solo 20%	7,516a	8,282 b	8,746 b	9,143 b	8,861 b	8,633 b

C.V. 1,315%.

Log do número de bactérias/g inoculante.

Na coluna, as médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Porém, em relação ao substrato diatomita e à mistura deste com mescla de solo, foram alcançados valores de sobrevivência na ordem de 10^8 células viáveis por grama de diatomita nos oito meses de armazenamento. A capacidade de retenção de água deste material pode ter ajudado as células bacterianas a manterem um teor de umidade compatível com a viabilidade celular. Esta possibilidade pode estar relacionada com a energia de retenção de água. Trabalhos conduzidos por Van Schreven (1970) estabeleceram um limite de umidade de 30% para inoculantes sólidos, e, abaixo deste valor, a taxa de mortalidade acelera rapidamente.

No estudo do efeito da temperatura na sobrevivência da bactéria nos diferentes intervalos de tempo (Tabela 4), a primeira contagem ($t=0$) permitiu avaliar a capacidade de absorção bacteriana de cada substrato com base na recuperação, avaliada pelo número obtido na contagem do inoculante, e o número de células adicionais por grama de inoculante. Quanto ao efeito da temperatura na sobrevivência

da bactéria, foi observado que a temperatura de 37 °C apresentou considerável diminuição no número de células viáveis. Isto indica que a alta temperatura baixou consideravelmente a população bacteriana. No intervalo de 60 dias, pôde-se constatar maior população bacteriana após a mistura do inóculo, sendo considerado como ponto máximo para todos os substratos estudados. Os resultados apresentados estão parcialmente de acordo com os obtidos por Date (1976) e Figueiredo et al. (1992) ao estudarem a sobrevivência do *Bradyrhizobium* em turfa estéril, em condições similares de armazenamento. Estes autores relatam um maior número de bactérias aos 90 dias, porém neste estudo não foi avaliado este intervalo de tempo, podendo também ter ocorrido, uma vez que esta faixa está entre os intervalos estudados.

No estudo da evolução do pH, observaram-se, na maioria dos cultivos, valores compreendidos entre 7,11 e 7,31 no final do processo em fermentador. Trabalhos conduzidos por Balatti et al. (1990) en-

TABELA 4. Efeito da temperatura na sobrevivência do *Bradyrhizobium* sp. nos diferentes intervalos de tempo em função do substrato.

Temperatura	Tempo (dias)					
	0	15	30	60	120	240
28 °C	8,651a	8,881a	9,010a	9,680a	9,151a	9,055a
37 °C	6,440 b	8,118 b	8,769 b	8,853 b	8,812 b	8,523 b

C.V. 1,315%.

Log de número de bactérias/g inoculante.

Na coluna, as médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

CONCLUSÕES

1. A estirpe multiplicada a 28 °C obteve uma população de 10⁹ cels/ml em 72 horas de processo, e se manteve até 240 dias de armazenamento, em todos os substratos estudados.

2. O estudo da turfa permitiu uma excelente sobrevivência, mesmo quando inoculada em baixa concentração.

3. Os efeitos da temperatura na sobrevivência da bactéria constataram que a 37 °C ela apresentou considerável diminuição no número de células viáveis pelo método de diluição em planta, em comparação com contagem em placas, o que indica que a alta temperatura, embora não tenha causado a morte da célula, baixou consideravelmente a capacidade de infecção nas plantas.

REFERÊNCIAS

- AVELLÁ, L. M.; PASTOR, M. D.; MAZZA, L. A.; BALATTI, A. P. Crecimiento y sobrevivencia de *Rhizobium meliloti* 323 en medio liquido y sobre turba estéril. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, v. 29, p. 321-328, 1987.
- BALATTI, A. P.; FORGIONE, C.; PASTOR, M. D.; GRASSANO, A. E. Desarrollo de suspensiones de *Rhizobium meliloti* B36, *Rhizobium phaseoli* F10 *Bradyrhizobium* E-45 en reactores de diferentes escalas. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, v. 32, p. 181-187, 1990.
- BALATTI, A. P.; MAZZA, L. A.; PASTOR, M. D. Effect of media nutrient concentrations on growth of *Bradyrhizobium japonicum*. *Tropical Agriculture*, Trinidad, v. 28, n. 3, p. 215-218, 1991.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Laboratório Nacional de Referência Vegetal. **Análise de corretivos, fertilizantes e inoculantes: métodos oficiais.** [S. l.: s. n.], 1983. 103 p.
- BURTON, J. C. *Rhizobium* culture and use. In: PEPPLER, H.J. (Ed.). *Microbial Technology*. New York: [s.n.], 1967. p. 1-33.
- CANNEL, E.; MOO-YOUNG, M. Solid state Fermentation System. *Process Biochemistry*, Aug./Sept., p. 24-28, 1980.
- COOPER, C. M.; FERNSTON, G.; MILLER, S. T. Gas liquid contactor. *Industrial and Engineering Chemistry*, v. 36, p. 504-509, 1944.
- DATE, R. A. The development and use of legume inoculant. In: AYANABA, A.; DART, P.I. **Biological nitrogen fixation in forming systems of the tropics.** Chichester: John Wiley & Sons, 1975. p.171-179.
- DATE, R. A. Legume inoculant production. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Bangalore, v. 40, n. 6, p. 667-686, 1976.
- DATE, R. A.; VINCENT, J. M. Determination of the number of root nodule bacteria in the presence of other organisms. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 2, p. 5-7, 1962.
- DUDMAN, W. F. Growth and Extracellular Polysaccharide production by *Rhizobium meliloti* in defined medium. *Journal of Bacteriology*, v. 88, p. 640-645, 1964.
- FIGUEIREDO, M. V. B.; STAMFORD, N. P.; VIDOR, C.; VILAR, J. J.; OLIVEIRA FILHO, E. C. Sobrevida do *Bradyrhizobium* sp. em substratos alternativos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 27 n 11, p. 1497-1506, nov. 1992.
- HILTBOLD, D. A. E.; THURLOW, D. L.; SKIPPER, H. D. Evolution of commercial soybean inoculants by various techniques. **Agronomy Journal**, v. 72, p. 675-681, 1980.
- KREMER, R. J.; PETERSON, H. L. Effect of inoculant carrier on survival of *Rhizobium* on inoculated seeds. **Soil Science**, v. 134, n. 2, p. 117-127, 1982.
- LEITAS, P. Producción de inoculantes. In: REUNIÓN LATINOAMERICANA SOBRE INOCULANTES PARA LEGUMINOSAS, 1., 1964. **Anais**. [S. l.: s. n.], 1964. p. 24.
- ROUGHLEY, R. J. The preparation and use of legume seed inoculants. **Plant and Soil**, v. 32, p. 675-701, 1970.
- ROUGHLEY, R. J.; VINCENT, J. M. Growth and survival of *Rhizobium* sp. in peat cultures. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 30, n. 2, p. 362-376, 1967.
- SKIPPER, H. D.; PALMER, J. H.; GIDDENS, J. E.; WOODRUFF, J. M. Evaluating of commercial soybean inoculants from South Carolina and Georgia. **Agronomy Journal**, v. 72, p. 673-674, 1980.
- VAN SCHREVEN, D. A. Some factors affecting growth and survival of *Rhizobium* spp., in soil peat cultures. **Plant and Soil**, the Hague, v.32, p.113-130, 1970.
- VINCENT, J. M. **A manual for the practical study of *Rhizobium* of root nodule bacteria.** Oxford: Blackwells, 1970. 164 p.
- WEAVER, R. W.; FREDERICK, L. R. A new technique for most probable number counts of *Rhizobium*. **Plant and Soil**, v. 36, p. 219-222, 1972.