

SOBREVIVÊNCIA DE *RHIZOBIUM PHASEOLI* EM TURFA ESTERILIZADA (1). ELI S. LOPES e ANTÔNIO ROBERTO GIARDINI (2). As estirpes de *Rhizobium* recomendadas para uso em inoculantes, além das características de eficiência e infectividade devem apresentar boa sobrevivência no material usado como suporte das bactérias no inoculante. Dito material, usualmente empregado no Brasil, é a turfa, após correção de acidez, secagem e moagem. A sobrevivência do rizóbio na turfa depende das características químicas, físicas e biológicas desse material e de outros fatores, tais como condições de umidade do inoculante, temperatura e umidade de armazenamento, e das próprias estirpes de bactérias empregadas. A escolha da turfa para produção de inoculantes deve ser feita com base em testes de sobrevivência das várias estirpes de *Rhizobium* nesse material.

Tem sido demonstrado que para condições de armazenamento em geladeira e turfa esterilizada, não se observa decréscimo acentuado do número inicial de bactéria, mesmo por longos períodos de armazenamento (3). Essas informações foram obtidas na maioria dos casos para leguminosas de clima temperado. Poucas informações a esse respeito são existentes para *Rhizobium phaseoli*. O presente trabalho foi conduzido para

verificar, em condições ideais, a sobrevivência de duas estirpes de *R. phaseoli*, previamente selecionadas quanto à eficiência de fixação de nitrogênio.

Material e métodos — As estirpes de *Rhizobium phaseoli* empregadas neste estudo estão catalogadas na Seção de Microbiologia do Solo sob n.ºs 371 (N.º original 127K-17, Nitragin Co.; USA cedida pela Dr.ª Alaidés P. Ruschell, CENA, Piracicaba) e SMS-376 (N.º CC-511, Austrália, e CIAT-57, Colômbia, pelo Dr. Peter Graham, CIAT, Colômbia).

Para o preparo dos inoculantes, elas foram cultivadas em meio líquido recomendado por Norris (4), com pH ajustado para 6,8 e incubadas a 28°C por períodos em que os caldos apresentavam número superior a 10⁹ bactérias/ml, em contagens diretas efetuadas em câmara de Petroff-Hausser. A turfa foi preparada para uso em escala comercial (2) e apresentou as seguintes características: carbono: 13,0%; cinzas: 53,5%; pH: 7,0; cloro: 180ppm. A análise granulométrica revelou que 65,0% passava na peneira de 100 mesh. A mistura do caldo das culturas com a turfa foi efetuada em 18-8-75, para a estirpe SMS-371, e em 24-8-75, para a SMS-376. Os inoculantes permaneceram em bandejas à temperatura ambiente por três dias após a mistura e depois foram

(1) Recebida para publicação em 22 de dezembro de 1976.

(2) Com bolsa de suplementação do C.N.Pq. Os autores agradecem à firma TURFAL — Ind. Com. Prod. Quim. Agron. Ltda., Sete Barras, PR.

(3) ROUGHLEY, R. S. & VINCENT, J. M. Growth and survival of *Rhizobium* spp. in peat culture. J. Appl. Bacteriol. 30(2):362-376, 1967.

(4) NORRIS, D. O. Techniques used in work with *Rizobium*. In Some concepts and methods in subtropical pasture research. Farnham Royal, Commonw. Agric. Bur., 1964, p. 186-189. (Bull. 47)

colocados em sacos plásticos e mantidos em geladeira durante o período de observação. As contagens do número de rizóbios foram efetuadas pelo método da diluição em placas⁽⁵⁾, usando-se amostras de 1,0g em duas repetições. Foram plaqueadas alíquotas de 0,1 ml das diluições 10^{-5} a 10^{-7} , em superfície com cinco repetições para cada diluição. As contagens das colônias foram efetuadas aos 4-5 dias após incubação das placas a 28°C; foram consideradas para os cálculos as placas das diluições que continham um número médio de colônias entre 30 e 300. Num período de observação com cerca de oito meses foram feitas cinco contagens do número de rizóbios sendo que as placas, mesmo na última contagem, mostravam quase exclusivamente colônias das bactérias misturadas com a turfa.

A análise estatística dos dados foi efetuada em esquema inteiramente casualizado, sendo comparadas pelo teste de Tukey as médias do número de rizóbios nas diferentes amostragens.

Resultados e discussão — No quadro 1 constam os números de rizóbios das duas estirpes em cinco amostragens que abrangeram um período de cerca de 250 dias após a mistura do caldo com a turfa.

Para o caso da estirpe SMS-376, só foi verificada a queda significativa em relação ao número inicial de rizóbios a partir da

quarta amostragem, efetuada aos 215 dias após o preparo do inoculante. O coeficiente de variação foi elevado (28,7%). Para a estirpe SMS-371, no período entre a primeira e a segunda amostragem houve elevação significativa no número de bactérias. Queda significativa em relação à primeira amostragem foi também verificada na quarta amostragem, aos 222 dias. O coeficiente de variação da análise, neste caso foi de 5,3%. Os cálculos da taxa de mortalidade semanal ($K = 1/t \times B/b$, onde B e b são os números iniciais e finais de rizóbios, para contagem no tempo t expresso em semanas) efetuados com base na primeira e última amostragem, mostraram que $K = 0,04$ para a estirpe SMS-371 e $K = 0,03$ para a SMS-376. Esses valores estão próximos aos observados por Freire e Jones⁽⁶⁾, para *Rhizobium japonicum*, em períodos e condições semelhantes.

O aumento do número de *Rhizobium* observado na segunda amostragem, com a estirpe SMS-371 seria explicado devido a uma multiplicação que poderia ter ocorrido logo depois da primeira amostragem, antes de o inoculante ter sido colocado na geladeira, pois a refrigeração foi iniciada no terceiro dia após a mistura, ou seja, um dia após a primeira amostragem. O acréscimo em valor absoluto, observado com a estirpe SMS-376 não foi significativo.

⁽⁵⁾ VINCENT, J. M. A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. Oxford, Blackwell Scientific Publication, 1970. p. 150 (IBP Handbook n.º 15)

⁽⁶⁾ FREIRE, J. R. J. & JONES, S. H. Influência da temperatura de armazenamento e da perda de umidade na longevidade dos inoculantes de leguminosas. Rev. Fac. Agron. Veter. Porto Alegre 6:85-93, 1963.

QUADRO 1. — Número de bactérias em inoculante úmido, preparado com duas estirpes de *Rhizobium phaseoli* e conservado em geladeira a 5°C

Estirpe	Tempo de armazenamento	<i>Rhizobium</i> /g inoculante (x 10 ⁷) (*)	Umidade do inoculante
	dias	n.º	%
SMS-371	2	405 b	33,3
	33	670 a	
	65	610 a	
	222	170 c	
	249	13 d	
C.V. (%)		5,3	
Tukey (5,0%)		80,0	
SMS-376	2	160 a	32,7
	36	260 a	
	68	225 a	
	215	51 b	
	242	12 b.	
C.V. (%)		28,7	
Tukey (5,0%)		162,6	

(*) Números seguidos de letras iguais não diferem significativamente.

O teor de umidade dos inoculantes, determinado por ocasião da segunda e da última amostragem, estava ao redor de 32,0% para a estirpe SMS-376 e 33,0% para a SMS-371. Freire e Jones (6) observaram decréscimos gradativos e maiores de *Rhizobium japonicum* conservado em condições e períodos semelhantes, com turfa não esterilizada. Esses autores comentaram, entretanto, sobre o baixo teor inicial de umidade dos inoculantes testados. Trabalhos realizados na Austrália, por

Roughley e Vincent (3), mostraram para a turfa investigada que os inoculantes com 30,0% de umidade eram muitos secos, provocando maiores taxas de mortalidade que os inoculantes úmidos.

Por outro lado, a taxa de mortalidade dos rizóbios em inoculantes com 60,0% de umidade dependia das espécies. Era baixa em *Rhizobium* spp, tipo "cow pea", e alta em rizóbios associados com alfafa e trevos. Julgando pelos dados obtidos no presente trabalho, um teor de umidade próxi-

mo de 33,0% propicia sobrevivência satisfatória para as duas estirpes de rizóbios estudadas.

Apesar dos decréscimos em relação ao número inicial, os inoculantes preparados com essas estirpes apresentaram, aos 240-250 dias de armazenamento, sob condições de refrigeração, número maior que $1,0 \times 10^8$ rizóbios/g de

inoculante úmido, superior, portanto, ao exigido pela legislação brasileira ($1,0 \times 10^7$ bactérias/g). Deve ser lembrado, entretanto, que o inoculante foi preparado com turfa esterilizada e que o número inicial de rizóbios era elevado. SEÇÃO DE MICROBIOLOGIA DO SOLO, INSTITUTO AGRONÔMICO DO ESTADO DE SÃO PAULO.

SURVIVAL OF RHIZOBIUM PHASEOLI IN STERILIZED PEAT

SUMMARY

Survival of *R. phaseoli* strains SMS-371 (=127 K-17, Nitragin Co. (USA) and SMS-376 (=CIAT-157, original CC-511) on peat was checked over a period of 240-250 days storage in the refrigerator.

The peat sample had been ground, limed (10% lime; final pH=7.0) and dried (80°C) for commercial use.

Both strains were cultivated on yeast manitol liquid media (pH=6.8) and mixed with the peat, when numbers of rhizobia were greater than 10^6 cells/ml, by direct counting.

Inoculant moisture was around 33%. Five plate counts were made in duplicate, during the storage period. In both strains a decrease in cell number was observed in the 4th counting date (215-222 days storage), but even so rhizobia population was greater than 1.2×10^8 at the final sampling.