

## AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE E CONSERVAÇÃO DE BACTÉRIAS ASSOCIADAS À SOJA APÓS MAIS DE 20 ANOS DE ARMAZENAMENTO POR ULTRACONGELAMENTO EM GLICEROL

Lucas Monteiro Fernandes<sup>1</sup>; Anna Livia Ramos Gouveia de Medeiros<sup>1</sup>; Ian Matheus Ganem dos Santos<sup>1</sup>; Leticia Moreschi Alves<sup>1</sup>; Luana Beatriz Dias de Albuquerque Ribeiro<sup>1</sup>; Luana Cristina Silva Lira<sup>1</sup>; Mariana Uchoa de Oliveira Santos<sup>1</sup>; Léia Cecilia de Lima Fávaro<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Embrapa Agroenergia. [\\*leia.favaro@embrapa.br](mailto:leia.favaro@embrapa.br)

Recursos genéticos microbianos se referem a linhagens de microrganismos que são taxonomicamente definidas, caracterizadas fisiologicamente, geneticamente estáveis, validadas, documentadas, com controle de qualidade e preservadas a longo prazo. A conservação da biodiversidade microbiana é essencial tanto para a manutenção dos ecossistemas quanto para o avanço científico em vários campos. A Coleção de Microrganismos e Microalgas Aplicados à Agroenergia e Biorrefinarias (CMMAABio) agrega valor a biodiversidade microbiana brasileira, impulsionando a bioeconomia. Neste trabalho foram avaliadas a viabilidade e a conservação apropriada de 481 bactérias epifíticas e endofíticas associadas à plantas de soja [(*Glycine max* (L.) Merrill)]. Essas bactérias haviam sido isoladas previamente de folhas, caules e raízes das cultivares Foscarin e Cristalina em diferentes estágios de desenvolvimento: vegetativo, florescimento e maturação. As plantas haviam sido cultivadas em áreas do Estado de São Paulo tratadas com herbicida glifosato e em áreas não tratadas nas safras 2000/2001 e 2001/2002. O primeiro estoque foi realizado com uma única repetição, sendo que na ocasião as bactérias foram cultivadas em caldo TSB 10% e conservadas em solução de glicerol 20%. Esse estoque permaneceu conservado no Departamento de Genética da ESALQ/USP até o ano de 2012, quando foi transferido mediante intercâmbio para a Embrapa Agroenergia mantendo-se até 2023 na forma original em ultrafreezer (-80°C), ou seja, por mais de 20 anos. Para o teste de viabilidade celular, as bactérias foram reativadas em placas de Petri contendo meio de cultura comercial TSA através da técnica de estria por esgotamento. As bactérias foram incubadas por até 7 dias a 28°C; sendo em seguida armazenadas em câmara fria. Quando diferentes tipos morfológicos cresceram na mesma placa, foi necessário realizar o repique para novo meio até a obtenção de culturas puras. Para a conservação, após a obtenção de culturas puras, uma colônia isolada de cada linhagem foi coletada e inoculada em 10 mL de caldo TSB e incubada *overnight* a 200 rpm e 28°C. Em seguida, cada linhagem foi transferida para criotubos e conservada em solução de glicerol 20% em ultrafreezer a -80°C, com cinco réplicas cada (cinco criotubos de 1,8 mL cada), acondicionadas em diferentes ultrafreezers. Além disso, o cultivo líquido restante foi centrifugado e as células resultantes foram congeladas em freezer (-20°C) para futura extração de DNA genômico e análise taxonômica molecular. Os resultados obtidos revelaram que todas as 481 linhagens do estoque original de mais de 20 anos estavam viáveis, apesar do tempo e condições de armazenamento e transporte. De todas as 481 bactérias, 144 apresentaram contaminação cruzada e foram purificadas. Assim, foram adicionadas 196 linhagens à esta coleção. Isto posto, foram conservadas adequadamente um total de 677 linhagens de bactérias associadas à plantas de soja. Dentre estas, há linhagens caracterizadas e documentadas em relação a sua capacidade de favorecer o desenvolvimento e o crescimento de plantas e precisarão passar por uma confirmação de identidade taxonômica posteriormente. Para isso, as etapas de extração de DNA genômico estão em andamento. Futuramente espera-se registrar as informações das linhagens no sistema AleloMicro da Embrapa.

**Palavras-chave:** bactérias endofíticas; coleção de microrganismos; *Glycine max*.

**Agradecimentos:** Ao CNPq (projeto 406335/2022-2) e a Embrapa (projeto 10.20.02.009.00.00) pelo apoio financeiro.