



NURY MARIEL LUTGARDA CAZON TAPIAS

**BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS SIMBIONTES
DE LEGUMINOSAS EM CANGA E EM ÁREA
DE MINERAÇÃO DE FERRO REVEGETADA
COM CAPIM**

LAVRAS-MG

2017

NURY MARIEL LUTGARDA CAZON TAPIAS

**BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS SIMBIONTES DE LEGUMINOSAS EM
CANGA E EM ÁREA DE MINERAÇÃO DE FERRO REVEGETADA
COM CAPIM**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, área de concentração em Biologia, Microbiologia e Processos Biológicos do Solo, para obtenção do título de Mestre.

Profa.Dra. Fátima Maria de Souza Moreira

Orientadora

Dra. Fernanda de Carvalho

Co-orientadora

**LAVRAS-MG
2016**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Tapias, Nury Mariel Lutgarda Cazón.

Bactérias diazotróficas simbiotes de leguminosas em Canga e em área de mineração de ferro revegetada com capim. / Nury Mariel Lutgarda Cazón Tapias. – Lavras : UFLA, 2016.

92 p. : il.

Dissertação (mestrado acadêmico) – Universidade Federal de Lavras, 2016.

Orientador(a): Fátima Maria de Souza Moreira.

Bibliografia.

1. Fixação biológica de nitrogênio. 2. Diversidade. 3. Campo rupestre. 4. Recuperação de áreas degradadas. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

NURY MARIEL LUTGARDA CAZON TAPIAS

**BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS SIMBIONTES DE LEGUMINOSAS EM
CANGA E EM ÁREA DE MINERAÇÃO DE FERRO REVEGETADA
COM CAPIM**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, área de concentração em Biologia, Microbiologia e Processos Biológicos do Solo, para obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 09 de setembro de 2016.

Profa. Dra. Fernanda de Carvalho	UFLA
Dr. Jessé Valentim dos Santos	UFLA
Profa. Dra. Rafaela Simão Abrahão Nóbrega	UFRB

Profa. Dra. Fátima Maria de Souza Moreira

Orientadora

**LAVRAS-MG
2016**

*A mi madre Nury, a mi padre César y a mis hermanas Milena y Anneli por su
constante amor, apoyo y dedicación a nuestra familia*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos Mestres Supremos a Sabedoria, a Paz, a Liberdade e a Elucidação liberados no mundo, à energia que flui num Universo de amor.

Gostaria de agradecer especialmente a minha Família, alicerce importante do meu universo, pela confiança, conselhos, cooperação, e acima de tudo pelo infinito amor. Adoro vocês.

À minha orientadora Professora Dra Fátima Maria de Souza Moreira pela clareza, apoio e rigor, sendo um modelo de objetividade, pelas oportunas sugestões e revisões na condução da pesquisa, além da compreensão nos momentos difíceis.

À minha co-orientadora Dra. Fernanda de Carvalho, pelas correções, por ter esclarecido as interrogações que foram surgindo ao longo da investigação, pela amizade, carinho, confiança e aprendizagem.

Ao Jessé pela coleta do material biológico que foi indispensável para a execução do trabalho, pela ajuda na escrita e pelas conversas e discussões filosóficas de temas pouco compreendidos e tão humanos e espirituais.

À Jacqueline, pela colaboração inestimável, pela paciência e bondade, por desenvolver um trabalho eficiente carregado de ideias criativas e por cuidar de mim.

À banca de defesa pela imediata disponibilidade e a valiosa contribuição neste trabalho.

Ao Departamento de Ciência do Solo e a todos os professores que destinaram parte de seu tempo e que de alguma forma contribuíram na conclusão dessa etapa de minha formação. À Dirce e Damy no PPGCS e à Juliana e toda sua equipe no DRI, pela assistência e competência no auxílio de nossas necessidades acadêmicas. À Denise por cuidar da gente.

À Universidade Federal de Lavras pela oportunidade dada e ao CNPQ, CAPES e OEA, pela concessão da bolsa de estudo que tornou possível a realização desse sonho.

Ao Projeto do edital Vale/FAPEMIG CRA-RDP 00136-10 pelo Suporte financeiro, a Capes pela concessão de bolsa a Mariel Cazon e ao CNPq pela bolsa de pos doutorado a Fernanda Carvalho e produtividade em pesquisa a Fatima M S Moreira.

Aos queridos colegas da microbiologia pelo magnífico trabalho em equipe e o apoio incondicional nas diversas atividades e nos lances da vida, pelos divertidos momentos de descontração e por terem aguentado as minhas bobagens, pelo afetuoso recebimento e as lembrancinhas ganhadas. Vocês fazem parte da minha vida e espero ter contribuído de alguma forma na sua caminhada. Gratidão especial para Aline, Linnajara, Marisângela, Karle Elzane, que aconchegaram minha alma com seu jeitinho de ser. Abraço imenso para Joana, Paula, Luciane, Márcia, Flávia L, Daniela, Júlia, Tainara, Anita, Juliana, Elismara, Alessandra, César C, Soraya, Mariana, Lorena, Gabriela, Jordana, Luiza, Elaine, Olavo, Ginaini, Amanda A, Amanda M, Flávia R, Rayssa, Raquel, e César P. Amo vocês.

Aos técnicos do Laboratório de Microbiologia do Solo, Marlene e Manuel, pela ajuda técnica e por estarem prontos a esclarecer minhas dúvidas.

À Vanuze, Cleber e Teotônio pela colaboração na resolução da estatística e matemática durante o mestrado.

A todo meu querido e encantador povo brasileiro e da cidade de Lavras, Dona Maria e Amanda, por terem me colhido como família de braços abertos, ao Luciano pelos adoráveis momentos divididos, ao Mituky pelo conforto, ao Edmar pela compaixão para com todos os seres, aos sorrisos dos Thiagos. Uma grande saudação a Cecília, Vitor, Bruno, Larissa, Bianca, Cristino, Ana Flávia, Cauê, Pablo, George, Lays e Jeésica. Também, quero agradecer com um carinho

especial, a todos os amigos do Departamento de Ciência do Solo e da UFLA e a todos que, embora não mencionados, contribuíram para o sucesso desta missão e para eu ser quem eu sou. Beijos para o Wharley, Dany, Matias, Ediu, Carolline, Malu, Thaís, Fábio, Sérgio, Douglas, Bruna e Fany.

A toda minha família estrangeira em Lavras, oriunda de todos os cantinhos do planeta, especialmente a Yojana, Lermen, Annelise, Adnane, Geslin, Yeinny e Nonoty pela ajuda, carinho, amizade, pelo estímulo quando o cansaço parecia me desabar e por estarem sempre presentes. Todos vocês são importantes para mim. Lembrarei das viagens, dos jantares, da alegria, das festas e do aprendizado.

A Elidiane e Fábio, um casal maravilhoso, por abrirem as portas da sua casa, numa etapa crítica na minha vida no Brasil, pelas sugestões e pelo apreço desinteressado. A Maíra pelo companheirismo e aos “nossos” cachorrinhos Tita e Minitito pela companhia. Vocês estão no meu coração.

Ao Ivanpor ser tão importante na minha vida. Obrigada pela paciência, ternura, ânimo e assistência durante o mestrado.

Aos meus primos, e gratidão calorosa às minhas primas, Helga e Andrea, por acreditarem constantemente em mim, pelo otimismo, pelas conversas e reflexões, e ao Baldemar por tornar, com suas piadas, mais leve minha caminhada.

À família Villarroel: Daisy, Nenita, Rider e Boris pelos serviços e detalhes, demonstrando tanta amabilidade e afeto.

A todos os membros da Fundação Gaia Pacha e aos meus estudantes e amigos na Bolívia, particularmente a Karol, Ricardo, Christian, Erikita, Nirvana e Carlos que, mesmo distantes, me apoiaram nessa jornada.

Por fim, aos que há pouco tempo já não estão presentes na minha família, por serem um modelo de coragem, inspiração, tolerância e amor: Kika e José. Ninguém vence sozinho, mais uma vez sou eternamente grata!

*Para abrir nuevos caminos, hay que inventar; experimentar; crecer, correr
riesgos, romper las reglas, equivocarse... y divertirse*

Mary Lou Cook

RESUMO

As formações ferríferas associadas ao ecossistema campo rupestre, denominadas canga, representam locais de diversidade de plantas e microrganismos, com um alto grau de diversidade e endemismo. Essas comunidades são adaptadas a ambientes únicos e limitantes, sendo capazes de desempenhar funções e processos essenciais na manutenção do solo. Estudos de diversidade de bactérias em campos rupestres mostraram a dominância dos gêneros *Bradyrhizobium*, *Rhizobium* e *Burkholderia*. A restauração dos habitats associados aos ecossistemas rupestres danificados por atividades de mineração é decretada como obrigação legal. Nesse contexto, o uso de leguminosas associadas com bactérias fixadoras de nitrogênio na recuperação de áreas degradadas tem caráter multifuncional, além de ser uma técnica acessível. O objetivo deste trabalho foi identificar espécies de bactérias diazotróficas simbiotes isoladas de nódulos de plantas de duas áreas pertencentes à mineradora VALE. Duas áreas foram estudadas: campo rupestre sobre bancada laterítica(canga), com predomínio de *Mimosa calodendron*; e um depósito de minério em reabilitação (capim), com vegetação predominante de gramíneas e presença espontânea das seguintes leguminosas: *Mimosa setosa*, *Mimosa sensitiva*, *Crotalaria incana*, *Chamaecrista nictitans*, *Neotonia wightii*, *Stylosanthes* sp, *Crotalaria spectabilis* e *Crotalaria lanceolata*. Foram realizadas coletas de nódulos em cinco pontos em canga e 12na área de reabilitação, e foram colhidos pelo menos cinco nódulos por planta. Os nódulos foram reidratados e desinfestados superficialmente. Após período de incubação, as colônias já purificadas foram caracterizadas morfológicamente. A caracterização genética das estirpes bacterianas foi obtida por meio do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA. No total foram obtidos 60 isolados bacterianos,sendo nove em canga e 51 em capim e foram sequenciados 24, os quais são representantes de sete dos nove grupos culturais. Houve predomínio de bactérias com crescimento lento (57%); em relação ao pH o predomínio foi de bactérias alcalinizantes (73,5%). A maior diversidade cultural foi encontrada para espécie *M. setosa* apresentando seis grupos culturais, seguido das espécies *Stylosanthes* sp. e *M.calodendron* com cinco grupos culturais. A espécie *C. icana* foi a que apresentou a menor diversidade na caracterização cultural dos seus isolados. Quanto à identificação genética, os gêneros nodulíferos encontrados foram *Bradyrhizobium* e *Burkholderia*, enquanto dentre o grupo das endofíticas, se obtiveram os gêneros *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Bacillus*,*Variovorax*, *Leifsonia*, *Stenotrophomonas* e *Sphingomonas*. As leguminosas *M. calodendron* na canga e *C. nictitans* na área em reabilitação apresentaram uma maior diversidade de bactérias. Ressalta-se que foi verificada a ocorrência de gêneros de bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas de leguminosas (BFNNL) tanto no ambiente preservado da canga

quanto na área em reabilitação, resultado positivo, uma vez que indica o potencial de uso dessas bactérias em programas de recuperação de áreas impactadas pela mineração de ferro.

Palavras-chave: Fixação biológica de nitrogênio. Diversidade. Campo rupestre. Recuperação de áreas degradadas.

ABSTRACT

The iron bands associated with rupestrian field, known as canga, displays a high degree of diversity and endemism. These communities of plants and microorganisms are adapted to unique and limiting environments, in which essential functions are performed, that results in soil maintenance. Diversity analyses in rupestrian fields, showed the dominance of *Bradyrhizobium*, *Rhizobium* and *Burkholderia*. It is a legal requirement to restore the habitats after detrimental impacts caused by mining activities. In this context, the low-cost technique of legume-root nodule symbiosis afforestation to recover degraded areas, has multiple benefits. The objective of this study was to identify species of associated diazotrophic bacteria, isolated from plants nodules in two areas that belong to the mining company Vale. Two areas were studied: rupestrian field on lateritic bench (canga), with predominance of *Mimosa calodendron*; and a rehabilitated area revegetated with grass on the deposition of soil removed from the opening of an iron mining, with predominant vegetation of *Braquiaria* and spontaneous presence of the following species: *Mimosa setosa*, *Mimosa sensitiva*, *Crotalaria incana*, *Chamaecrista nictitans*, *Neotonia wightii*, *Stylosanthes* sp., *Crotalaria spectabilis* and *Crotalaria lanceolata*. Nodule samples were collected at five points in canga and 12 points were sampled on the second area, collecting 5 nodules per plant. Nodules were stored in sterile flasks containing silica gel to prevent spoilage. The nodules were rehydrated and disinfected. After the incubation period, the colonies were purified and characterized morphologically. In order to verify the genetic diversity, the extraction of genomic DNA and the partial sequencing of the 16S rRNA gene was performed. From 60 strains isolated, nine found in canga and 51 on the rehabilitation area; 24 were sequenced which are representatives of seven from a total of nine cultural groups. Slow-growth bacteria (57%) were predominant, while there was a predominance of alkalizing bacteria (73.5%). Most phenotypic diversity was found in *M. setosa* with six cultural groups, followed by *M. calodendron* and *Stylosanthes* sp. which formed five cultural groups each. *C. incana* had the lowest diversity according to its strains' cultural characteristics. Genetically, the two most common nodule bacteria found were *Bradyrhizobium* and *Burkholderia*, whilst genera of *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Variovorax*, *Leifsonia*, *Stenotrophomonas* and *Sphingomonas* were the isolated bacterial endophytes strains. *M. calodendron* in canga and *C. nictitans* in the rehabilitation area showed the highest diversity. It is noteworthy, the occurrence of legume nodule bacteria (NFLNB) in both environments. This positive result indicates a potential use of these bacteria in Soil Recovery Programs.

Keywords: Biological nitrogen fixation. Diversity. Rupestrian field. Recovery of degraded areas.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –Pontos de coleta de nódulos, no município de Brumadinho-MG.....	62
Figura 2 –Pontos de coleta de nódulos, no município de Nova Lima-MG.....	63
Figura 3– Grupos culturais baseados no tempo de crescimento e reação do pH do meio de cultura.....	68
Figura 4–Número de estirpes isoladas das leguminosas no capim, aglomeradas por tipos culturais baseados no tempo de crescimento e alteração do pH do meio de cultura.....	69
Figura 5 – Número de estirpes isoladas das leguminosas na canga, aglomeradas por tipos culturais baseados no tempo de crescimento e alteração do pH do meio de cultura.....	72
Figura 6 – Distribuição das estirpes isoladas dos nódulos das leguminosas baseada nas características culturais.....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Número de isolados purificados do hospedeiro de origem.....	67
Tabela 2 – Número de estirpes sequenciadas e número de espécies encontradas no hospedeiro de origem.....	74
Tabela 3 – Identificação de estirpes com base nas sequências do 16S rRNA mais similares encontradas no GenBank.....	79
Tabela 4 – Caracterização cultural das 68 estirpes isoladas das mudas de espécies de leguminosas em campo rupestre e área de reabilitação após mineração de ferro, pertencentes a mineradora Vale, em Nova Lima-MG e Brumadinho-MG.....	90

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE.....	17
1 INTRODUÇÃO.....	19
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	21
2.1 Cerrado.....	21
2.2 Campos rupestres	24
2.3 Canga.....	27
2.4 Diversidade de BFN, nodulação e fixação biológica do nitrogênio nos Campos rupestres.....	29
2.5 Bactérias endofíticas diazotróficas.....	33
2.6 Papel das leguminosas na recuperação de áreas degradadas.....	35
REFERÊNCIAS.....	41
SEGUNDA PARTE – ARTIGO.....	53
ARTIGO1 – BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS SIMBIONTES DE LEGUMINOSAS EM CANGA E EM ÁREA DE MINERAÇÃO DE FERRO REVEGETADA COM CAPIM.....	54
REFERÊNCIAS.....	82
ANEXO.....	89

PRIMEIRA PARTE

1INTRODUÇÃO

Os campos rupestres ferruginosos ou couraças lateríticas denominados de vegetação de canga referem-se ao ecossistema formado de fitofisionomias herbáceo-arbustivas, associadas a afloramentos rochosos hematíticos (itabiríticos/jaspelíticos) sobre solos rasos (CARMO; JACOBI, 2013; VIANA; LOMBARDI, 2007), produto dos processos de lixiviação, intemperismo e pedogênese policíclica, presente no Quadrilátero Ferrífero em Minas Gerais (MG) e na Serra dos Carajás no Pará (DORR, 1969). Essa vegetação neotropical e azonal está composta por ilhas ou mosaicos de elementos florísticos distintivos que abrigam espécies ornamentais, medicinais e metalófilas (PORTO; SILVA, 1989; RIZZINI, 1997), inseridas dentro de uma matriz circundante de vegetação zonal, nos platôs mais elevados e nas cristas montanhosas. Veloso, Rangel Filho e Lima (1991) classificam essa vegetação como relíquias.

Essas regiões ricas em minerais apresentam um sério dilema. Resultante do isolamento, as comunidades presentes na canga apresentam uma alta diversidade e endemismo, desenvolvendo-se em condições ambientais oligotróficas e severas, mas a dinâmica e ocorrência dos seus ecossistemas é restrita, sendo os menos estudados de Minas Gerais ,encarando grande risco de extinção. O Quadrilátero Ferrífero é considerado como uma região de importância biológica extrema, sendo incluso dentro da Reserva da Biosfera da Cadeia do Espinhaço pela UNESCO em 2005 (DRUMMOND et al., 2005). Por outro lado, a mineração é uma das atividades essenciais na obtenção de matérias-primas e, apesar dos minérios da canga possuírem menor valor econômico, são explorados comercialmente em alguns locais. A estreita relação entre a lavra de minério e as fitofisionomias existentes na canga coloca o Complexo Rupestre em condição de vulnerabilidade. No entanto, a mineração implica uma intensa remoção e contaminação de solos e a deposição de um

considerável volume de metais traço. O Plano de Recuperação de Áreas Degradadas (PRAD) decreta a obrigação legal fundamental na restauração dos habitats únicos associados aos ecossistemas rupestres e a recuperação de áreas exploradas por operações de mineração (BRASIL, 1989).

A significativa diversidade da canga reflete uma alta diversidade de microrganismos inexplorada. Microrganismos desempenham papéis essenciais na funcionalidade do solo e na manutenção, restauração e resiliência dos ecossistemas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Muitas das bactérias que apresentam a capacidade de estabelecer simbiose e fixar nitrogênio em ambientes impactados têm sido isoladas em locais próximos ou foram isoladas no solo original antes das atividades de mineração.

A recuperação desses habitats apresenta desafios na busca de estratégias de reabilitação e soluções tecnológicas. Segundo Chaeret al. (2011), os principais desafios enfrentados na recuperação de terras severamente degradadas estão na gestão dos sistemas e na escolha da representatividade das famílias de plantas que crescerão sob as condições adversas comuns em solos degradados. As bactérias isoladas podem servir para futuros estudos de revegetação com leguminosas ou outras espécies na recuperação das áreas degradadas. Nesse contexto, o uso de leguminosas associadas com bactérias fixadoras de nitrogênio ou outros microrganismos, apresenta inúmeras vantagens na estabilização de matéria orgânica e dos agregados do solo, na distribuição, fixação e ciclagem de nutrientes nos ecossistemas, além de ser uma técnica de baixo custo.

Pelas razões citadas o objetivo deste trabalho foi identificar espécies de bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas de leguminosas (BFNNL) isoladas de nódulos de plantas de duas áreas pertencentes à mineradora VALE: um campo rupestre sobre bancada laterítica e em uma área de mineração de ferro revegetada com capim.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Cerrado

O Cerrado, segundo maior bioma na América Latina, ocupa a maior parte do interior do Brasil e algumas pequenas áreas contíguas na Bolívia e no Paraguai (RATTER; RIBEIRO; BRIDGEWATER, 1997). No Brasil está localizado principalmente no Planalto Central e em área representa o segundo maior bioma, ocupando o 23% do território, superado apenas pela Floresta Amazônica (RIBEIRO; WALTERS, 2008). O Cerrado é a savana mais rica e diversificada do mundo e tem sido classificado como um dos hotspots de biodiversidade terrestres mais importantes (MYERS et al., 2000). Além disso, o Cerrado é importante como um corredor ecológico para as espécies que habitam a floresta Amazônica e a Mata Atlântica (RAMPELOTTO et al., 2013). No entanto, as estimativas da sua verdadeira diversidade não são claras.

A vegetação apresenta fisionomias que englobam formações florestais, savânicas e campestres (RIBEIRO; WALTERS, 2008). Embora, algumas comunidades vegetais do Cerrado são encontradas em outros biomas, a fisionomia da flora do Cerrado é geralmente exclusiva deste bioma (RIZZINI et al., 1997). As fisionomias do Cerrado são os principais determinantes dos padrões do funcionamento biológico no solo. As fisionomias florestais exibem uma maior atividade e biomassa microbiana quando comparadas com pastagens e fisionomias savânicas (CARVALHO MENDES et al., 2012).

O Cerrado varia de uma floresta lenhosa alta na savana, na qual a dossel das árvores é quase fechada e não existe a presença de gramíneas, a uma pastagem baixa e aberta, normalmente uma camada de gramíneas, ervas e subarbustos. Ao longo de corpos d'água, o Cerrado é substituído por florestas de galeria ou pântanos sazonalmente alagados (RATTER; RIBEIRO;

BRIDGEWATER, 1997). Muitas espécies mostram um gradiente latitudinal de diversidade florística nas regiões sul e oeste do Brasil (OLIVEIRA-FILHO; RATTER, 1995). A maioria dos solos desse bioma são latossolos e argissolos altamente intemperizados, existindo a presença de alguns entissolos. São solos ácidos, ricos em óxidos de ferro e alumínio, de baixa fertilidade com sérias limitações para a produção de alimentos (LOPES; GUILHERME, 2016).

O Cerrado vem sendo alvo de investigações biológicas diversas que projetam esclarecer e definir aspectos estruturais que caracterizam a sua vegetação (RIZZINI et al., 1997). O bioma possui uma rica nomenclatura fitofisionômica. Contudo, as várias propostas de classificação vigentes na literatura são empíricas e confusas, e ratifica-se uma frequente invenção, adaptação e registro de nomes para as paisagens próprias do bioma Cerrado, desconsiderando trabalhos prévios, o que tem consequências na conservação vegetal (RIBEIRO; WALTERS, 2008).

Os critérios adotados na classificação por Ribeiro et al. (1983) são fundamentados preliminarmente na fisionomia, definida pela estrutura, formas de crescimento predominante e mudanças estacionais. Posteriormente, consideram-se fatores edáficos e da composição florística. Assim sendo, os onze tipos principais de vegetação são enquadrados em formações florestais (Mata Ciliar, Mata Seca, Mata de Galeria e Cerradão), formações savânicas (Cerrado *stricto sensu*, Parque de Cerrado, Vereda e Palmeiral) e campestres (Campo Rupestre, Campo Limpo e Campo Sujo). *Mimosa*, o táxon mais numeroso no bioma, é um bom indicador da estrutura fitogeográfica do Cerrado com base nas diferenças na distribuição de espécies (MENDONÇA et al., 1998), que é um importante centro de diversidade e endemismo (SIMON; PROENÇA, 2000).

O surgimento da produção agrícola no Cerrado é considerado como uma das maiores conquistas da agricultura no século passado. Na década de 1960 começou-se a desenvolver diligentemente esta área, utilizada principalmente

para pecuária. Estimativas recentes apontam que a agricultura brasileira será responsável por 40% da produção total de alimentos e, nesse contexto, o Cerrado é uma região chave (LOPES; GUILHERME, 2016).

Apesar da importância ecológica e econômica do Cerrado, pouco se sabe sobre a diversidade, abundância e estrutura das comunidades microbianas do solo. Embora a maioria dos estudos tem-se centrado sobre a diversidade de flora e fauna e poucos estudos têm comparado áreas nativas com áreas convertidas em pastagens ou agricultura (CASTRO et al., 2002). São também necessários mais estudos populacionais sobre o estado de conservação, registro e gestão de comunidades vegetais. A compreensão de como o uso da terra afeta comunidades microbianas é fundamental para a gestão sustentável dos ecossistemas agrícolas. A expansão das áreas protegidas existentes, infraestrutura adequada, proteção do local e políticas rígidas são essenciais para sua conservação (SIMON; PROENÇA 2000), sendo a expansão urbana, conversão de habitats autóctones em pastagens, extração de rocha, produção agrícola ou mineração grandes ameaças para a sua preservação (SIMON; HAY, 2003).

O Cerrado, principalmente em Minas Gerais e Goiás, apresenta uma substancial riqueza de espécies vegetais e o maior número de restritas e endêmicas, principalmente em áreas de campos rupestres, onde as associações de áreas abertas e margens da floresta, solos úmidos ou secos e altitudes elevadas condicionaram a especiação de alguns gêneros de plantas (FERNANDES et al., 2016a). Uma combinação de várias espécies amplamente distribuídas e localmente endêmicas são compartilhadas no Cerrado e no campo rupestre em algumas regiões, como Carajás (SCHAEFER et al., 2015). No entanto, um número considerável de espécies semelhantes entre si, no Cerrado e nos campos rupestres, tem distribuições regionais ou endêmicas (FERNANDES

et al., 2016a). Embora ocorrendo em altas densidades, as espécies raras têm uma distribuição geográfica muito restrita, o que as torna mais suscetíveis à extinção.

2.2 Campos rupestres

Campo rupestre é um complexo de vegetação azonal e endêmica neotropical do Brasil, composta por comunidades vegetais distintas com afinidades florísticas diversificadas, formando um mosaico de "arquipélagos" inserido dentro de uma matriz de vegetação zonal; nos topos das regiões montanhosas, principalmente nos domínios do Cerrado e da Caatinga do escudo brasileiro, nas regiões Sudeste, Nordeste e Centro-Oeste (ALVES et al., 2014; CONCEIÇÃO et al., 2016; SCHAEFER et al., 2015).

Essas cadeias de montanhas são extremamente importantes do ponto de vista geoambiental e os campos rupestres são encontrados nas mais variadas litologias (SCHAEFER et al., 2015), formando planaltos ou cadeias de montanhas: Serra do Espinhaço-Chapada Diamantina, composta principalmente por quartzitos; Serra da Mantiqueira, com predominância de rochas plutônicas (granito) e metamórficas (migmatitos, gnaiss); Tepuy de Roraima, basicamente formada a partir de metarenitos e quartzitos; Serra dos Pirineus e Serras do Planalto Central; Serras de Ricardo Franco e Santa Bárbara em Mato Grosso, composta principalmente por metarenitos; Serra de Carajás com jaspilite e itabirites e o Quadrilátero Ferrífero, com itabirites e quartzitos (SCHAEFER et al., 2016). A Serra do Espinhaço no Brasil é a área matriz dos campos rupestres. Essas montanhas estão rodeadas por Cerrado e Mata Atlântica na sua porção sul (MG), e na sua porção norte (Estado da Bahia) a vegetação matriz é a Caatinga (CONCEIÇÃO et al., 2016). O Quadrilátero Ferrífero é considerado como uma região de importância biológica extrema, sendo incluso dentro da

Reserva da Biosfera da Cadeia do Espinhaço pela UNESCO em 2005 (DRUMMOND et al., 2005).

De modo geral estes habitats ocorrem em solos arenosos ou cascalhentos, rasos, ácidos, pobres, de baixa fertilidade (GIULIETTI et al., 1987). Dada a natureza da rocha que deu origem aos campos rupestres, os solos são susceptíveis a drenagem pesada e/ou lixiviação, e são excepcionalmente pobres. Os solos de origem quartzarênico têm um alto teor de alumínio (CARVALHO et al., 2014) e areia (SCHAEFER et al. 2015), enquanto os solos presentes na canga apresentam níveis elevados de metais pesados (JACOBI et al., 2007) e uma textura mais rica em argila e silte (SCHAEFER et al., 2015). A ocorrência de solos peculiares nas superfícies rochosas revela uma adaptação extraordinária de plantas a um cenário edáfico física e quimicamente restritivo (ALVES et al., 2014).

Foram identificados três diferentes tipos de vegetação nos campos rupestres. A fisionomia dos campos rupestres é aberta, herbácea e/ou arbustiva e as diferenças de vegetação foram associadas com variações na química, profundidade e acidez do solo (SCHAEFER et al., 2015), ainda assim, são as diferenças físicas encontradas entre os solos de campo rupestre, as que interveem na disponibilidade de água em curtas distâncias. A natureza irregular de campos rupestres é altamente influenciada pela profundidade do solo e a repercussão do fogo. Os diferentes habitats (cerrado, afloramentos rochosos, campos de areia, pântanos, pradarias de pedra) apresentaram comunidades de fungos micorrízicos arbusculares (FMA), cuja diversidade provavelmente exerce uma influência nos padrões distintos de diversidade de vegetação entre os diferentes habitats que constituem os campos rupestres (CARVALHO; SOUZA; CARRENHO,2012). Entretanto, os autores não encontraram uma correlação significativa entre a diversidade de plantas e fungos, embora as comunidades apresentem padrões distintos de organização, de acordo com o tipo de habitat.

A alta biodiversidade e endemismo dos campos rupestres são influenciados pelas variações de latitude e altitude (900 a 2000 m) (MOTTA et al., 2016), orientação e declividade do terreno, insularidade e antiguidade, na criação de uma grande variedade de microclimas onde a temperatura, luz e umidade variam enormemente (FERNANDES et al., 2016a), destacando-se fendas e depressões, pequenos corpos d'água temporários e cavernas (JACOBI et al., 2007).

Uma das famílias vegetais mais ricas em espécies nos campos rupestres é Leguminaceae (GIULIETTI et al., 1997), com cerca de 343 espécies distribuídas em 50 gêneros (DUTRA, 2005). Os estudos exclusivos sobre essa importante família são escassos, tendo como referência as pesquisas filogenéticas, com base em morfologia de Dutra, Messias e Garcia (2005), além dos trabalhos de Queiroz (2004) e Conceição et al., (2003) (DUTRA; GARCIA; LIMA, 2008).

O gênero *Mimosa*, dos campos rupestres de MG, apresenta hábito muito variável, com potencial econômico representado por diversas espécies medicinais, forrageiras e madeireiras, sendo majoritariamente espécies herbáceas, subarbustivas ou arbustivas (DUTRA; GARCIA; LIMA, 2008). Geograficamente, o gênero está representado nestes campos por 97 táxons e o Espinhaço Central é a região com maior diversidade de Mimosas nos campos rupestres de MG (48,5), seguida pelo Quadrilátero Ferrífero (36%) (DUTRA et al., 2005). A espécie *Mimosa calodendron* é endêmica dos campos rupestres ferruginosos (FERNANDES et al., 2016a), foi frequentemente encontrada em associação com plântulas de outras espécies, principalmente orquídeas e proporciona locais de germinação e sombreamento graças a sua densa cobertura vegetal, proteção física contra o vento, promovendo a retenção de matéria orgânica e umidade (GIULIETTI et al., 1987). Plantas com essa função facilitadora na comunidade recebem o nome de plantas-berçário (PADILLA;

PUGNAIRE, 2006). Estudos taxonômicos detalhados abordando a riqueza de *Chamaecrista* nos campos rupestres e na Região Centro-Oeste do Brasil inexistem (SOUZA; BORTOLUZZI 2012), embora haja informação sobre a diversidade no Cerrado (DANTAS; SILVA, 2013) e nas fisionomias savânicas do centro-leste, onde o gênero é abundante (GIULIETTI et al., 1987). Informações sobre a diversidade do gênero na região do Cerrado são encontradas principalmente no estudo de Irwin e Barneby (1982). A riqueza de *Stylosanthes* está bem representada nos extensos estratos arbustivos herbáceos prevalentes em campos rupestres (RIBEIRO; WALTERS, 2008; SCHAEFER et al., 2015). A planta mais estudada do gênero *Crotalaria* é a espécie *Crotalaria juncea*, uma espécie invasiva nos campos rupestres (FERNANDES et al., 2016b)

O conhecimento sobre campos rupestres é fundamental para ações de conservação e para o desenvolvimento de práticas de restauração, devido à crescente pressão causada por uma multiplicidade de fatores sobre o ecossistema, principalmente a falta de planos de avaliação ambiental e a inadequada gestão, o que se vê refletido na conversão dos campos rupestres à agricultura e mineração, aumento da frequência da ação do fogo, introdução de espécies exóticas, ecoturismo incontrolável, construção de estradas, mudanças climáticas, dentre outros fatores (FERNANDES et al., 2014; MOURÃO; STEHMANN, 2007; SILVEIRA et al., 2016).

2.3 Canga

Canga refere-se ao ecossistema campo rupestre associado com crosta de ferro superficial, produto dos processos intempéricos, presente na região do Quadrilátero Ferrífero em Minas Gerais e na Serra dos Carajás no Pará. A fisionomia dos campos rupestres ferruginosos é associada com afloramentos

rochosos compostos por Fe (itabiritos, jaspilitos), formados a partir da decomposição de substratos ferruginosos (BENITES et al., 2003). A área total coberta por canga é cerca de 100 km² (DORR, 1969). A canga é um minério secundário, constituído de brecha de hematita cimentada por limonita, ou diamictitos ferruginosos originados por processo de lixiviação e intemperismo e posterior enriquecimento de ferro (CARMO; JACOBI, 2013). No Brasil, ocorrem principalmente em ilhas de vegetação aberta. Apesar de apresentar um baixo teor de ferro e um teor de fósforo elevado, tem sido utilizado pelas usinas a carvão vegetal em razão de sua porosidade, que torna sua redução mais fácil (SCHAEFER et al., 2008).

O ecossistema canga foi esculpido durante milhares de anos o que deu origem à evolução de comunidades que prosperam em condições ambientais únicas, limitantes e severas. Floristicamente, Veloso, Rangel Filho e Lima (1991) classificam essa vegetação como relíquias. A estreita relação entre a lavra de minério e as fitofisionomias existentes na canga coloca o Complexo Rupestre em condição de vulnerabilidade.

As formações ferríferas bandadas são sedes da diversidade de plantas, adaptadas a ambientes oligotróficos, ao redor do mundo (JACOBI et al., 2007; VIANA; LOMBARDI, 2007). O processo abarca uma adaptação à exposição da alta radiação ultravioleta (UV), altas temperaturas diárias, perda rápida de água, ventos fortes e cobertura do solo pouco desenvolvido (MOURÃO; STEHMANN, 2007; VIANA; LOMBARDI, 2007), solos irregulares de escassa profundidade e fertilidade (TEIXEIRA et al., 2010), alta concentração de ferro oxidado, insuficiente retenção de água, incidência frequente de fogo, ventos permanentes, oscilação diária de temperaturas, concentrações de metais potencialmente tóxicos, insolação e seca (JACOBI et al., 2007; SANTOS; VARAJÃO 2004). As espécies de plantas podem reter altas concentrações de metais em seus tecidos (PORTO; SILVA, 1989; SILVA, 1992; VINCENT;

MEGURO, 2008) e apresentar nanismo (MEIRELLES; MATTOS; SILVA, 1997; PORTO; SILVA, 1989). Por consequência, a vegetação revela numerosas adaptações fisiológicas, reprodutivas, anatômicas, morfológicas e bioquímicas (SILVEIRA et al., 2016), sendo distintiva estruturalmente da vegetação circundante (JACOBI et al., 2007; YATES et al., 2007).

O campo rupestre aberto apresenta afloramentos rochosos ricos em Fe raramente superiores a 10 cm. Ora os solos dos campos rupestres arbustivos são ligeiramente mais profundos, podendo atingir 30 cm (VINCENT; MEGURO, 2008). A canga é muito mais fragmentada, dando lugar a uma terra solta de fácil penetração das raízes, já com o desenvolvimento do solo são comumente encontradas árvores, formando pequenas ilhas redondas de floresta geralmente associada a depressões ou sistemas de cavernas, de sedimentos finos (SCHAEFER et al., 2015).

A vegetação das cangas, sustentada pela maior influência de elementos florísticos do domínio Atlântico, tem alta frequência de sinúcias formadas por árvores e arbustos, em que sobressai a riqueza dos gêneros *Solanum*, *Andropogon* e *Cattleya* (CARMO; JACOBI, 2013). As ervas (37%) constituem a forma decrescimento mais frequente entre as espécies, seguida pelos arbustos (21%), subarbustos (20%), árvores (11%) e trepadeiras (10%). Parasitas e palmeiras somam 1%. Outra situação que distingue a vegetação das cangas é a pouca atuação de elementos florísticos de Eriocaulaceae e Xyridaceae na fisionomia ou aspecto estrutural campestre (VIANA; LOMBARDI 2007).

2.4 Diversidade de BFN, nodulação e fixação biológica do nitrogênio nos campos rupestres

A pesquisa de conservação nos trópicos tem-se centrado sobre os ecossistemas florestais, negligenciando os ambientes de campo e Cerrado, entre

outros (SILVEIRA et al.,2016). Portanto, a diversidade de bactérias capazes de nodular espécies de leguminosas e a fixação biológica do nitrogênio na região é pouco conhecida, apesar de os microrganismos desempenharem papéis essenciais na funcionalidade do solo, e na manutenção e restauração dos ecossistemas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

A maior parte do nitrogênio fixado anualmente é mediada pelos microrganismos diazotróficos que reduzem o N_2 atmosférico a NH_3 e quebram a tripla ligação entre os dois átomos de nitrogênio por meio da nitrogenase. Essa enzima, extremamente sensível ao oxigênio, é composta pela Fe-proteína que coleta a força redutora e energia, e pela Fe-Mo que coleta e reduz o substrato (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). A fixação biológica do nitrogênio é considerada o segundo processo bioquímico mais importante do planeta depois da fotossíntese e da decomposição orgânica (MOREIRA et al., 2008). Os diazotróficos são representados por aeróbios, anaeróbios e anaeróbios facultativos, apresentando uma alta diversidade morfológica, fisiológica, genética e filogenética, garantindo, assim, a resiliência em um determinado ecossistema, como também a ocorrência destes organismos nos mais diferentes tipos de habitat (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; SANTOS et al. 2016).

Microrganismos do solo são os principais agentes que regulam o ciclo de nutrientes no solo. Por conseguinte, o conhecimento do tamanho e da atividade do componente microbiana dos solos de cerrado, sob diferentes fisionomias, pode ajudar na compreensão de mudanças no balanço de carbono, no fluxo de energia e fluxos de gases de efeito estufa em áreas que se mudaram para atividades agrícolas. Além disso, porque a atividade e biomassa de microrganismos do solo são consideradas indicadores ecológicos sensíveis da degradação do solo (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; SANTOS et al. 2016).

Em campos rupestres, há perdas contínuas de nitrogênio do sistema, predominantemente devido aos regimes de queimadas. O fogo é empregado na

renovação de pastagens naturais para o gado, gestão de floração das flores sempre vivas e na caça (ALVES et al., 2011). Também, os acidentes causam incêndios nestes campos (MESQUITA et al., 2011). Todavia, cada área de diferentes habitats rupestres parece responder de forma peculiar. É plausível que a disponibilidade muito baixa do fósforo em campos rupestres limita a fixação simbiótica. Aliás, algumas espécies são incapazes de nodular em solos empobrecidos, a menos que esses habitats sejam colonizados por FMA que aumentam a absorção de P da planta (SPRENT, 1979; VITOUSEK et al., 2002). Sabe-se recentemente que o campo rupestre é um hotspot de um importante grupo de FMA (CARVALHO; SOUZA; CARRENHO, 2012). O importante papel ecológico destes fungos na ciclagem de nutrientes é revelado principalmente em relação ao nitrogênio e fósforo, nos campos rupestres (FERNANDES et al., 2014).

Na maior parte das pesquisas da nodulação nas leguminosas pouco se compreende a respeito da frequência de nodulação e relevância dos dados ecofisiológicos na fixação de N₂ em campos rupestres. Outrora, o trabalho de Reiset al. (2010) fornece informação nos campos rupestres do Cerrado e da Caatinga. Os autores testaram a presença de nitrogenase por imunomarcacão com um anticorpo contra uma subunidade da nitrogenase. A maioria das espécies apresentava atividade dessa enzima. A nodulação foi observada em 67 das 70 espécies coletadas. Na verdade, dados quantitativos são necessários para entender a importância da fixação de nitrogênio em campos rupestres e ilustrar a entrada de nitrogênio no sistema (FERNANDES et al., 2014; SPRENT et al., 2007).

Distintos mosaicos de campos rupestres, localizados na Serra do Cipó, foram os locais onde Carvalho (2010) isolou bactérias provenientes de solos usando como as espécies *Mimosa atropurpureum* e *Mimosa tenuiflora* como plantas iscas. Ambas as plantas mostraram predomínio dos gêneros *Rhizobium* e

Burkholderia. Uma alta diversidade de BFNNL pode ser fruto da diversidade da família Leguminosae na região tropical, evidenciando a utilidade dos estudos de bactérias isoladas nestas regiões e especificamente em campos rupestres.

O potencial de estirpes de *Burkholderia* oriundas de campos rupestres, quanto à eficiência simbiótica em simbiose com *Mimosa bimucronata*, *Mimosa foliolosa* e *Mimosa atropurpureum*, foi estudado por Araújo et al. (2014). A autora verificou a relação quanto à eficiência simbiótica de 14 estirpes de *Burkholderia* em simbiose com as três leguminosas. Essas estirpes foram previamente isoladas dos nódulos de leguminosas cultivadas em solos de distintos habitats de campos rupestres, localizados na Serra do Cipó por Carvalho (2010). A interação entre *Burkholderia* com *Mimosa*, ilustra a afinidade e o sucesso na simbiose, uma vez que todas as estirpes testadas foram capazes de nodular a espécie *M. bimucronata*, enquanto um 86% das espécies de *M. foliolosa* tiveram a capacidade de estabelecer simbiose, e ambas as espécies vegetais mostraram um crescimento favorecido. Todavia, *Burkholderia* foi ineficiente na promoção do crescimento de *M. atropurpureum* e apenas um 14% das bactérias formaram nódulos nos tecidos vegetais.

Uma nova estirpe bacteriana gram-negativa, não formadora de esporos com a capacidade de solubilizar fosfato altamente insolúvel, designada FeG101, foi isolada por Valverde et al. (2006), a partir de um minério com alta concentração de ferro de Minas Gerais, Brasil. Com base na sua caracterização genotípica e fenotípica foi classificada dentro do gênero *Burkholderia*. Muitas cepas de espécies de *Burkholderia* têm, entre outras propriedades, a capacidade de solubilizar minerais fosfatados altamente insolúveis e, conseqüentemente, são de significativo interesse para o sector agrícola no que diz respeito à sua aplicabilidade em biofertilização (ARTURSSON; FINLAY; JANSSON, 2006). Além disso, esta propriedade também pode ser economicamente útil para as indústrias emergentes, como a biomineração.

Estirpes isoladas de áreas reabilitadas depois de mineração de bauxita, na região ocidental da Amazônia são potenciais promotoras de crescimento no siratro e no feijão caupi. Oliveira-Longattietal.(2014) estudaram processos relacionados à eficiência no desenvolvimento das plantas, tais como: produção de ácido indol acético (AIA), solubilização de fosfatos inorgânicos de cálcio e alumínio, fixação biológica de nitrogênio nos organismos de vida livre, e outros mecanismos que atuam indiretamente. A espécie *Burkholderia fungorum* foi capaz de fixar nitrogênio. A máxima produção de AIA foi realizada por *Enterobacter*sp. (UFLA 03-14). A maioria das estirpes mostrou resistência a antibióticos.

A capacidade para executar processos adicionais sugere a formulação de inoculantes proveitosos como potenciais suplementos de fertilizantes, herbicidas, fungicidas, além de promover o crescimento vegetal (ADESEMOYE; KLOEPPER,2009). Neste sentido, pesquisas estão focadas no desenvolvimento de inoculantes microbianos, promissores componentes que auxiliam na melhoria da qualidade ambiental.

2.5 Bactérias endofíticas diazotróficas

A definição do endófito mudou nos últimos anos e o conhecimento da ecologia e interações de endófitos e plantas ainda é arbitrário. As bactérias endofíticas diazotróficas são microrganismos que colonizam os tecidos internos das plantas, pelo menos num período do seu ciclo vital (HARDOIM et al., 2005) e fixam N₂ atmosférico, sem causar sintomas de doenças (DÖBEREINER, 1992). Ao colonizar tecidos internos da planta, os microrganismos endofíticos permanecem protegidos de estresses bióticos e abióticos (TAURIAN et al., 2012). As raízes são o local preferencial para as bactérias endofíticas diazotróficas, e são os organismos competentes os capazes de se espargir

sistemicamente ao longo de toda a planta durante o desenvolvimento do hospedeiro (UDE et al., 2006;SPRENT, 2007, TAURIAN et al., 2012,).

A composição das comunidades de endófitos é governada por fatores bióticos e abióticos, sendo os mais importantes o genótipo e o estágio de desenvolvimento do hospedeiro, assim como fatores do ambiente a partir do qual se originam (tal como as características do solo) (HARDOIM et al., 2005). Estudos moleculares mostraram que o tipo de solo foi o fator influente mais importante da composição da comunidade bacteriana, seguido do estágio de desenvolvimento da planta (CHANWAY, 1996) e a magnitude dos efeitos pode diferir entre sistemas diferentes (HARDOIM et al., 2005).

Embora a eficiência de fixação de nitrogênio nas raízes em organismos de vida livre é mais baixa, o processo tem implicações na promoção de crescimento das plantas e seus processos biológicos (HARDOIM et al., 2005), sendo uma exceção a relativamente alta eficiência observada nas linhagens de *Gluconacetobacterdiazotrophicus* em simbiose com plantas de cana de açúcar (DONG et al., 1994). *Acetobacterdiazotrophicus*, *Herbaspirillum*spp.e *Azoarcus* spp. são endófitos capazes de fixar nitrogênio. Aliás, as bactérias endofíticas podem promover o crescimento da planta através da solubilização de fosfatos (ARAÚJO; HUNGRIA, 1999; MARRA et al., 2011; SILVA, 2012; SILVA et al., 2012) ou outros mecanismos como a produção de ácido indol acético (SPAEPEN; VANDERLEYDEN; REMANS,2007) ou outros hormônios (ARAÚJO; HUNGRIA, 1999). As bactérias também podem interagir positivamente com as plantas através da produção de biofilmes ou antibióticos que as protegem contra agentes patogênicos potenciais (UDE et al., 2006) ou por degradar compostos vegetais produzidos em solos que de outra forma seriam alelopáticos (TAURIAN et al., 2012). A capacidade das bactérias para colonizar

tecidos vegetais é uma característica desejável na produção de inoculantes (UDE et al., 2006)

Em resumo, vários efeitos dos endófitos sobre os hospedeiros de origem podem ser explicados por diversos mecanismos, o que sugere que novas propriedades permanecem a ser identificadas entre os endófitos. De maneira geral, os endófitos pertencem principalmente a quatro Filos, abrangendo muitos gêneros e espécies. As suas funções não podem ser atribuídas ou relacionadas claramente à taxonomia e parecem depender do hospedeiro e parâmetros ambientais.

2.6 Papel das leguminosas na recuperação de áreas degradadas

O conhecimento relativo sobre as comunidades vegetais localizadas nas formações ferruginosas do Quadrilátero Ferrífero revela a presença de sua rica diversidade, endemismo e ameaças de extinção (JACOBI et al., 2007), sendo primordial o diagnóstico do solo no Quadrilátero Ferrífero no desenvolvimento de técnicas para a regeneração da vegetação nativa, em áreas danificadas por atividades de mineração. Recentemente um número crescente de estudos ecológicos em campos rupestres, contribui para suscitar a atenção da comunidade internacional, ação crucial para o desenvolvimento das atividades de conservação e práticas de restauração e de gestão (FERNANDES et al., 2014).

O Plano de Recuperação de Áreas Degradadas decreta a obrigação legal fundamental na restauração dos habitats únicos associados aos ecossistemas rupestres e a recuperação de áreas exploradas por operações de mineração, apoiada pelas políticas nacionais para a biodiversidade, bem como muitas leis estaduais, federais e municipais (BRASIL, 1989). Há igualmente regulamentos acessórios, tais como a instrução ABNT NBR 13030, que exigem a restauração

de áreas mineradas com espécies nativas (ABNT, 1999). De acordo com o Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, a recuperação de uma área degradada está ligada a um plano preestabelecido, com condições e valores estáveis para uso do solo (IBAMA, 2003). O conhecimento acerca do uso adequado determina os procedimentos necessários na elaboração desses programas, o prazo estabelecido no levantamento de dados ambientais, bem como o conhecimento disponível dos processos de reabilitação de áreas mineradas, conjunto de etapas para evitar a sua degradação (BARRETO et al., 2001, SANTOS et al. 2001), assim como para aquisição de resultados efetivos (TEODORO et al., 2011), restabelecendo o seu potencial de produção (CHAER et al., 2011; SANTOS et al. 2001).

É fato declarado um retorno financeiro garantido das atividades de mineração. A relevância da mineração no Brasil é refletida no 5% do PIB nacional e alcança aproximadamente a produção de 70 minerais, empregados nas indústrias petroquímicas, metalúrgicas, siderúrgicas e na fabricação de fertilizantes (BARRETO, 2001). Particularmente, as áreas de mineração geram ganhos lucrativos privados de curto ou médio prazo, em detrimento de muitos outros serviços do ecossistema.

Áreas perturbadas causam um impacto grave sobre os microrganismos, a vegetação e os processos funcionais do ecossistema, que resulta na perda de biodiversidade e uma diminuição na provisão de serviços ambientais (MECHI; SANCHES, 2010). O processamento de metais deteriora paisagens e contamina solos, sendo que essas áreas podem causar impacto sobre ambientes imaculados longe do local original (FERNANDES, 2014; SANTOS et al. 2001). Além do mais, toda atividade de mineração implica a intensa remoção e/ou movimentação do solo, supressão de vegetação e a deposição de um considerável volume de rejeitos e metais pesados no solo. Todos os impactos anteriormente referidos podem acarrear impedimento da regeneração das

plantas, erosão e perda da matéria orgânica, interrupção das migrações da biota, afugentamento e morte da fauna, assoreamento de nascentes e outros corpos d'água, rebaixamento do lençol freático, turbidez e sedimentos em suspensão nos rios apresentando instabilidade das margens nos mesmos, liberação de gases tóxicos, poluição sonora, alterações microclimáticas, risco de deslizamento de terra e baixo potencial de ecoturismo (BARRETO, 2001; FERNANDES, 2014;MECHI; SANCHES, 2010; SANTOS et al. 2001).

Pelas razões citadas, esta situação requer novas soluções tecnológicas para a recuperação desses habitats e o monitoramento contínuo para verificar a eficiência da técnica empregada. Estratégias de reabilitação incluem a fitorremediação, biorremediação, uso de mantas biocolonizadoras e a substituição de solos deteriorados (GÓMEZ-SAGASTI et al., 2012; REZENDE, 2013; SANTOS et al. 2016).

Segundo Chaeret al. (2011), os principais desafios enfrentados na recuperação de terras severamente degradadas estão na gestão dos sistemas e na escolha de espécies de plantas que crescerão sob as condições adversas comuns em solos deteriorados. Projetos de reabilitação de áreas degradadas devem utilizar uma variedade grande de espécies, sendo um dos critérios de escolha, a representatividade de suas famílias tanto em número de espécies quanto em abundância de indivíduos, uma vez que essa é uma indicação do sucesso do táxon num ambiente particular (JACOBI; CARMO; VINCENT, 2008). Pesquisas recentes sobre a utilização de plantas-berçário como é o caso da espécie *Mimosa calodendron* na restauração de ambientes degradados demonstraram as vantagens desses serviços ecológicos, com efeitos positivos na comunidade, como a otimização da sucessão vegetal (CASTRO et al., 2002; PADILLA; PUGNAIRE, 2006). Neste sentido, é evidenciada a representatividade e importância das leguminosas quanto ao seu emprego genérico na reabilitação de áreas degradadas. O uso de leguminosas arbóreas,

arbustivas e herbáceas associadas com bactérias fixadoras de nitrogênio e fungos micorrízicos na recuperação, de áreas degradadas apresenta várias vantagens.

Segundo Lewis et al. (2005), a família botânica Leguminosae é uma das mais importantes, numerosas e diversas nas regiões tropicais. De acordo com Bertoni Lombardi Neto (2008), essas plantas exercem um importante papel na incorporação e cobertura de material e palha vegetal e serrapilheira ao solo. Essa prática tem caráter multifuncional e tem efeito na estabilização de matéria orgânica e dos agregados do solo, na distribuição e fixação de nitrogênio e carbono nos ecossistemas e ciclagem de nutrientes, controle de processos erosivos, estabilidade de taludes e incremento no estoque da água e, portanto, na conservação e fertilidade do solo como consequência da adubação verde. Além disso, é uma técnica de baixo custo (AZEVEDO; RIBEIRO; AZEVEDO, 2007).

Os resultados de pesquisa obtidos na recuperação de solos no Brasil durante os últimos 25 anos indicam que os padrões de sucessão natural são dependentes da função ecológica que cada espécie tem no sistema, em vez da identidade botânica ou origem das espécies (TEODORO et al., 2011). *Mimosa caesalpinifolia*, nativa da Caatinga brasileira, é a leguminosa pioneira mais frequentemente plantada e amplamente utilizada na estabilização de paisagens e recuperação de terras (CHAER et al., 2011). Corrêa (2007) sugere uma mistura de gramíneas e leguminosas para arranjar a manta de cobertura. A camada rasteira com leguminosas é o estímulo e aceleração do processo de sucessão.

A colonização natural dos solos severamente degradados e isolados por 20 anos foi dominada por espécies de leguminosas no Estado de Minas Gerais (ARAÚJO et al., 2006). De acordo com este estudo, uma área montanhosa de pastagens foi impactada em 1985 pela mineração de caulim. A área, que estava rodeada de fragmentos florestais próximos, foi colonizada por uma floresta secundária, onde a estrutura da vegetação de uma área de amostragem mostrou que a família com um maior número de indivíduos foi Leguminosae. As três

subfamílias presentes, Mimosoideae, Papilionoideae e Caesalpinioideae, apresentaram a maior riqueza total com 11 espécies de nove gêneros.

O objetivo de Matias et al. (2009) foi restaurar uma área de solo frágil e de baixa fertilidade próprio de campo rupestre com produtos de minério de ferro, mediante um modelo de revegetação utilizando duas espécies nativas comuns no domínio Cerrado, sendo uma delas uma leguminosa (*Centrosema coriaceum*) inoculadas com estirpes selecionadas de FMA e/ou uma cepa rizóbio, no estado de Minas Gerais. O aumento do nitrogênio e fósforo na biomassa vegetal resultou numa melhoria da disponibilidade de nutrientes e da capacidade de retenção de água do solo, influenciando no crescimento das plantas. Os autores concluíram que a simbiose tripartite sinérgica é essencial para a reabilitação de campos rupestres, que foram depósito dos rejeitos da exploração de minério de ferro.

Houve uma grande densidade e diversidade fenotípica entre os isolados obtidos nas diferentes áreas de reabilitação do solo após mineração de bauxita, revegetadas com o emprego das gramíneas: azevém, capim-gordura e braquiária. Os autores sugeriram que algumas estirpes de diazotróficas endofíticas como *Burkholderia* e *Azospirillum* têm um papel meritório nos primeiros estágios de sucessão da vegetação (MELLONI et al., 2004).

É evidente que é necessária a alteração dos modelos de produção e de desenvolvimento atualmente praticados no Brasil e no mundo. Neste contexto, as bactérias isoladas podem servir para futuros estudos de revegetação com leguminosas ou outras espécies na recuperação das áreas degradadas. Devem-se direcionar os avanços das pesquisas científicas e tecnológicas com vistas a que sejam incorporados pelo setor produtivo, devendo proporcionar vantagens para o meio ambiente. Os procedimentos empregados na recuperação ambiental em áreas degradadas por metais pesados, geralmente para as atividades

agropecuárias têm custos elevados. A busca por soluções alternativas de baixo custo e de fácil aplicação podem garantir a sua sustentabilidade.

REFERÊNCIAS

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. Elaboração e apresentação de projetos de reabilitação de áreas degradadas pela mineração. Projeto NBR 13030, Rio de Janeiro, 1999, 5 p.

ADESEMOYE, A. O.; KLOPPER, J. W. Plant-microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. **Applied microbiology and biotechnology**, Berlin, New York, v. 85, n.1, p.1-12,ago.2009.

ALVES, R.J.; SILVA, N.G. O fogo é sempre um vilão nos campos rupestres? **Biodiversidade Brasileira**, Brasília, v. 1, n. 2, p. 120 -127,jul2011.

ALVES, R. et al. Circumscribing campo rupestre-megadiverse Brazilian rocky montane savanas. **Brazilian journal of biology**, São Carlos, SP, v. 74, n. 2, p. 355-362, may. 2014.

ARAÚJO, F.F.; HUNGRIA, M. Nodulação e rendimento de soja co-infectada com *Bacillus subtilis* e *Bradyrhizobium japonicum/Bradyrhizobium elkanii*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 9, p. 1633-1643, set. 1999.

ARAÚJO, F. S. D. et al. Estrutura da vegetação arbustivo-arbórea colonizadora de uma área degradada por mineração de caulim,Brás Pires, MG.**Revista Árvore**,Viçosa, v. 30, n. 1, p. 107-116,jan./fev. 2006.

ARAÚJO, K. S. **Eficiência simbiótica e identificação de estirpes de *Burkholderia* oriundas de campos rupestres**. 2014. 128 p. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

ARTURSSON, V.; FINLAY, R. D.; JANSSON, J. K. Interactionsbetweenarbuscularmycorrhizal fungi and bacteria and theirpotential for stimulatingplantgrowth.**Environmental microbiology**,Oxford, v. 8, n.1,p. 1-10, jan. 2006.

AZEVEDO, R.L.; RIBEIRO, G.T.; AZEVEDO, C.L.L. Feijão Guandu: Uma Planta Multiuso. **Revista da Fapese**, São Cristóvão, v.3, n. 2, p. 81-86, jul./dez. 2007.

BARRETO, M. L. **Mineração e desenvolvimento sustentável: desafios para o Brasil**. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 2001. 215p.

BENITES, V.M. et al. Solos e vegetação nos Complexos Rupestres de Altitude da Mantiqueira e do Espinhaço. **Revista Floresta e Ambiente**, Rio de Janeiro, v.10, n.1, p. 76-85, jan./jul.2003.

BERTONI, J.; LOMBARDI NETO, F. **Conservação do Solo**. São Paulo: Ícone. 7. Ed. 2008. 355 p.

BRASIL. Ministério da Justiça. **Decreto Federal nº 97.632**, de 10 de abril de 1989. Brasília, 1989.

CARMO, F. F.; JACOBI, C. M. A vegetação de canga no Quadrilátero Ferrífero, Minas Gerais: caracterização e contexto fitogeográfico. **Rodriguésia, Revista do Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, v.64, n.3, p. 527-541, jul./sep.2013.

CASTRO, J. et al. Use of shrubs as nurse plants: a new technique for reforestation in Mediterranean mountains. **Restoration ecology**, Washington, v.10, n.2, p. 297-305, jun. 2002.

CARVALHO, F. et al. Relationship between physical and chemical soil attributes and plant species diversity in tropical mountain ecosystems from Brazil. **Journal of Mountain Science**, Chengdu, v. 11, n. 4, p. 875-883, jul. 2014.

CARVALHO, F.; DE SOUZA, F.A.; CARRENHO, R. The mosaic of habitats in the high-altitude Brazilian rupestrian fields is a hotspot for arbuscular mycorrhizal fungi. **Applied Soil Ecology**, San Francisco, v. 52, p. 9-19, jan.2012.

CARVALHO, F. **Abundância de espécies de plantas e diversidade de simbiontes radiculares em campos rupestres da Serra do Cipó, MG**. 2010. 93 p. Tese (Doutorado em Ecologia Conservação e Manejo da Vida Silvestre)—Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

CARVALHO MENDES, I. et al. Biological functioning of Brazilian Cerrado soils under different vegetation types. **Plant and soil**, Dordrecht, v.359 n. 1, p. 183-195, oct. 2012.

CHAER, G. M. et al. Nitrogen-fixing legume tree species for the reclamation of severely degraded lands in Brazil. **Tree physiology**, Victoria, v. 31, n.2, p.139-149, dec. 2011.

CHANWAY, C. P. Endophytes: they're not just fungi! **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, 74, n. 3, p. 321-322, jul. 1996.

CONCEIÇÃO, A. de S.; GIULIETTI, A. M.; QUEIROZ, L.P de. O gênero *Chamaecrista* Moench (Leguminosae-Caesalpinioideae) em Catoles, Abaira, Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. **Sitientibus**, Feira de Santana, vol. 3, n. 4, p. 81-108. 2003.

CONCEIÇÃO, A. A. et al. Rupestrian Grassland Vegetation, Diversity, and Origin. In: FERNANDES, G.W. (Ed.). **Ecology and Conservation of Mountaintop grasslands in Brazil**. New York: Springer. 1 ed. 2016. p. 105-127.

CORRÊA, R. S. **Recuperação de áreas degradadas pela mineração no Cerrado**. Manual para revegetação. Brasília: Universa. 2007. 169 p.

DANTAS, M. M.; SILVA, M. J. D. The genus *Chamaecrista* (Leguminosae, Caesalpinioideae, Cassieae) in the Serra Dourada State Park, Goiás,

Brazil. **Rodriguésia, Revista do Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, Rio de Janeiro, v.64, n.3, p. 581-595, jul./sep. 2013.

DÖBEREINER, J. Recent changes in concepts of plant bacteria interactions: endophytic N₂ fixing bacteria. **Ciência e Cultura**, Campinas, v.44, n.5, p. 310-313, 1992.

DONG, Z. et al. A nitrogen-fixing endophyte of sugarcane stems (a new role for the apoplast). **Plant physiology**, Lancaster, v.105, n.4, p. 1139-1147, dec. 1994.

DORR, J.V.N. **Physiographic, stratigraphic, and structural development of the Quadrilátero Ferrífero Minas Gerais Brazil**. Geological survey professional paper. Washington: United States Government Printing Office, 1969. p.641.

DRUMMOND, G. M, et al. **Biodiversidade em Minas Gerais: um atlas para sua conservação**. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, 2 ed. 2005.

DUTRA V. F. 2005. **Leguminosae Adans. nos Campos Rupestres do Parque Estadual do Itacolomi, Minas Gerais, Brasil**: florística, preferência por habitat, aspectos reprodutivos e distribuição geográfica. 2005. 171 p. Dissertação (Mestrando em Botânica) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2005.

DUTRA, V. F.; MESSIAS, M. C. T.; GARCIA, F. C. P. Papilionoideae (Leguminosae) of "campos ferruginosos" of Itacolomi State Park, Minas Gerais, Brazil. **Brazilian Journal of Botany**, São Paulo, v. 28, n.3, p. 493-504, jul./sep.2005.

DUTRA, V. F.; GARCIA, F. C. P.; LIMA, H. C. D. Caesalpinioideae (Leguminosae) nos Campos Rupestres do Parque Estadual do Itacolomi, MG, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, Belo Horizonte, v.22, n. 2, p. 547-558. apr./jun. 2008.

FERNANDES, G.W. et al. Challenges for the conservation of vanishing megadiverse rupestrian grasslands. **Natureza & Conservação**, São Paulo, v.12, n. 2, p.162-165, jul./dec. 2014.

FERNANDES, G. W. et al. Cerrado to Rupestrian Grasslands: Patterns of Species Distribution and the Forces Shaping Them Along an Altitudinal Gradient. In: FERNANDES, G.W. (Ed.). **Ecology and Conservation of Mountaintop grasslands in Brazil**. New York: Springer. 1 ed. 2016a. p. 345-377.

FERNANDES, G. W. et al. Challenges in the Restoration of Quartzitic and Ironstone Rupestrian Grasslands. In: FERNANDES, G.W. (Ed.). **Ecology and Conservation of Mountaintop grasslands in Brazil**. New York: Springer. 1 ed. 2016b. p. 449-477.

GIULIETTI, A.M. et al. Flora da Serra do Cipó Minas Gerais: caracterização e lista de espécies. **Boletim de Botânica**, São Paulo, v.9, p. 11-51, 1987.

GIULIETTI, A. M. et al. **Centres of plant diversity: A guide and strategy for their conservation**. Cambridge: WWF/IUCN, 1997. 578 p.

GÓMEZ-SAGASTI, M.T. et al. Microbial monitoring of the recovery of soil quality during heavy metal phytoremediation. **Water, Air, & Soil Pollution**, Netherlands, v.223, n. 6, p. 3249-326, jul. 2012.

HARDOIM, P. R. et al. The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v.79, n.3, p. 293-320, sep. 2015.

IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Plano de manejo para uso múltiplo da Floresta Nacional de Carajás. Brasília. 2003.

IRWIN, H. S. B.; BARNEBY, R. C. **The American Cassiinae**:synoptical revision of leguminosae tribe Cassieae subtribe Cassiinae in the New World. 1 ed. New.York: New York Botanical Garden v. 35, 1982.895 p.

JACOBI, C.M. et al. Plant communities on ironstone outcrops:A diverse and endangered Brazilian ecosystem. **Biodiversity and Conservation**,Netherlands, v.16, n.7, p. 2185–2200, jun. 2007.

JACOBI, C. M.; CARMO, F. D.; VINCENT, R. D. C. Estudo fitossociológico de uma comunidade vegetal sobre canga como subsídio para a reabilitação de áreas mineradas no quadrilátero ferrífero, MG.**Revista Árvore**,Viçosa, v. 32, n. 2, p. 345-353, mar./abr. 2008.

LEWIS, G.; et al. (Ed.).**Legumes of the world**.London: Richmond Royal Botanic Gardens Kew. 2005. p.577.

LOPES, A. S.; GUILHERME, L. R. G. A career perspective on soil management in the Cerrado region of Brazil.**Advances in Agronomy**,Newark, v. 137, p. 1-72, dec.2016.

MARRA, L. M. et al. Solubilisation of inorganicphosphatesby inoculants strains from tropical legumes.**ScientiaAgricola**,Piracicaba, v. 68, n. 5, p. 603-609,sept./oct. 2011.

MATIAS, S. R. et al. Effect of rhizobia,mycorrhizal fungi and phosphate-solubilizing microorganisms in the rhizosphereof native plants used to recover an iron ore area in Brazil. **European Journal of Soil Biology**,Braunschweig, v. 45, n. 3, p. 259-266, may./jun. 2009.

MECHI, A.; SANCHES, D. L. Impactos ambientais da mineração no Estado de São Paulo. **Estudos avançados**,São Paulo, v. 24, n. 68, p.209-220, 2010.

MEIRELLES, S. T.; MATTOS, E. A. de.; SILVA, A. C. da. Potential desiccation tolerant vascular plants from Southeastern Brazil. **Polish Journal of Environmental Studies**, Gliwice, v. 6, n. 4, p. 17-22, jan. 1997.

MELLONI, R. et al. Densidade e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas endofíticas em solos de mineração de bauxita, em reabilitação. **Revista Brasileira de Ciência do solo**, Viçosa, v. 28, n. 1, p. 85-93, jan./feb. 2004.

MENDONÇA, R. D. et al. Flora vascular do cerrado. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P (Eds.). **Cerrado: ambiente e flora**. Planaltina: Embrapa-CPAC, v. 1, 1998. p. 288-556.

MESQUITA, F.W. et al. Histórico dos incêndios na vegetação do Parque Nacional da Chapada Diamantina, entre 1973 e abril de 2010, com base em imagens Landsat. **Biodiversidade Brasileira**, Brasília, v. 1, p. 237-256, dec. 2011.

MOREIRA F.M.S. Bactérias fixadoras de nitrogênio que nodulam Leguminosae. In: Moreira F.M.S.; Siqueira J.O, Brusaard L. (Eds.). **Biodiversidade so solo em ecossistemas brasileiros**. Lavras: Ed. UFLA, 2008. p 621-681.

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

MOTA, N.M. et al. Forces driving the regeneration component of a rupestrian grassland complex along an altitudinal gradient. **Brazilian Journal of Botany**, São Paulo, v. 39, n. 3, p. 845-860 194, sep. 2016.

MOURÃO, A.; STEHMANN, J.R. Levantamento da flora do campo rupestre sobre canga hematíticacouraçada remanescente na Mina do Brucutu, Barão de Cocais, Minas Gerais, Brasil. **Rodriguésia, Revista do Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, Rio de Janeiro, v. 58, n. 4, p. 775-785, ago. 2007.

MOURÃO, A.; STEHMANN, J.R. Levantamento da flora do campo rupestre sobre canga hematítica couraçada remanescente na Mina do Brucutu, Barão de Cocais, Minas Gerais, Brasil. **Rodriguésia, Revista do Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, Rio de Janeiro, v. 58, n. 4, p. 775-786. ago. 2007.

MYERS, N. et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, London, v. 403, n. 6772, p. 853-858, feb. 2000.

OLIVEIRA-FILHO, A.T.; RATTER, J.A. A study of the origin of central Brazilian forests by the analysis of plant species distribution patterns. **Edinburgh Journal of Botany**, Edinburgh, v. 52, n. 2, p. 141-194, jul. 1995.

OLIVEIRA-LONGATTI, S. M. et al. Bacteria isolated from soils of the western Amazon and from rehabilitated bauxite-mining areas have potential as plant growth promoters. **World Journal of Microbiology e Biotechnology**, Netherlands, v. 30, n. 4, p. 1239-1250, apr. 2014.

PADILLA, F. M.; PUGNAIRE, F. I. The role of nurse plants in the restoration of degraded environments. **Frontiers in Ecology and the Environment**, Washington, v. 4, n. 4, p. 196-202, 2006.

PORTO, M.L.; SILVA, M.F.F. Tipos de vegetação metalófila em áreas da Serra de Carajás e de Minas Gerais, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, Belo Horizonte, v. 3, n. 2, p. 13-21, 1989.

QUEIROZ, L. P. **Flora de Grão-Mogol, Minas Gerais: Leguminosae**. Boletim de Botânica, São Paulo, vol. 22, n. 2, 2004, p. 213-265.

RAMPELOTTO, P. H. et al. Changes in diversity, abundance, and structure of soil bacterial communities in Brazilian Savanna under different land use systems. **Microbial ecology**, Cambridge, v. 66, n. 3, p. 593-607, oct. 2013.

RATTER, J.A.; RIBEIRO, J.F.; BRIDGEWATER, S. The Brazilian cerrado vegetation and threats to its biodiversity. **Annals of Botany, Oxford**, v. 80, p. n. 3, p. 223-230, may. 1997.

REIS, F.B.J.R. et al. Nodulation and nitrogen fixation by *Mimosa* spp. in the Cerrado and Caatinga biomes of Brazil. **New Phytologist**, Cambridge, v. 186, n. 4, p. 934-946, jun. 2010.

REZENDE, L. A. L. D. **Restauração ecológica de Campos rupestres ferruginosos**. 2013. 75 p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas)– Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2013.

RIBEIRO, J. F. et al. **Os principais tipos fitofisionômicos da região dos cerrados**. Planaltina: Embrapa-CPAC, 28 p. 1983.

RIBEIRO, J.F.; WALTER, B.M.T. As principais fitofisionomias do bioma Cerrado. In: SANO, S.M.; ALMEIDA S.P.; RIBEIRO J.F. (Eds.). **Cerrado: ecologia e flora**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, v. 1, 2008, p. 153-212.

RIZZINI, C. T. **Tratado de fitogeografia do Brasil: aspectos ecológicos, sociológicos e florísticos**. 2. ed. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural. 1997. 747 p.

SANTOS, A. C. et al. Gramíneas e leguminosas na recuperação de áreas degradadas: efeito nas características químicas do solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 25, n.4 p.1063-1071, oct./dec. 2001.

SANTOS, J. V. dos et al. Biological attributes of rehabilitated soils contaminated with heavy metals. **Environmental Science and Pollution Research**, Landsberg, v. 23, n.7 p.6735–6748, apr. 2016.

SANTOS, M.D.C.; VARAJÃO, A.F. Sedimentation and pedogenic features in a clay deposit in Quadrilátero Ferrífero, Minas Gerais, Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 76, n.1 p. 147-159, mar. 2004.

SCHAEFER, C. E. G. R.; MENDONÇA, B. A. F.; RIBEIRO, A. S. Solos desenvolvidos sobre canga ferruginosa no Quadrilátero Ferrífero, Minas Gerais. In: **Simpósio Afloramentos Ferruginosos no Quadrilátero Ferrífero: Biodiversidade, Conservação e Perspectivas de Sustentabilidade.**, Belo Horizonte: UFMG/ICB. 2008.

SCHAEFER, C.E.G.R. et al. Solos desenvolvidos sobre canga ferruginosa no Brasil: In: CARMO, F.F.; KAMINO, L.H.Y.(Orgs.). **Geossistemas ferruginosos do Brasil: Áreas prioritárias para conservação da diversidade geológica e biológica. Patrimônio cultural e serviços ambientais.** Belo Horizonte:3i, 2015. p. 77-102.

SCHAEFER, C. E.G.R. et al. Soils Associated with Rupestrian Grasslands. In: FERNANDES, G.W.(Ed.). **Ecology and Conservation of Mountaintop grasslands in Brazil.** New York: Springer. 1 ed, 2016, p. 55-69.

SILVA, A. T. D. **Diversidade de bactérias simbióticas e não simbióticas isoladas de nódulos de siratro.** 2012. 93 p. Dissertação (Mestrado em Ciências do Solo) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

SILVA, K. da. et al. Diazotrophic *Burkholderia* species isolated from the Amazon region exhibit phenotypical, functional and genetic diversity. **Systematic and applied microbiology**, Stuttgart, New York, v. 35, n. 4, p. 253-262, jun. 2012.

SILVA, M. F. Distribuição de metais pesados na vegetação metalófila de Carajás. **Acta Botanica Brasilica**, Belo Horizonte, v. 6, n. 1, p. 107-122, ago. 1992.

SILVEIRA, F.A.O. et al. Ecology and evolution of plant diversity in the endangered campo rupestre: a neglected conservation priority. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 403, n. 1, p. 129–152 jun. 2016.

SIMON, M. F.; HAY, J.D.V. Comparison of a common and rare species of *Mimosa* (Mimosaceae) in Central Brazil. **Austral Ecology**, Windsor, v. 28, n. 3, p. 315-326, jun. 2003.

SIMON, M. F., PROENÇA, C. Phytogeographic patterns of *Mimosa* (Mimosoideae, Leguminosae) in the Cerrado biome of Brazil: an indicator genus of high-altitude centers of endemism? **Biological conservation**, Boston, v. 96, n.3, p. 279-296, dec. 2000.

SOUZA, V. C.; BORTOLUZZI, R. L. C. *Chamaecrista*. In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil, Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, Rio de Janeiro, 2012.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; REMANS, R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plantsignaling. **FEMS microbiologyreviews**, Amsterdam, v. 31, n. 4, p. 425-448, may. 2007.

SPRENT, J.I. **The biology of nitrogen-fixing organisms**. London: McGraw-Hill, 1979. 196 p.

SPRENT, J.I. Evolving ideas of legume evolution and diversity: a taxonomic perspective on the occurrence of nodulation. **New phytologist**, Cambridge, v. 174, n. 1, p. 11-25, mar. 2007.

TAURIAN, T. et al. Endophytic bacteria and their role in legumes growth promotion. In: **Bacteria in Agrobiolgy: Plant Probiotics**. Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg. p. 141-168, 2012.

TEIXEIRA, F.C.P. et al. Characterization of indigenous rhizobia from Caatinga. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo. v. 41, n. 1, p. 201-208, jan./mar. 2010.

TEODORO, R. B. et al. Aspectos agronômicos de leguminosas para adubação verde no Cerrado do Alto Vale do Jequitinhonha. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.35, n. 2, p. 635-643, 2011.

UDE, S. et al. Biofilm formation and cellulose expression among diverse environmental *Pseudomonas* isolates. **Environmental microbiology**, Oxford, v. 8, n. 11, p. 1997-2011, nov. 2006.

VALVERDE, A. et al. *Burkholderia ferrariae* sp. nov., isolated from an iron ore in Brazil. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, London, v. 56, n. 10, p. 2421-2425, oct. 2006.

VELOSO, H.P.; RANGEL FILHO, A.L.R.; LIMA, J.C.A. Classificação da vegetação brasileira adaptada a um sistema universal. Rio de Janeiro: **IBGE**, 1991. 124 p.

VIANA, P.L.; LOMBARDI, J.A. Florística e caracterização dos campos rupestres sobre canga na Serra da Calçada, Minas Gerais, Brasil. **Rodriguésia, Revista do Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, Rio de Janeiro, v. 58, n. 1, p. 159-177, 2007.

VINCENT, R. D. C.; MEGURO, M. Influence of soil properties on the abundance of plant species in ferruginous rocky soils vegetation, southeastern Brazil. **Brazilian Journal of Botany**, São Paulo, v. 31, n. 3, p. 377-388, jul./sep. 2008.

VITOUSEK, P. M. et al. Towards an ecological understanding of biological nitrogen fixation. **Biogeochemistry**, Corvallis, v. 57, n. 1, p. 1-45, apr. 2002.

YATES, C.J. et al. Hierarchies of cause: Understanding rarity in an endemic shrub *Verticordia staminosa* (Myrtaceae) with a highly restricted distribution. **Australian Journal of Botany**, Melbourne, v. 55, n. 3, p. 194-205, may. 2007.

SEGUNDA PARTE – ARTIGO

ARTIGO 1

**BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS SIMBIONTES DE LEGUMINOSAS
EM CANGA E EM ÁREA DE MINERAÇÃO DE FERRO
REVEGETADA COM CAPIM**

Preparado de acordo com as normas da Revista PAB (Pesquisa
agropecuária brasileira)

**Bactérias diazotróficas simbiontes de leguminosas em canga e em área de
mineração de ferro revegetada com capim**

Nury Mariel Cazon Tapias¹; Fernanda de Carvalho²; Jessé Valentim dos Santos³;

Jacqueline Savana da Silva⁴ e Fatima Maria de Souza Moreira⁵

^(1,2,3,4,5) Departamento de Ciência do Solo, Setor Microbiologia do Solo,
Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brazil. Universidade Federal
de Lavras, Cx. Postal 3037, 37200-000, Lavras, Minas Gerais, Brazil.

*Author for correspondence:E-mail:

¹mariel@posgrad.ufla.br, ⁵fmoreira@dcs.ufla.br

Resumo— No presente estudo foram identificadas espécies de bactérias diazotróficas associativas isoladas de nódulos de plantas de duas áreas pertencentes à mineradora VALE: campo rupestre sobre bancada laterítica (canga), com predomínio de *Mimosa calodendron*; e um depósito de minério em reabilitação (capim), com presença espontânea de: *Mimosa setosa*, *Mimosa sensitiva*, *Crotalaria incana*, *Chamaecrista nictitans*, *Neotonia wightii*, *Crotalaria spectabilis*, *Crotalaria lanceolata* e *Stylosanthes* sp. Foram realizadas coletas de nódulos em cinco pontos em canga e 12 na área de reabilitação. No total foram obtidos 60 isolados bacterianos, sendo nove em canga e 51 em capim e foram sequenciados 24, os quais são representantes de sete dos nove grupos culturais. Houve predomínio de bactérias com crescimento lento (57%); em relação ao pH o predomínio foi de bactérias alcalinizantes (73,5%). A maior diversidade cultural foi encontrada para espécie *M. setosa* apresentando seis grupos culturais, seguido das espécies *Stylosanthes* sp. e *M.*

calodendron com cinco grupos culturais. A espécie *C. icana* foi a que apresentou a menor diversidade na caracterização cultural dos seus isolados. Quanto à identificação genética os gêneros nodulíferos encontrados foram *Bradyrhizobium* e *Burkholderia*, enquanto dentre o grupo das endofíticas, se obtiveram os gêneros *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Variovorax*, *Leifsonia*, *Stenotrophomonas* e *Sphingomonas*. As leguminosas *M. calodendron* na canga e *C. nictitans* na área em reabilitação apresentaram uma maior diversidade de bactérias.

Termos para indexação: fixação biológica de nitrogênio, diversidade, campo rupestre, recuperação de áreas degradadas.

Abstract —An experiment was conducted to identify species of associated diazotrophic bacteria, isolated from plants nodules in two areas that belong to the mining company Vale: rupestrian field on lateritic bench (canga), with predominance of *Mimosa calodendron*; and a rehabilitated area revegetated with grass on the deposition of soil removed from the opening of an iron mining, with spontaneous presence of the following species: *Mimosa setosa*, *Mimosa sensitiva*, *Crotalaria incana*, *Chamaecrista nictitans*, *Neotonia wightii*, *Crotalaria spectabilis*, *Crotalaria lanceolata* and *Stylosanthes* sp. Nodules samples were collected at five points in canga and 12 points were sampled on the second area. After the incubation period, the colonies were purified and characterized morphologically. From 60 strains isolated, nine found in canga and 51 on the rehabilitation area; 24 were sequenced which are representatives of seven from a total of nine cultural groups. Slow-growth bacteria (57%) were predominant, while there was a predominance of alkalizing bacteria (73.5%). Most phenotypical diversity was found in *M. setosa* with six cultural groups, followed by *M. calodendron* and *Stylosanthes* sp. which formed five cultural

groups each. *C. incana* had the lowest diversity according to its strains' cultural characteristics. Genetically, the two most common nodule bacteria found were *Bradyrhizobium* and *Burkholderia*, whilst genera of *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Variovorax*, *Leifsonia*, *Stenotrophomonas* and *Sphingomonas* were the isolated bacterial endophytes strains. *M. calodendron* in canga and *C. nictitans* in the rehabilitation area showed the highest diversity.

Index terms: biological nitrogen fixation, diversity, rupestrian field, recovery of degraded areas.

INTRODUÇÃO

Os campos rupestres ferruginosos, ou couraças lateríticas denominados de vegetação de canga, referem-se ao ecossistema formado de fitofisionomias herbáceo-arbustivas, associadas a afloramentos rochosos hematíticos (itabiríticos/jaspelíticos) sobre solos rasos (Carmo & Jacobi, 2013; Viana & Lombardi, 2007), produto dos processos de lixiviação, intemperismo e pedogênese policíclica, presente no Quadrilátero Ferrífero em Minas Gerais (MG) e na Serra dos Carajás no Pará (Dorr, 1969). Essa vegetação neotropical e azonal está composta por ilhas ou mosaicos de elementos florísticos distintivos que abrigam espécies ornamentais, medicinais e metalófilas (Porto & Silva, 1989; Rizzini, 1997), inseridas dentro de uma matriz circundante de vegetação zonal, nos platôs mais elevados e nas cristas montanhosas. Veloso, Rangel Filho e Lima (1991) classificam essa vegetação como relíquias.

Essas regiões ricas em minerais apresentam um sério dilema. Resultante do isolamento, as comunidades presentes na canga apresentam uma alta diversidade e endemismo, desenvolvendo-se em condições ambientais

oligotróficas e severas, mas a dinâmica e ocorrência dos seus ecossistemas é restrita, sendo os menos estudados os de Minas Gerais, os quais encaram grande risco de extinção. O Quadrilátero Ferrífero é considerado como uma região de importância biológica extrema, sendo incluso dentro da Reserva da Biosfera da Cadeia do Espinhaço pela UNESCO em 2005 (DRUMMOND et al., 2005). A estreita relação entre a lavra de minério e as fitofisionomias existentes na canga coloca o Complexo Rupestre em condição de vulnerabilidade.

Por outro lado, a mineração é uma das atividades essenciais na obtenção de matérias-primas e, apesar de os minérios da canga serem explorados comercialmente em alguns locais, possuem menor valor econômico. No entanto, a mineração implica uma intensa remoção e contaminação de solos e a deposição de um considerável volume de metais traço. O Plano de Recuperação de Áreas Degradadas (PRAD) decreta a obrigação legal fundamental na restauração dos habitats únicos associados aos ecossistemas rupestres e a recuperação de áreas exploradas por operações de mineração (Brasil, 1989).

A significativa diversidade da canga reflete uma alta diversidade de microrganismos inexplorada. Microrganismos desempenham papéis essenciais na funcionalidade do solo e na manutenção, restauração e resiliência dos ecossistemas (Moreira & Siqueira, 2006). O conhecimento sobre campos rupestres é fundamental para ações de conservação e a recuperação desses habitats apresenta desafios na busca de estratégias de reabilitação e soluções tecnológicas. As bactérias e fungos isolados podem servir para futuros estudos de revegetação com leguminosas ou outras espécies na recuperação das áreas degradadas. Muitas das bactérias que apresentam a capacidade de estabelecer simbiose e fixar nitrogênio em ambientes impactados têm sido isoladas em locais próximos ou foram isoladas no solo original antes das atividades de mineração. Nesse contexto, o uso de leguminosas associadas com bactérias fixadoras de nitrogênio ou outros microrganismos, apresenta inúmeras vantagens

na estabilização de matéria orgânica e dos agregados do solo, na distribuição, fixação e ciclagem de nutrientes nos ecossistemas, além de ser uma técnica de baixo custo.

Os diferentes habitats (cerrado, afloramentos rochosos, campos de areia, pântanos, pradarias de pedra) são um hotspot de uma importante comunidade de fungos micorrízicos arbusculares (FMA), cuja diversidade provavelmente exerce influência nos padrões distintos de diversidade de vegetação entre os diferentes habitats que constituem os campos rupestres (Carvalho et al., 2012). Entretanto, os autores não encontraram uma correlação significativa entre a diversidade de plantas e fungos, embora as comunidades apresentem padrões distintos de organização, de acordo com o tipo de habitat. O importante papel ecológico destes fungos na ciclagem de nutrientes é revelado principalmente em relação ao nitrogênio e fósforo, nos campos rupestres (Fernandes et al., 2014).

Distintos mosaicos de campos rupestres, localizados na Serra do Cipó, foram os locais onde Carvalho (2010) isolou bactérias provenientes de solos usando como as espécies *Mimosa atropurpureum* e *Mimosa tenuiflora* como plantas iscas. Ambas as plantas mostraram predomínio dos gêneros *Rhizobium* e *Burkholderia*. Uma alta diversidade de BFNNL pode ser fruto da diversidade da família Leguminosae na região tropical, evidenciando a utilidade dos estudos de bactérias isoladas nestas regiões e especificamente em campos rupestres.

O potencial de estirpes de *Burkholderia* oriundas de campos rupestres, quanto à eficiência simbiótica em simbiose com *Mimosa bimucronata*, *Mimosa foliolosa* e *Mimosa atropurpureum*, foi estudado por Araújo et al. (2014). Os autores verificaram a relação quanto a eficiência simbiótica de 14 estirpes de *Burkholderia* em simbiose com as três leguminosas. Essas estirpes foram previamente isoladas dos nódulos de leguminosas cultivadas em solos de distintos habitats de campos rupestres, localizados na Serra do Cipó por Carvalho (2010). A interação entre *Burkholderia* com *Mimosa* ilustra a afinidade

e o sucesso na simbiose, uma vez que todas as estirpes testadas foram capazes de nodular a espécie *M. bimucronata*, enquanto um 86% das espécies de *M. foliolosa* tiveram a capacidade de estabelecer simbiose, e ambas as espécies vegetais mostraram um crescimento favorecido.

Uma nova estirpe bacteriana gram-negativa, não formadora de esporos com a capacidade de solubilizar fosfato altamente insolúvel, designada FeGl01, foi isolada por Valverde et al. (2006), a partir de um minério com alta concentração de ferro de Minas Gerais, Brasil. Com base na sua caracterização genotípica e fenotípica foi classificada dentro do gênero *Burkholderia*. Muitas cepas de espécies de *Burkholderia* têm, entre outras propriedades, a capacidade de solubilizar minerais fosfatados altamente insolúveis e, conseqüentemente, são de significativo interesse para o sector agrícola no que diz respeito à sua aplicabilidade em biofertilização (Artursson et al., 2006). Além disso, esta propriedade também pode ser economicamente útil para as indústrias emergentes, como a biomineração.

Este trabalho foi delineado com o objetivo de identificar espécies de bactérias diazotróficas simbiontes isoladas de nódulos de plantas de duas áreas pertencentes à mineradora VALE: um campo rupestre sobre bancada laterítica e em uma área de mineração de ferro revegetada com capim.

MATERIAL E MÉTODOS

Descrição do projeto

O trabalho desenvolvido está vinculado ao projeto geral de pesquisa: “Diversidade de plantas e de organismos dos solos com potencial biotecnológico e indicadores de impacto ambiental, no estado de Minas Gerais” (Nº CRA RDP – 00136/10, Chamada de proposta Nº 2010) no qual se procurava pesquisar a

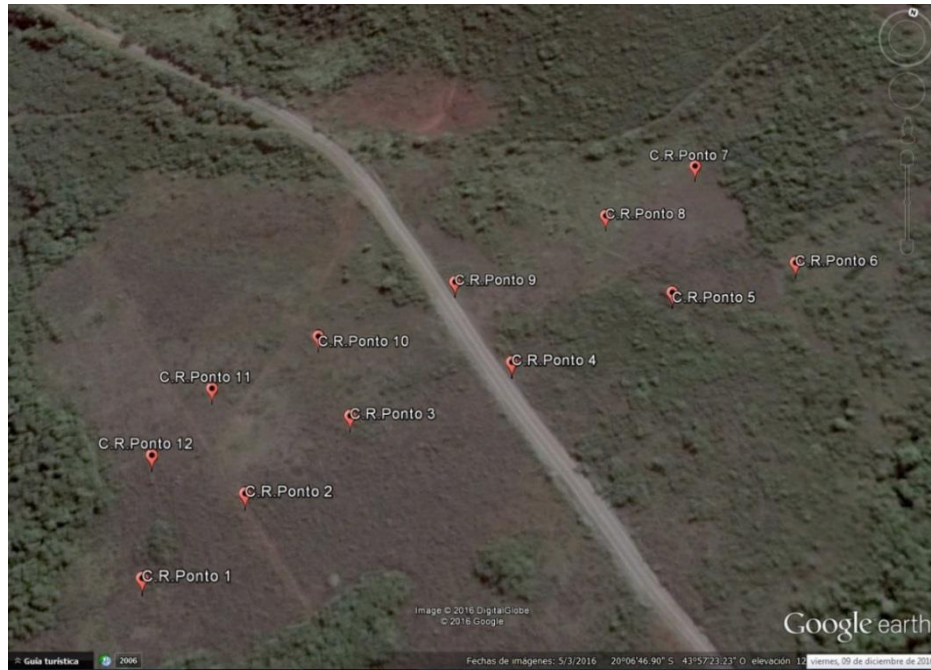
diversidade de bactérias que nodulam leguminosas (BNL) em áreas preservadas e com impactos diretos e indiretos pelas atividades da VALE.

Descrição das áreas de estudo

Duas áreas pertencentes à mineradora VALE foram selecionadas para o estudo. Uma das áreas fica no município de Nova Lima-MG (20° 06' 48" S e 43° 57' 23" O, 1292 m de altitude) e corresponde a um campo rupestre sobre bancada laterítica, denominada de Canga; nesta área houve predominância da espécie leguminosa *Mimosa Calodendron* (Mart). A segunda área fica no município de Brumadinho-MG (20° 09' 33" S e 44° 09' 03" O, 796 m de altitude) e corresponde a um antigo depósito de minério submetido a processo de reabilitação através da construção de taludes, com cobertura vegetal predominante de gramíneas, principalmente *Brachiariaurochloae* com presença esparsa de diferentes espécies de leguminosas (*M. setosa* (Benth), *M. sensitiva* (L), *Crotalaria incana* (L), *Crotalaria spectabilis*, *Crotalaria lanceolata*, *Chamaecrista nictitans* (L), *Neotonia wighti* (Wight&Arn) e *Stylosanthes* sp. O clima da região é do tipo Cwb na classificação de Köppen, com estação seca de abril a setembro.

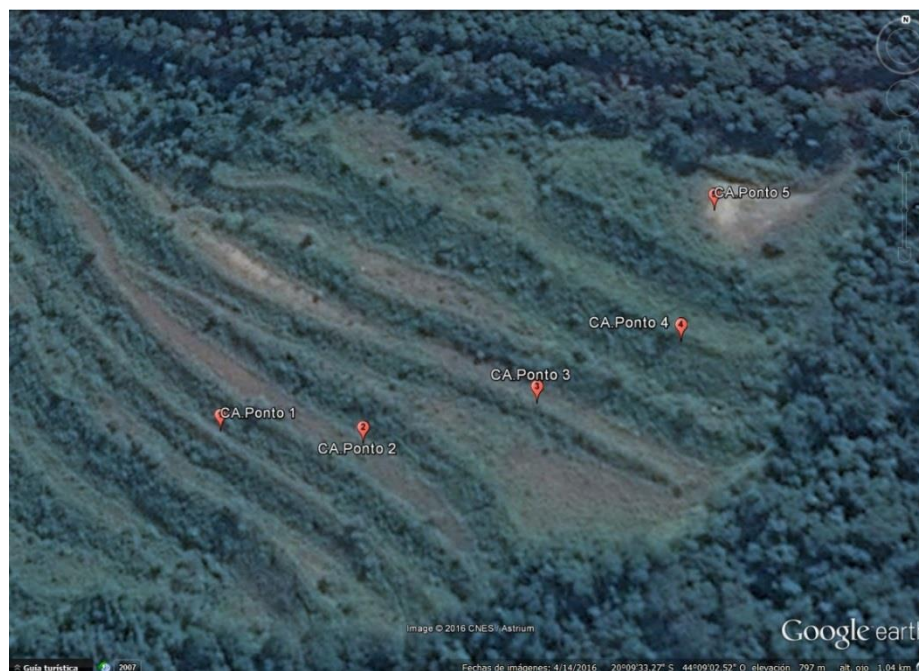
A coleta foi realizada em Janeiro de 2016, durante o período chuvoso. Ao todo foram 17 pontos de coletas, sendo cinco em canga e 12 em capim. No sítio de estudo foram coletadas amostras de solo em pontos preestabelecidos em quatro fitofisionomias para avaliações físicas, químicas e biológicas para outros trabalhos do projeto geral de pesquisa. Raízes noduladas foram coletadas de leguminosas que ocorriam próximas a alguns destes pontos nas fitofisionomias canga e área de mineração de ferro revegetada com capim.

Figura 1 – Pontos de coleta de nódulos, no município de Brumadinho-MG.



Fonte: Tapias (2016).

Figura 2 – Pontos de coleta de nódulos, no município de Nova Lima-MG.



Fonte: Tapias (2016).

Coleta de Nódulos

As coletas dos nódulos foram realizadas com auxílio de pás e tesoura, tomando-se o cuidado de retirar o sistema radicular da planta, sem ferir os nódulos. O excesso de solo foi retirado; em seguida, com auxílio de uma tesoura desinfestada, diversos fragmentos de raízes noduladas foram cortados e armazenados em frascos de vidros vedados contendo sílica gel. Esse procedimento foi realizado para evitar a umidade e manter as raízes, até o momento do isolamento das bactérias no Laboratório de Biologia, Microbiologia e Processos Biológicos do Solo do Departamento de Ciência do Solo (DCS) da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

Os nódulos foram retirados de uma única muda nas seguintes espécies: *C. incana*, *C. spectabilis*, *C. lanceolata*, *Stylosanthes* sp., enquanto os

nódulos forma obtidos a partir de duas plantas de *M. setosa*, *M. sensitiva*, *C.nictitanse* *Neotonia wighti*.

Isolamento

Para o isolamento das bactérias foram utilizados cinco nódulos provenientes de cada espécie vegetal. Primeiramente, estes nódulos foram lavados e reidratados em água destilada estéril por 5 minutos. Logo foram imersos em álcool etílico 95%, por 30 segundos para quebrar a tensão superficial. Depois foram embebidos em peróxido de hidrogênio (H₂O₂) durante 1 minuto para desinfestar a superfície do nódulo, sendo os reagentes trocados para cada espécie. Os nódulos foram lavados seis vezes com água destilada estéril e a água da última lavagem foi plaqueada para confirmar a desinfestação.

Posteriormente, foram esmagados com uma pinça em placas contendo meio de cultura sólido YMA ou 79 (Fred & Waksman, 1928; Vincent, 1970), pH 6,8 e o material obtido foi riscado em forma de estrias nas placas para obtenção de colônias isoladas. Esses procedimentos foram realizados no Laboratório de no Laboratório de Biologia, Microbiologia e processos biológicos do (DCS) da UFLA, em MG.

Caracterização cultural

No cultivo as bactérias foram cultivadas sob temperatura de 28°C, os morfotipos observados foram plaqueados para purificação e os isolados foram caracterizados de acordo com suas propriedades culturais e logo depois armazenados. A caracterização foi realizada entre 7 e 12 dias após a inoculação do meio da cultura. As seguintes características culturais foram avaliadas: tempo de crescimento (muito rápido: 1 dia; rápido:2-3 dias; intermediário: 4-5 dias; lento: 6-10 dias e muito lento: mais de 10 dias), modificação do pH do meio (ácido, neutro ou alcalino) após o crescimento da bactéria, na avaliação do

pH, comparou-se a coloração dos isolados nas placas com uma placa com meio YMA sem inoculação.

Igualmente, se avaliaram as características das colônias: cromogênese (creme, branca, amarela ou rosa), diâmetro (mm), borda (inteira, irregular, denteada, ondulada, lobada ou filamentosa), forma (circular, irregular, puntiforme ou filamentosa), elevação (plana, lenticular, convexa, pulvinada, umbonada ou umbilicada), superfície (lisa, rugosa ou papilada), detalhes ópticos (translúcida, transparente ou opaca), consistência (seca, aquosa, gomosa, butírica ou viscosa) e produção de muco (escasso, pouco, moderado ou abundante) e a absorção de corante (Jordan, 1984; Moreira, 1991). Nos detalhes ópticos observou-se a transmissão de luz, onde as colônias consideradas opacas não permitiram nenhuma passagem de luz através de si; ao contrário das translúcidas que permitiram a passagem total de luz e as transparentes ou semitranslúcidas que admitem a passagem não tão expressiva da luz ou apenas nas bordas das colônias.

Na identificação dos isolados foram utilizadas letras iniciais referentes ao nome do local onde os nódulos foram colhidos (canga ou capim), um primeiro número relativo ao ponto de coleta das espécies, seguido do número do nódulo isolado e finalmente uma letra (acompanhada ou não de um número) que determina a estirpe obtida daquele respectivo nódulo. Após a purificação, os isolados foram estocados em meio 79 (líquido) e guardados em tubos rosqueáveis de plástico acrescidos de glicerol 20% e armazenados a - 80°C, e células das placas foram estocadas em tubos rosqueáveis de plástico com água destilada estéril à temperatura ambiente.

Sequenciamento parcial do gene 16S rRNA das estirpes bacterianas

O DNA das estirpes bacterianas foi extraído pelo método da lise alcalina descrito por Niemann et al.(1997), a partir de células de cultura pura. Para a

amplificação parcial do gene 16S rRNA foram utilizados os pares de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) 27F (AGAGTTTGACCTGGCTCAG) e 1492R (GGTTACCTTGTTACGACTT) (Lane, 1991) na fase logarítmica em meio 79. A concentração final dos reagentes por reação foi de 5 µL tampão 10X para PCR, 5µL dNTP Mix (0,2 mM de cada), 5 µL (2,5 mM) de MgCl₂, 0,2 µM de cada *primer* (27F e 1492R), 1,25 u (0,25 µL) de *Taq* DNA Polimerase e água Mili-Q para completar a reação.

Alíquotas de 10µL do *templatedos* DNA extraídos das estirpes foram utilizadas para 50 µL de reação de PCR. A reação de amplificação foi realizada em termociclador EppendorfMastercycler® nas seguintes condições: desnaturação inicial de 94 °C por 5 min., 40 ciclos de desnaturação (94 °C por 40 s), anelamento (55 °C por 40 s), extensão (72 °C por 1 min e 30 s) e uma extensão final de 72 °C por 7 min. Os produtos amplificados foram separados em gel de agarose 1% e visualizados sob luz UV. Os produtos de PCR foram enviados para o Laboratório da Macrogen (Coréia), para sequenciamento e purificação. A qualidade das sequências foram determinadas com o uso do programa BioNumerics, versão 7.1 (AppliedMaths, Austin TX, EUA) e submetidas ao programa BLASTn (Bethesda, MD, EUA) (Altschul et al., 1997). As sequências obtidas foram comparadas no banco de dados do NCBI (National Center for BiotechnologyInformation), com sequências similares depositadas no banco de dados do GenBank.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Isolamento e caracterização cultural

A partir dos nódulos das leguminosas *M. setosa*, *M. sensitiva*, *M. calodendron*, *C. incana*, *C. nictitans*, *N. wightii*, *Stylosanthes* sp., foram obtidos

60 isolados bacterianos. Não se obtiveram isolados das espécies *C. spectabilis* e *C. lanceolata*.

Tabela 1 – Número de isolados purificados do hospedeiro de origem.

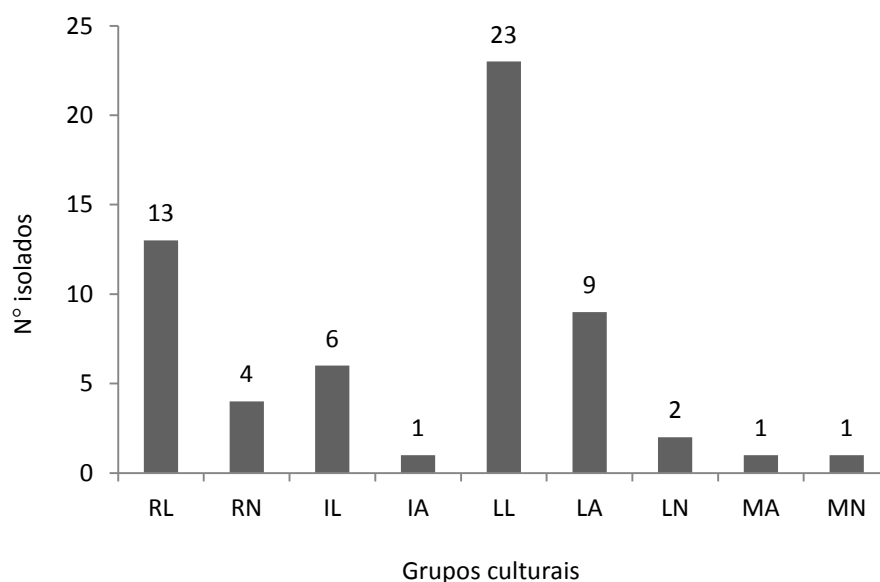
Hospedeiro de origem	Área	Nº isolados
<i>M. calodendron</i>	Canga	9
<i>M. setosa</i>	Capim	11
<i>M. sensitiva</i>	Capim	5
<i>C. incana</i>	Capim	4
<i>C. nictitans</i>	Capim	14
<i>N. wighti</i>	Capim	7
<i>Stylosanthes</i> sp.	Capim	10

Fonte: Tapias (2016).

Obtiveram-se nove grupos culturais a partir do tempo do crescimento e a reação do indicador ácido-base. Do total de estirpes bacterianas estudadas, 17 (28%) mostraram crescimento rápido, sete (12%) crescimento intermediário, 34 (57%) crescimento lento e a taxa de crescimento foi muito lenta para dois (3%) dos isolados. Nas bactérias de crescimento rápido, 12 % das bactérias acidificaram o meio de cultura, 24% dos isolados sem modificar o pH do meio e 64 % isolados que alcalinizaram o meio. Das espécies de crescimento intermediário 14% das estirpes o acidificaram e 86% o alcalinizaram. Das 34 espécies de crescimento lento 26% foram acidificantes, 6% foram neutras e 68 % foram alcalinizantes. Unicamente duas espécies apresentaram crescimento muito lento, das quais uma foi neutra e uma foi acidificante. Portanto, na caracterização cultural, a maioria dos isolados obtidos (27 %) mostrou crescimento lento no meio de cultura, apresentou forma puntiforme, elevação

lenticular, borda inteira, superfície lisa, escassa produção de muco, consistência gomosa ou butírica e apresentaram absorção corante negativa (Figura 6).

Figura 3 – Grupos culturais baseados no tempo de crescimento e reação do pH do meio de Cultura.



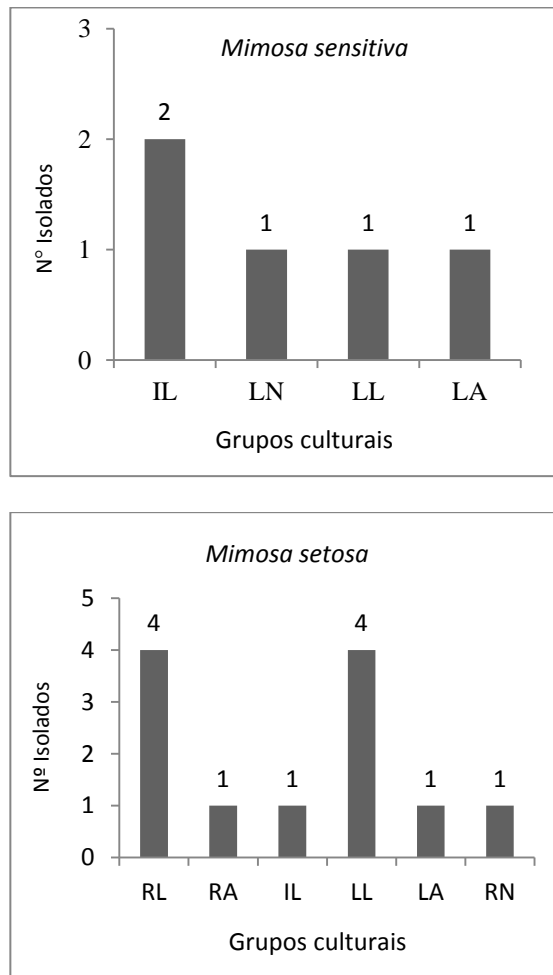
Legenda: Estirpes isoladas dos nódulos das espécies de leguminosas, em nove grupos culturais baseados no tempo de crescimento e reação do pH do meio de cultura: crescimento rápido com alcalinização do meio (RL), sem modificar o pH do meio de cultura (RN); crescimento intermediário de isolados que alcalinizam e acidificam o meio:(IL) e (IA) respectivamente; crescimento lento sem alteração do meio e com acidificação (LA) e com alcalinização do meio (LL).

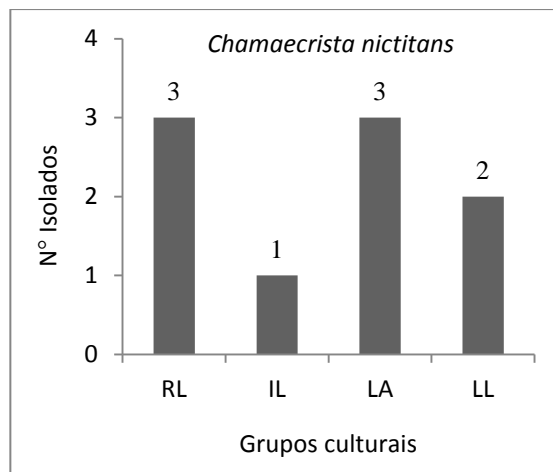
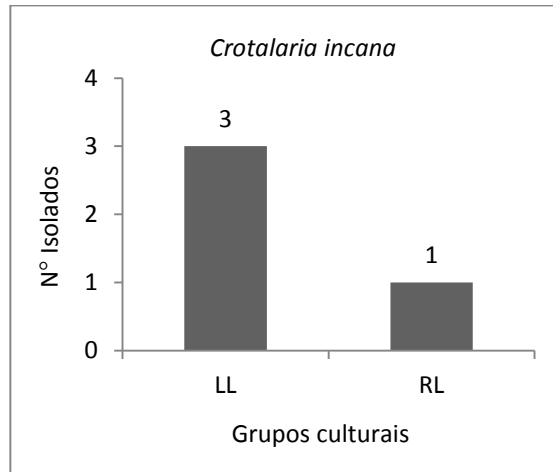
Fonte: Tapias (2016).

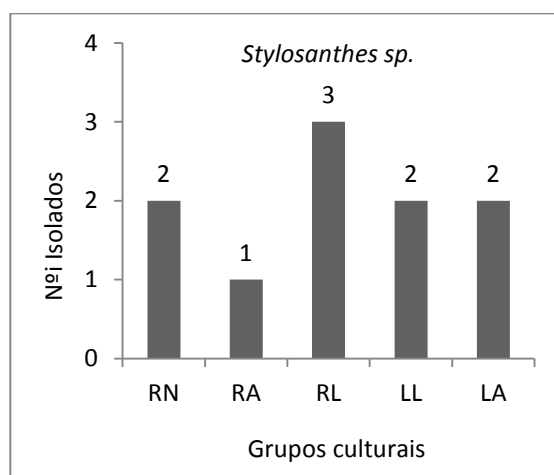
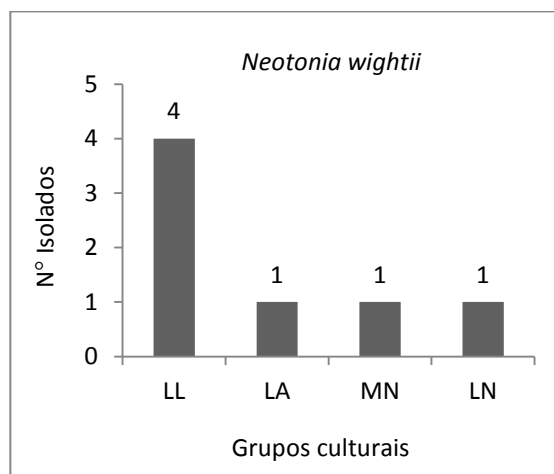
Observando a diversidade cultural nas diferentes espécies vegetais nos dois tipos de ambientes, a maior diversidade foi encontrada para espécie *M. setosa* apresentando seis grupos culturais, seguido das espécies *Stylosanthes* sp.no capim (Figura 4) e *M.calodendron* com cinco grupos culturais (Figura 5)

na canga. A espécie *C.icana* foi a que apresentou a menor diversidade cultural (Figura 4).

Figura 4 – Número de estirpes isoladas das leguminosas no capim, aglomeradas por tipos culturais baseados no tempo de crescimento e alteração do pH do meio de cultura.



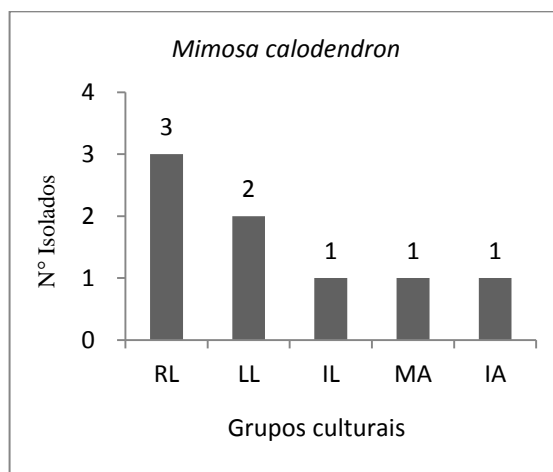




Legenda: Número de estirpes isoladas das leguminosas no capim, aglomeradas por tipos culturais baseados no tempo de crescimento e alteração do pH do meio: crescimento rápido com alcalinização do meio(RL),crescimento rápido com acidificação do meio (RA) e crescimento sem modificação do pH (RN); crescimento intermediário com alcalinização (IL) do meio de cultura; crescimento lento com alcalinização do meio (LL), com acidificação do meio (LA) e sem alteração do pH (LN).

Fonte: Tapias (2016).

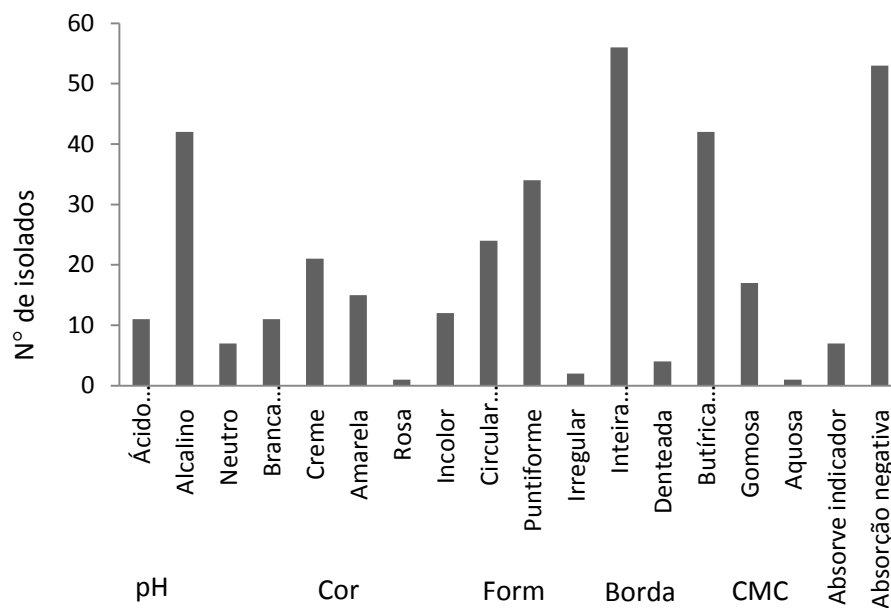
Figura 5 – Número de estirpes isoladas das leguminosas na canga, aglomeradas por tipos culturais baseados no tempo de crescimento e alteração do pH do meio de cultura.



Legenda: Número de estirpes isoladas das leguminosas na canga, aglomeradas por tipos culturais baseados no tempo de crescimento e alteração do pH do meio de cultura: crescimento rápido com alcalinização do meio (RL); crescimento intermediário com alcalinização (IL) do meio de cultura e com acidificação (IA); crescimento lento com alcalinização do meio (LL) e crescimento muito lento com (MA) alcalinização do meio de cultura.

Fonte: Tapias (2016).

Figura 6 – Distribuição das estirpes isoladas dos nódulos das leguminosas baseada nas características culturais.



Legenda: Distribuição das estirpes isoladas dos nódulos das espécies vegetais baseada nas características culturais: pH, cor, forma, borda, CMC (Consistência da massa da colônia) e absorção do corante.

Fonte: Tapias (2016).

Sequenciamento parcial do gene 16S rRNA

Do isolamento de 60 estirpes obtidas dos nódulos das mudas de leguminosas, um total de 24 bactérias foram sequenciadas, se identificaram 19 espécies, que pertenciam a um total de 11 gêneros e uma família.

Tabela 2– Número de estirpes sequenciadas e número de espécies encontradas no hospedeiro de origem.

Hospedeiro de origem	Área	Nº sequenciados	Nº espécies
<i>M. calodendron</i>	Canga	5	4
<i>M. setosa</i>	Capim	5	3
<i>M. sensitiva</i>	Capim	2	2
<i>C. incana</i>	Capim	2	1
<i>C. nictitans</i>	Capim	6	5
<i>N. wighti</i>	Capim	2	2
<i>Stylosanthes</i> sp.	Capim	2	2

Fonte: Tapias (2016).

Esses isolados formaram sete grupos culturais (LL, LA, RL, RN, RA, IL, IA) e tiveram entre 312 e 1264 pares de bases, as sequências obtidas mostraram uma similaridade de 99% e 100% com as sequências depositadas no GenBank (Tabela 3). A comparação revelou que as sequências foram filogeneticamente relacionadas com Filos de α e β Protobacteria, encontrados entre as estirpes de BFNNL, corroborando assim com pesquisas de diversidade de BFN, onde isolados provenientes das diversas espécies vegetais pertencem a ambos os filios em campos rupestres (Carvalho, 2010; Reis et al., 2010) e bactérias isoladas de minérios e áreas de reabilitação após processos de mineração (Melloni et al., 2004; Oliveira-Longatti et al., 2014; Valverde et al., 2006). Essa diversidade é evidenciada no resultado das análises de sequências que mostraram também a presença de gêneros considerados não-nodulíferos, embora em números reduzidos.

O sequenciamento parcial do gene 16S rRNA identificou 19 estirpes, sendo estas pertencentes aos gêneros *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Leifsonia*, *Sphingomonas*, *Skermanella*, *Stenotrophomonas*, *Steroidobacter*,

Variovorax, *Massilia*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas* uma bactéria pertencente à família Oxalobacteriaceae, ressaltando-se que quatro espécies foram identificadas como pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium* e uma espécie como *Burkholderia*. No entanto, duas foram consideradas como *Paenibacillus* e os gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Variovorax*, *Leifsonia*, *Stenotrophomonas* e *Sphingomonas* foram representados por uma espécie (Tabela 3). Os gêneros *Bradyrhizobium* e *Burkholderia* apresentam a maior ocorrência e eficiência relativa, sendo os mais utilizados em estudos de seleção de estirpes (Silva et al., 2012).

Os endofíticos de nódulos mais estudados pela sua ocorrência nos levantamentos são as estirpes dos gêneros *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Burkholderia* e *Bacillus* (Chen et al., 2005; Jaramillo et al., 2013; Kan et al., 2007; Lima et al., 2009; Silva, 2010; Silva et al., 2012; Stajković et al., 2009), sendo frequentemente isoladas dos nódulos das raízes das mais variadas espécies vegetais. Os gêneros *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Pantoea*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Pseudomonas* têm regularmente sido identificados a partir de nódulos de várias espécies de leguminosas (Aserseet et al., 2013; Han et al., 2005; Hardoim et al., 2015; Lajudie et al., 1999). Estirpes de *Stenotrophomonas*, *Enterobacter* e *Achromobacter* foram isoladas das plantas iscas feijão-caupi (Guimarães et al., 2012; Jaramillo et al., 2013) e siratro (Lima et al., 2009). No estudo de Guimarães et al. (2012) foi relatada por primeira vez simbiote *Achromobacter* nesta planta. *Bradyrhizobium* foi o gênero predominante. Também foi identificada a presença de *Rhizobium* e *Burkholderia*. Embora o gênero *Paenibacillus* é frequentemente identificado como endofítico de nódulos, também é capaz de nodular leguminosas promíscuas como feijão-caupi e siratro (Costa, 2014; Jaramillo et al., 2013; Oliveira-Longatti et al., 2015; Silva, 2012; Silva, 2015).

De acordo como os nossos resultados, as plantas que tiveram a maior diversidade de gêneros, quer nodulíferos quer não-nodulíferos foram *M. calodendron* e *C. nictitans* (Tabela 3). As leguminosas que se associaram com bactérias pertencentes a *Bradyrhizobium* foram *M.setosa*, *C. incana*, *N. wightii* e *Stylosanthes* sp. As espécies *N.wightii* e *Stylosanthes* sp. foram capazes de estabelecer simbiose tanto com rizobios quanto com diazotróficas associativas (*Paenibacillus* e *Pseudomonas*). Por outra parte, *Burkholderia*, *Bacillus* e *Variovorax* foram encontradas nas espécies vegetais *M calodendron*, *M. setosa* e *M. sensitiva* (Tabela 3).

Recentemente, um número crescente de artigos confirma a presença de membros de β - Protobacteria nos nódulos nos mais diversos locais do mundo, obtidos a partir de uma ampla gama de espécies de leguminosas, tais como *Mimosa sensitiva* (Pandey et al., 2005), *Glycinemax* (Chueire et al., 2003; Rumjanek et al., 1993), *Vicia faba* (Guerin et al., 1990) e *Phaseolusvulgaris* (Chueire et al., 2003; Silva et al., 2012), sendo espécies consideradas de grande importância econômica-social no Brasil. In vitro, a maioria das bactérias endofíticas mostraram propriedades de promoção do crescimento que indicam o seu potencial na promoção do crescimento das plantas quando colonizar a rizosfera (Aserse et al., 2013). Espécies do gênero *Bacillus* são capazes de promover crescimento vegetal em outras plantas, além das leguminosas e constituem uma das bactérias mais comuns do solo e são frequentemente isolados da rizosfera de plantas e de outros tecidos (Stajković et al., 2009).

Estirpes pertencentes a *Burkholderia*, isoladas de solos amazônicos apresentaram diferentes características morfológicas e características fisiológicas dependendo da espécie de leguminosa a partir da qual foram estudadas (Silva et al., 2012). Chen et al. (2005) demonstraram que *Burkholderia* foi capaz de nodular outras espécies de *Mimosa* sp., não apenas os hospedeiros de origem. Nesta pesquisa, o maior número de estirpes do gênero *Burkholderia* foram

isoladas do hospedeiro de origem *M. calodendron*. Essa simbiose particular, além de algumas outras, tem sido pela primeira vez identificada no Cerrado e na Caatinga, ambos os biomas contendo áreas de campo rupestre, no trabalho de Reis et al. (2010). Os autores também encontraram que estirpes de *Bradyrhizobium* estabeleciam uma simbiose altamente eficiente com a espécie *M. setosa*, na Caatinga, fato contrastante com a simbiose pouco eficiente entre essas duas espécies no Cerrado. Da mesma maneira, em nosso estudo estirpes de *Bradyrhizobium* sp. estabeleceram simbiose com *M. setosa*, outrossim essa espécie vegetal foi capaz de estabelecer simbiose com *Bacillus* sp. E *Stenotrophomonas* sp.

M. setosa mostrou-se prolífica na captura de espécies, embora nem todas nodulíferas, encontrando-se nos nódulos espécies pertencentes aos gêneros *Sphingomonas* e *Stenotrophomonas* sp. e a espécie *Skermanella aerolata*. Outra leguminosa com um elevado número de isolados foi *Chamaecrista nictitans*. Na leguminosa foram encontradas as espécies *Herbiconiuxmoechotypicola*, *Leifsonia xyli*, *Massilia* sp. e *Massiliatimonae*, entre outros, além de uma actinobacteria.

A ocorrência das estirpes bacterianas dos gêneros *Agrobacterium*, *Burkholderia*, *Paenibacillus*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, e *Serratia* nos nódulos de *Crotalaria incana* foi relatada (Aserse et al., 2013; Keller, 2014). O gênero *Stylosanthes* destaca-se como uma leguminosa forrageira de ampla resistência a pressões bióticas e abióticas e a leguminosa estabelece simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio (Paciulo et al., 2003). *Variovorax* e *Sphingomonas* são conhecidos por serem gêneros oportunistas e, possivelmente, a colonização das espécies de *Mimos*, a neste trabalho, foi decorrente dessa interação, fato comum no isolamento de microrganismos nos nódulos. Ora a nodulação da espécie *Mimosa sensitiva* foi descrita com os simbiontes de

Bradyrhizobium (Liu et al., 2007), *Rhizobium* (Barrett e Parker, 2006; Liu et al., 2007) e *Cupriavidus* (Barrett e Parker, 2006; Chen et al. 2003).

Estirpes representantes do gênero *Burkholderia* provenientes de diferentes espécies de leguminosas arbóreas em viveiro do Quadrilátero Ferrífero foram encontradas nos nódulos de *Mimosa caesalpinifolia*, simbiose amplamente documentada na literatura e com estirpes de *Bradyrhizobium* (Silva, 2015). A eficiência de ambas as associações resultou na produção de inoculantes aprovados. Embora a presente pesquisa não tenha isolado estirpes dessa espécie arbórea, o fato reflete a importância de estudos de diversidade de BNFNL e no desenvolvimento de inoculantes comerciais. Outro exemplo do sucesso na produção de inoculantes é a aprovação de estirpes de *Bradyrhizobium* com *Piptadeniagonoacantha* (SEMIA 6382 e SEMIA 6410)(MAPA, 2011).

Alguns trabalhos evidenciam a ocorrência de bactérias pertencentes ao gênero *Rhizobium* nos mais diversos ambientes (Barrett e Parker, 2006; Carvalho, 2010; Guimarães et al., 2012; Liu et al., 2007, Silva, 2015), o que contrasta com os resultados obtidos neste trabalho. Dados da literatura mostram que o gênero *Rhizobium* consiste de um grupo de bactérias bastante diverso; no entanto, atualmente apenas uma fração de rizóbios pertencem a este gênero e foram posteriormente identificados como *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, e *Mesorhizobium* (Laranjo, et al., 2014).

Estudos subsequentes poderão avaliar a potencialidade destes isolados para o desenvolvimento de novas pesquisas visando seu uso como inoculantes nas leguminosas de origem *M. calodendron*, *M. setosa*, *M. sensitiva*, *C. incana*, *C. nictitans*, *N. wightii* *Stylosanthes* sp.

Tabela 3— Identificação de estirpes com base nas sequências do 16S rRNA mais similares encontradas no GenBank. Os isolados são oriundos de diferentes espécies de leguminosas.

Hospedeiro de origem	Códigos isolados	Códigos UFLA	Grupos culturais	PB	Espécie	Si	Acesso
<i>M. calodendron</i>	Cg3N4A	05-75	IA	312	<i>Leifsonia</i> sp.	100	KC987456.1
<i>M. calodendron</i>	Cg4N2A	05-33	RL	464	<i>Burkholderia</i> sp.	99	AY528706.1
<i>M. calodendron</i>	Cg4N2A1	05-71	RL	777	<i>Burkholderia</i> sp.	99	AY528706.1
<i>M. calodendron</i>	Cg4N1A2	05-73	LL	391	<i>Sphingomonas</i> sp.	99	HE814641.1
<i>M. calodendron</i>	Cg4N1B	05-57	LL	1264	<i>Skermanella aerolata</i>	99	NR_043929.1
<i>M. setosa</i>	Ca1N4A	05-42	RL	989	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	99	KC853183.1
<i>M. setosa</i>	Ca7D5	05-30	RA	416	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	99	CP013949.1
<i>M. setosa</i>	Ca7B5A	05-53	RN	1198	<i>Bacillus</i> sp.	99	KM187602.1
<i>M. setosa</i>	Ca7B1A	05-26	LL	825	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	FR822763.1
<i>M. setosa</i>	Ca7B4A	05-62	IL	750	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	99	NR_137331.1
<i>M. sensitiva</i>	Ca7C2	05-50	LN	598	<i>Steroidobacter</i> sp.	99	HQ183826.1
<i>M. sensitiva</i>	Ca7C3A	05-80	IL	538	<i>Variovorax</i> sp.	99	KM187214.1

Continua...

Conclusão.

Hospedeiro de origem	Códigos isolados	Códigos UFLA	Grupos culturais	PB	Espécie	Si	Acesso
<i>C. incana</i>	Ca2D1A	05-40	LL	325	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	99	KX289843.1
<i>C. incana</i>	Ca2D3	05-69	LL	1211	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	KC113614.2
<i>C. nictitans</i>	Ca10B4B	05-29	RL	598	Oxalobacteraceae	99	EU446139.1
<i>C. nictitans</i>	Ca10B4D	05-31	RL	370	<i>Massilia</i> sp.	99	AB545620.1
<i>C. nictitans</i>	Ca10B3	05-81	LA	442	<i>Leifsonia</i> xyli	99	EU340910.1
<i>C. nictitans</i>	Ca10B4B1	05-58	LL	424	<i>Burkholderia</i> sp.	99	NR_117691.1
<i>C. nictitans</i>	Ca10B4A	05-77	RL	395	<i>Massilia</i> timonae	100	KP862725.1
<i>C. nictitans</i>	Ca7F2A	05-64	LA	613	<i>Paenibacillus</i> sp.	100	KF979149.1
<i>N. wightii</i>	Ca7E2	05-59	LL	1214	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	JF266645.1
<i>N. wightii</i>	Ca7E5	05-53	LL	548	<i>Paenibacillus</i> sp.	99	KF979149.1
<i>Stylosanthes</i> sp.	Ca7D1B1	05-28	RN	615	<i>Pseudomonas</i> sp.	100	KM187066.1
<i>Stylosanthes</i> sp.	Ca7D5A1	05-84	LL	569	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	HQ641214.2

Fonte: Tapias (2016).

CONCLUSÕES

Os principais gêneros encontrados foram *Bradyrhizobium* e *Burkholderia*, e as espécies que tiveram a maior diversidade de gêneros foram *C. nictitans* e *Stylosanthes* sp. Não se encontraram bactérias pertencentes ao gênero *Rhizobium*, enquanto dentre o grupo das endofíticas, se obtiveram os gêneros *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Variovorax*, *Leifsonia*, *Stenotrophomonas* e *Sphingomonas*.

A maior diversidade morfológica foi encontrada para espécie *M. setosa*, seguida das espécies *Stylosanthes* sp. no capim e *M. calodendron* na canga. A espécie *C. icana* foi a que apresentou a menor diversidade cultural. As leguminosas *M. calodendron* na canga e *C. nictitans* no capim apresentaram maior diversidade de bactérias.

O estudo contribuiu para o conhecimento da diversidade de bactérias diazotróficas simbióticas e bactérias fixadoras de nitrogênio de vida livre em dois tipos específicos de ambientes, uma vez que sua ocorrência indica o potencial de uso como inoculantes nas leguminosas de origem *M. setosa*, *M. sensitiva*, *M. calodendron*, *C. incana*, *C. nictitans*, *N. wightii*, *Stylosanthes* sp., em programas de recuperação de áreas impactadas pela mineração de ferro.

REFERÊNCIAS

ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic acids research**, London, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, sep. 1997.

ASERSE, A. A. et al. Diversity of sporadic symbionts and nonsymbiotic endophytic bacteria isolated from nodules of woody, shrub, and food legumes in Ethiopia. **Applied microbiology and biotechnology**, Berlin, New York, v. 97, n. 23, p. 10117-10134, dec. 2013.

BARRETT, C. F., PARKER, M. A. Prevalence of *Burkholderia* sp. nodule symbionts on four mimosoid legumes from Barro Colorado Island, Panama. **Systematic and applied microbiology**, Stuttgart, New York, v. 28, n. 1, p. 57-65, 2005.

BRASIL. Ministério da Justiça. **Decreto Federal nº 97.632**, de 10 de abril de 1989. Brasília, 1989.

CARMO, F. F.; JACOBI, C. M. A vegetação de canga no Quadrilátero Ferrífero, Minas Gerais: caracterização e contexto fitogeográfico. **Rodriguésia, Revista do Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, Rio de Janeiro, v. 64, n. 3, p. 527-541, jul./sep. 2013.

CHAER, G. M. et al. Nitrogen-fixing legume tree species for the reclamation of severely degraded lands in Brazil. **Tree physiology**, Victoria, v. 31, n. 2, p. 139-149, dec. 2011.

CHEN, W. M. et al. Legume symbiotic nitrogen fixation by β -proteobacteria is widespread in nature. **Journal of bacteriology**, Washington, v. 185, n. 24, p. 7266-7272, dec. 2003.

CHEN W.M. et al. Proof that *Burkholderia* strains form effective symbioses with legumes: a study of novel Mimosa-nodulating strains from South America.

Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 71, n. 11, p. 7461-71, nov. 2005.

CHUEIRE, L. M. O. et al. Classificação taxonômica das estirpes de rizobio recomendadas para as culturas da soja e do feijoeiro baseada no sequenciamento do gene 16SrRNA. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 27, n. 5, p. 833-840, ago. 2003.

COSTA, J. D. S. **Diversidade fenotípica, genética e simbiótica de bactérias isoladas de nódulos de diferentes leguminosas florestais em viveiro**. 2014. 86 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

DORR, J.V.N. **Physiographic, stratigraphic, and structural development of the Quadrilátero Ferrífero Minas Gerais Brazil**. Geological survey professional paper. Washington: United States Government Printing Office, 1969.641

FRED, E.B.; WAKSMAN S.A. **Laboratory manual of general microbiology**, with special reference to the microorganisms of the soil. New York: McGraw-Hill, 145p. 1928.

GUERIN, V.; TRINCHANT, J. C.; RIGAUD, J. Nitrogen fixation (C_2H_2 reduction) by Broad Bean (*Vicia faba* L.) nodules and bacteroids under water-restricted conditions. **Plant Physiology**, Rockville, Lancaster, v. 92, n. 3, p. 595-601, mar. 1990.

GUIMARÃES, A. A. et al. Genetic and symbiotic diversity of nitrogen-fixing bacteria isolated from agricultural soils in the Western Amazon by using cowpea as the trapplant. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 78, n. 18, p. 6726-6733, sep. 2012.

HAN, S. Z.; WANG, E. T.; CHEN, W. X. Diverse bacteria isolated from root nodules of *Phaseolus vulgaris* and species within the genera *Campylotropis* and *Cassia* grown in China. **Systematic and applied microbiology**, Stuttgart, New York, v. 28, n. 3, p. 265-276, apr. 2005.

HARDOIM, P. R. et al. The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 79, n. 3, p. 293-320, sep. 2015.

JARAMILLO, P. M. D. et al. Symbiotic nitrogen-fixing bacterial populations trapped from soils under agroforestry systems. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 70, n. 6, p. 397-404, nov./dec. 2013.

JORDAN, D. C. Family III Rhizobiaceae Conn 1938. In: KRIEG, N.R.; HOLT, J. D (Eds.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore, London: Williams and Wilkins, 1984. p. 234-244. 1984.

KAN, F. L. et al. Characterization of symbiotic and endophytic bacteria isolated from root nodules of herbaceous legumes grown in Qinghai-Tibet plateau and in other zones of China. **Archives of microbiology**, Berlin, New York, v. 188, n. 2, p. 103-115, ago. 2007.

KELLER, K. R. Mutualistic rhizobia reduce plant diversity and alter community composition. **Oecologia**, Germany, v. 176, n. 4, p. 1101-1109. dec. 2014.

LAJUDIE, P. de. et al. *Agrobacterium* bv. 1 strains isolated from nodules of tropical legumes. **Systematic and applied microbiology**, Stuttgart, New York, v. 22, n. 1, p. 119-132, feb. 1999.

LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. In: GOODFELLOW, M.; STACKEBRANDT, E. **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**. Wiley: New Jersey, v. 5. 1991.

LARANJO, M. et al. Legume growth-promoting rhizobia: an overview on the Mesorhizobium genus. **Microbiological research**, Germany, v. 169, n. 1, p. 2-17, jan. 2014.

LIMA, A. S. et al. Nitrogen-fixing bacteria communities occurring in soils under different uses in the Western Amazon Region as indicated by nodulation of siratro (*Macropodium atropurpureum*). **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 319 n.1, p. 127-145, jun. 2009.

LIU, X. Y. et al. Diverse bacteria isolated from root nodules of *Trifolium*, *Crotalaria* and *Mimosa* grown in the subtropical regions of China. **Archives of microbiology**, Berlin, New York, v. 188 n.1, p. 1-14, jul. 2007.

MELLONI, R. et al. Densidade e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas endofíticas em solos de mineração de bauxita, em reabilitação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 28, n. 1, p. 85-93, jan./feb. 2004.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO – MAPA. Instrução Normativa nº 13, de 24/03/2011.

MOREIRA F.M.S. **Caracterização de estirpes de rizóbio isoladas de espécies florestais pertencentes a diversos grupos de divergência de Leguminosa e introduzidas ou nativas da Amazônia e Mata Atlântica**. 1991. 152 p. Tese (Doutorado em Agronomia)
–Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1991.

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

NIEMANN, S., et al. Evaluation of the resolving power of three different DNA fingerprinting methods to discriminate among isolates of a natural *Rhizobium meliloti* population. **Journal of applied microbiology**, Oxford, vol. 82, n. 4, p. 477-484, apr. 1997.

OLIVEIRA-LONGATTI, S. M. et al. Bacteria isolated from soils of the western Amazon and from rehabilitated bauxite-mining areas have potential as plant growth promoters. **World Journal of Microbiology e Biotechnology**, Netherlands, v. 30, n. 4, p.1239-1250, apr. 2014.

PACIULLO, D. S. C. et al. Características produtivas e qualitativas de pastagem de braquiária em monocultivo e consorciada com estilosantes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 3, p. 421-426.mar.2003.

PANDEY, P.; KANG, S. C.; MAHESHWARI, D. K. Isolation of endophytic plant growth promoting *Burkholderia* sp. MSSP from root nodules of *Mimosa pudica*. **Current Science**, Crawley, v. 89, n.1, p. 177-180, jul. 2005.

PORTO, M.L.; SILVA, M.F.F. Tipos de vegetação metalófila em áreas da Serra de Carajás e de Minas Gerais, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, Belo Horizonte, v. 3, n. 2, p. 13-21, 1989.

REIS, F.B. J.R. et al. Nodulation and nitrogen fixation by *Mimosa* spp. in the Cerrado and Caatinga biomes of Brazil. **New Phytologist**, Cambridge, v. 186, n. 4, p. 934-946, jun. 2010.

RIZZINI, C. T. **Tratado de fitogeografia do Brasil**: aspectos ecológicos, sociológicos e florísticos. 2. ed. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural. 1997. 747 p.

RUMJANEK, N. G. et al. Common soybean inoculant strains in Brazil are members of *Bradyrhizobium elkanii*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, n. 12, p. 4371-4373. dec.1993.

SANTOS, J. V. dos et al. Biological attributes of rehabilitated soils contaminated with heavy metals. **Environmental Science and Pollution Research**, Landsberg, v. 23, n.7 p.67356748, apr. 2016.

SILVA, A. T. D. **Diversidade de bactérias simbióticas e não simbióticas isoladas de nódulos de siratro.** 2012. 93 p. Dissertação (Mestrado em Ciências do Solo) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

SILVA, J. S. D. **Simbioses de rizóbio com nove espécies de leguminosas florestais em viveiro do Quadrilátero Ferrífero.** 2015. 96p. Dissertação (Mestrado em Ciências do Solo) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2015.

SILVA, K. da. et al. Diazotrophic *Burkholderia* species isolated from the Amazon region exhibit phenotypical, functional and genetic diversity. **Systematic and applied microbiology**, Stuttgart, New York, v. 35, n. 4, p. 253-262, jun. 2012.

SILVA, M. A. P. **Diversidade e eficiência de bactérias isoladas de nódulos de diferentes leguminosas da região do Alto Solimões, AM.** 2010. 93 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

STAJKOVIĆ, O. et al. Isolation and characterization of endophytic non-rhizobial bacteria from root nodules of alfalfa (*Medicago sativa* L.). **Botanicaserbica**, Belgrade, v. 33, n. 1, p. 107-114, jan. 2009.

VALVERDE, A. et al. *Burkholderia ferrariae* sp. nov., isolated from an iron ore in Brazil. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, London, v. 56, n. 10, p. 2421-2425, oct. 2006.

VELOSO, H.P.; RANGEL FILHO, A.L.R.; LIMA, J.C.A. Classificação da vegetação brasileira adaptada a um sistema universal. Rio de Janeiro: **IBGE**, 1991. 124 p.

VIANA, P.L.; LOMBARDI, J.A. Florística e caracterização dos campos rupestres sobre canga na Serra da Calçada, Minas Gerais, Brasil. **Rodriguésia, Revista do Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, Rio de Janeiro, v. 58, n. 1, p. 159-177, 2007.

VINCENT, J.M. **A manual for the practical study of root-nodule bacteria.**
Oxford: Blackwell Scientific Publications. 1970. 164 p.

ANEXO

Tabela 4 - Caracterização cultural das 60 estirpes isoladas das mudas de espécies de leguminosas em campo rupestre e área de reabilitação após mineração de ferro, pertencentes a mineradora Vale, em Nova Lima-MG e Brumadinho-MG. Significado das abreviações no final da tabela.

Estirpe	Cresc.	F(mm)	pH	Forma	Elev.	Borda	Sup.	Muco	Consist.	Det. Óticos	Cromog.	Abs. Cor.
Cg4N4A	Ráp.	< 1	Al.	Punt.	Len.	Int.	Lisa	Pouco	But.	Transl.	Bra.	Não
Ca1N4A	Ráp.	= 1	Al.	Punt.	Len.	Int.	Lisa	Esc.	But.	Transp.	Inc.	Não
Ca7B5	Ráp.	> 1	Neu.	Circ.	Conv.	Int.	Lisa	Mod.	Gom.	Opaca	Cre.	Sim
Ca7D1B1	Ráp.	> 1	Neu.	Circ.	Plana	Int.	Lisa	Pouco	But.	Opaca	Ama.	Sim
Ca10B4B	Ráp.	> 1	Al.	Circ.	Len.	Dent.	Lisa	Pouco	But.	Transl.	Inc.	Sim
Ca1N4A1	Ráp.	= 2	Al.	Circ.	Len.	Int.	Lisa	Pouco	But.	Transp.	Cre.	Não
Ca10B4D	Ráp.	> 1	Al.	Circ.	Len.	Int.	Lisa	Pouco	But.	Transl.	Bra.	Não
Ca7B2C	Ráp.	< 1	Al.	Punt.	Len.	Int.	Lisa	Pouco	But.	Opaca	Bra.	Não
Cg4N2A	Ráp.	< 1	Al.	Punt.	Len.	Int.	Lisa	Pouco	But.	Opaca	Bra.	Não
Ca7D1B2A	Ráp.	= 1	Al.	Circ.	Len.	Int.	Lisa	Mod.	But.	Transl.	Ama.	Sim
Ca7C4A	Inter.	> 1	Al.	Circ.	Conv.	Int.	Lisa	Pouco	But.	Opaca	Cre.	Não
Ca7B4A	Inter.	< 1	Al.	Punt.	Len.	Int.	Lisa	Mod.	Gom.	Transl.	Inc.	Não
Ca7D1A	Inter.	> 1	Al.	Circ.	Len.	Int.	Lisa	Pouco	Gom.	Opaca	Cre.	Não
Ca10B1	Inter.	< 1	Al.	Punt.	Len.	Int.	Lisa	Mod.	But.	Transl.	Inc.	Não
Cg4N1A6	Inter.	< 1	Al.	Punt.	Len.	Int.	Lisa	Pouco	But.	Transl.	Cre.	Não
Ca2D1A	Lent.	< 1	Al.	Punt.	Len.	Int.	Lisa	Mod.	Gom.	Opaca	Inc.	Não
Ca7B2	Lent.	< 1	Al.	Punt.	Len.	Int.	Lisa	Mod.	Gom.	Opaca	Cr.	Não
Ca7B1A	Lent.	< 1	Al.	Punt.	Len.	Int.	Lisa	Pouco	Gom.	Opaca	Inc.	Não
Ca7B1B	Lent.	< 1	Al.	Punt.	Len.	Int.	Lisa	Pouco	But.	Transl.	Inc.	Não
Cg4N1A2	Lent.	< 1	Al.	Punt.	Len.	Int.	Lisa	Esc.	But.	Opaca	Ama.	Não
Cg4N1B	Lent.	> 2	Al.	Circ.	Conv.	Int.	Lisa	Pouco	Gom.	Opaca	Bra.	Não
Ca7D5	Lent.	< 1	Al.	Punt.	Len.	Int.	Lisa	Pouco	But.	Opaca	Cre.	Não
Ca7D2	Lent.	< 1	Ác.	Punt.	Len.	Int.	Lisa	Esc.	But.	Transl.	Ama.	Não
Ca7F5B	Lent.	< 1	Al.	Punt.	Len.	Int.	Lisa	Pouco	But.	Transl.	Inc.	Não

Continua...

Continuação...

Estirpe	Cresc.	F(mm)	pH	Forma	Elev.	Borda	Sup.	Muco	Consist.	Det. Óticos	Cromog.	Abs. Cor.
Ca7F4	Lent.	< 1	Al.	Punt.	Len.	Int.	Lisa	Pouco	Gom.	Transl.	Bra.	Não
Ca7C2	Lent.	< 1	Neu.	Punt.	Len.	Int.	Lisa	Esc.	But.	Transl.	Cre.	Não
Ca7C3	Lent.	= 2	Alc.	Circ.	Len.	Int.	Lisa	Esc.	But.	Transl.	Cre.	Não
Ca10B3	Lent.	< 1	Ác.	Punt.	Len.	Int.	Lisa	Esc.	But.	Transl.	Cre.	Não
Ca7E5	Lent.	< 1	Al.	Punt.	Len.	Int.	Lisa	Pouco	Gom.	Opaca	Inc.	Não
Ca10A1A	Lent.	> 1	Al.	Circ.	Len.	Int.	Lisa	Pouco	Gom.	Opaca	Inc.	Não
Ca10A2	Lent.	> 1	Al.	Circ.	Len.	Int.	Lisa	Pouco	Gom.	Opaca	Bra.	Não
Ca10B4B1	Lent.	= 5	Al.	Circ.	Conv.	Int.	Lisa	Mod.	Gom.	Opaca	Ama.	Sim
Ca7E2	Lent.	> 1	Al.	Circ.	Len.	Int.	Lisa	Pouco	But.	Opaca	Cre.	Não
Ca7E3	Lent.	> 1	Ác.	Punt.	Len.	Int.	Lisa	Esc.	But.	Transl.	Ama.	Não
Ca10B5	Lent.	< 1	Al.	Punt.	Len.	Int.	Lisa	Pouco	But.	Opaca	Cre.	Não
Ca7B2B	Lent.	< 1	Al.	Punt.	Len.	Int.	Lisa	Esc.	But.	Transl.	Ros.	Não
Ca7F2B	Lent.	< 1	Al.	Punt.	Len.	Int.	Lisa	Pouco	But.	Transl.	Bran.	Não
Ca7F2A	Lent.	< 1	Ác.	Punt.	Len.	Int.	Lisa	Esc.	But.	Transl.	Inc.	Não
Ca2D4	Lent.	> 1	Al.	Circ.	Len.	Den.	Lisa	Pouco	Gom.	Opaca	Bra.	Não
Ca1N1	Lent.	> 1	Ác.	Circ.	Len.	Int.	Lisa	Esc.	But.	Transl.	Ama.	Não
Ca7F4B	Lent.	< 1	Al.	Punt.	Len.	Int.	Lisa	Esc.	But.	Opaca	Ama.	Não
Ca2C1	Lent.	< 1	Ác.	Punt.	Len.	Int.	Lisa	Esc.	But.	Transp.	Inc.	Não
Ca2D3	Lent.	> 1	Al.	Circ.	Len.	Int.	Lisa	Mod.	Gom.	Transl.	Bra.	Não
Ca2B3	Lent.	< 1	Ác.	Punt.	Len.	Int.	Lisa	Esc.	But.	Transp.	Ama.	Não
Cg4N1A1A	Lent.	< 1	Al.	Punt.	Len.	Int.	Lisa	Pouco	But.	Transl.	Cre.	Não
Ca2B2	Lent.	< 1	Ác.	Punt.	Len.	Int.	Lisa	Pouco	But.	Transl.	Ama.	Não
Cg3N5B2	M. L.	= 1	Ác.	Circ.	Len.	Int.	Lisa	Pouco	But.	Transl.	Cre.	Não
Ca10A1	M. L.	= 1	Neu.	Circ.	Plana	Int.	Lisa	Pouco	But.	Transl.	Cre.	Não
Cg3N4A	Inter.	< 1	Ác.	Punt.	Plana	Int.	Lisa	Esc.	But.	Transp.	Ama.	Não
Ca7D5A	Ráp.	= 1	Al.	Circ.	Len.	Int.	Lisa	Abun.	Gom.	Transl.	Cre.	Não
Ca10B4A	Ráp.	≥ 3	Al.	Circ.	Len.	Den.	Lisa	Mod.	But.	Opaca	Cre.	Sim
Ca10A1C	Lent.	< 1	Neu.	Punt.	Len.	Int.	Lisa	Esc.	But.	Transp.	Ama.	Não

Continua...

Conclusão

Estirpe	Cresc.	F(mm)	pH	Forma	Elev.	Borda	Sup.	Muco	Consist.	Det. Óticos	Cromog.	Abs. Cor.
Ca7D3	Lent.	< 1	Ác.	Punt.	Len.	Int.	Lisa	Esc.	But.	Transp.	Ama.	Não
Ca7C3A	Inter.	> 2	Al.	Circ.	Len.	Int.	Lisa	Esc.	But.	Transp.	Ama.	Não
Cg4N2A1	Ráp.	= 1	Al.	Circ.	Len.	Int.	Lisa	Pouco	But.	Transp.	Cre.	Sim
Ca7B5A	Ráp.	= 1	Neu.	Irreg.	Plana	Den.	Rug.	Pouco	But.	Opaca	Ama.	Não
Ca7D1B2	Ráp.	= 1	Neu.	Irreg.	Len.	Int.	Lisa	Mod.	Gom.	Transl.	Cre.	Não
Ca7D5A1	Lent.	< 1	Al.	Punt.	Len.	Int.	Lisa	Esc.	But.	Transl.	Cre.	Não
Ca2D2	Ráp.	= 1	Al.	Circ.	Len.	Int.	Lisa	Mod.	Aqu.	Transl.	Bra.	Não
Ca7D1B2a	Ráp.	< 1	Al.	Punt.	Len.	Int.	Lisa	Pouco	Gom.	Transl.	Cre.	Não

Legenda das abreviações: Cresc.: Crescimento, Ráp.: Rápido, Inter.: Intermediário, Lent.: Lento, M. L: Muito Lento; F:diâmetro; Al.: Alcalino, Neu.: Neutro, Ác.: Ácido; Punt.: Puntiforme, Circ.: Circular, Irreg.: Irregular; Elev.: Elevação, Len.: Lenticular, Den.: Denteada; Int.: Inteira; Sup.: Superfície, Rug.: Rugosa; Esc.: Escasso, Mod.: Moderado, Abun.: Abundante; Consist.: Consistência; But.: Butírica, Gom.: Gomosa, Aqu.: Aquosa; Det. Óticos: Detalhes Óticos, Transl.: Translúcida, Trasnp.: Transparente; Cromog.: Cromogênese; Bra.: Branca; Ama.: Amarela; Cre.: Creme; Inc.: Incolor; Ros.: Rosa; Abs. Cor.: Absorção de Corante.