



JACQUELINE SAVANA DA SILVA

**SIMBIOSES DE RIZÓBIO COM NOVE
ESPÉCIES DE LEGUMINOSAS FLORESTAIS
EM VIVEIRO DO QUADRILÁTERO
FERRÍFERO**

LAVRAS – MG

2015

JACQUELINE SAVANA DA SILVA

**SIMBIOSES DE RIZÓBIO COM NOVE ESPÉCIES DE LEGUMINOSAS
FLORESTAIS EM VIVEIRO DO QUADRILÁTERO FERRÍFERO**

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.

Orientadora

Dra. Fatima Maria de Souza Moreira

LAVRAS – MG

2015

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

Silva, Jacqueline Savana da.

Simbioses de Rizóbio com Nove Espécies de Leguminosas
Florestais em Viveiro do Quadrilátero Ferrífero / Jacqueline
Savana da Silva. – Lavras : UFLA, 2015.

95 p. : il.

Dissertação (mestrado acadêmico)—Universidade Federal de
Lavras, 2015.

Orientador(a): Fátima Maria de Souza Moreira.

Bibliografia.

1. Leguminosas arbóreas. 2. Fixação biológica de nitrogênio.
3. Recuperação de áreas degradadas. I. Universidade Federal de
Lavras. II. Título.

JACQUELINE SAVANA DA SILVA

**SIMBIOSES DE RIZÓBIO COM NOVE ESPÉCIES DE LEGUMINOSAS
FLORESTAIS EM VIVEIRO DO QUADRILÁTERO FERRÍFERO**

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 26 de fevereiro de 2015.

Dr. Eduardo Gross	UESC
Dra. Patrícia Gomes Cardoso	UFLA
Dra. Paula Rose de Almeida Ribeiro	UFLA

Dra. Fatima Maria de Souza Moreira

Orientadora

LAVRAS – MG

2015

A Jesus Cristo, por seu amor incondicional

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Mestre dos Mestres, Jesus Cristo, pela minha existência, por preencher meus vazios mais íntimos, pela oportunidade de ter uma nova chance a cada novo dia, por ser especialista em manter o sorriso em meu rosto e por me ensinar que aquilo que realmente traz sentido à vida se encontra Nele.

Agradeço aos meus pais, Jurandir e Jovita, pela minha criação regada de tanto amor, dedicação e paciência. Aos meus irmãos, Juliano, Juliana e Marcelo, por tornarem os meus dias mais alegres. Aos meus sobrinhos Otávio, Rafael, Thallys e Luigi, por me ensinarem que o sentido da vida está nas coisas mais simples e puras. Aos meus cunhados, Flávia e Carmelo, pela amizade e companheirismo. À minha prima, amiga e irmã, Jovita, por me ensinar o *carpe diem*.

À Universidade Federal de Lavras, ao Departamento de Ciência do Solo e ao CNPq, que tornaram possível a concretização desse sonho.

À Profa. Dra. Fátima Maria de Souza Moreira, por acreditar em minha capacidade e me conferir a oportunidade de aprender através de sua orientação durante todos esses anos.

Ao projeto CRA-RDP-00136-10 (FAPEMIG / FAPESP / FAPESPA / VALE S.A.), “Diversidade de plantas e de organismos do solo com potencial biotecnológico e indicadores de recuperação ambiental em Minas Gerais”, Vale, pelo apoio financeiro.

À banca de defesa, pela disponibilidade e contribuição.

Aos técnicos do Laboratório de Microbiologia do Solo (LMS) Marlene e Manuel, pela amizade e ajudas constantes.

A todos os amigos do LMS pela amizade durante esses anos, em especial à Amanda Azarias, Amanda Monique, Cibelli, Elzane, Isaac, Jordana,

Linnajara, Maira, Márcia e Paula, pelo auxílio no desenvolvimento das atividades deste projeto.

RESUMO

A degradação ambiental causada pela mineração resultou na criação de leis ambientais que obrigam as empresas mineradoras a mitigar os impactos causados por essa atividade. A revegetação com diversas espécies de plantas é uma técnica muito utilizada para a reabilitação dessas áreas. Entretanto, esse processo é lento e limitado quando ocorre natural e espontaneamente. A utilização de espécies arbóreas leguminosas inoculadas com estirpes de rizóbios é uma alternativa indicada para a recuperação e sucessão vegetal de solos impactados. O objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade fenotípica, genotípica e simbiótica de bactérias isoladas de nódulos de mudas de espécies de leguminosas arbóreas utilizadas para a recuperação de áreas degradadas pela mineração, sendo elas: *Acacia farnesiana*, *Anadenanthera colubrina*, *Clitoria fairchildiana*, *Erythrina speciosa*, *Inga marginata*, *Inga sessilis*, *Mimosa caesalpiniiifolia*, *Piptadenia gonoacantha* e *Plathymenia reticulata*. Através do isolamento dos nódulos, foram obtidas 93 estirpes de bactérias que foram submetidas ao experimento de autenticação em simbiose com siratro (*Macroptilium atropurpureum*). O experimento foi realizado em casa de vegetação em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com três repetições e conduzido por um período de 45 dias. Para verificar a diversidade genética, realizou-se a extração do DNA genômico e o sequenciamento parcial do gene 16S rRNA. Das 93 estirpes isoladas, foram sequenciadas 43, as quais são representantes de três dos sete grupos culturais formados: RA (crescimento rápido com acidificação do meio de cultura), RAL (crescimento rápido com alcalinização do meio de cultura) e LAL (crescimento lento com alcalinização do meio de cultura). Foram encontrados os gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Paenibacillus*, *Mesorhizobium*, *Variovorax*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Mucilaginibacter*, *Polaromonas*, *Dyella*, *Pseudomonas*, *Terrioglobus* e *Sphingomonas*. Nos experimentos de autenticação, 33 % dos isolados nodularam. Foi encontrada alta diversidade genética, fenotípica e simbiótica nos rizóbios estudados.

Palavras-chave: Leguminosas arbóreas. Fixação biológica de nitrogênio. Recuperação de áreas degradadas.

ABSTRACT

The environmental degradation caused by mining resulted in the creation of environmental laws which require mining companies to mitigate the impacts caused by this activity. Revegetation with various plant species is a technique widely used for the rehabilitation of these areas. However, this process is slow and limited, when it occurs naturally and spontaneously. The use of leguminous tree species inoculated with rhizobial strains is an alternative indicated for the recovery and plant succession of impacted soils. The objective of this study was to evaluate the phenotypic, genotypic and symbiotic diversity of bacteria isolated from seedling nodules of leguminous tree species used for the recovery of degraded areas by mining. They are: *Acacia farnesiana*, *Anadenanthera colubrina*, *Clitoria fairchildiana*, *Erythrina speciosa*, *Inga marginata*, *Inga sessilis*, *Mimosa caesalpiniiifolia*, *Piptadenia gonoacantha* and *Plathymenia reticulata*. By isolating the nodules, 93 strains of bacteria were obtained and they were submitted to the authentication experiment in symbiosis with siratro (*Macroptilium atropurpureum*). The experiment was carried out in a greenhouse, in a completely randomized design (CRD) with three replications, and conducted for a period of 45 days. In order to verify the genetic diversity, the extraction of genomic DNA and the partial sequencing of the 16S rRNA gene was performed. From 93 strains isolated, 43 were sequenced, which are representatives of three of the seven culture groups formed: RA (rapid growth with acidification of the culture medium), RAL (rapid growth with alkalization of the culture medium) and LAL (slow growth with alkalization of the culture medium). The genera *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Paenibacillus*, *Mesorhizobium*, *Variovorax*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Mucilaginibacter*, *Polaromonas*, *Dyella*, *Pseudomonas*, *Terriglobus* and *Sphingomonas* were found. In the authentication experiments, 33% of the isolated ones nodulated. A high genetic, phenotypic and symbiotic diversity was found in the studied rhizobia.

Keywords: Leguminous trees. Biological nitrogen fixation. Recovery of degraded areas.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1	Características gerais das espécies de leguminosas em viveiro..	27
Figura 1	Distribuição das 94 estirpes isolados de diferentes espécies de leguminosas, em sete tipos culturais baseados no tempo de crescimento e alteração do pH do meio de cultura: crescimento rápido com acidificação do meio (RA), sem alteração do pH do meio (RN) e alcalinizando o meio (RAL); crescimento intermediário sem modificar o pH do meio (IN) e com alcalinização do meio (IAL); crescimento lento sem modificar o pH do meio (LN) e alcalinizando o meio (LAL).....	66
Figura 1	Número de isolados de cada espécie das mudas de leguminosas, em tipos culturais baseados no tempo de crescimento e alteração do pH do meio de cultura: crescimento rápido com acidificação do meio (RA), sem alteração do pH do meio (RN) e alcalinizando o meio (RAL); crescimento intermediário sem modificar o pH do meio (IN) e com alcalinização do meio (IAL); crescimento lento sem modificar o pH do meio (LN) e alcalinizando o meio (LAL).....	67
Figura 2	Distribuição de todos os isolados obtidos de 10 espécies das leguminosas estudadas, com base nas características culturais avaliadas: pH, cor, forma, borda, EPS (Produção de exopolissacarídeo), CMC (Consistência da massa da colônia) e absorção de corante.....	68

LISTA DE QUADRO E TABELAS

Tabela 1	Análises químicas e físicas do substrato de cultivo das mudas das espécies de leguminosas das mudas provenientes do viveiro Centro de Tecnologia de Ferrosos - CTF Miguelão da Vale S/A.....	57
Tabela 2	Autenticação de 93 estirpes de bactérias quanto à nodulação de siratro, isoladas de nódulos de mudas de espécies florestais cultivadas em viveiro no Centro de Tecnologia de Ferrosos - CTF Miguelão da Vale S/A.....	70
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 arbóreas cultivadas em viveiro no Centro de Tecnologia de Ferrosos - CTF Miguelão da Vale S/A.....	74

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
2.1	A mineração.....	16
2.2	Impactos oriundos das atividades de mineração.....	17
2.3	Legislação da mineração no Brasil.....	20
2.4	Recuperação de áreas degradadas.....	21
2.5	Utilização de leguminosas na recuperação de áreas degradadas.....	24
2.6	Características gerais das mudas de leguminosas utilizadas neste estudo.....	25
2.7	Diversidade microbiana.....	29
2.8	Fixação Biológica de Nitrogênio.....	30
	REFERÊNCIAS.....	33
	SEGUNDA PARTE – ARTIGO.....	47
	ARTIGO 1 SIMBIOSES DE RIZÓBIO COM NOVE ESPÉCIES DE LEGUMINOSAS FLORESTAIS EM VIVEIRO DO QUADRILÁTERO FERRÍFERO.....	48
	REFERÊNCIAS.....	86
	ANEXO.....	94

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

A mineração contribui significativamente para o progresso econômico e sócio-cultural do país por disponibilizar à sociedade os recursos essenciais ao seu desenvolvimento. Entretanto, suas atividades provocam considerável degradação ambiental, alterando intensamente a área minerada e as áreas vizinha, onde são feitos os depósitos de estéril e de rejeito. No final da década de 80, foi criada uma legislação que obrigava as empresas mineradoras a minimizarem esses impactos pela revegetação da área afetada (BRASIL, 1989).

Sob condições de degradação, a revegetação natural do solo é extremamente limitada, podendo não ocorrer espontaneamente. Uma das causas para essa limitação é o comprometimento da comunidade microbiana, que afeta a disponibilidade de nutrientes para as plantas. A utilização de técnicas de revegetação com espécies de leguminosas arbóreas inoculadas com bactérias fixadoras de nitrogênio (FBN) é uma alternativa potencialmente satisfatória para a reabilitação dessas áreas.

A FBN contribui de forma significativa na recuperação dessas áreas, sobretudo no aumento da biomassa e na entrada de nitrogênio (N_2). (BROWN; LUGO, 1994; MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). Além disso, algumas bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas de leguminosas (BFNNL) apresentam resistência a metais pesados (TRANNIN; MOREIRA; SIQUEIRA, 2001; MATSUDA; MOREIRA; SIQUEIRA, 2002; FERREIRA et al., 2013). Dessa forma, a utilização de BFNNL em simbiose com leguminosas em áreas contaminadas com metais pesados é de grande importância para a recuperação desses ambientes.

A maioria das espécies de leguminosas arbóreas tropicais são capazes de se associarem com BFNNL (FARIA et al. 1984, FARIA, 1987, 1999, 1995; MOREIRA et al., 1992; SPRENT e PARSONS, 2000). Estudos sobre a

nodulação de leguminosas arbóreas começaram em meados dos anos 1960 com a seleção de estirpes em resposta de campo de *Mimosa caesalpiniaefolia*, uma espécie nativa da Caatinga brasileira (DÖBEREINER, 1967). Estudos sobre FBN em espécies de leguminosas tropicais no Brasil intensificaram-se desde o início de 1980, que resultou na identificação de um grande número de espécies nodulíferas, e de fatores bióticos e abióticos que limitam a nodulação e a FBN (FARIA et al. 1984 , 1987, 1989, MOREIRA et al., 1992; MOREIRA et al., 1993; MOREIRA e FRANCO, 1991; FRANCO e FARIA 1997).

A seleção de estirpes de rizóbio é de fundamental importância, pois alguns rizóbios têm uma especificidade restrita para determinadas leguminosas. É comum encontrar bactérias que têm uma elevada capacidade para FBN, quando associado com uma dada leguminosa e são incapazes de nodular ou fixar N com outras espécies (FRANCO e FARIA, 1997, FARIA et al., 1999).

No presente trabalho tem-se por objetivo avaliar a diversidade genotípica, fenotípica e simbiótica de bactérias nodulíferas que estabelecem simbioses com mudas de *Acacia farnesiana*, *Anadenanthera colubrina*, *Clitoria fairchildiana*, *Erythrina speciosa*, *Inga marginata*, *Inga sessilis*, *Mimosa caesalpiniaefolia*, *Piptadenia gonoacantha* e *Plathymenia reticulata*, leguminosas arbóreas pertencentes ao viveiro do CTF Miguelão (Centro de Tecnologia de Ferrosos) da VALE S/A.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A mineração

A atividade de mineração é um dos setores básicos da economia brasileira que contribui significativamente para o progresso econômico e sócio-cultural do país. Considerada como uma atividade de utilidade pública, a mineração disponibiliza à sociedade os recursos essenciais ao seu desenvolvimento, sendo responsável pela produção de matéria-prima para diversos produtos que utilizamos cotidianamente e pela geração de empregos diretos, sendo portanto, uma atividade essencial para a vida moderna (FARIAS e GOMES, 2002; TAGLIANI, 2002).

O setor que conta com o número de 8.870 mineradoras localizadas por todas as regiões do País (considerando tanto o regime de concessão de lavra quanto o regime de licenciamento), e que gerou aproximadamente 199 mil empregos diretos, foi responsável pela produção mineral brasileira de US\$ 44 bilhões em 2013. No primeiro semestre de 2014, essa produção registrou um aumento de 9,57%, comparado ao mesmo período de 2013, ou seja, obteve seu melhor desempenho desde o ano de 2011, resultado esse principalmente devido ao aumento na produção de minérios de ferro (PNM 2030, 2011; IBRAM, 2014; DNPM, 2014).

Com o investimento previsto de US\$ 53,6 bilhões para os anos de 2014 a 2018, o segmento alcança uma posição de destaque na indústria mineral mundial devido à contribuição de estados como MG, PA, SP, GO, BA, MS, SC, entre outros, que são responsáveis por 48,2%; 31,3%; 3,7%; 3,6%; 2,3%; 1,6%; 1,0% e 8,3%, respectivamente, da produção nacional (DNPM, 2014). O País é o maior produtor mundial de nióbio, o 2º maior produtor de minério de ferro, manganês e tantalita, o 3º de bauxita e rochas ornamentais, o 5º de cobre, caulim

e estanho e o 12º de ouro e zinco. Além disso, também produzimos alumínio, níquel, fosfato, potássio, manganês, calcário, vanádio, carvão e cromita (IBRAM, 2012).

Em relação ao comércio exterior do setor mineral, o Brasil é o maior exportador de nióbio, o 2º maior exportador de minério de ferro, manganês, bauxita e tantalita, o 3º de grafite e o 4º de rochas ornamentais, além de também exportar níquel, magnesita, caulim, estanho, vermiculita, cromo e ouro.

Entretanto, temos dependência externa de minerais estratégicos como carvão metalúrgico, enxofre, potássio, fosfato e terras raras. Importamos 91% do potássio e 51% do fosfato necessários para a indústria de fertilizantes brasileira (IBRAM, 2012). No entanto, o saldo positivo relacionado à indústria de mineração brasileira confirma a sua importância no desenvolvimento social e econômico do País.

2.2 Impactos oriundos das atividades de mineração

Como em qualquer tipo de exploração natural, a mineração também causa impactos negativos, sobretudo quando realizada de maneira indiscriminada. O fato de sua exploração não admitir uma alternativa locacional e causar a alteração da estrutura física do terreno, impossibilitando o retorno das condições originais, são algumas das principais questões que despertam a atenção para as consequências dessa atividade e seus possíveis impactos negativos de ordem ambiental e social (TAGLIANI, 2002).

Por não admitir uma alternativa locacional, como supracitado, a exploração de minérios necessita do remanejamento de comunidades para a realização de suas atividades, fato esse responsável pelo êxodo de muitas famílias para outras regiões, afetando, assim, o bem-estar da população local. Além disso, a exposição aos resíduos da mineração e aos raios solares (atividade

diurna) favorecem o aparecimento de problemas respiratórios, alterações dermatológicas e danos nas articulações nos mineiros e na população ao redor da área explorada. Isso, somado à ocorrência de acidentes, muitas vezes fatais, devido à não utilização de equipamentos de proteção individual (EPI), caracterizam os principais impactos de cunho social da atividade mineira (NASCIMENTO, 2012; PONTES et al., 2012).

Os impactos negativos de ordem ambiental relacionam-se principalmente à exploração de áreas naturais, como a abertura da cava, retirada da vegetação, escavações, movimentação de terra e modificação da paisagem local e a geração de resíduos e vêm ganhando importante destaque, sobretudo diante do atual panorama de desenvolvimento sustentável (SILVA, 2007; NASCIMENTO, 2012). Os principais problemas ambientais da exploração mineira e que, muitas vezes, podem ser irreversíveis se enquadram em cinco categorias: poluição da água, poluição do ar, poluição sonora, subsidência do terreno, incêndios causados pelo carvão e rejeitos radioativos (CPRM, 2002; BACCI et. al., 2006).

A poluição da água ocorre devido às substâncias lixiviadas e carreadas ou contidas nos efluentes das áreas de mineração, tais como óleos, graxa e metais pesados. Esses últimos podem inclusive atingir as águas subterrâneas, agravando o impacto provocado. Os sedimentos finos em suspensão podem provocar a turbidez das águas dos rios e reservatórios ao entorno da área explorada, comprometendo sua qualidade (MECHI e SANCHES, 2010; NASCIMENTO, 2012). Além disso, há a utilização de um grande volume de água durante as etapas da extração mineral, o que pode contribuir para a escassez do recurso quando realizado de maneira inconsciente.

A poluição atmosférica causada pela mineração deve-se à suspensão de particulados durante os vários processos da exploração (lavra, beneficiamento e transporte) e pela emissão de gases gerados na queima dos combustíveis, o que

coloca o setor como responsável pela maior fração de emissões advindas de uso de combustíveis fósseis (MECHI e SANCHES, 2010). Muitas vezes, as emissões de gases do efeito estufa (GEE) e o consumo de energia mais significativo não advêm da extração mineral propriamente dita, mas de outros elos da cadeia de produção, como exemplo, durante a extração do minério de ferro, é na siderurgia que as emissões gasosas atingem os níveis mais elevados (IBRAM, 2013).

Outros impactos negativos ao meio ambiente estão associados a ruídos, sobrepressão acústica e vibrações no solo associados à operação de equipamentos, ao uso de explosivos no desmonte de rocha (sobrepressão atmosférica, vibração do terreno, ultralancamento de fragmentos, fumos, gases, poeira, ruído); e ao transporte e beneficiamento do minério (geração de poeira e ruído), afetando, assim, os meios físico, biótico e antrópico. (BACCI, 2006).

A alteração do relevo pela extração mineral deve-se principalmente à abertura de grandes crateras de exploração que resultam na remoção do solo superficial (maior fertilidade) e à exposição dos solos remanescentes aos processos erosivos, os quais podem favorecer o assoreamento dos corpos d'água do entorno. Os solos dessa área terão sua estruturação prejudicada, baixo teor de matéria orgânica, redução de sua atividade biológica e comprometimento de sua vegetação, muitas vezes, sem a possibilidade de regeneração. Posteriormente, ocorre o abandono das áreas exploradas sem o devido cumprimento das normas ambientais (FRANCO et al., 1995; MECCHI e SANCHES, 2010).

A mineração, apesar de ser entendida como catalisador de desenvolvimento, também influencia negativamente na dinâmica socioeconômica e ambiental da sua área de instalação. Para que essas questões sejam solucionadas, é necessária a reavaliação da política pública da indústria mineradora, objetivando um consenso dos interesses sociais, ambientais e

econômicos, garantindo, assim, o desenvolvimento sustentável dessa atividade (IBRAM, 2013; VIEIRA, 2011).

2.3 Legislação da mineração no Brasil

No Brasil, a atividade da mineração é regulada pelo Decreto Lei nº 227, de 28/2/1967, também conhecido como Código de Mineração. Portanto, existe um conjunto de normas e regulamentações que controlam a exploração e o aproveitamento dos recursos minerais brasileiros, os quais se dão por outorga de direitos minerários em distintos regimes legais. Em nível federal, existem diferentes órgãos que têm a responsabilidade de definir as diretrizes e regulamentações, bem como atuar na concessão, fiscalização e cumprimento da legislação mineral e ambiental para o aproveitamento dos recursos minerais (VIEIRA, 2011; IBRAM, 2013).

Em 2011, foi lançado o Plano Nacional de Mineração 2030 (PNM – 2030), cujo principal objetivo é orientar a formulação de políticas de médio e longo prazo que possam contribuir para que o setor mineral seja um alicerce para o desenvolvimento sustentável. Para isso, são necessários mecanismos legais para controle de atividades consideradas de impacto ou que sejam poluidoras, entre os quais estão: o licenciamento ambiental, a avaliação de impacto ambiental, o plano de controle ambiental e a recuperação de áreas degradadas (PNM 2030, 2011; IBRAM, 2013).

Em relação à recuperação da área mineira degradada, o Decreto Federal nº 97.632, de 10 de abril de 1989, tem como exigência principal o Plano de Recuperação da Área Degradada (PRAD), que tem por objetivo estabelecer um novo equilíbrio dinâmico na área comprometida, obtendo uma recuperação de seus processos biológicos, de maneira que os solos construídos após a mineração proporcionem condições para o desenvolvimento vegetal. O plano de

reabilitação envolve a reposição na sequência original dos materiais estéreis e do saprolito na cava minerada, visando à reconstituição topográfica e à cobertura desses com o material solo (QUINONES et al., 2008).

Os impactos relacionados à biodiversidade da área explorada são complexos e geralmente duradouros, características que dificultam sua observação, descrição, avaliação e previsão. Consequentemente, há apenas previsões genéricas de impactos, como a redução, fragmentação ou perda de habitats, a eliminação de indivíduos e populações ou a alteração da estrutura da comunidade. Entretanto, a Política Nacional de Meio Ambiente, Lei nº 6.938/1981 e a Resolução Conama nº 01/1986 têm interferido para uma ampliação de incorporação de exigências legais aos estudos ambientais e essas, em muitos casos, têm permitido conhecer melhor a diversidade biológica das áreas exploradas (IBRAM, 2013).

2.4 Recuperação de áreas degradadas

A revegetação constitui a forma mais aceita para proteger os solos contra a degradação; entretanto, o sucesso do estabelecimento das plantas e sucessão depende do grau de preservação da qualidade do solo, que está relacionado com as suas propriedades. Baixa fertilidade, baixa retenção hídrica, redução da atividade biológica e ausência de bancos de sementes são fatores que limitam o crescimento vegetal, inviabilizando, assim, a recuperação natural da vegetação (BARTH, 1989; IBAMA, 1990; PARROTA; TURNBULL, 1997).

Por isso, a maioria desses solos depende da entrada de matéria orgânica e da sua decomposição, exigindo, assim, uma comunidade microbiana viável. Portanto, a quantidade e diversidade dos micro-organismos podem ser consideradas um indicador sensível da qualidade do solo para o restabelecimento bem sucedido da sua vegetação (POWLSON et al., 1987). A decomposição da

matéria orgânica é especialmente importante em áreas impactadas, onde as agregações de raízes das plantas rodeadas por superfícies rochosas formam um importante nicho microbiano (BURBANCK e PLATT, 1964; SHURE e RAGSDALE, 1977). O papel das comunidades microbianas do solo, particularmente aqueles relacionados aos ciclos de N e P, são relevantes para a avaliação de sua recuperação (HERRICK, 2000; NAEL, 2004; GIL-SOTRES et al., 2005; IZQUIERDO, 2005; ŠOURKOVÁ et al., 2005).

Com o intuito de explorar o potencial benéfico dos micro-organismos na recuperação de áreas degradadas pela mineração, indica-se a utilização de uma estratégia sustentável e eficiente, como o cultivo de leguminosas em simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas de leguminosas (BFNNL). Esse tipo de associação contribui de forma significativa na recuperação dessas áreas, sobretudo no aumento da biomassa e na entrada de N. (BROWN; LUGO, 1994; MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). Estudos mostram resultados satisfatórios na recuperação dessas áreas com a utilização de espécies nativas inoculadas com rizóbios e com fungos micorrízicos (MATIAS et al., 2007; RAO, 2001).

Matias et al. (2009), utilizando *Centrosema coriaceum* (Leguminosae) e *Tibouchina multiflora* (Melastomataceae), inoculadas com fungos micorrízicos (FMA) e/ou uma estirpe de rizóbio, para restaurar uma área de extração de minério de ferro, concluíram que a dupla inoculação beneficiou o crescimento das duas espécies vegetais, aumentando o N e P na biomassa vegetal, o que resultou em uma melhoria da disponibilidade de nutrientes, na matéria orgânica e na capacidade de retenção de água do solo.

Melloni et al. (2006), ao estudarem a eficiência e a diversidade de BFNNL em solos de mineração de bauxita em reabilitação com gramíneas, leguminosas herbáceas, bracatinga, espécies arbóreas nativas e eucalipto, observaram que o impacto negativo da mineração é maior na diversidade fenotípica cultural de BFNNL do que na nodulação das plantas-isca utilizadas e

que a revegetação contribuiu para aumentar a diversidade dessas bactérias na área, especialmente quando ocorreu a introdução de leguminosas.

Ribeiro de Souza et al. (2012) estudaram o potencial de mudas de *Mimosa caesalpiniaefolia*, *Erythrina speciosa* e *Schizolobium parahyba* para a revegetação de áreas contaminadas com chumbo. O estudo foi realizado em vasos com solos contaminados com diferentes concentrações de Pb. *M. caesalpiniaefolia* foi a única espécie que não apresentou sintomas aparentes de toxicidade, sendo, portanto, considerada como a mais tolerante às altas concentrações do metal, enquanto *E. speciosa* e *S. parahyba* apresentaram tolerância moderada. Das três espécies estudadas, *M. caesalpiniaefolia* é potencialmente indicada para a revegetação de áreas contaminadas com Pb.

Ferreira, et al. (2013) avaliaram a eficiência simbiótica de estirpes de *Cupriavidus necator* em *Mimosa caesalpiniaefolia*, *Leucaena leucocephala* e *Mimosa pudica* em solos contaminados com metais pesados na sequência da aplicação de materiais inorgânicos. Houve uma melhoria da nodulação das leguminosas que apresentaram aumentos significativos no teor de N da parte aérea. O efeito do silicato de cálcio resultou em maior produção de matéria seca da parte aérea da planta, aumento no número de nódulos e aumento na taxa de fixação de N. Os autores concluíram que a combinação de rizóbios, leguminosas e silicato de cálcio pode representar um fator-chave para a remediação de áreas contaminadas por metais pesados.

Costa (2014) encontrou uma alta diversidade fenotípica, genética e simbiótica de rizóbios isolados de nódulos de mudas de 11 espécies arbóreas. Algumas das estirpes isoladas possuem o potencial para uso como inoculante para o siratro, pois apresentaram alta eficiência relativa na fixação de nitrogênio.

Como já exposto, a utilização de leguminosas florestais em simbiose com estirpes de rizóbio apresentam inúmeras vantagens na recuperação de áreas degradadas pela mineração. No entanto, para que a medida de recuperação

ocorra de maneira totalmente satisfatória, é ideal que as plantas utilizadas no processo possuam condições ideais para o seu desenvolvimento. Para isso, é indicado o cultivo das mudas em viveiros, uma vez eles oferecem condições controladas de umidade, irrigação, luminosidade, temperatura, tipo de solo, adubação, além de proteção contra o vento e chuvas, o controle de doenças, pragas e ervas daninhas, e principalmente, mão de obra especializada.

2.5 Utilização de leguminosas na recuperação de áreas degradadas

A família Leguminosae é dividida em três subfamílias, Papilionoideae, Mimosoideae e Caesalpinoideae compreendendo um número estimado de 20.000 espécies e 730 gêneros (APG II, 2003; LEWIS, 2005). Essa família possui espécies de todos os tipos de hábitos, ou seja, lianas, herbáceas, arbustos e árvores.

As leguminosas apresentam grande potencial para utilização em diversos setores da economia nacional, seja para fornecimento de produtos alimentícios, medicinais, ornamentais, forrageiras, apícolas, madeira, cortiça, fibras, óleo e tanino, entre outros, seja para a incorporação em sistemas consorciados, no reflorestamento de matas ciliares e na recuperação de áreas degradadas. Além disso, muitas dessas espécies são capazes de estabelecer simbiose com as BNL, promovendo, assim, a fixação biológica de N (FBN).

Uma das características importantes dessa associação é a formação de nódulos nas raízes das leguminosas. Estima-se que em relação à capacidade de nodular, aproximadamente 23% dessas espécies tenham sido estudadas, das quais 88% dos gêneros nodulam (FARIA, et al., 1998; MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). Estudos sobre nodulação e FBN são importantes para o conhecimento da diversidade de rizóbio e posterior utilização de leguminosas fixadoras de N₂ em sistemas florestais, agroflorestais, agrosilvipastoris, e em

programas de recuperação de áreas degradadas (MOREIRA et al., 1993; DUPUY et al., 1994; FRANCO et al., 1996; FRANCO e CAMPELLO, 2002).

Leguminosas em simbiose com BFNNL têm sido empregadas na restauração da fertilidade do solo em áreas degradadas, pois mantêm os níveis adequados de N no solo, dispensando o uso de fertilizantes nitrogenados que podem exercer impactos sobre o meio ambiente (FRANCO e FARIA, 1997).

Espécies arbóreas como *Leucaena leucocephala*, *Acácia* spp. e *Inga* spp. são capazes de fixar até 500, 200 e 35 kg.N.ha⁻¹.ano⁻¹, respectivamente (CARDOSO et al., 1992; FARIA, 1993). Além disso, podem contribuir para a ciclagem de nutrientes de modo efetivo, uma vez que aumentam significativamente a biomassa do solo, sendo a qualidade dessa geralmente superior àquela proveniente de espécies não leguminosas (FRANCO e CAMPELLO, 2002).

2.6 Características gerais das mudas de leguminosas utilizadas neste estudo

O Centro de Tecnologia de Ferrosos - CTF Miguelão da Vale S/A se localiza na Fazenda Rio do Peixe S/N, na Zona Rural do município de Nova Lima/MG. O empreendimento consiste em um conjunto de unidades que tem por finalidade realizar ensaios de pesquisa e desenvolvimento e assessoramento técnico às unidades minerárias locais da Vale.

Entre essas unidades, encontra-se um viveiro de produção de mudas de espécies agrícolas, florestais e ornamentais para o restabelecimento da flora das áreas de atuação da mineradora. Tendo em vista os processos de compensação ambiental impostos à VALE S.A., torna-se de fundamental importância a manutenção de um viveiro de mudas para fornecimento de germoplasma, material esse que auxiliará na recomposição de áreas degradadas e destinadas à compensação ambiental. Além de produzir mudas propriamente ditas, essas

estruturas podem ainda ser depósitos temporários de indivíduos de espécies vegetais oriundos de processos de supressão vegetal, o que garante taxa de sobrevivência desses indivíduos, aclimatação, garantindo a sua sobrevivência quando do ato de reintrodução.

Quadro 1 Características gerais das espécies de leguminosas em viveiro (Lorenzi, 2002).

Espécies	Subfamília	Ocorrência	Nodulação	Aplicações
<i>Acacia farnesiana</i> (L.) Willd	Mimosoideae	Pantanal Matogrossense, Paraguai e Bolívia	+	Madeira é utilizada na construção civil, lenha, carvão, etc. As raízes possuem aplicações medicinais e parasiticidas. Flores são usadas no paisagismo, como inseticidas e na perfumaria.
<i>Anadenanthera colubrina</i> var. <i>cebil</i> (Griseb.) Reis	Mimosoideae	Maranhão até Paraná e Goiás, na floresta pluvial situada em altitudes superiores a 400 m	+	Madeira é útil na construção civil, carpintaria, lenha, carvão, etc. Usada em arborização e em plantio em florestas mistas destinadas à recomposição de áreas degradadas de preservação.
<i>Clitoria fairchildiana</i> R.A. Howard	Papilionoideae	Amazonas, Pará, Maranhão e Tocantins na floresta pluvial amazônica de terra firme	+	Madeira é útil na construção civil, confecção de brinquedos e caixotaria. A árvore é utilizada para fins ornamentais, na arborização urbana e rural e em reflorestamentos heterogêneos destinados à reconstituição da vegetação de áreas degradadas de preservação permanente.
<i>Erythrina speciosa</i> Andrews	Papilionoideae	Espírito Santo e Minas Gerais até Santa Catarina, na floresta pluvial atlântica	+	Utilizada para fins ornamentais, na formação de cerca viva defensiva e é recomendada para plantios mistos destinados à recomposição de áreas degradadas de preservação permanente.
<i>Inga marginata</i> Wild.	Mimosoideae	Em todo o país, também nos demais países da América do Sul e Central	+	Madeira usada na carpintaria, bem como para lenha e carvão. Pomares e ornamentação urbana.
<i>Inga sessilis</i> (Vell.) Mart.	Mimosoideae	Sudeste do país, na encosta Atlântica e em matas de galerias do cerrado	+	Madeira é usada para tabuado em geral, forros, fabricação de fósforos e para lenha e carvão. É grande fixadora de N e é indicada para a composição de reflorestamentos heterogêneos destinados à recuperação e enriquecimento da vegetação de áreas degradadas.

<i>Mimosa caesalpiniiifolia</i> Benth.	Mimosoideae	Maranhão e região Nordeste até a Bahia, na caatinga	+	Madeira é útil para usos externos (moirões, estacas postes, etc), lenha e carvão. Folhagem pode ser usada como forragem e a árvore pode ser útil no paisagismo, na produção de cerca viva defensiva, além de ser ideal para reflorestamentos heterogêneos destinados à recomposição de áreas degradadas de preservação permanente.
<i>Piptadenia gonoacantha</i> (Mart.) J.F. Macbr	Mimosoideae	Rio de Janeiro, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul até Santa Catarina, principalmente na floresta pluvial da encosta atlântica	+	A madeira é usada para acabamentos da construção civil, produção de brinquedos, embalagens, lenha e carvão. Flores são melíferas. Planta com caráter pioneiro, de rápido crescimento, é indispensável nos reflorestamentos mistos destinados à recomposição de áreas degradadas de preservação permanente.
<i>Plathymenia reticulata</i> Benth.	Mimosoideae	Amapá até Goiás, Mato Grosso, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul e São Paulo, no cerrado e campo cerrado	+	Madeira usada na marcenaria, lâminas faqueadas decorativas, acabamentos internos na construção civil. A árvore é útil no paisagismo. Planta pioneira adaptada a terrenos pobres é ótima para plantios mistos destinados á recomposição de áreas degradadas de preservação.

2.7 Diversidade bacteriana

A variabilidade entre os organismos vivos é chamada de diversidade biológica e pode ser avaliada por meio de níveis taxonômicos ou por características genéticas ou fenotípicas (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). A importância da diversidade microbiana do solo está relacionada à sustentabilidade dos ecossistemas e pode ser considerada como indicadores sensíveis das mudanças do solo por alterações antrópicas e pela vegetação presente (BALLARD et al., 2004; GASTINE et al., 2003; KASCHUK et al., 2006; KENNEDY, 1999).

Apesar de sua grande importância, a diversidade do solo ainda é pouco conhecida e a principal razão para isso é a dificuldade no cultivo de micro-organismos pelos métodos convencionais de laboratório (AZEVEDO, 1998b; PACE, 1997). Estima-se que apenas cerca de 1% dos organismos do solo sejam cultiváveis, sendo essa porcentagem atribuída ao pouco conhecimento sobre seus requisitos nutricionais e à biologia de organismos presentes em diferentes amostras ambientais (AMANN et al., 1995).

Entre as vantagens de um conhecimento aprofundado sobre a diversidade microbiana, está a compreensão das funções exercidas pelos micro-organismos e de suas interações com outros componentes da biodiversidade, como, por exemplo, as plantas (ARAÚJO et al., 2001, ARAÚJO et al., 2002; GARBEVA et al., 2001; MARILEY e ARAGNO, 1999; SESSITSCH et al., 2002). Diante disso, é necessária a utilização de técnicas mais sofisticadas que auxiliem no avanço desse conhecimento. Recentemente, técnicas moleculares tem sido uma nova ferramenta para identificação da diversidade, melhor classificação e descoberta de novas espécies (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

Isso se deve à utilização de cronômetros moleculares (RNA ribossômico), ou seja, moléculas universais altamente conservadas com funções

específicas e que foram estabilizadas ao longo da evolução, sendo o gene 16S um dos mais utilizados para detectar as relações entre bactérias (WOESE, 1991).

O gene 16S pode ser amplificado pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e o produto da reação pode ser clonado para o sequenciamento ou sequenciado diretamente (WEISBURG et al., 1991). Essa técnica pode ser empregada com facilidade em estudos de diversidade e para analisar as relações filogenéticas entre espécies de bactérias fixadoras de nitrogênio (LIMA et al., 2009; GUIMARÃES et al., 2012; COSTA et al., 2013). Dessa forma, tais técnicas mostram-se eficientes na avaliação da diversidade da comunidade microbiana.

2.8 Fixação biológica de nitrogênio

O nitrogênio (N_2) é um elemento essencial à manutenção dos organismos vivos, sendo constituinte de compostos vitais, tais como; aminoácidos, ácidos nucleicos, proteínas, entre outros. Nos vegetais, esse nutriente é exigido em grande quantidade devido à multiplicidade de reações químicas e biológicas nas quais o elemento está envolvido. Entretanto, a disponibilidade do N_2 é restrita, pois, apesar de ser abundante na atmosfera terrestre na forma de N_2 , essa forma não é assimilável para a maioria dos organismos.

A fixação do nitrogênio é o processo pelo qual o nitrogênio atmosférico é convertido em amônia e torna-se assimilável para os organismos, podendo ocorrer por meio de descargas elétricas na atmosfera, através da indústria química (processo de Haber-Bosch) e através de reações biológicas mediadas pela enzima nitrogenase presente em alguns procariotos. Entre os organismos capazes de fixar o nitrogênio, um importante grupo é formado pelas bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas em leguminosas (BFNNL), que estabelecem

com essas plantas uma simbiose mutualística, ou seja, em que ambos os componentes são beneficiados. As bactérias fornecem para as plantas o N atmosférico em forma assimilável e as plantas leguminosas fornecem para as BFNNL carboidratos essenciais à manutenção de seu metabolismo.

Portanto, a fixação biológica de nitrogênio (FBN) é considerada uma importante simbiose edáfica na agricultura sustentável. A simbiose é uma relação mutuamente vantajosa entre dois ou mais organismos vivos. Na relação simbiótica, os organismos agem ativamente em conjunto para proveito mútuo, o que pode acarretar em especializações funcionais de cada espécie envolvida. Determinadas bactérias e fungos presentes no solo podem estabelecer associação mutualística com diferentes espécies vegetais, proporcionando, assim, vantagens para ambos os organismos integrantes da relação (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

Quando o aporte de N_2 nos sistemas agrícolas é realizado de maneira biológica em vez da utilização de insumos oriundos de processos químicos industriais, os benefícios provenientes da FBN excedem o mero aumento da produção vegetal. A FBN evita problemas associados ao uso do N industrial, já que a eficiência da absorção de N fornecido pelos fertilizantes para as plantas é baixa devido à facilidade com que esse pode ser volatilizado na forma de amônia ou lixiviado na forma de nitrato, ou ainda sofrer desnitrificação, sendo perdido na forma de N_2 . Além disso, esses fertilizantes são onerosos e, se mal utilizados, podem contribuir para o alto custo de produção agrícola, causar contaminação ambiental e contribuir para a emissão de gases responsáveis pelo efeito estufa (CANTARELLA, 2007).

A adubação química nitrogenada é totalmente substituída pela FBN para a cultura da soja no Brasil (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). Nesse caso, a adubação foi substituída pela inoculação de bactérias nodulíferas em leguminosas do gênero *Bradyrhizobium*, proporcionando uma produção eficiente

e responsável. Com isso, fica evidenciada a importância dessa simbiose na agricultura moderna, que visa a uma otimização da produção de maneira sustentável.

REFERÊNCIAS

- AMANN, R. I., LUDWIG, W., e SCHLEIFER, K. H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological reviews**, 59(1), 143-169.
- AMARGER, N.; MACHERET, V.; LAGUERRE, G. *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Ames, v. 47, n. 4, p. 996-1006, 1997.
- APG II. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 141, p. 399-436, 2003.
- ARAÚJO, W. L., MACCHERONI JR, W., AGUILAR-VILDOSO, C. I., BARROSO, P. A., SARIDAKIS, H. O., e AZEVEDO, J. L. (2001). Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. **Canadian Journal of Microbiology**, 47(3), 229-236.
- ARAÚJO, W. L., MARCON, J., MACCHERONI, W., VAN ELSAS, J. D., VAN VUURDE, J. W., e AZEVEDO, J. L. (2002). Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. **Applied and Environmental Microbiology**, 68(10), 4906-4914.
- AZEVEDO, J. L., e MELO, I. S. (1998). Biodiversidade microbiana e potencial biotecnológico. Ecologia Microbiana. **EMBRAPA CNPMA**, Jaguariúna.
- BACCI, D. D. L. C.; LANDIM, P. M. B.; ESTON, S. M. Aspectos e impactos ambientais de pedreira em área urbana. **Rem: Revista Escola de Minas**, v. 5, n. 1, p. 47-54, 2006.

BALLARD, R. A. et al. Size, symbiotic effectiveness and genetic diversity of field pea rhizobia (*Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*) populations in South Australian soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 36, n. 8, p. 1347-1355, 2004.

BARTH, R. C. Avaliação da recuperação de áreas mineradas no Brasil. **Boletim da Sociedade de Investigações Florestais**, Viçosa MG - Departamento de Engenharia Florestal/Universidade Federal de Viçosa, 41p. 1989.

BRASIL. **Decreto Federal nº 97.632**, de 10 de abril de 1989. Dispõe sobre a regulamentação do Artigo 2º, inciso VIII, da Lei nº 6.938, de 31 de agosto de 1981, e dá outras providências. Disponível em:
<http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/1980-1989/D97632.htm>.
Acesso em 06 de dezembro de 14.

BROMFIELD, E. S. P.; BARRAN, L. R. Promiscuous nodulation of *Phaseolus vulgaris*, *Macroptilium atropurpureum* e *Leucaena leucocephala* by indigenous *Rhizobium meliloti*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 36, p. 369-372, 1990.

BROWN, S. e LUGO, A. E. Rehabilitation of tropical lands: A Key sustaining development. **Restoration Ecology**, v. 2, p. 97-111, 1994.

BURBANCK, M. P.; PLATT, R. B. Granite outcrop communities of the Piedmont Plateau in Georgia, **Ecology**, v. 45, p. 292-306, 1964.

CANTARELLA, H. Nitrogênio. In: NOVAIS, R.F.; ALVAREZ V., V.H.; BARROS, N.F.; FONTES, R.L.F.; CANTARUTTI, R.B. e NEVES, J.C.L., eds. **Fertilidade do solo**. Viçosa, MG, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2007. p. 375-470.

CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S. M.; NEVES, M. C. P. **Microbiologia do Solo**. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, Campinas, 1992.

CARVALHO, F. **Abundância de espécies de plantas e diversidade de simbiotes radiculares em campos rupestres da serra do cipó, MG.** 2010. 224p. Tese (Doutorado em Ecologia, Ecologia, Conservação e Manejo da Vida Silvestre) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

COSTA, E. M.; NÓBREGA, R. S. A.; CARVALHO, F.; TROCHMANN, A.; FERREIRA, L. V. M.; MOREIRA, F. M. S. Promoção do crescimento vegetal e diversidade genética de bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** (1977. Impressa), v. 48, p. 1275-1284, 2013.

COSTA, J. S. **Diversidade fenotípica, genética e simbiótica de bactérias isoladas de nódulos de diferentes leguminosas florestais em viveiro.** 2014. 82 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

CRPM. Perspectivas do Meio Ambiente do Brasil – Uso do Subsolo. MME - Ministério de Minas e Energia, 2002. Disponível em <www.cprm.gov.br>. Acesso em 12 Jan 2015.

DE PONTES, J. C., ROLIM FILHO, J. L., SILVA, J. A. L., MEDEIROS, M. C., e DE LIMA, V. L. A. (2012). Desmonte de rocha com técnicas de produção mais limpa: uma contribuição para a saúde do trabalhador. **Estudos Geológicos**, 22, 2.

DEPARTAMENTO NACIONAL DE PRODUÇÃO MINERAL – DNPM. **Sumário Mineral**, 34 ed., 2014.

DO NASCIMENTO CABRAL, L., PEREIRA, S. S., e ALVES, T. L. B. (2012). Degradação ambiental e implicações para a saúde humana decorrentes da mineração: o caso dos trabalhadores de uma pedreira no município de Campina Grande/PB. **Hygeia**, 8(15).

DOBEREINER, J. (1967). Efeito da inoculação de sementeiras da sabiá (*Mimosa caesalpinifolia*) no estabelecimento e desenvolvimento das mudas no campo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.2, p.301-305, 1967.

DUPUY, N.; WILLENS, A.; POT, B.; DEWETTINCK, D.; VANDENBRUAENE, I. Phenotypic and genotypic characterization of Bradyrhizobia nodulating the Leguminous tree *Acacia albida*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 44, n. 3, p. 461-473, July, 1994.

ESPINDOLA, J. A. A.; GUERRA, J. G. M.; ALMEIDA, D. L. Uso de Leguminosas Herbáceas para Adubação Verde. In: AQUINO, A. M.; ASSIS, R. L. (Org.). **Agroecologia: princípios e técnicas para uma agricultura orgânica sustentável**. 1ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005, p. 435-451.

FARIA, S. D., FRANCO, A. A., JESUS, R. D., MENANDRO, M. D. S., BAITELLO, J. B., MUCCI, E. S. F., e SPRENT, J. I. (1984). NEW NODULATING LEGUME TREES FROM SOUTH-EAST BRAZIL. **New phytologist**, 98(2), 317-328.

FARIA, S. M. ; SPRENT, J. L. ; LEWIS, G. P. ; SUTHERLAND, J. M. . Occurrence of nodulation in the Leguminosae. **New Phytologist** (Print), Londres, v. 111, p. 607-619, 1989.

FARIA, S. M. ; FRANCO, A. A. ; MENANDRO, M. S. ; JESUS, R. M. ; BAITELLO, J. B. ; AGUIAR, O. T. ; DOBEREINER, J. . Levantamento da nodulação de leguminosas florestais nativas da região sudeste do Brasil. **Pesq Agrop Bras, Brasília**, v. 19, p. 143-153, 1984.

FARIA, S. M. ; LIMA, H. C. ; MUCCI, E. S. F. ; SPRENT, J. L. . Nodulation of legume trees from south east Brazil. **Plant and Soil** (Print), Amoterdan, v. 99, p. 347-356, 1987.

FARIA, S. M.; FRANCO, A. A.; CAMPELLO, E. F. C.; SILVA, E. M. R. **Recuperação de Solos Degradados com Leguminosas Noduladas e Micorrizadas**. Seropédica: EMBRAPA CNPAB, 1998. 23p. (EMBRAPA-CNPAB. Documentos, 77).

FARIA, S. M.; GUEDES, R. E. **Obtenção de estirpes de rizóbio eficientes na fixação biológica de nitrogênio para espécies florestais**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia. Recomendação Técnica nº 5, dez. 1999, p 1- 4.

FARIA, S. M.; GUEDES, R. E. **Obtenção de estirpes de rizóbio eficientes na fixação biológica de nitrogênio para espécies florestais**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia. Recomendação Técnica nº 5, dez. 1999, p 1- 4.

FARIA, S. M.; LIMA, H. C.; OLIVARES, F. L.; MELO, R. B.; XAVIER, R. P. Nodulação em espécies florestais: especificidade hospedeira e implicações na sistemática de Leguminosae. In: SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S.; LOPES, A. S.; GUILHERME, L. R. G.; FAQUIN, V.; FURTINI NETO, A. E.; CARVALHO, J. G. (Ed.). **Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas**. Lavras: SBCS/UFLA/DCS, 1999, p. 667-686.

FARIA, S. M.; LIMA, H. C.; OLIVARES, F. L.; MELO, R. B.; XAVIER, R. P. Nodulação em espécies florestais: especificidade hospedeira e implicações na sistemática de Leguminosae. In: SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S.; LOPES, A. S.; GUILHERME, L. R. G.; FAQUIN, V.; FURTINI NETO, A. E.; CARVALHO, J. G. (Ed.). **Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas**. Lavras: SBCS/UFLA/DCS, 1999, p. 667-686.

FARIAS, C.; GOMES, E. **Mineração e meio ambiente**: relatório preparado para o CGEE. Porto Alegre, 2002.

FERREIRA, P. A. A.; LOPES, G.; BOMFETI, C. A.; LONGATTI, S. M. O.; SOARES, C. R. F. S.; GUILHERME, L. R. G.; MOREIRA, F. M. S. Leguminous plants nodulated by selected strains of *Cupriavidus necator* grow in heavy metal contaminated soils amended with calcium silicate. **World Journal of Microbiology e Biotechnology**, v. 29, p. 2055-2066, 2013.

FLORENTINO, L. A. *Sesbania virgata* stimulates the occurrence of its microsymbiont in soils but does not inhibit microsymbiont of other species. **Scentia Agricola**, Piracicaba, v. 66, n. 5, p. 667-676, 2009.

FLORENTINO, L. A.; MOREIRA, F. M. S. Características simbióticas e fenotípicas de *Azorhizobium doebereineriae*, microssimbiote de *Sesbania virgata*. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 33, p. 215-226, 2009.

FRANCO, A. A.; CAMPELLO, E. F. C. Manejo nutricional integrado na recuperação de áreas degradadas e na sustentabilidade de sistemas produtivos utilizando a fixação biológica de nitrogênio. In: Curso intensivo em Agrobiologia, 14. 2002, Seropédica. **Princípios e técnicas ecológicas aplicadas à agricultura**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2002. v. 2, cap. 14, 11p. CD-ROM.

FRANCO, A. A.; CAMPELO, E. F. C.; DIAS, L. E. ; FARIA, S. M. **Uso de leguminosas associadas a microrganismos na revegetação de áreas de mineração de bauxita em Porto-Trombetas-PA**. Embrapa Agrobiologia, 1996. 69p.

FRANCO, A. A.; DIAS, L. E.; FARIA, S. M.; CAMPELLO, E. F. C.; SILVA, E. M. R. Uso de leguminosas florestais noduladas e micorrizadas como agentes de recuperação e manutenção da vida do solo: Um modelo tecnológico. **Oecologia Brasilienses**, v. 1, p. 459-467, 1995.

FRANCO, A. A.; FARIA, S. M. The contribution of N₂-fixing tree legumes to land reclamation and sustainability in the tropics. **Soil Biochemistry**, Oxford, v. 29, n. 5, p. 897-983, May 1997.

FRANCO, A. A.; RESENDE, A. S.; CAMPELLO, E. F. C. Importância das Leguminosas Arbóreas Nativas Recuperação de Áreas Degradadas e na Sustentabilidade de Sistemas Agroflorestais. In: SEMINÁRIO SISTEMAS AGROFLORESTAIS E DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL, 2003, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2003.

FRANK, B. Ueber die Parasiten in den Wurzelan-schwillungen der Papilionaceen. **Botanical Zeitung**, Berlin, v. 37, p. 376-387/ 394-399, 1879.

FRANK, B. Ueber die Pilzsymbiose der leguminosen. **Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft**, Stuttgart, v. 7, p. 32-346, 1889.

GARBEVA, P., VAN OVERBEEK, L. S., VAN VUURDE, J. W. L., e VAN ELSAS, J. D. (2001). Analysis of endophytic bacterial communities of potato by plating and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of 16S rDNA based PCR fragments. *Microbial ecology*, 41(4), 369-383.

GASTINE, A.; SCHERER-LORENZEN, M.; LEADLEY, P. W. No consistent effects of plant diversity on root biomass, soil biota and soil abiotic conditions in temperate grassland communities. **Applied Soil Ecology**, v. 24, n. 1, p. 101-111, 2003.

GIL-SOTRES, F.; TRASAR-CEPEDA, C.; LEIRÓS, M. C.; SEOANE, S. Different approaches to evaluating soil quality using biochemical properties. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 7, p. 877-887, 2005.

GONÇALVES, M. e MOREIRA, F. M. S. Specificity of the Legume *Sesbania virgata* (Caz.) Pers. and its nodule isolates *Azorhizobium johannae* with other Legume Host and Rhizobia. **I Symbiosis**, Rehovot, v. 36, n. 1, p. 57-68, 2004.

GUIMARÃES, A. A.; JARAMILLO, P. M. D.; NÓBREGA, R. S. A.; FLORENTINO, L. A.; SILVA, K. B.; MOREIRA, F. M. S. Genetic and Symbiotic Diversity of Nitrogen-Fixing Bacteria Isolated from Agricultural Soils in the Western Amazon by Using Cowpea as the Trap Plant. **Applied and Environmental Microbiology** (Print), v. 78, p. 6726-6733, 2012.

HERRICK, J. E. Soil quality: an indicator of sustainable land management? **Applied Soil Ecology**, v. 15, p. 75-83, 2000.

INSTITUTO BRASILEIRO DE MINERAÇÃO - IBRAM. **Gestão para a sustentabilidade na mineração: 20 anos de história Gestão para a sustentabilidade na mineração.** Instituto Brasileiro de Mineração; organizadores, Cláudia Franco de Salles Dias, Rinaldo César Mancin, M^a Sulema M. de Budin Pioli. 1.ed. - Brasília. 168 p. 2013.

INSTITUTO BRASILEIRO DE MINERAÇÃO – IBRAM. **Informações e Análises da Economia Mineral Brasileira**, 7 ed., 68 p. 2012.

INSTITUTO BRASILEIRO DE MINERAÇÃO – IBRAM. **Relatório Anual Julho 2012 – Junho 2013**, 2014.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS – IBAMA. **Manual de recuperação de áreas degradadas pela mineração:** técnicas de revegetação. Brasília, 95 p. 1990.

IZQUIERDO, I.; CARAVACA, F.; ALGUACIL, M.M.; HERNÁNDEZ, G.; ROLDÁN, A. Use of microbiological indicators for evaluating success in soil restoration after revegetation of a mining area under subtropical conditions. **Applied Soil Ecology**, v. 30, p. 3-10, 2005.

JARVIS, B. D. W.; BPANKHURST, C. E.; PATEL, J. J. *Rhizobium loti*, a new species of legume root nodule bacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Ames, v. 32, p. 378-380, 1982.

JORDAN, D. C. Rhizobiaceae Conn 1938. In: KRIEG, N. R.; HOLT, J. D. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**, London: Williams and Wilkins, v. 1, p. 234-244, 1984.

KASCHUK, G., HUNGRIA, M., SANTOS, J. C. P., e BERTON-JUNIOR, J. F. (2006). Differences in common bean rhizobial populations associated with soil tillage management in southern Brazil. **Soil and Tillage Research**, 87(2), 205-217.

KENNEDY, A. C. (1999). Bacterial diversity in agroecosystems. **Agriculture, ecosystems e environment**, 74(1), 65-76.

LEWIS, G.; SCHRIRE, B. D.; MACKINDER, B. A.; LOCK, J. M. (Ed.) **Legumes of the world**, Royal Botanic Gardens, Kew, 577 p. 2005.

LIMA, A. S. **Densidade, eficiência, e diversidade de bactérias fixadoras de N₂ que nodulam o siratro (*Macroptilium atropurpureum*) de solos sob diferentes usos na Amazônia Ocidental**. 2007. 167p. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. Ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, v. 1, n. 4, 2002.

LIMA, A. S.; NÓBREGA, R. S. A.; BARBERI, A.; SILVA, K.; FERREIRA, D. F.; MOREIRA, F. M. S. Nitrogen-fixing bacteria communities occurring in soils under different uses in the Western Amazon region as indicated by nodulation of siratro (*Macroptilium atropurpureum*). **Plant and Soil**, v. 320, p. 1-19, 2009.

MACHARIA, P. N.; KINYAMARIO, J. I.; EKAYAT, W. N.; GACHENE, C. K. K.; MUREITHI, J. G. Evaluation of forage legumes for introduction into natural pastures of semi-arid rangelands of Kenya. **Grass and Forage Science**, v. 65, p. 456-462, 2010.

MARILLEY, L., e ARAGNO, M. (1999). Phylogenetic diversity of bacterial communities differing in degree of proximity of *Lolium perenne* and *Trifolium repens* roots. **Applied Soil Ecology**, 13(2), 127-136.

MATIAS, S. R.; PASSOS, R.; SCOTTI, M. R. M.; SA', N. H. **Developments in plant and soil sciences**, in: E. Velázquez, C. Rodríguez-Barrueco (Eds.), First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization, Heidelberg, p. 337-340, 2007.

MATIAS, S. R.; PAGANO, M. C.; MUZZI, F. C.; OLIVEIRA, C. A.; CARNEIRO, A. A.; HORTA, S. N.; SCOTTI, M. R. Effect of rhizobia, mycorrhizal fungi and phosphate-solubilizing microorganisms in the rhizosphere of native plants used to recover an iron ore area in Brazil. **European Journal of Soil Biology**, v. 45, p. 259-266, 2009.

MATSUDA, A.; MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Tolerância de rizóbios de diferentes procedências ao zinco, cobre e cádmio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n.3, p. 343-355, 2002.

MECHI, A. e SANCHES, D. L. Impactos Ambientais da Mineração no Estado de São Paulo. **Estudos Avançados**, v. 24, n. 68, 2010.

MELLONI, R.; MOREIRA, F. M. D. S.; NÓBREGA, R. S. A.; SIQUEIRA, J. O. D. Eficiência e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas que nodulam caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] e feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em solos de mineração de bauxita em reabilitação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 30, n. 2, p. 235-246, 2006.

MME, M. D. (2011). Plano Nacional de Mineração 2030-Geologia, Mineração e Transformação Mineral. Brasília: Secretaria de Geologia, Mineração e Transformação Mineral-SGM.

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

MOREIRA, F. M. S. et al. *Azorhizobium doebereinerare* sp Nov. microsymbiont of *Sesbania virgata* (Caz.). Pers. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 29, p. 197-206, 2006.

MOREIRA, F. M. S.; GILLIS, M.; POT, B.; KERSTERS, K.; FRANCO, A. Characterization of Rhizobia Isolated from Different Divergence Groups of Tropical *Leguminosae* by Comparative Polyacrylamide Gel Electrophoresis of their Total Proteins. **Systematic Applied Microbiology**, Washington, v. 16, p. 135-146, 1993.

MOREIRA, F.M.S.; SILVA, M.F.; FARIA, S.M. Occurrence of nodulation in legume species in the Amazon region. *New phytologist*, Cambridge, v.121, p. 563-570, 1992.

MOULIN, L. et al. Nodulation of legumes by members of beta sub-class of Proteobacteria. **Nature**, London, v. 411, n. 6840, p. 948-950, 2001.

NAEL, M.; KHADEMI, H.; HAJABBASI, M.A. Response of soil quality indicators and their spatial variability to land degradation in central Iran. **Applied Soil Ecology**, v. 27, p. 221-232, 2004.

PACE, N. R. (1997). A molecular view of microbial diversity and the biosphere. **Science**, 276(5313), 734-740.

PARROTTA, J. A.; TURNBULL, J. W.; JONES, N. Catalyzing native forest regeneration on degraded tropical lands. **Forest Ecology and Management**, v. 99, p. 1-7, 1997.

PERIN, A.; GUERRA, J. G. M.; ESPINDOLA, J. A. A.; TEIXEIRA, M. G.; BUSQUET, R. N. B. Desempenho de bananeiras consorciadas com leguminosas herbáceas perenes. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras (UFLA), v. 33, p. 210-217, 2009.

POWLSON, D.S.; PROOKES, P.C.; CHRISTENSEN, B.T. Measurement of soil microbial biomass provides an early indication of changes in total soil organic matter due to straw incorporation. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 19, p. 159-164, 1987.

PUPPO, N. I. H. **Manual de pastagens e forrageiras**: formação, conservação, utilização. Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1979.

QUINÔNES, O. R. G.; INDA JUNIOR, A. V.; GIASSEN, E.; BISSANI, C. A.; DICK, D. P. Constructed soils characteristics after coal mining related to construction process and to material composition utilized. **Ciência Rural**, v. 38, n. 6, p. 1564-1571, 2008.

RAO, A.V.; TAK, R. Effect of rhizobial inoculation on Albizia lebbeck and its rhizosphere activity in mine. **Arid Land Research and Management**, v. 15, p. 157-162, 2001.

RIBEIRO DE SOUZA, S. C.; ANDRADE, S. A. L.; ANJOS DE SOUZA, L.; SCHIAVINATO, M. A. Lead tolerance and phytoremediation potential of Brazilian leguminous tree species at the seedling stage. **Journal of environmental management**, v. 110, p. 299-307, 2012.

SESSITSCH, A., REITER, B., PFEIFER, U., e WILHELM, E. (2002). Cultivation-independent population analysis of bacterial endophytes in three potato varieties based on eubacterial and Actinomycetes-specific PCR of 16S rRNA genes. **FEMS microbiology ecology**, 39(1), 23-32.

SHURE, D. J. e RAGSDALE, H. L. Patterns of primary succession on granite outcrop surfaces, **Ecology**, v. 5, p. 993-1006, 1977.

SILVA, J. P. S. Impactos ambientais causados por mineração. **Revista Espaço da Sophia**, n. 8, 2007.

SILVA, K. **Identification and funcional characterization of diazotrophic β -proteobacteria from brazilian soils**. 2009. 124 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

SILVA, K.; FLORENTINO, L. A.; DA SILVA, K. B.; DE BRANDT, E.; VANDAMME, P.; MOREIRA, F. M. S. *Cupriavidus necator* isolates are able to fix nitrogen in symbiosis with different legume species. **Systematic and applied microbiology**, v. 3, n. 3, p. 175-182, 2012.

SIQUEIRA, J. O.; FRANCO, A. A. **Biotecnologia do solo**: Fundamentos e perspectivas. Brasília: MEC/ESAL/FAEPE/ABEAS, 236 p. 1988.

ŠOURKOVÁ, M.; FROUZ, J.; FETTWEIS, U.; BENS, O.; HÜTTL, R.F.; ŠANTRŮČKOVÁ, H. Soil development and properties of microbial biomass succession in reclaimed post mining sites near Sokolov (Czech Republic) and near Cottbus (Germany), **Geoderma**, v. 129, p. 73-80, 2005.

SPRENT, J. I., e PARSONS, R. (2000). Nitrogen fixation in legume and non-legume trees. **Field Crops Research**, 65(2), 183-196.

TAGLIANI, C. R. A. **A mineração na porção média da Planície Costeira do Rio Grande do Sul**: estratégia para a gestão sob um enfoque de Gerenciamento Costeiro Integrado. 2002. 252p. Tese (Doutorado em Geociências) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

TRANNIN, I. C. B.; MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Crescimento e nodulação de *Acacia mangium*, *Enterolobium contortisiliquum* e *Sesbania virgata* em solo contaminado com metais pesados. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 25, p. 743-753, 2001.

TRINICK, M. J.; MILLER, C.; HADOBAS, P. A. Formation and structure of root nodules induced on *Macroptilium atropurpureum* inoculated with various species of *Rhizobium*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 69, n. 7, p. 1520-1532, July 1991.

VIEIRA, E. A. (2011). A (in) sustentabilidade da indústria da mineração no Brasil. *Estação Científica (UNIFAP)*, 1(2), 1-15.

VINUESA, P. et al. *Bradyrhizobium canariense* sp. nov., an acid-tolerant endosymbiont that nodulates endemic genistoid legumes (Papilionoideae: Genisteae) from the Canary Islands, along with *Bradyrhizobium japonicum* bv. *genistearum*, *Bradyrhizobium* *genospecies* alpha and *Bradyrhizobium* *genospecies* beta. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 55, p. 569-575, 2005.

WEISBURG, W. G., BARNS, S. M., PELLETIER, D. A., e LANE, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of bacteriology*, 173(2), 697-703.

WOESE, C. Prokaryote Systematics: Chapter1. The evolution of a science. In: BALOWS, A.; TRÜPER, H. G.; DWORKIN, M.; HARDER, W.; SCHLEIFER, K. H. (Editors). **The Prokaryotes - A Handbook on the Biology of Bacteria, Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications**. 2 ed. New York, 1991.

SEGUNDA PARTE – ARTIGO

ARTIGO 1

SIMBIOSES DE RIZÓBIO COM NOVE ESPÉCIES DE LEGUMINOSAS FLORESTAIS EM VIVEIRO DO QUADRILÁTERO FERRÍFERO

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

1 **Simbioses de rizóbio com nove espécies de leguminosas florestais em**
2 **viveiro do quadrilátero ferrífero**

3

4 Jacqueline Savana da Silva¹; Amanda Azarias Guimarães²; Márcia
5 Ruffini³; Paula Rose de Almeida Ribeiro⁴; Fatima Maria de
6 Souza Moreira⁵

7

8 ^(1,2,3,4,5) Departamento de Ciência do Solo, Setor Microbiologia do Solo,
9 Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brazil. Universidade Federal
10 de Lavras, Cx. Postal 3037, 37200-000, Lavras, Minas Gerais, Brazil.
11 *Author for correspondence. E-mail: jacsavana@yahoo.com.br

12

13 **Resumo** - A degradação ambiental causada pela mineração resultou na
14 criação de leis ambientais que obrigam as empresas mineradoras a mitigar
15 os impactos causados por essa atividade. A revegetação com diversas
16 espécies de plantas é uma técnica bastante utilizada para a reabilitação
17 dessas áreas. Entretanto, esse processo é lento e limitado quando ocorre
18 natural e espontaneamente. Diante disso a utilização de espécies arbóreas
19 leguminosas inoculadas com estirpes de rizóbios é uma alternativa
20 indicada para a recuperação e sucessão vegetal de solos impactados. O
21 objetivo deste trabalho foi de avaliar a diversidade fenotípica, genotípica
22 e simbiótica de bactérias isoladas de nódulos de mudas de espécies de

23 leguminosas arbóreas utilizadas para a recuperação de áreas degradadas
24 pela mineração. Através do isolamento dos nódulos foram obtidas 93
25 estirpes de bactérias que foram submetidas ao experimento de
26 autenticação em simbiose com siratro (*Macroptilium atropurpureum*). O
27 experimento foi realizado em casa de vegetação em DIC com três
28 repetições e conduzido por um período de 45 dias. Para verificar a
29 diversidade genética realizou-se a extração do DNA genômico e o
30 sequenciamento parcial do gene 16S rRNA. Das 93 estirpes isoladas
31 foram sequenciadas 43, as quais são representantes de três dos sete grupos
32 culturais formados: RA (crescimento rápido com acidificação do meio de
33 cultura), RAL (crescimento rápido com alcalinização do meio de cultura)
34 e LAL (crescimento lento com alcalinização do meio de cultura). Foram
35 encontrados os gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*,
36 *Paenibacillus*, *Mesorhizobium*, *Variovorax*, *Bacillus*, *Brevibacillus*,
37 *Mucilaginibacter*, *Polaromonas*, *Dyella*, *Pseudomonas*, *Terriglobus* e
38 *Sphingomonas*. Nos experimentos de autenticação 33 % dos isolados
39 nodularam. Os resultados mostraram alta diversidade genética, fenotípica
40 e simbiótica.

41 Termo para indexação: Leguminosas arbóreas, fixação biológica de
42 nitrogênio, recuperação de áreas degradadas.

43 **Abstract**

44 The environmental degradation caused by mining resulted in the
45 creation of environmental laws which require mining companies to mitigate the
46 impacts caused by this activity. Revegetation with various plant species is a
47 technique widely used for the rehabilitation of these areas. However, this
48 process is slow and limited, when it occurs naturally and spontaneously. The use
49 of leguminous tree species inoculated with rhizobial strains is an alternative
50 indicated for the recovery and plant succession of impacted soils. The objective
51 of this study was to evaluate the phenotypic, genotypic and symbiotic diversity
52 of bacteria isolated from seedling nodules of leguminous tree species used for
53 the recovery of degraded areas by mining. They are: *Acacia farnesiana*,
54 *Anadenanthera colubrina*, *Clitoria fairchildiana*, *Erythrina speciosa*, *Inga*
55 *marginata*, *Inga sessilis*, *Mimosa caesalpiniiifolia*, *Piptadenia gonoacantha* and
56 *Plathymenia reticulata*. By isolating the nodules, 93 strains of bacteria were
57 obtained and they were submitted to the authentication experiment in symbiosis
58 with siratro (*Macroptilium atropurpureum*). The experiment was carried out in a
59 greenhouse, in a completely randomized design (CRD) with three replications,
60 and conducted for a period of 45 days. In order to verify the genetic diversity,
61 the extraction of genomic DNA and the partial sequencing of the 16S rRNA

62 gene was performed. From 93 strains isolated, 43 were sequenced, which are
63 representatives of three of the seven culture groups formed: RA (rapid growth
64 with acidification of the culture medium), RAL (rapid growth with alkalization
65 of the culture medium) and LAL (slow growth with alkalization of the culture
66 medium). The genera *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Paenibacillus*,
67 *Mesorhizobium*, *Variovorax*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Mucilaginibacter*,
68 *Polaromonas*, *Dyella*, *Pseudomonas*, *Terriglobus* and *Sphingomonas* were
69 found. In the authentication experiments, 33% of the isolated ones nodulated. A
70 high genetic, phenotypic and symbiotic diversity was found in the studied
71 rhizobia.

72 **Keywords:** Leguminous trees. Biological nitrogen fixation. Recovery of
73 degraded areas.

74

75 **Introdução**

76 A mineração é um dos setores básicos da economia
77 brasileira responsável por disponibilizar para a sociedade os recursos
78 essenciais para o seu desenvolvimento, contribuindo
79 significativamente para o progresso econômico e sócio cultural do
80 País. A atividade é responsável pela produção de matéria- prima para
81 diversos produtos que utilizamos cotidianamente e pela geração de

82 empregos diretos, sendo, portanto, importante para a sobrevivência e
83 conforto da sociedade. Entretanto, essa atividade causa impactos na
84 sua área de exploração, como a retirada da vegetação, causando perda
85 da matéria orgânica do solo e consequente perda de seus nutrientes
86 (CAMPELLO, 1998).

87 O papel protetor da vegetação para o solo é de suma importância,
88 uma vez que reduz consideravelmente as chances de degradação do
89 mesmo. Por isso, a ausência de uma alta diversidade vegetal nas áreas
90 impactadas demandará um programa de recuperação baseado no
91 conceito de sustentabilidade ecológica, atentando-se para a
92 biodiversidade, a ciclagem de nutrientes e o fluxo de energia,
93 objetivando o resgate da produtividade daquele solo.

94 Um solo produtivo é caracterizado por possuir uma alta
95 diversidade de espécies vegetais em um mesmo cultivo ou em
96 sucessão, elevados níveis de matéria orgânica e diversidade da vida
97 no solo, além da eficiência na utilização de água, luz e nutrientes. As
98 primeiras técnicas dos programas de recuperação visam à adição de
99 mais matéria orgânica do que a quantidade mineralizada. Para isso, é
100 importante o uso de espécies que adicionem carbono (C) e nitrogênio

101 (N₂) ao sistema, além de fornecer material formador de serapilheira
102 com decomposição (FRANCO et al., 2003).

103 O emprego de espécies arbóreas leguminosas inoculadas com
104 bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas de leguminosas
105 (BFNNL) é uma alternativa potencialmente satisfatória para a
106 revegetação de áreas degradadas pela mineração. Uma das principais
107 características dessa simbiose é o aumento da biomassa e a entrada de
108 N₂ no sistema (BROWN e LUGO, 1994; MOREIRA e SIQUEIRA,
109 2006).

110 A fixação biológica de nitrogênio promovida pela simbiose entre
111 leguminosas arbóreas e BFNNL pode ser maximizada por uma maior
112 diversidade dessas últimas em áreas degradadas uma vez que são
113 capazes de se associarem com várias espécies de leguminosas,
114 aumentando a resiliência dos processos microbiológicos naquele solo
115 (MELLONI et al., 2006; MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). Além
116 disso, algumas BFNNL possuem resistência a metais pesados,
117 podendo sua utilização ser de grande importância na recuperação de
118 áreas contaminadas (TRANNIN et al., 2001; MATSUDA et al.,
119 2002; FERREIRA et al., 2013).

120 O presente trabalho teve por objetivo analisar a diversidade
121 genotípica, fenotípica e simbiótica de BFNNL que estabelecem
122 simbioses com mudas de *Acacia farnesiana*, *Anadenanthera*
123 *colubrina*, *Clitoria fairchildiana*, *Erythrina speciosa*, *Inga marginata*,
124 *Inga sessilis*, *Mimosa caesalpiniiifolia*, *Piptadenia gonoacantha* e
125 *Plathymenia reticulata*, leguminosas arbóreas coletadas no viveiro do
126 CTF Miguelão (Centro de Tecnologia de Ferrosos) da VALE S/A.

127 **Material e métodos**

128 **Área de estudo e coleta de nódulos de rizóbios**

129 As mudas das espécies arbóreas foram coletadas no viveiro do
130 Centro de Tecnologia de Ferrosos - CTF Miguelão da Vale S/A,
131 localizado na Fazenda Rio do Peixe S/N, na Zona Rural do município de
132 Nova Lima/MG em 10 de outubro de 2014. Foram coletadas duas mudas
133 de cada espécie arbórea estudada, ou seja, *Acacia farnesiana*,
134 *Anadenanthera colubrina*, *Clitoria fairchildiana*, *Erythrina speciosa*,
135 *Inga marginata*, *Inga sessilis*, *Mimosa caesalpiniiifolia*, *Piptadenia*
136 *gonoacantha* e *Plathymenia reticulata*. Essas espécies arbóreas foram
137 utilizadas por seu emprego em programas de recuperação de áreas
138 degradadas e pela capacidade que algumas possuem de se associar

139 eficientemente com algumas estirpes de gêneros de BFNNL, as quais têm
140 sido aprovadas como aptas para a produção de inoculantes comerciais
141 (FRANCO e FARIA, 1997; FARIA e MELO, 1998; FARIA e GUEDES;
142 1999; FARIA, 2000; FARIA e FRANCO, 2002; MAPA, 2011).

143 O processo de retiradas dos nódulos radiculares das mudas foi
144 realizado no Laboratório de Biologia, Microbiologia e Processos
145 Biológicos do Solo (DCS) da Universidade Federal de Lavras (UFLA).
146 Foi utilizada apenas uma muda de cada espécie arbórea coletada, da qual
147 foram retirados seis nódulos que foram lavados posteriormente em água
148 corrente e submetidos ao processo de isolamento das estirpes.

149 Durante este processo, foram retiradas amostras do substrato de
150 cultivo das mudas para análises química e física. Em geral, o substrato
151 apresentava pH tendendo à neutralidade e à alta fertilidade indicada pelos
152 valores das bases trocáveis e porcentagem da saturação de bases (Tabela
153 1).

154

155 Tabela 1 Análises químicas e físicas do substrato de cultivo das mudas das espécies de leguminosas das mudas
 156 provenientes do viveiro Centro de Tecnologia de Ferrosos - CTF Miguelão da Vale S/A.

	pH	K ⁺	P	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Al ³⁺	H+Al	SB	t	T	V	m
		mg/dm ³			cmol/dm ³						%	
<i>A.farnesiana</i>	6,0	58	22,93	3,6	1,2	0,2	4,04	4,95	5,15	8,99	55,05	3,88
<i>A.colubrina</i>	6,0	168	76,96	16,08	0,98	0	1,66	17,49	17,49	19,15	91,34	0
<i>C.fairchildiana</i>	7,4	36	3,21	1,6	1,2	0	1,49	2,89	2,89	4,38	66,03	0
<i>E.speciosa</i>	7,3	94	84,55	15,2	0,7	0	1,07	16,14	16,14	17,21	93,79	0
<i>I.marginata</i>	6,4	52	27,27	3,1	1,5	0	1,86	4,73	4,73	6,59	71,83	0
<i>I.sessilis</i>	6,5	82	121,14	15,23	1,08	0	1,07	16,52	16,52	17,59	93,92	0
<i>M.caesalpiniiifolia</i>	4,2	90	26,05	1,13	0,32	1,2	5,05	1,68	2,88	6,73	24,97	41,67
<i>P.gonoacantha</i>	6,7	58	6,85	1,5	1,2	0	1,49	2,85	2,85	4,34	65,64	0
<i>P.reticulata</i>	5,7	52	9,62	1,77	1,3	0	1,66	3,2	3,2	4,86	65,91	0
	M.O	P-rem	Zn	Fe	Mn	Cu	B	S	Argila	Silte	Areia	
	dag/kg	mg/L	mg/dm ³					dag/kg				
<i>A.farnesiana</i>	1,75	19,58	1,16	80,73	29,54	0,07	0,5	44,93	46	3	51	
<i>A.colubrina</i>	5,78	9,91	4,29	106,93	259,97	0,62	0,17	31,31	46	26	28	
<i>C.fairchildiana</i>	0,97	9,91	1,81	85,24	15,4	0,86	0,21	15,05	46	22	32	
<i>E.speciosa</i>	6,15	4,04	5,27	23,87	211,19	0,1	0,24	24,46	44	21	35	
<i>I.marginata</i>	1,99	17,71	5,47	89,33	27,3	1,11	0,26	15,05	50	18	32	
<i>I.sessilis</i>	3,84	10,63	4,55	70,86	211,92	0,78	0,13	27,31	44	13	43	
<i>M.caesalpiniiifolia</i>	0,65	10,63	1,54	35,72	21,89	0,78	0,08	28,07	52	20	28	
<i>P.gonoacantha</i>	0,75	2,84	3,12	71,84	16,12	0,21	0,28	38,98	60	16	24	
<i>P.reticulata</i>	1,29	10,99	6,04	60,67	17,4	0,9	0,06	38,98	62	15	23	

157 Legenda:

158 pH em água; Ca – Mg – Al – Extrator: KCl – 1 mol/L S – Extrator – Fosfato monocálcio em ácido acético

159 SB = Soma de bases trocáveis P – Na – K – Fe – Zn – Mn – Cu – Extrator Mehlich 1

160 CTC (T) – Capacidade de Troca Catiônica a pH 7,0 H + Al – Extrator : SMP

161 m = Índice de Saturação de Alumínio CTC (t) - Capacidade de Troca Catiônica Efetiva

162 P-rem: Fósforo remanescente V = Índice de Saturação de Bases

163 Mat. Org. (MO) – Oxidação: Na₂Cr₂O₇ 4N+H₂SO₄ 10N B – Extrator água quente

164 **Isolamento e caracterização cultural**

165 Os nódulos retirados das espécies arbóreas foram lavados e
166 hidratados em água destilada estéril, por 30 minutos. Posteriormente, os
167 nódulos foram desinfestados superficialmente em álcool etílico 95%
168 durante 30 segundos e em H₂O₂ por três minutos, em seguida foram
169 lavados em água destilada estéril por seis vezes. Os reagentes utilizados
170 para a desinfestação (álcool, H₂O₂ e água) dos nódulos foram trocados
171 para cada espécie e a água da última lavagem foi plaqueada para
172 comprovar a eficácia do processo de desinfestação. Os nódulos foram
173 macerados em placas contendo meio de cultura 79 (FRED e
174 WAKSMAN, 1928) e o líquido obtido foi espalhado em forma de estrias
175 compostas para a obtenção de colônias isoladas.

176 Os morfotipos observados foram plaqueados e purificados em
177 meio de cultura 79. Um total de 94 estirpes foram obtidas e estocados em
178 meio 79 (líquido), mais glicerol 20% e armazenado a 4°C e também em
179 água destilada estéril à temperatura ambiente.

180 As estirpes foram avaliadas quanto as seguintes características
181 culturais: taxa de crescimento avaliado pelo tempo de formação de
182 colônias isoladas (1-3 dias, crescimento rápido; 4-5 dias, crescimento

183 intermediário; 6-10, crescimento lento; mais de 10 dias, crescimento
184 muito lento), alteração do pH do meio (acidificação, neutralização e
185 alcalinização); características das colônias: cor (creme, branca, amarela
186 ou rosa); diâmetro das colônias (mm); borda (inteira, ondulada,
187 filamentosa, lobada ou denteada); forma (circular, irregular ou
188 puntiforme); elevação (plana, lente, convexa, drop-like, umbilicada ou
189 umbanada); superfície (lisa, rugosa ou papilosa); detalhes ópticos
190 (transparente ou opaca); consistência da colônia (seca, aquosa, gomosa,
191 butírica ou viscosa); produção de exopolissacarídeos (escassa, pouca,
192 moderada ou abundante) e absorção de corante.

193 **Autenticação das estirpes**

194 Para a avaliação da autenticação das estirpes foi utilizado o
195 siratro (*Macropitilium atropurpureum*) por ser uma planta hospedeira
196 promíscua que estabelece simbiose com bactérias fixadoras de
197 nitrogênio (BFN) de diversos gêneros, como *Rhizobium* e
198 *Sinorhizobium* (BROMFIELD e BARRAN, 1990; TRINICK et al.,
199 1991), *Mesorhizobium* e *Bradyrhizobium* (JORDAN, 1984),
200 *Azorhizobium* (FLORENTINO et al., 2009; GONÇALVES e
201 MOREIRA, 2004; MOREIRA et al., 2006), *Burkholderia* -subclasse

202 β -proteobactéria (MOULIN et al., 2001; SILVA, 2009,
203 CARVALHO, 2010) e *Cupriavidus* (FLORENTINO et al., 2009,
204 SILVA et al., 2012).

205 Foram instalados dois experimentos em casa de vegetação nos
206 dias 06/12/2014 e 10/12/2014 que possuíam 49 e 44 estirpes (tratamentos)
207 respectivamente, essa divisão objetivou uma melhor manipulação durante
208 a instalação dos mesmos garantindo assim uma redução na possibilidade
209 de contaminação. Em cada experimento foram adicionados dois
210 tratamentos controle positivos (com baixo teor de N mineral e inoculado
211 com as estirpes referência para o siratro, UFLA 04-212 e SEMIA 656). O
212 controle positivo UFLA 04-0212, identificada como *Bradyrhizobium* sp.
213 possui comprovada eficiência em estabelecer simbiose com o siratro
214 (FLORENTINO et al., 2009) e a SEMIA 656 também pertencente ao
215 gênero *Bradyrhizobium* é estirpe aprovada como inoculante para siratro
216 (*Macroptilium atropurpureum*) pelo MAPA. Além disso, dois
217 tratamentos sem inoculação (negativos) também foram adicionados nos
218 experimentos: um sem nitrogênio mineral (S/N) e o outro contendo
219 nitrogênio mineral (C/N) para comprovar a ausência de contaminação e
220 para comparação com as plantas inoculadas.

221 As plantas foram cultivadas em tubetes de polipropileno com
222 capacidade volumétrica de 250 cm³ contendo uma mistura de areia e
223 vermiculita na proporção de 1:1 (v:v) e adicionada solução nutritiva de
224 Hoagland (HOAGLAND e ARNON, 1950) esterilizada, de acordo com a
225 necessidade das plantas. Para a inoculação, as estirpes selecionadas foram
226 crescidas em meio “79” líquido sob agitação, por cerca de três a sete dias
227 de acordo com a taxa de crescimento das estirpes. Foram plantadas duas
228 sementes de siratro por tubete e inoculado 1 mL da suspensão bacteriana
229 na fase log em cada semente. Após uma semana de plantio foi feito o
230 desbaste restando apenas uma planta por tubete.

231 Nos tratamentos controle com baixo teor de N e nos inoculados, a
232 solução nutritiva de Hoagland utilizada continha 5,25 mg.L⁻¹ de N, a qual
233 é considerada uma dose de arranque para o processo de fixação biológica
234 de nitrogênio. As seguintes quantidades de solução estoque foram
235 adicionadas em 4 L de água: 0,1 mL de 114 g.L⁻¹ NH₄H₂PO₄; 0,6 mL de
236 101,11 g.L⁻¹ KNO₃; 0,4 mL de 236,16 g.L⁻¹ Ca(NO₃)₂.4H₂O; 2 mL de
237 246,9 g.L⁻¹ MgSO₄.7H₂O; 3 mL de 87,13 g.L⁻¹ K₂SO₄; 10 mL de 12,6
238 g.L⁻¹ Ca(H₂PO₄)₂.H₂O; 200 mL de 1,72 g.L⁻¹ CaSO₄.2H₂O; 1 mL
239 FeEDTA e 1 mL de micronutrientes (2,86 mg.L⁻¹ H₃BO₃; 2,03 mg.L⁻¹

240 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 0,22 mg.L^{-1} $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,09 mg.L^{-1} $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$;
241 0,08 mg.L^{-1}). No controle com teor de nitrogênio mineral (N) ideal para o
242 desenvolvimento das plantas foi utilizada a solução de Hoagland e Arnon
243 (1950) completa com 52,5 mg.L^{-1} de nitrogênio.

244 Os experimentos foram conduzidos por 45 dias em DIC, com três
245 repetições e após esse período foi analisada a presença ou ausência de
246 nodulação.

247 **Sequenciamento parcial do gene 16S rRNA das estirpes bacterianas**

248 Um total de 42 estirpes foram submetidas ao sequenciamento
249 parcial do gene 16S rRNA. Para isso, foi realizada a extração do DNA
250 genômico das estirpes pelo método de lise alcalina como descrito por
251 Niemann et al. (1997), a partir de células de cultura pura, cultivadas de
252 três a sete dias em meio de cultura 79 (FRED e WAKSMAN, 1928). Para
253 a amplificação do gene 16S rRNA foram utilizados os pares de
254 oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) 27F
255 GAGTTTGACCTGGCTCAG) e 1492R (GGTTACCTTGTTACGACTT)
256 (LANE, 1991). Alíquotas de 5 μL do *template* de DNA foram utilizadas
257 para 50 μL de reação de PCR. O volume final dos reagentes por reação
258 foram: 5 μL de tampão KCl para PCR (10X), 5 μL dNTP Mix (0,2 mM

259 de cada), 4 μL (2,5 mM) de MgCl_2 , 1 μL de cada *primer* (10 μM), 0,4 μL
260 (5U μL^{-1}) de *Taq* DNA Polimerase e água estéril ultra pura para
261 completar o volume da reação. A reação de amplificação foi realizada em
262 termociclador Eppendorf Mastercycler® nas seguintes condições:
263 desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos, 35 ciclos de desnaturação
264 (94°C por 40 segundos), anelamento (55°C por 40 segundos), extensão
265 (72°C por 1 minuto e 30 segundos) e uma extensão final de 72°C por 7
266 minutos. Os produtos amplificados foram separados em gel de agarose
267 1% e visualizados sob luz UV. Os produtos de PCR foram enviados para
268 o Laboratório da Macrogen (Coreia), para purificação e
269 sequenciamento. A qualidade das sequências foram avaliadas com uso do
270 programa BioNumerics, versão 7.1 (Applied Maths, Austin, TX, EUA) e
271 posteriormente foram submetidas ao programa BLASTn (Bethesda, MD,
272 EUA) (ALTSCHUL et al., 1997), para comparação com sequências
273 similares depositadas no banco de dados do GenBank, do National Center
274 for Biotechnology Information (NCBI).

276

277

284

292

293 A maioria das estirpes acidificou o meio de cultura (58%),
294 apresentou coloração amarela, forma circular, borda inteira, moderada
295 produção de exopolissacarídeo, consistência de massa butírica e
296 absorveram indicador (Figura 3).

297

298

299

300

301

302

303

304

305

306

307

308

309

310

311

312

313

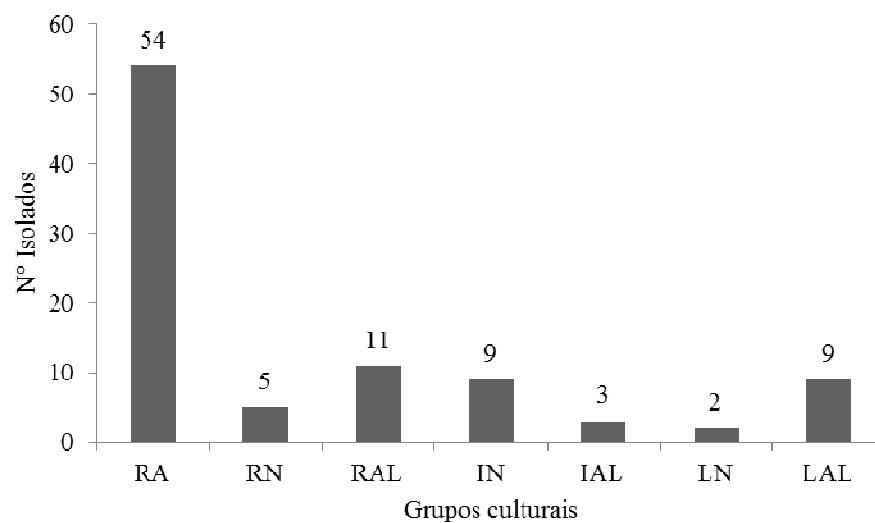
314

315

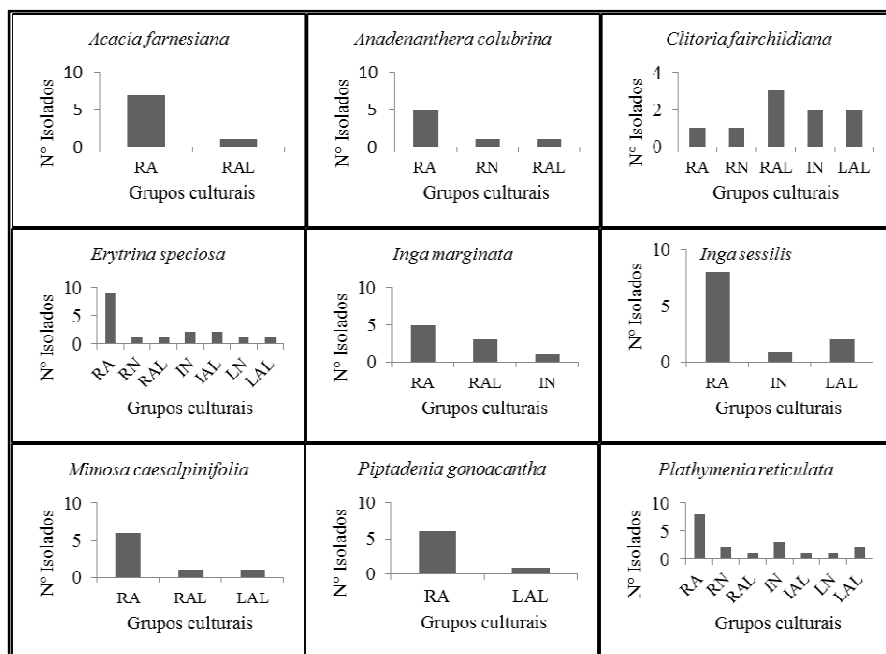
316

317

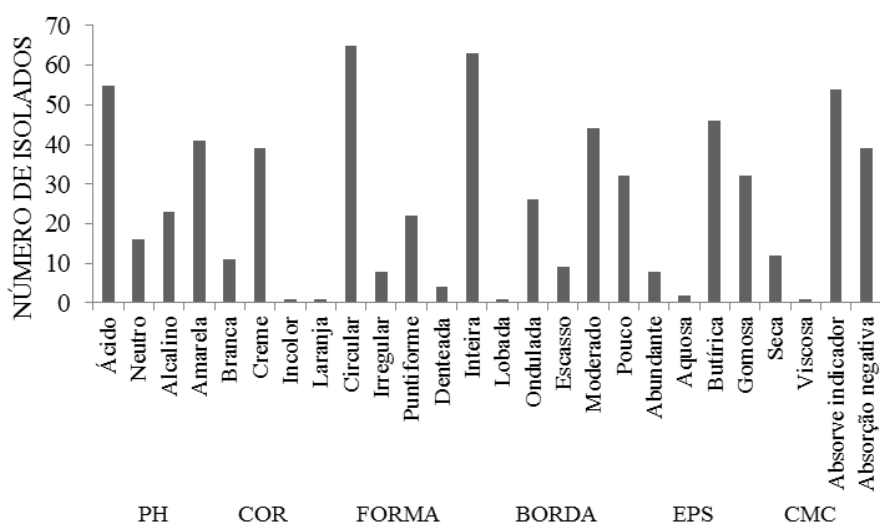
318



319 **Figura 1.** Estirpes isoladas dos nódulos das espécies arbóreas, distribuídas em
320 sete grupos culturais baseados no tempo de crescimento e reação do pH do meio
321 de cultura: crescimento rápido com acidificação do meio (RA), sem alteração do
322 pH do meio (RN) e alcalinizando o meio (RAL); crescimento intermediário sem
323 modificar o pH do meio (IN) e com alcalinização do meio (IAL); crescimento
324 lento sem modificar o pH do meio (LN) e com alcalinização do meio (LAL).
325



326
 327 **Figura 2:** Número de estirpes isoladas das espécies arbóreas, agrupadas
 328 por tipos culturais baseados no tempo de crescimento e alteração do
 329 pH do meio de cultura: crescimento rápido com acidificação do meio
 330 (RA), sem alteração do pH do meio (RN) e alcalinizando o meio (RAL);
 331 crescimento intermediário sem modificar o pH do meio (IN) e com
 332 alcalinização do meio (IAL); crescimento lento sem modificar o pH do
 333 meio(LN) e com alcalinização do meio (LAL).



334 **Figura 3:** Distribuição de todas as estirpes isoladas dos nódulos das
 335 espécies arbóreas baseada nas características culturais: pH, cor, forma,
 336 borda, EPS (Produção de exopolissacarídeo), CMC (Consistência da
 337 massa da colônia) e absorção de corante.

338 **Autenticação das estirpes**

339 Nos experimentos de autenticação das 93 estirpes avaliadas
340 apenas 32 estirpes foram capazes de estabelecer simbiose com o siratro.
341 Não houve formação de nódulos nos controles negativos de nodulação
342 (com nitrogênio e sem nitrogênio), o que indica que não ocorreu
343 contaminação nos experimentos. Os controles positivos de nodulação
344 utilizados, UFLA 04-212 e Semia 656, nodularam normalmente,
345 concordando com trabalho anterior (FLORENTINO et al., 2009). Na
346 tabela 2 está representada a nodulação do siratro inoculado com as
347 estirpes isoladas dos nódulos das espécies arbóreas.

348

349

350

351 **Tabela 2:** Autenticação de 93 estirpes de bactérias quanto à nodulação de
 352 siratro, isoladas de nódulos de mudas de espécies florestais cultivadas em
 353 viveiro no Centro de Tecnologia de Ferrosos - CTF Miguelão da Vale S/A.

Isolados	Nodulação	Isolados	Nodulação	Isolados	Nodulação
01-1002	+	01-1034	+	01-1065	-
01-1003	-	01-1035	+	01-1066	-
01-1004	-	01-1036	-	01-1067	+
01-1005	-	01-1037	-	01-1068	-
01-1006	-	01-1038	+	01-1069	-
01-1007	-	01-1039	+	01-1070	-
01-1008	-	01-1040	+	01-1071	-
01-1009	-	01-1041	-	01-1072	-
01-1010	+	01-1042	+	01-1073	-
01-1011	-	01-1043	+	01-1074	-
01-1012	-	01-1044	+	01-1075	-
01-1013	-	01-1045	+	01-1076	-
01-1014	-	01-1046	+	01-1077	-
01-1015	-	01-1047	-	01-1078	-
01-1016	-	01-1048	-	01-1079	-
01-1017	-	01-1049	-	01-1080	-
01-1018	-	01-1050	-	01-1081	-
01-1019	+	01-1051	-	01-1082	-
01-1020	-	01-1052	-	01-1084	-
01-1022	-	01-1053	-	01-1085	+
01-1023	-	01-1054	+	01-1086	-
01-1024	-	01-1055	-	01-1094	+
01-1025	-	01-1056	+	01-1095	+
01-1026	+	01-1057	-	01-1096	+
01-1027	-	01-1058	-	01-1097	-
01-1028	-	01-1059	-	01-1098	+
01-1029	+	01-1060	-	01-1099	+
01-1030	+	01-1061	-	01-1100	+
01-1031	+	01-1062	-	01-1101	+
01-1032	+	01-1063	-	01-1102	-
01-1033	+	01-1064	-	01-1103	+

354

355

356

357 O siratro estabeleceu simbiose com estirpes isoladas de nódulos
358 de *Acacia farnesiana*, *Anadenanthera colubrina*, *Clitoria fairchildiana*,
359 *Erythrina speciosa*, *Inga sessilis*, *Mimosa caesalpiniiifolia*, *Piptadenia*
360 *gonoacantha* e *Plathymenia reticulata*, ou seja, oito das nove espécies
361 arbóreas estudadas. As estirpes isoladas da espécie *Inga marginata* não
362 foram autenticadas em siratro. As estirpes isoladas de *Erythrina speciosa*
363 e *Plathymenia reticulata*, foram as que obtiveram maior frequência na
364 nodulação do siratro, seguidas pelas estirpes isoladas de *Clitoria*
365 *fairchildiana*.

366 O siratro estabeleceu simbiose com estirpes dos sete grupos
367 culturais encontrados nesse trabalho, são eles RA, RN, RAL, IN, IAL,
368 LN e LAL. Resultados de alta diversidade cultural como os obtidos no
369 presente trabalho têm sido relatados na literatura (JESUS et al., 2005;
370 FLORENTINO et al., 2009). Algumas das estirpes simbiontes do siratro
371 pertencentes aos grupos culturais RA e LAL foram identificadas como
372 pertencentes aos gêneros *Rhizobium* (RA), *Bradyrhizobium* (LAL),
373 *Mesorhizobium* (RA), *Burkholderia* (RA) e *Paenibacillus* (RA),
374 resultado este que confirma a promiscuidade dessa planta (LIMA et al.,
375 2009; SILVA et al., 2012).

376 A baixa taxa de nodulação obtida nos experimentos de
377 autenticação pode ser explicada por alguns fatores importantes. Durante
378 o isolamento, todas as estirpes oriundas dos nódulos foram isoladas,
379 obtendo-se, portanto, estirpes simbióticas e não simbióticas. Há registros
380 na literatura com situação semelhante onde a maioria das estirpes
381 isoladas de nódulos não foi autenticada em outras espécies vegetais ou
382 nos hospedeiros de origem (DE LAJUDIE et al., 1999; LI et al., 2008).

383 Outra possível explicação para a baixa nodulação é que essas
384 estirpes não foram inoculadas nas suas espécies de origem, ou seja, de
385 onde foram isoladas, sugerindo assim, certa especificidade dessas
386 bactérias com seu hospedeiro original (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

387 A baixa taxa de nodulação encontrada nos resultados dos
388 experimentos de autenticação e de eficiência pode estar relacionada às
389 altas temperaturas registradas na casa de vegetação durante o período em
390 que os mesmos foram instalados. A temperatura média máxima registrada
391 no interior da estufa foi de 43° C. Essas condições provavelmente
392 afetaram a infecção de algumas estirpes. Contudo, é possível inferir que
393 as estirpes que nodularam são tolerantes à alta temperatura, característica

394 positiva uma vez que um dos critérios nos estágios de seleção de estirpes
395 é que sejam competitivas em condições de estresse.

396 **Sequenciamento parcial do gene 16S rRNA**

397 Das 93 estirpes de bactérias isoladas dos nódulos das mudas de
398 leguminosas estudadas, 43 foram sequenciadas, as quais são
399 representantes de três dos sete grupos culturais formados (RA, RAL e
400 LAL). As sequências obtidas variaram de 319 a 1406 pares de bases, com
401 similaridade de 91 % a 100 % com as sequências de estirpes depositadas
402 no GenBank.

403 Os resultados obtidos pelas análises das sequências mostraram que
404 houve diversidade de gêneros de BFNNL, além da presença de estirpes de
405 gêneros considerados não nodulíferos. Das 43 estirpes sequenciadas, 12
406 foram identificadas como pertencentes ao gênero *Rhizobium*, nove como
407 *Bradyrhizobium*, cinco como *Paenibacillus*, quatro como *Burkholderia*,
408 três como *Mesorhizobium* e dois como *Variovorax*. Os gêneros *Bacillus*,
409 *Brevibacillus*, *Mucilaginibacter*, *Polaromonas*, *Dyella*, *Sphingomonas*
410 *Pseudomonas* e *Terriglobus* foram representados por apenas uma estirpe
411 (Tabela 3).

412 **Tabela 3:** Identificação de estirpes com base nas sequências do 16S rRNA mais similares encontradas no
 413 GenBank. Os isolados são oriundos de diferentes espécies de leguminosas arbóreas cultivadas em viveiro no
 414 Centro de Tecnologia de Ferrosos - CTF Miguelão da Vale S/A.

Hospedeiro de origem	Códigos ⁽¹⁾ isolados	Código UFLA	Nodulação ⁽²⁾	Grupos culturais ⁽³⁾	PB ⁽⁴⁾	Sequência mais similar encontrada no GenBank		
						Espécie	Si	Acesso
<i>A. farnesiana</i>	E3B1	01-1060	-	RAL	781**	<i>Mucilaginibacter</i> sp.	99	HM204922.1
<i>A. farnesiana</i>	E3b2	01-1056	+	RA	751***	<i>Rhizobium</i> sp.	100	HM486519.1
<i>A. farnesiana</i>	E3a	01-1057	-	RA	1011***	<i>Pseudomonas</i> sp.	99	EU143651.1
<i>A. colubrina</i>	AV4a	01-1084	-	RA	659**	<i>Burkholderia</i> sp.	100	JQ316419.1
<i>A. colubrina</i>	AV6b	01-1086	-	RAL	803***	<i>Dyella</i> sp.	99	JX173884.1
<i>A. colubrina</i>	AV5a	01-1080	-	RA	518***	<i>Rhizobium</i> sp.	99	KM926553.1
<i>A. colubrina</i>	AV1a	01-1082	-	RA	554***	<i>Paenibacillus</i> sp.	99	EF612325.1
<i>A. colubrina</i>	AV6a	01-1083	ND	RA	319**	<i>Sphingomonas</i> sp.	99	HE575948.1
<i>C. fairchildiana</i>	S3b2	01-1096	+	LAL	765**	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	99	KF114645.1
<i>C. fairchildiana</i>	S5b	01-1102	-	RA	691**	<i>Brevibacillus</i> sp.	99	EU571150.1
<i>C. fairchildiana</i>	S1c	01-1097	-	RAL	996***	<i>Variovorax</i> sp.	99	KJ184862.1
<i>C. fairchildiana</i>	S2a	01-1100	+	LAL	835***	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	KF933598.1
<i>E. speciosa</i>	M4a	01-1026	+	LAL	1251*	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	99	KF114645.1
<i>E. speciosa</i>	M2c2b	01-1027	-	RA	1276*	<i>Rhizobium</i> sp.	99	AF511494.1
<i>E. speciosa</i>	M2b	01-1037	-	RA	1319*	<i>Rhizobium</i> sp.	99	AF510630.1
<i>E. speciosa</i>	M2a	01-1034	+	RA	1153*	<i>Mesorhizobium</i> sp.	97	AB480767.1
<i>E. speciosa</i>	M1C	01-1024	-	RA	712**	<i>Rhizobium</i> sp.	100	KF933542.1
<i>E. speciosa</i>	M5c2	01-1028	-	RA	775***	<i>Burkholderia</i> sp.	100	EU827486.1
<i>E. speciosa</i>	M5c1	01-1029	+	RA	822***	<i>Rhizobium</i> sp.	99	KF933541.1
<i>I. marginata</i>	IF4a1a	01-1075	-	RA	1217*	<i>Burkholderia</i> sp.	91	JN172099.1
<i>I. marginata</i>	IF4a2	01-1071	-	RA	1289*	<i>Paenibacillus</i> sp.	93	JX266342.1
<i>I. marginata</i>	IF5a2a	01-1074	-	RAL	609**	<i>Polaromonas</i> sp.	99	AB730465.1
<i>M. caealpinifolia</i>	SC2a	01-1002	+	RA	1330*	<i>Burkholderia</i> sp.	100	FJ025136.1

<i>I. sessilis</i>	IM2a	01-1016	-	RA	825**	<i>Rhizobium</i> sp.	100	AB456618.1
<i>I. sessilis</i>	IM5a	01-1013	-	LAL	996***	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	99	FJ390937.1
<i>I. sessilis</i>	IM2c	01-1017	-	RA	950***	<i>Mesorhizobium</i> sp.	99	EU571131.1
<i>I. sessilis</i>	IM5b2	01-1014	-	RA	881***	<i>Rhizobium</i> sp.	99	KF933541.1
<i>I. sessilis</i>	IM5b1	01-1012	-	LAL	994*	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	99	KF114645.1
<i>I. sessilis</i>	IM6b1	01-1015	-	RA	772***	<i>Rhizobium</i> sp.	99	KF933537.1
<i>M.caesalpiniiifoli</i>	SC3a	01-1008	-	RA	614***	<i>Terriglobus</i> sp.	100	AY587228.1
<i>M.caesalpiniiifoli</i>	SC4a1	01-1006	-	LAL	917***	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	99	KF113099.2
<i>P. gonoacantha</i>	JR6b1	01-1064	-	RA	992***	<i>Variovorax</i> sp.	99	KJ184862.1
<i>P. gonoacantha</i>	JR6a	01-1068	-	RA	1281*	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	99	JX524430.1
<i>P. gonoacantha</i>	JR5b	01-1070	-	RA	802**	<i>Rhizobium</i> sp.	99	JX855240.1
<i>P. gonoacantha</i>	JR3a	01-1065	-	LAL	753***	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	99	KF113099.2
<i>P. reticulata</i>	V5B1	01-1045	+	LAL	1188***	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	99	FJ025101.1
<i>P. reticulata</i>	V4a	01-1049	-	LAL	1406*	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	96	AY238503.1
<i>P. reticulata</i>	V5b2	01-1050	-	RA	1351*	<i>Paenibacillus</i> sp.	93	JF768727.1
<i>P. reticulata</i>	V2a	01-1040	+	RA	1284*	<i>Mesorhizobium</i> sp.	98	AB636289.1
<i>P. reticulata</i>	V4d	01-1038	+	RA	1384*	<i>Paenibacillus</i> sp.	98	EF612325.1
<i>P. reticulata</i>	V5b3	01-1051	-	RA	1285*	<i>Bacillus</i> sp.	97	DQ275185.1
<i>P. reticulata</i>	V1A	01-1052	-	RA	850**	<i>Paenibacillus</i> sp.	99	EF612325.1
<i>P. reticulata</i>	V6c1	01-1039	+	RA	779***	<i>Rhizobium</i> sp.	99	KF933541.1

415 ⁽¹⁾ Códigos dos Isolados: Sigla alfabética correspondente ao hospedeiro de origem, o primeiro número se refere ao nódulo utilizado
416 para o isolamento e a letra a seguir se refere à estirpe.

417 ⁽²⁾ Sinal positivo (+): presença de nódulos nas plantas de siratro; sinal negativo (-): ausência de nódulos nas plantas de siratro;
418 ND: não determinado.

419 ⁽³⁾ Características culturais no meio 79: (RA) tempo de crescimento rápido com acidificação do meio, (RAL) tempo de crescimento
420 rápido alcalinizando o meio, (LAL) tempo de crescimento lento alcalinizando o meio; NPB: número de pares de bases; SI (%):
421 percentagem de similaridade no GenBank.

422 ⁽⁴⁾ *:contig; **:forward; ***:reverse

423

424 Foram identificadas estirpes de BFNNL pertencentes aos filos α e
425 β Proteobacteria corroborando assim com resultados anteriores onde
426 estirpes desses dois filos provenientes de nódulos de siratro e feijão caupi
427 foram isoladas (COSTA et al., 2013; JARAMILLO et al., 2013; LIMA et
428 al., 2009).

429 Dos nódulos da espécie *Acacia farnesiana* foram isoladas estirpes
430 do gênero *Rhizobium*, *Mucilaginobacter* e *Pseudomonas*. A simbiose
431 entre *A. farnesiana* e estirpes do gênero *Rhizobium* já foi relatada
432 (TRINICK, 1968) e há uma estirpe do gênero aprovada pelo MAPA como
433 inoculante para a cultura, a BR9002 (MAPA, 2011). Estirpes do gênero
434 *Rhizobium* também têm sido isoladas de diferentes espécies de *Acacia* em
435 estudos de diversidade (MOREIRA et al., 1992; MOREIRA et al., 1993;
436 ANYANGO et al., 1995).

437 Foram isoladas de *Anadenanthera colubrina* estirpes de
438 *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Dyella*, *Paenibacillus* e *Sphingomonas*. A
439 simbiose entre essa espécie vegetal com estirpes de *Rhizobium* e
440 *Burkholderia* foi relatada recentemente (BOURNAUD et al., 2013).
441 Estirpes do gênero *Rhizobium* também têm sido isoladas de nódulos de

442 *Anadenanthera peregrina* (MOREIRA et al.,1992; MOREIRA et al.,
443 1993; MICHIELS et al., 1998).

444 Foram isoladas da espécie *Clitoria fairchildiana* estirpes de
445 *Bradyrhizobium*, *Brevibacillus* e *Variovorax*. A simbiose entre *Clitoria*
446 *fairchildiana* e *Bradyrhizobium* também foi registrada em um estudo de
447 diversidade de estirpes isoladas de espécies arbóreas da Amazônia
448 (MOREIRA et al., 1998, MOREIRA, 2008). A capacidade dessa espécie
449 arbórea de se associar eficientemente com estirpes de *Bradyrhizobium*
450 resultou na aprovação das estirpes BR8003 e BR8005 para a produção de
451 inoculantes para a cultura (MAPA,2011).

452 Foram isoladas estirpes de *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*,
453 *Mesorhizobium* e *Burkholderia* dos nódulos de *Erythrina speciosa*. A
454 simbiose entre *E. speciosa* com *Rhizobium* e com *Bradyrhizobium* já foi
455 registrada anteriormente e há estirpes dos dois gêneros autorizadas para a
456 produção de inoculante para a espécie florestal (BR 4301,BR 3609, BR
457 8205, SEMIA 6393 e SEMIA 6395) (FRANCO e DE FARIA, 1997; DE
458 FARIA e MELO, 1998; DE FARIA e GUEDES; 1999; DE FARIA, 2000;
459 DE FARIA e FRANCO, 2002). A presença de *Bradyrhizobium* em nossos
460 resultados é confirmada por estudos anteriores onde estirpes do gênero

461 foram isoladas da mesma espécie arbórea (MOREIRA et al.,1992;
462 MOREIRA et al., 1993, MOREIRA et al., 1998; MOREIRA et al., 2008;
463 MICHIELS et al, 1998).

464 *Inga marginata* apresentou simbose com estirpes de *Burkholderia*,
465 *Paenibacillus* e *Polaromonas* e a espécie *Inga sessilis* com *Rhizobium*,
466 *Bradyrhizobium* e *Mesorrhizobium*. Há registros da simbiose dessas duas
467 espécies arbóreas com *Bradyrhizobium* e desse gênero com outras
468 espécies de *Inga* (MOREIRA et al.,1992; MOREIRA et al., 1993;
469 MOREIRA et al., 1998; MOREIRA, 2008).

470 Foram obtidas estirpes de *Bradyrhizobium*, *Burkholderia* e
471 *Terriglobus* do isolamento de nódulos de *Mimosa caesalpinifolia*. A
472 simbiose entre *Burkholderia* com essa espécie arbórea é fato
473 documentado na literatura (CHEN et al., 2008; BOURNET et al., 2013)
474 assim como a autorização de estirpes do gênero (BR 3405 e BR 3451)
475 para a produção de inoculantes comerciais ((FRANCO e DE FARIA,
476 1997; DE FARIA e MELO, 1998; DE FARIA e GUEDES; 1999; DE
477 FARIA, 2000; DE FARIA e FRANCO, 2002). A eficiência da simbiose
478 entre essa espécie arbórea e estirpes de *Bradyrhizobium* também resultou

479 na aprovação de duas estirpes do gênero (SEMIA 6382 e SEMIA 6410)
480 para a produção de inoculantes comerciais (MAPA, 2011).

481 Foram isoladas de *Piptadenia gonoacantha* estirpes de *Rhizobium*,
482 *Bradyrhizobium* e *Variovorax*. A simbiose entre *P. gonoacantha* e
483 estirpes de *Rhizobium* foi relatada recentemente e corrobora com os
484 nossos resultados (BOURNET et al., 2013) e a simbiose entre a espécie
485 vegetal e estirpes de *Bradyrhizobium* resultaram na aprovação de estirpes
486 do gênero para a produção de inoculante (SEMIA 6385 e SEMIA 6398)
487 (MAPA,2011) . Da espécie arbórea *Plathymenia reticulata* foram isoladas
488 estirpes de *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Paenibacillus* e
489 *Bacillus*. A presença de *Bradyrhizobium* em *P. reticulata* e em outras
490 espécies do gênero é fato relatado na literatura e concorda com nossos
491 resultados (MOREIRA et al.,1992; MOREIRA et al., 1993; MOREIRA,
492 2008; MICHIELS et al., 1998).

493 Esse é o primeiro relato da associação de *Erytrina speciosa* com
494 *Mesorhizobium* e com *Burkholderia*, *Inga marginata* com *Burkholderia*,
495 *Inga sessilis* com *Rhizobium* e com *Mesorhizobium*, *Platymenia*
496 *reticulata* com *Rhizobium* e com *Mesorhizobium*, *Platymenia reticulata*
497 com *Paenibacillus*.

498 De acordo como os nossos resultados, a espécie vegetal com a
499 maior diversidade genética de BFNNL foi *Erytrina speciosa* que se
500 associou com estirpes de *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* e
501 *Burkholderia*, seguida por *Plathymenia reticulata* estabeleceu simbiose
502 com estirpes dos gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Mesorhizobium*.
503 A alta diversidade de BFNNL encontrada nesse trabalho é de grande
504 importância no potencial de utilização dessas estirpes como inoculantes
505 das espécies arbóreas estudadas. A variabilidade de gêneros já
506 reconhecidos de BFNNL com *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*,
507 *Mesorhizobium* e *Burkholderia* encontrada em nosso trabalho pode ser
508 explicada pela variabilidade de espécies arbóreas estudadas (MOREIRA,
509 2008).

510 O maior número de estirpes do gênero *Rhizobium* foi isolado de
511 nódulos de *Inga sessilis* com três estirpes, *Piptadenia gonoacantha* com
512 duas estirpes e finalmente *Anadenanthera colubrina*, *Acacia farnesiana* e
513 *Plathymenia reticulata* com uma estirpe cada. Estirpes representantes
514 desse gênero têm sido identificados em diversos trabalhos com outras
515 espécies vegetais (MELONI et al., 2006, GUIMARÃES et al., 2012,

516 COSTA et al., 2013) incluindo espécies arbóreas (COSTA, 2014,
517 RASOLOMAMPIANINA et al., 2005).

518 A alta frequência do gênero *Bradyrhizobium* nesse trabalho
519 corrobora com resultados de estudos anteriores. O gênero tem sido
520 identificado em vários estudos de diversidade com feijão caupi (MELONI
521 et al., 2006, GUIMARÃES et al., 2012, COSTA et al., 2013),
522 leguminosas florestais na Amazônia (MOREIRA et al.,1992; MOREIRA
523 et al.,1993; MOREIRA et al., 1997) e espécies arbóreas utilizadas na
524 recuperação de áreas degradadas pela mineração (COSTA, 2014). Em
525 relação a identificação dessas estirpes a nível de espécie não foi possível
526 devido a região ao gene 16S rRNA desse gênero ser muito conservada,
527 exigindo assim novos testes genéticos para tal identificação (WILLEMS
528 et al., 2001; GUIMARÃES et al., 2012, COSTA et al., 2013)

529 *Plathymenia reticulata* e *Inga sessilis* foram as espécies arbóreas
530 que possuíram maior número de isolados de *Bradyrhizobium*. Seguidas
531 por *Erythrina speciosa*, *Clitoria fairchildiana*, *Piptadenia gonoacantha* e
532 *Mimosa caesalpiniiifolia*. Essa alta diversidade de espécies arbóreas com
533 as quais o gênero estabeleceu simbiose é fato já relatado na literatura e
534 demonstra que o gênero possui uma capacidade de se associar pouco

535 específica. Consequentemente, suas estirpes são muito frequentes dentre
536 as autorizadas para a fabricação de inoculantes para diversas espécies
537 florestais (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

538 O terceiro gênero mais frequente nesse trabalho foi o
539 *Burkholderia* que estabeleceu simbiose com *Mimosa caesalpiniiifolia*,
540 *Anadenanthera colubrina* e *Erythrina speciosa* sendo isolada apenas uma
541 estirpe do gênero de cada espécie vegetal.

542 Nossos resultados corroboram com diversos estudos de
543 diversidade onde estirpes do gênero *Burkholderia* tem sido encontradas
544 em feijão caupi e siratro (ANGUS et al., 2013; GUIMARÃES et al.,
545 2012; LIMA et al., 2009; MOULIN et al., 2001; DE OLIVEIRA
546 LONGATII et al., 2014), em simbiose efetiva com várias espécies de
547 *Mimosa* (BONTEMPS et al., 2010; CHEN et al., 2005; CHEN et al.,
548 2007) ou em associação com diferentes espécies de *Dalbergia*,
549 leguminosa arbórea utilizada em recuperação de áreas degradadas pela
550 mineração (COSTA, 2014; RASOLOMAMPIANINA et al., 2005).

551 O gênero *Mesorhizobium* foi isolado de *Plathymenia reticulata*,
552 *Erythrina speciosa* e *Inga sessilis*, porém com uma estirpe de cada espécie
553 arbórea. A presença de *Mesorhizobium* nesse trabalho confirma resultados

554 já registrados onde o gênero foi isolado de nódulos de diversas espécies
555 leguminosas (JARVIS et al., 1982; DE LAJUDIE et al., 1998).

556 A presença de estirpes de *Mesorhizobium* no atual trabalho
557 corrobora com os resultados encontrados por Barberi et al. (1998)
558 trabalhando com *Anadenanthera peregrina*, *Albizia lebbeck* e
559 *Platycyamus regnellii*, leguminosas florestais em viveiro, esses autores
560 também observaram a presença de espécies de *Rhizobium* e
561 *Sinorhizobium* na diversidade de BFNNL estudada. Rasolomampianina
562 et al. (2005) também encontraram estirpes de *Mesorhizobium* em estudos
563 sobre a diversidade em *Dalbergia*, os gêneros *Bradyrhizobium*,
564 *Rhizobium*, *Azorhizobium*, *Phyllobacterium*, *Burkholderia* e *Cupriavidus*
565 também foram identificados por esses autores.

566 O gênero *Paenibacillus* é frequentemente identificado como
567 endofítico de nódulos, porém, neste estudo a capacidade de nodulação
568 por estirpes desse gênero foi observada, possivelmente essas estirpes se
569 evoluíram adquirindo genes simbióticos por meio da transferência
570 horizontal (LI et al., 2008; SHIRAISHI et al., 2010). Nossos resultados
571 concordam com relatos da literatura onde *Paenibacillus* foi capaz de
572 nodular feijão caupi e siratro (COSTA et al., 2013; JARAMILLO et al.,

2013; LI et al., 2008; MARRA et al., 2012; DE OLIVEIRA-LONGATTI et al., 2015; SILVA et al., 2012).

A colonização dos nódulos de algumas das espécies arbóreas estudadas por estirpes dos gêneros *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Pseudomonas*, *Variovorax*, *Mucilaginibacter*, *Polaromonas*, *Dyella*, *Terriglobus* e *Sphingomonas* possivelmente se deu de maneira oportunista, fato comum no isolamento de microrganismos de nódulos (BAY et al., 2002; MURESU et al., 2008) e que foi comprovado pois essas estirpes não nodularam o siratro no teste de autenticação.

Conclusão

As estirpes isoladas das mudas de leguminosas arbóreas neste trabalho possuem alta diversidade fenotípica e genotípica e simbiótica.

O estudo contribuiu significativamente para o conhecimento da diversidade de BFNNL e para os primeiros passos para o desenvolvimento de novas pesquisas que têm por objetivo avaliar a potencialidade destes isolados para uso como inoculantes nas leguminosas de origem *Acacia farnesiana*, *Anadenanthera colubrina*, *Clitoria fairchildiana*, *Erythrina speciosa*, *Inga marginata*, *Inga sessilis*,

592 *Mimosa caesalpiniiifolia*, *Piptadenia gonoacantha* e *Plathymenia*
593 *reticulata*.

594

595

596

597

REFERÊNCIAS

- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped Blast and PSI-Blast: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 3389-3402, 1997.
- ANGUS, A. A.; LEE, A.; LUM, M. R. L.; HIRSCH, A. M. SHEHAYEB, M.; HESSABI, R.; FUJISHIGE, N.; YERRAPRAGADA, S.; KANO, S.; SONG, N.; YANG, P.; ESTRADA DE LOS SANTOS, P.; FARIA, S. M.; DAKORA, F. D.; WEINSTOCK, G.; HIRSH, A. M. Nodulation and effective nitrogen fixation of *Macroptilium atropurpureum* (siratro) by *Burkholderia tuberum*, a nodulating and plant growth promoting beta-proteobacterium, are influenced by environmental factors. **Plant soil**, 2013.
- ANYANGO, B., WILSON, K. J., BEYNON, J. L., e GILLER, K. E. (1995). Diversity of rhizobia nodulating *Phaseolus vulgaris* L. in two Kenyan soils with contrasting pHs. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(11), 4016-4021.
- BAI, Y.; D'AOUST, F.; SMITH, D.; DRISCOLL, B. Isolation of plant-growth-promoting *Bacillus* strains from soybean root nodules. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 48, p. 230-238, 2002.
- BARBERI, A., CARNEIRO, M. A., MOREIRA, F. M., e SIQUEIRA, J. O. (1998). Nodulação em leguminosas florestais em viveiros no sul de Minas Gerais. *Cerne*, 4(1), 145-153.
- BONTEMPS, C.; ELLIOTT, G. N.; SIMON, M. F.; DOS REIS JÚNIOR, F. B.; GROSS, E.; LAWTON, R. C.; NETO, N. E.; DE FÁTIMA, M. L.; DEFARIA, S. M.; SPRENT, J. I.; JAMES, E. K.; YOUNG, J. P. *Burkholderia* species are ancient symbionts of legumes. **Molecular Ecology**, v. 19, p. 44-52, 2010.
- BROMFIELD, E. S. P.; BARRAN, L. R. Promiscuous nodulation of *Phaseolus vulgaris*, *Macroptilium atropurpureum* e *Leucaena leucocephala* by indigenous *Rhizobium meliloti*. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v. 36, p. 369-372, 1990.
- BROWN, S. e LUGO, A. E. Rehabilitation of tropical lands: A Key sustaining development. *Restoration Ecology*, v. 2, p. 97-111, 1994.

BOURNAUD, C., DE FARIA, S. M., DOS SANTOS, J. M. F., TISSEYRE, P., SILVA, M., CHAINTREUIL, C., e MOULIN, L. (2013). Burkholderia species are the most common and preferred nodulating symbionts of the piptadenia group (tribe mimoseae). *PloS one*, 8(5), e63478.

CAMPELLO, E.F.C. Sucessão vegetal na recuperação de áreas degradadas. In: DIAS, L.E.; MELLO, J.W. (Eds.). Recuperação de áreas degradadas. Viçosa: SOBRAD/DPS-UFV, 1998. p. 183-196.

CARVALHO, F. **Abundância de espécies de plantas e diversidade de simbiontes radiculares em campos rupestres da serra do cipó, MG.** 2010. 224p. Tese (Doutorado em Ecologia, Ecologia, Conservação e Manejo da Vida Silvestre) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

CHEN, W. M., DE FARIA, S. M., CHOU, J. H., JAMES, E. K., ELLIOTT, G. N., SPRENT, J. I., ... e VANDAMME, P. (2008). Burkholderia sabiae sp. nov., isolated from root nodules of Mimosa caesalpinifolia. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(9), 2174-2179.

CHEN, W. M.; DE FARIA, S. M.; JAMES, E. K.; ELLIOTT, G. N.; LIN, K. Y.; CHOU, J. H.; SHEU, S. Y.; CNOCKAERT, M.; SPRENT, J. I.; VANDAMME, P. *Burkholderia nodosa* sp. nov., isolated from root nodules of the woody Brazilian legumes *Mimosa bimucronata* and *Mimosa scabrella*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Spencers Wood, v. 57, n. 5, p. 1055-1059, 2007.

CHEN, W. M.; DE FARIA, S. M.; STRALIOTTO, R.; PITARD, R. M.; SIMÕES-ARAÚJO, J. L.; CHOU, Y. J.; CHOU, J. H.; BARRIOS, E.; PRESCOTT, A. R.; ELLIOTT, G. N. SPRENT, J. I.; YOUNG, J. P.; JAMES, E. K. Proof that Burkholderia forms effective symbioses with legumes: a study of novel Mimosa-nodulating strains from South America. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 7461-7471, 2005.

COSTA, E. M.; NÓBREGA, R. S. A.; CARVALHO, F.; TROCHMANN, A.; FERREIRA, L. V. M.; MOREIRA, F. M. S. Promoção do crescimento vegetal e diversidade genética de bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** (1977. Impressa), v. 48, p. 1275-1284, 2013.

COSTA, J. S. **Diversidade fenotípica, genética e simbiótica de bactérias isoladas de nódulos de diferentes leguminosas florestais em viveiro.** 2014. 82 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

DE LAJUDIE, P., WILLEMS, A., NICK, G., MOHAMED, S. H., TORCK, U., COOPMAN, R., e GILLIS, M. (1999). Agrobacterium bv. 1 strains isolated from nodules of tropical legumes. *Systematic and applied microbiology*, 22(1), 119-132.

DE LAJUDIE, P.; LAURENT-FUTELE, E.; WILLEMS, A.; TORCK, U.; COOPMAN, R.; COLLINS, M. D.; KERSTERS, K.; DREYFUS, B.; GILLIS, M. *Allorhizobium undicola* sp. nov., nitrogen-fixing bacteria that efficiently nodulate *Neptunia natans* in Senegal. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, v. 48, p. 1277-1290, 1998.

DE OLIVEIRA-LONGATTI, S. M., DE SOUSA, P. M., MARRA, L. M., FERREIRA, P. A. A., e DE SOUZA MOREIRA, F. M. (2015). Burkholderia fungorum promotes common bean growth in a dystrophic oxisol. *Annals of Microbiology*, 1-8.

DE OLIVEIRA-LONGATTI, S. M.; MARRA, L. M.; SOARES, B. L.; BOMFETI, C. A.; SILVA, K.; FERREIRA, P. A. A.; MOREIRA, F. M. S. 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**, v. 30, p. 1239-1250, 2014.

DE FARIA, S. M. Obtenção de estirpes de rizóbio eficientes na fixação de nitrogênio para espécies florestais. Seropédica: Embrapa, 2000 (Recomendação técnica).

DE FARIA, S. M.; GUEDES, R. E. **Obtenção de estirpes de rizóbio eficientes na fixação biológica de nitrogênio para espécies florestais**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia. Recomendação Técnica nº 5, dez. 1999, p 1- 4.

DE FARIA S. M.; MELLO, R. B. **Obtenção de estirpes de rizóbio eficientes na fixação biológica de nitrogênio para espécies florestais**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia. Recomendação Técnica nº 3, dez. 1998, p. 1-4

FRANCO, A. A., e DE FARIA, S. M. (1997). The contribution of N₂-fixing tree legumes to land reclamation and sustainability in the tropics. *Soil Biology and Biochemistry*, 29(5), 897-903.

FERREIRA, P. A. A.; LOPES, G.; BOMFETI, C. A.; LONGATTI, S. M. O.; SOARES, C. R. F. S.; GUILHERME, L. R. G.; MOREIRA, F. M. S. Leguminous plants nodulated by selected strains of *Cupriavidus necator* grow in heavy metal contaminated soils amended with calcium silicate. **World Journal of Microbiology e Biotechnology**, v. 29, p. 2055-2066, 2013.

FLORENTINO, L. A.; GUIMARÃES, A. P.; RUFINI, M.; SILVA, K.; MOREIRA, F. M. S. *Sesbania virgata* stimulates the occurrence of its microsymbiont in soils but does not inhibit microsymbionts of other species. **Scientia Agrícola** (USP. Impresso), v. 66, p. 667-676, 2009.

FRANCO, A. A., RESENDE, A. D., e CAMPELLO, E. F. C. (2003). Importância das leguminosas arbóreas na recuperação de áreas degradadas e na sustentabilidade de sistemas agroflorestais. *Sistemas Agroflorestais e Desenvolvimento Sustentável, Mato Grosso do Sul*, 1-24.

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

GONÇALVES, M.; MOREIRA, F. M. S. Specificity of the Legume *Sesbania virgata* (Caz.) Pers. and its nodule isolates *Azorhizobium johannae* with other Legume Host and Rhizobia. *I Symbiosis, Rehovot*, v. 36, n. 1, p. 57-68, 2004.

GUIMARÃES, A. A.; JARAMILLO, P. M. D.; NÓBREGA, R. S. A.; FLORENTINO, L. A.; DA SILVA, K. B.; MOREIRA, F. M. S. Genetic and Symbiotic Diversity of Nitrogen-Fixing Bacteria Isolated from Agricultural Soils in the Western Amazon by Using Cowpea as the Trap Plant. **Applied and Environmental Microbiology** (Print), v. 78, p. 6726-6733, 2012.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. **The water culture method for growing plants without soil**. Berkeley: Agricultural Experiment Station, 1950. 32p. (Circular, 347; Solução, 2).

JARAMILLO, P. M. D.; GUIMARÃES, A. A.; FLORENTINO, L. A.; DA SILVA, K. B.; NÓBREGA, R. S. A.; MOREIRA, F. M. S. Symbiotic nitrogen-fixing bacterial populations trapped from soils under agroforestry systems. **Scientia Agrícola** (USP. Impresso), v. 70, p. 397-404, 2013.

JARVIS, B. D. W.; BPANKHURST, C. E.; PATEL, J. J. *Rhizobium loti*, a new species of legume root nodule bacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Ames, v. 32, p. 378-380, 1982.

JESUS, E. C.; MOREIRA, F. M. S.; FLORENTINO, L. A.; RODRIGUES, M. I. D.; OLIVEIRA, M. S. Diversidade de bactérias que nodulam siratro em três sistemas de uso da terra da Amazônia Ocidental. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** (1977. Impressa), Brasília, v. 40, n. 8, p. 769-776, 2005.

JORDAN, D. C. Rhizobiaceae Conn. 1938. In: KRIEG, N. R.; HOLT, J. D. B. Manual of systematic bacteriology. London: Willians and Wilkins, 1984. p. 234-244.

LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. In: STACKEBRANDT, E; GOODFELLOW, M. (Ed.). **Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics**. New York: Wiley, 1991. p. 115-175.

LI, J. H.; WANG, E. T.; CHENA, W. F.; CHENA, W. X. Genetic diversity and potential for promotion of plant growth detected in nodule endophytic bacteria of soybean grown in Heilongjiang province of China. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, p. 238-246, 2008.

LIMA, A. S.; NÓBREGA, R. S. A.; BARBERI, A.; SILVA, K.; FERREIRA, D. F.; MOREIRA, F. M. S. Nitrogen-fixing bacteria communities occurring in soils under different uses in the Western Amazon Region as indicated by nodulation of siratro (*Macropitium atropurpureum*). **Plant and Soil**, v. 319, p. 127-145, 2009.

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

MARRA, L. M.; SOARES, C. R. F. S.; OLIVEIRA, S. M.; FERREIRA, P. A. A.; SOARES, B. L.; CARVALHO, R. F.; LIMA, J. M.; MOREIRA, F. M. S. Biological nitrogen fixation and phosphate solubilization by bacteria isolated from tropical soils. **Plant and Soil**, v. 357, p. 289-307, 2012.

MATSUDA, A.; MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Tolerância de rizóbios de diferentes procedências ao zinco, cobre e cádmio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n.3, p. 343-355, 2002.

MELLONI, R.; MOREIRA, F. M. S.; NÓBREGA, R. S. A.; SIQUEIRA, J. O. Eficiência e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas que nodulam caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] e feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em solos de mineração de bauxita em reabilitação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 30, n. 2, p. 235-246, 2006.

MICHIELS, J., DOMBRECHT, B., VERMEIREN, N., XI, C., LUYTEN, E., e VANDERLEYDEN, J. (1998). *Phaseolus vulgaris* is a non-selective host for nodulation. *FEMS Microbiology Ecology*, 26(3), 193-205.

MOREIRA, F. M. S. Bactérias Fixadoras de Nitrogênio que Nodulam Leguminosae. In: MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O.; BRUSSAARD, L. **Biodiversidade do solo em ecossistemas brasileiros**. Ed. Lavras: UFLA, p. 621-666, 2008.

MOREIRA, F. M. S. Nodulação e crescimento de 49 leguminosas arbóreas nativas da Amazônia em viveiro. **Revista Brasileira de Ciencia do Solo**, Viçosa, v. 21, n. 4, p. 581-590, 1997.

MOREIRA, F. M. S. et al. *Azorhizobium doebereinerare* sp Nov. microsymbiont of *Sesbania virgata* (Caz.). Pers. Systematic and Applied Microbiology, Stuttgart, v. 29, p. 197-206, 2006.

MOREIRA, F. M. S.; GILLIS, M.; POT, B.; KERSTERS, K.; FRANCO, A. A. Characterization of rhizobia isolated from different divergence groups of tropical leguminosae by comparative polyacrylamide gel electrophoresis of their total proteins. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 16, p. 135-146, 1993.

MOREIRA, F. M. S.; HAUKKA, K.; YOUNG, J. P. W. Biodiversity of rhizobia isolated from a wide range of forest legumes in Brazil. **Molecular Ecology**, Inglaterra, v. 7, p. 889-895, 1998.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2 ed. Lavras: UFLA, 2006. 729 p.

MOREIRA, F.M.S.; SILVA, M.F.; FARIA, S.M. Occurrence of nodulation in legume species in the Amazon region. *New phytologist*, Cambridge, v.121, p. 563-570, 1992.

MOULIN, L.; MUNIVE, A.; DREYFUS, B.; BOLVIN-MASSON, C. Nodulation of legumes by members of the beta sub class of Proteobacteria. **Nature**, London, v. 411, n. 21, p. 948-950, 2001.

MURESU, R.; POLONE, E.; SULAS, L.; BALDAN, B.; TONDELLO, A.; DELOGU, G.; CAPPUCCINELLI, P.; ALBERGHINI, S.; BENHIZIA, Y.; BENHIZIA, H.; BENGUEDOGUAR, A.; MORI, B.; CALAMASSI, R.; DAZZO, F.; SQUARTINI, A. Coexistence of predominantly nonculturable rhizobia with diverse, endophytic bacterial taxa within nodules of wild legumes. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 63, p. 383-400, 2008.

NIEMANN, S.; PUEHLER, A.; TICHY, H. V.; SIMON, R.; SELBITSHKA, W. 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*, v. 82, p. 477-484, 1997.

RASOLOMAMPIANINA, R.; BAILLY, X.; FETIARISON, R.; RABEVOHITRA, R.; B'ENA, G.; RAMAROSSEN, L.; RAHERIMANDIMBY, M.; MOULIN, L.; DE LAJUDIE, P.; DREYFUS, B.; AVARRE, J. C. Nitrogen-fixing nodules from rose wood legume trees (*Dalbergia* spp.) endemic to Madagascar host seven different genera belonging to α and β -Proteobacteria. *Molecular Ecology*, v. 14, p. 4135-4146, 2005.

SHIRAISHI, A.; MATSUSHITA, N.; HOUGETSU, T. Nodulation in black locust by the Gammaproteobacteria *Pseudomonas* sp. and the Betaproteobacteria *Burkholderia* sp. *Systematic and Applied Microbiology*, v.33, p.269-274, 2010. DOI: 10.1016/j. syapm.2010.04.005.

SILVA, K.; CASSETARI, A. S.; LIMA, A. S.; DE BRANDT, E.; PINNOCK, E.; VANDAMME, P.; MOREIRA, F. M. S. Diazotrophic Burkholderia species isolated from the Amazon region exhibit phenotypical, functional and genetic diversity. *Systematic and Applied Microbiology* (Print), v. 35, p. 253-262, 2012.

SILVA, K. Identification and functional characterization of diazotrophic β -proteobacteria from Brazilian soils. 2009. 124 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

TRANNIN, I. C. B.; MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O.; LIMA, A. Tolerância de estirpes e isolados de Bradyrhizobium e Azorhizobium a zinco, cádmio e cobre in vitro. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Viçosa, v. 25, n. 25, p. 305-316, abr./jun. 2001.

TRINICK, M. J. (1968). Nodulation of tropical legumes I. Specificity in the rhizobium symbiosis of Leucaena leucocephala. *Experimental Agriculture*, 4(03), 243-253.

TRINICK, M. J.; MILLER, C.; HADOBAS, P. A. Formation and structure of root nodules induced on *Macroptilium atropurpureum* inoculated with various species of *Rhizobium*. Canadian Journal of Botany, Ottawa, v. 69, n. 7, p. 1520-1532, July 1991.

WILLEMS A, COOPMAN R, GILLIS M. 2001. Phylogenetic and DNA-DNA hybridization analyses of *Bradyrhizobium* species. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51:111–117.

ANEXO

TABELA 1A: Caracterização cultural das 94 estirpes isoladas das mudas de espécies de leguminosas arbóreas do viveiro do Centro de Tecnologia de Ferrosos - CTF Miguelão da Vale S/A, localizado na Fazenda Rio do Peixe S/N, na Zona Rural do município de Nova Lima/MG. Significado das letras e palavras no final da tabela: Tempo de aparecimento da colônia, Ph, Cor, CM – Consistência da massa da colônia, F- Forma, El. – Elevação, B – Borda, Sup. – Superfície, EPS – Produção de exopolissacarídeo, D.O – Detalhes ópticos, A.I – Absorção de indicador.

Isolado	Tempo	pH	F	El.	B	Sup.	EPS	CM	D.O	Cor	AI
01-1002	R	Ac	C	L	I	L	A	G	B	C	S
01-1003	R	Ac	C	P	I	L	M	B	B	C	S
01-1004	R	Ac	C	L	I	L	A	G	B	Am	S
01-1005	R	Ac	C	L	I	L	M	G	B	C	S
01-1006	L	Al	C	D	I	L	A	G	B	C	S
01-1007	R	Ac	C	P	I	L	P	B	B	Am	N
01-1008	R	Ac	C	L	O	L	M	B	B	C	S
01-1009	R	Al	C	P	I	L	M	G	B	Am	N
01-1010	R	Ac	C	P	I	L	P	B	B	C	N
01-1011	R	Ac	C	P	I	L	M	B	B	Am	N
01-1012	L	Al	C	P	I	R	P	B	O	Am	N
01-1013	L	Al	C	L	I	L	M	B	B	Am	N
01-1014	R	Ac	C	L	I	L	M	G	B	Am	S
01-1015	R	Ac	C	P	I	L	M	B	O	Am	N
01-1016	R	Ac	C	C	I	L	A	G	B	Am	N
01-1017	R	Ac	P	L	O	L	P	S	B	Am	S
01-1018	R	Ac	P	L	I	L	E	S	B	Am	N
01-1019	I	N	P	P	I	L	P	S	O	C	N
01-1020	R	Ac	I	P	D	L	M	B	B	Am	S
01-1022	R	Ac	C	L	I	L	A	V	B	C	N
01-1023	R	Ac	P	P	O	L	E	S	O	L	S
01-1024	R	Ac	C	C	I	L	A	G	B	Am	S
01-1025	R	Al	I	P	O	L	M	B	B	C	S
01-1026	L	Al	C	C	I	L	M	G	O	C	S
01-1027	R	Ac	P	L	I	L	M	B	B	C	N
01-1028	R	Ac	C	P	I	L	M	G	B	Am	S
01-1029	R	Ac	C	P	I	L	M	G	B	C	N
01-1030	R	Ac	C	P	I	L	P	B	B	Am	N
01-1031	L	N	P	L	I	L	M	G	B	B	N
01-1032	I	N	C	L	I	L	M	G	B	B	S
01-1033	I	N	C	L	I	L	M	G	B	B	N
01-1034	R	Ac	C	C	I	L	A	G	B	C	S
01-1035	I	Al	P	L	I	L	M	G	B	B	N
01-1036	R	N	P	P	I	L	P	B	B	Am	N
01-1037	R	A	P	L	O	L	M	B	B	C	N
01-1038	R	Ac	P	P	I	L	E	S	B	Am	N
01-1039	R	Ac	P	P	I	L	E	S	T	Am	N
01-1040	R	Ac	C	L	I	L	P	G	B	C	S
01-1041	R	Ac	P	P	I	L	E	S	B	Am	N
01-1042	R	Ac	I	P	D	L	P	B	O	B	S
01-1043	L	N	C	L	I	L	P	B	B	C	N
01-1044	I	N	P	P	I	L	P	B	B	B	N
01-1045	L	Al	C	L	I	L	P	B	T	Am	S
01-1046	I	Al	I	P	I	L	M	G	B	C	S
01-1047	I	N	C	L	I	L	P	B	B	C	S
01-1048	I	N	C	C	O	L	M	G	B	Am	S
01-1049	L	Al	P	P	I	L	E	S	O	Am	N
01-1050	R	Ac	P	P	O	L	E	S	O	Am	N

01-1051	R	Ac	C	P	I	L	E	S	B	Am	S
01-1052	R	Ac	C	P	O	L	P	B	B	C	N
01-1053	R	N	P	P	I	L	P	B	B	Am	N
01-1054	R	Al	C	P	O	R	P	S	O	Am	S
01-1055	R	N	P	P	O	L	P	B	B	Am	S
01-1056	R	Ac	C	P	I	L	P	B	O	C	N
01-1057	R	Ac	C	L	O	L	P	B	B	C	S
01-1058	R	Ac	C	L	O	L	P	B	B	C	S
01-1059	R	Ac	C	L	O	L	P	B	B	C	S
01-1060	R	Al	C	C	I	L	A	G	B	C	S
01-1061	R	Ac	C	L	O	L	P	B	B	C	S
01-1062	R	Ac	C	P	O	L	P	B	B	C	S
01-1063	R	Ac	C	P	O	L	P	B	B	C	S
01-1064	R	Ac	C	C	I	L	M	G	B	Am	S
01-1065	L	Al	C	P	I	L	P	B	B	Am	S
01-1066	R	Ac	C	L	I	L	M	G	B	C	S
01-1067	R	Ac	C	L	I	L	M	G	B	C	S
01-1068	R	Ac	C	L	I	L	M	B	B	Am	S
01-1069	R	Ac	C	L	O	L	M	B	B	Am	S
01-1070	R	Ac	C	L	O	L	M	B	B	Am	S
01-1071	R	Ac	C	U	O	L	M	G	B	Am	S
01-1072	R	A	I	P	L	R	M	B	B	Am	N
01-1073	R	A	C	L	I	L	M	G	B	Am	N
01-1074	R	Al	P	L	I	L	E	B	B	I	N
01-1075	R	Ac	I	P	O	R	E	S	T	Am	N
01-1076	R	Ac	P	P	D	L	P	B	B	Am	N
01-1077	R	Al	C	P	I	L	P	B	B	Am	N
01-1078	I	N	P	P	I	L	M	G	B	B	S
01-1079	R	Al	C	P	I	L	P	G	B	C	N
01-1080	R	Ac	C	P	I	L	M	B	B	Am	S
01-1081	R	Ac	C	L	I	L	M	B	B	C	S
01-1082	R	Ac	C	L	I	L	M	B	B	C	N
01-1084	R	Ac	C	L	I	L	M	B	B	C	N
01-1085	R	N	C	P	I	L	P	B	B	C	S
01-1086	R	Al	C	L	I	L	M	B	B	C	S
01-1094	I	N	I	L	I	L	M	A	B	B	S
01-1095	I	N	C	L	O	L	M	B	B	B	S
01-1096	L	Al	I	L	O	L	M	G	B	B	S
01-1097	R	Al	C	L	O	L	M	G	B	C	S
01-1098	R	Al	C	L	O	L	M	A	B	B	N
01-1099	R	Al	C	L	O	L	B	B	B	C	S
01-1100	L	Al	C	L	I	L	G	G	B	Am	S
01-1101	R	N	C	L	I	L	G	G	B	B	S
01-1102	R	Ac	C	P	I	L	S	S	B	Am	S
01-1103	I	Al	C	L	I	L	M	G	B	C	N

As letras utilizadas na identificação dos isolados possuem os seguintes significados: Tempo: dias para o aparecimento de colônias isoladas R: rápido (1 a 3), I: intermediário (4 a 5), L: lento (6 a 10), pH: modificação do pH meio de cultivo: Ac: acidificação, N: neutralização, Al: alcalinização, Cor: Cr: creme, B: branca, Am: amarela, CM: Consistência de massa da colônia: A: aquosa, B: butírica, G: gomosa, S: seca, V: viscosa, Forma: C: circular, I: irregular, P: pontiforme, elevação (plana, lente, convexa, drop-like, umbilicada ou umbanada), Elevação das colônias: P: plana, L: lente, C: convexa, D: drop-like, Borda: I: inteira, O: ondulada, F: filamentosa, L: lobada, Superfície: L: lisa, R: rugosa, EPS: produção de exopolissacarídeos: E: escassa, P: pouca, M: moderada, A: abundante, D.O: detalhes ópticos: T: transparente, O: opaca, A.I: absorção de indicador: S: sim, N: não.