



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO

INSTITUTO DE FLORESTAS

**CARACTERIZAÇÃO E SELEÇÃO DE RIZÓBIOS NODULADORES DE
LEGUMINOSAS FLORESTAIS PARA RECUPERAÇÃO DE ÁREAS
CONTAMINADAS POR PETRÓLEO**

TATIANA CORRÊA FERREIRA

SEROPÉDICA, RJ

2007

TATIANA CORRÊA FERREIRA

**CARACTERIZAÇÃO E SELEÇÃO DE RIZÓBIOS NODULADORES DE
LEGUMINOSAS FLORESTAIS PARA RECUPERAÇÃO DE ÁREAS
CONTAMINADAS POR PETRÓLEO**

“Monografia apresentada ao Curso de Engenharia Florestal, como requisito parcial para a obtenção do Título de Engenheiro Florestal, Instituto de Florestas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.”

Sob a orientação da Dra. Rosângela Stralotto

Seropédica, RJ

2007

FICHA CATALOGRÁFICA

Ferreira, Tatiana Corrêa.

Caracterização e Seleção de Rizóbios Noduladores de Leguminosas Florestais para Recuperação de Áreas Contaminadas por Petróleo. / Tatiana Corrêa Ferreira. Rio de Janeiro: UFRRJ/ IF, 2007.

xiii, 111 f.: il; 28 cm.

Orientadora: Rosângela Stralotto

Monografia (Bacharelado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, UFRRJ – Instituto de Florestas - 2007.

Referências Bibliográficas: f.:22-28.

1. Microbiologia e ecologia do solo. 2.Diversidade fenotípica de rizóbios. 3.Eficiência de isolados de rizóbio. 4. Recuperação de áreas contaminadas por resíduos oleosos. I. Stralotto, Rosângela. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. III. Diversidade Fenotípica e Seleção de Rizóbios para Nodulação de três Leguminosas Florestais com potencial de uso na Recuperação de Áreas Contaminadas por Resíduos Oleosos.

**CARACTERIZAÇÃO E SELEÇÃO DE RIZÓBIOS NODULADORES DE
LEGUMINOSAS FLORESTAIS PARA RECUPERAÇÃO DE ÁREAS
CONTAMINADAS POR PETRÓLEO.
TATIANA CORRÊA FERREIRA**

Monografia apresentada ao Curso de Engenharia Florestal, como requisito parcial para a obtenção do Título de Engenheiro Florestal, Instituto de Florestas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Aprovada em : 03/08/2007

Banca examinadora:

Orientadora: Dra. Rosângela Straliozzo - Embrapa Agrobiologia

Titular: Ph.D. Silvia Regina Goi – Prof. Adjunta UFRRJ

Titular: Dr. Paulo Sérgio dos Santos Leles – Prof. Adjunto UFRRJ

DEDICO

Aos meus pais: Francisco da Silva Ferreira e Suely Corrêa Barros Ferreira.

Aos meus irmãos: Leandro Corrêa Ferreira e Marcos Vinícius Corrêa Ferreira.

À minha vovó amada Maria do Carmo Benetida Ferreira (*in memoriam*).

Aos meus amigos da vida e do coração.

E ao meu amigo companheiro e namorado Rodrigo Stutz Salgueiro.

AGRADECIMENTOS

A Deus por estar sempre presente, me conduzindo e iluminando meu caminho;

Aos meus pais: Francisco da Silva Ferreira e Suely Corrêa Barros Ferreira e meus irmãos: Leandro Corrêa Ferreira e Marcos Vinícius Corrêa Ferreira que sempre apoiaram meus estudos;

A toda minha família pela torcida e apoio constante;

Ao meu namorado Rodrigo Stutz Salgueiro e família, que mesmo morando longe sempre estiveram ao meu lado me apoiando com muito carinho nos momentos mais difíceis;

A minha amiga e irmã de consideração Cláudia Lopes Ribeiro que segurou na minha mão em todos os momentos, tanto bons quanto ruins;

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro pelos recursos oferecidos para minha formação acadêmica;

Aos professores da UFRRJ, pelo conhecimento e lições de vida que me foram passados;

À Embrapa Agrobiologia pela oportunidade de iniciação científica;

À FAPED e à PETROBRÁS pela bolsa de iniciação científica;

À pesquisadora Doutora Rosângela Straliozzo pela atenção, carinho, amizade e pela orientação durante meu estágio;

À pesquisadora Rosa M. Pitard pela orientação, dedicação e preocupação com a minha iniciação científica;

À Deise de Salles Silva pela paciência, amizade, companheirismo, e conhecimentos transmitidos na caracterização de rizóbios;

Aos funcionários da casa de vegetação da Embrapa Agrobiologia pela força e orientação na montagem e condução do experimento em Vasos de Leonard, em especial ao Cláudio Pereira Ferreira pela paciência e o bom humor contagiante mesmo nas situações mais difíceis;

Aos funcionários do laboratório de Meio de Cultura, em especial à Luís Carlos Chaves e pela atenção, paciência e amizade;

Ao Itamar Garcia Ignácio do Laboratório de Micorrizas pelo auxílio e amizade;

Aos funcionários da Biblioteca da Embrapa Agrobiologia pelo apoio nas pesquisas e Revisão de Literatura;

À Janaína Ribeiro pelo apoio e pelas várias horas dedicadas à estatística do experimento;
A Ricardo Aparecido Bento por ter sido um grande amigo e conselheiro tanto nas pesquisas quanto nas disciplinas da universidade, além de muito paciente nas horas de sufoco;
A todos os bolsistas da Embrapa Agrobiologia pelos conselhos e idéias que muito me ajudaram e pelas conversas saudáveis na hora do café que sempre nos descontraíam;
Aos meus companheiros de turma e de coração pelas madrugadas na sala de estudos que apesar de tensas foram inesquecíveis e divertidas: Elisa Teodoro Sant' Anna, Jolmerson de Medeiros Silva, Ricardo Aparecido Bento, Rafael Dias Mayer e Monise Aguillar Faria Magalhães;
A todos os meus amigos da UFRRJ, pelos momentos de: alegria, desabafos, compreensão, companheirismo, torcida, pelos risos e pela experiência de vida que por nós foi compartilhada, vivendo como se fossemos a família uns dos outros, nesses quatro anos de convivência.
A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

"Na natureza nada se cria, nada se perde, tudo se transforma".

Antoine Laurent Lavoisier

RESUMO
CARACTERIZAÇÃO E SELEÇÃO DE RIZÓBIOS PARA NODULAÇÃO DE
TRÊS LEGUMINOSAS FLORESTAIS COM POTENCIAL DE USO NA
BIORREMEDIAÇÃO DE ÁREAS CONTAMINADAS POR RESÍDUOS OLEOSOS.

O uso de microrganismos com a finalidade de melhorar a disponibilidade de nutrientes às plantas, através da relação simbiótica entre bactérias e plantas capazes de promover a Fixação Biológica de Nitrogênio, é uma alternativa ao cultivo com adubos químicos visando a preservação dos recursos naturais. Um número considerável de leguminosas conhecidas é capaz de formar nódulos com bactérias fixadoras de nitrogênio e têm potencial para uso em sistemas agroflorestais, para reabilitação de áreas degradadas e para a manutenção da sustentabilidade dos sistemas agrícolas. O objetivo do presente trabalho foi promover a caracterização fenotípica e simbiótica de 28 isolados de rizóbio de área contaminada por petróleo. Os estudos foram desenvolvidos em casa de vegetação e no Laboratório de Coleção de Culturas da Embrapa Agrobiologia. A diversidade fenotípica dos isolados foi avaliada por meio das características culturais destes em meio de cultivo levedura-manitol-ágar (YMA), conforme Vincent (1970) e em meio mínimo conforme Straliozzo (1999). Os resultados indicam que a maioria dos isolados agrupam-se com estirpes padrão dos gêneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium* e *Burkholderia*, ao nível de similaridade de 69,5%. Ao nível de 70% de similaridade um segundo agrupamento com 4 isolados foi obtido com estirpes de *Cupriavidus taiwanensis* e *Azorhizobium doebereineriae* sendo que o isolado L79 apresenta similaridade de 95% com esta espécie. A eficiência na capacidade de fixação biológica de nitrogênio de 13 isolados selecionados, cuja eficiência simbiótica em feijoeiro e siratro foi comprovada anteriormente em experimentos em condições esterilizadas, foi testada através da inoculação em 3 espécies de leguminosas arbóreas, visando avaliar a possibilidade de recomendação destes isolados para fitorremediação de áreas degradadas por resíduos oleosos. Este teste de eficiência, o qual acrescenta dados em relação ao círculo de hospedeiras dos isolados foi realizado em casa de vegetação entre julho e outubro de 2006. O experimento foi conduzido em vasos de Leonard, conforme Vincent (1970), no delineamento em blocos casualizados, com 3 repetições, em esquema fatorial 3 x 13 mais 9 testemunhas. Foi realizada a análise de variância e as médias dos tratamentos, no programa SISVAR, analisadas as variáveis: massa seca da parte aérea e massa seca dos nódulos, para o cálculo da eficácia e eficiência dos isolados. As três espécies arbóreas testadas diferiram estatisticamente em média com relação à MSPA e MSN. Os dados do teste de eficiência e eficácia mostraram que houve diferenças entre o desempenho dos isolados nas espécies arbóreas testadas, revelando que seis isolados possuem potencial para uso em simbiose com duas das espécies testadas (*Mimosa caesalpiniaeifolia* Benth e *Albizia saman* (Jacq.) Merr.), apresentando eficiência superior aos isolados atualmente recomendados pela pesquisa.

Palavras-chave: fixação biológica de nitrogênio, leguminosas arbóreas, rizóbio.

ABSTRACT

CHARACTERIZATION AND SELECTION OF RIZHOBIA FOR BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION WITH LEGUMINOUS TREES WITH FITORREMEDICATION POTENTIAL.

Nitrogen-fixing *Rhizobium* bacteria in nodules on the roots of leguminous forest trees are an important means of maintaining such plants in nutrient-poor tropical soils. These bacteria are used in agroflorestry systems to recover the fertility and sustainability of degraded soils. This study aimed to characterize 28 isolates of rhizobia isolated from petroleum residues contaminated soils according to its phenotypic diversity and nitrogen fixation potential. The isolates were phenotypically characterized in yeast-mannitol minimal medium supplemented with 8 different carbon sources and the data was analysed through numerical cluster analysis, comparing with strains belonging to the bacterial species which nodulate legume trees. At a similarity of 69,5% most isolates formed great groups with *Rhizobium*, *Sinorhizobium* and *Burkholderia*. A second grouping with 4 isolates was formed at a similarity of 70% with the bacteria *Cupriavidus taiwanensis* and *Azorhizobium doebereinae*. The isolate L79 presented similarity of 95% with the bacteria *Azorhizobium doebereinae*. The efficiency of selected isolates was tested in experiments arranged in factorial randomized block design with three replicates. Treatments consisted of 13 selected isolates and three control treatments: (1) plants inoculated with the commercial isolates; (2) plants grown without nitrogen and non inoculated and (3) nitrogen supplied plants. Quantitative results were analyzed by statistic software SISVAR. The analyzed variable was shoot dry weight and nodule weight to calculate the efficiency of the isolates. All the three legume tree presented statistical difference about shoot and nodule dry weight. Six isolates showed higher efficiency than commercial recommend strains to be inoculated in two species of legume trees (*Mimosa caesalpiniaeifolia* Benth and *Albizia saman* (Jacq.) Merr).

Word-key: biological nitrogen fixation. , legume tree, rhizobia.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Colônias isoladas de rizóbio 11.
- Figura 2.** Vasos de Leonard 12.
- Figura 3.** Estirpes crescidas em meio 79 semi-sólido, pipeta automática com ponteira de 1 mL e sementes cobertas com areia estéril 14.
- Figura 4.** Coleta de nódulos presentes nas raízes de *Acacia holosericea* 15.
- Figura 5.** Dendrograma obtido pela análise de agrupamento utilizando o método UPGMA e o coeficiente de similaridade Simple Matching (SM) baseado nas características fenotípicas das estirpes padrão e isolados de rizóbio, obtidos de nódulos de feijoeiro e siratro, utilizados como plantas-iscas, e inoculados com solo de área contaminada com xenobióticos17.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Isolados de rizóbio, obtidos de nódulos de feijoeiro e siratro em experimento de casa de vegetação, que apresentaram maiores peso de massa seca da parte aérea (total de 2 plantas/ vaso) **9.**

Tabela 2. Efeito da inoculação de isolados de rizóbio, provenientes de áreas de biorremediação de resíduos oleosos, em *Mimosa caesalpiniaefolia* sob condições esterilizadas **18.**

Tabela 3. Efeito da inoculação de isolados de rizóbio, provenientes de áreas de iorremediação de resíduos oleosos, em *Albizia saman* sob condições esterilizadas **19.**

Tabela 4. Acúmulo de massa seca na parte aérea e de nódulos, eficiência e eficácia de vários isolados inoculados em *Acacia holosericea* aos 94 DAP **20.**

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS _____	vi
RESUMO _____	ix
ABSTRACT _____	x
LISTA DE FIGURAS _____	xi
LISTA DE TABELAS _____	xii
SUMÁRIO _____	xiii
1. INTRODUÇÃO _____	1
1.1. Objetivos _____	2
2. REVISÃO DE LITERATURA _____	3
2.1. Importância da Biorremediação de Áreas Contaminadas _____	3
2.2. Simbiose e Fixação Biológica de Nitrogênio _____	3
2.3. Bactérias Diazotróficas Noduladoras de Leguminosas _____	4
2.4. Bactérias Diazotróficas Associativas _____	5
2.5. Importância da Caracterização da Fenotípica _____	6
2.6. Leguminosas Florestais Testadas no Experimento _____	6
3. MATERIAL E MÉTODOS _____	8
3.1. Caracterização Fenotípica dos Isolados _____	8
3.1.1. Origem do material caracterizado _____	8
3.1.2. Procedimentos realizados na caracterização fenotípica _____	9
3.1.3. dados utilizados para obtenção do dendrograma de agrupamento _____	11
3.2. Eficiência dos Isolados _____	12
3.2.1. Montagem dos vasos de Leonard _____	12
3.2.2. Delineamento Experimental _____	13
3.2.3. Manejo das Plantas _____	13
3.2.3.1. Preparo das sementes para a semeadura _____	13
3.2.3.2. Inoculação e plantio _____	13
3.2.3.3. Fornecimento de nutrientes _____	14
3.2.3.4. Eficiência e eficácia dos isolados _____	14
3.2.3.5. Eficiência e eficácia dos isolados testados _____	15
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO _____	15
4.1. Caracterização Fenotípica _____	15
4.2. Eficiências dos Isolados _____	18

5.CONCLUSÕES e RECOMENDAÇÕES	21
5.1. Diversidade Fenotípica	21
5.2. Recomendação de Estirpes	21
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22
ANEXO	29

1. INTRODUÇÃO

A agricultura é uma das principais fontes de contaminação ambiental devido ao uso intensivo de agroquímicos e fertilizantes minerais, especialmente os nitrogenados, que coloca em risco o meio ambiente devido ao seu potencial de contaminação do solo, lençóis e espelho de água. O íon nitrato é um dos principais poluentes, devido a sua fácil lixiviação. Tendo em vista a preservação dos recursos naturais, através do uso sustentável dos agrossistemas, dentro das práticas agroecológicas, uma alternativa ao cultivo com adubos químicos é o uso de microrganismos com a finalidade de melhorar a disponibilidade de nutrientes às plantas. Entre os microrganismos mais utilizados, destaca-se a importância da simbiose formada pelas bactérias do grupo dos rizóbios, pertencentes aos gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, entre outros. Estas se associam às raízes das plantas formando estruturas denominadas nódulos, nas quais realizam a Fixação Biológica de Nitrogênio - FBN, em troca dos carboidratos fornecidos pelas hospedeiras. A FBN se caracteriza pelas reações químicas que transformam o N₂, que constitui 78% dos gases da atmosfera, em compostos nitrogenados assimiláveis pelas plantas.

Existem muitas famílias botânicas na natureza, porém poucas são as famílias capazes de estabelecer simbiose com as bactérias do grupo dos rizóbios, como a família Leguminosae. A família Leguminosae é uma das maiores famílias botânicas, com aproximadamente 20000 espécies (SPRENT, 2001), e essas são, em sua maior parte, árvores tropicais (DÖBEREINER, 1984). Espécies da família Leguminosae que estabelecem simbiose eficiente com bactérias fixadoras de N₂ atmosférico apresentam uma vantagem adicional para plantios de reabilitação de áreas degradadas, considerando-se que em condições tropicais o nitrogênio é em geral, extremamente limitante (FRANCO *et al.*, 1992; FRANCO *et al.*, 1995; FRANCO & FARIA, 1997). Um número considerável de leguminosas conhecidas é capaz de formar nódulos com bactérias fixadoras de nitrogênio e tem potencial para uso em sistemas agroflorestais, para reabilitação de áreas degradadas e para ajudar a manutenção da sustentabilidade dos solos (HERRERA *et al.*, 1993; FRANCO & FARIA, 1997).

A contaminação de solos e mananciais por resíduos de petróleo e/ou derivados exige a aplicação de tecnologias muitas vezes dispendiosas para sua recuperação. As pesquisas atuais destacam o uso de microrganismos na recuperação de áreas degradadas, uma vez que estas áreas encontram-se pobres em nutrientes e poucas formas de vida sobrevivem nestas condições. O uso de leguminosas em associação com rizóbios visa o estabelecimento destas espécies vegetais nestas condições adversas, as quais poderão atuar como agentes de fitorremediação.

As leguminosas florestais têm sido utilizadas para os mais variados fins, em especial para recuperação de áreas degradadas por diferentes impactos. Estudos relacionados a essas espécies são de grande importância para manutenção ou recuperação dos ecossistemas, da mesma forma que os estudos sobre as bactérias que estabelecem simbiose com essas plantas. Por estas e outras razões, estudos taxonômicos e filogenéticos são necessários para estruturar a biodiversidade de rizóbio no solo, facilitar a comunicação entre os cientistas e buscar o maior entendimento da biologia e evolução desta simbiose, com importantes aplicações práticas (STRALIOTTO, 1999). Os estudos de combinações simbióticas com capacidade de tolerar diversos estresses ambientais são essenciais para o sucesso do estabelecimento desta simbiose

em solos contaminados com resíduos oleosos. Sendo assim, a identificação e caracterização de novos grupos taxonômicos podem melhorar a eficiência do processo de fixação biológica de nitrogênio e potencializar o processo de fitorremediação.

1.1. Objetivos

O objetivo deste trabalho foi obter, a partir da caracterização fenotípica, o agrupamento taxonômico de 28 isolados de rizóbio, obtidos de solos contaminados com resíduos oleosos da REDUC (Refinaria Duque de Caxias), e testar a eficiência de 13 isolados selecionados na nodulação de 3 espécies de leguminosas arbóreas: *Mimosa caesalpiniaeifolia* Benth, *Albizia saman* (Jacq.) Merr e *Acacia holosericea* A. Cunn. ex G. Don.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Importância da Biorremediação de Áreas Contaminadas

Áreas contaminadas pelos mais diversos xenobióticos são uma constante nos dias de hoje, porém o uso de muitos desses contaminantes são necessários para o desenvolvimento do país. Muitas vezes, acidentes são inevitáveis e trazem como conseqüências grandes impactos ambientais que colocam em risco os recursos naturais do planeta. Cabe aos cientistas e técnicos criarem soluções mitigadoras de tais danos. Entre as técnicas utilizadas para amenizar tais danos, existe a biorremediação de áreas contaminadas.

Para Moreira e Siqueira (2002), as técnicas de biorremediação são fundamentadas em um único processo básico (biodegradação) e envolvem variações de tratamentos “*in situ*” (no local) e “*ex situ*” (fora do local) que podem envolver inúmeros procedimentos. A natureza química, bioatividade, distribuição na matriz do rejeito ou de solo e a concentração do contaminante são decisivas na bioretratibilidade do rejeito. Vários contaminantes podem ser tratados biologicamente com sucesso, entre os quais os autores citaram os seguintes: petróleo bruto, hidrocarbonetos de petróleo como gasolina, óleo diesel, combustível de avião, preservativos de madeira, solventes diversos, lodo de esgoto urbano ou industrial, entre outros xenobióticos.

Segundo Melo e Azevedo (1997), em solos contaminados os microrganismos podem se adaptar e adquirir a capacidade de utilizar o composto como fonte de carbono e energia para o seu metabolismo. Segundo estes mesmos autores, a entrada de hidrocarbonetos em um ecossistema pode ter como resultado o aumento ou decréscimo da população microbiana. O efeito do petróleo dependerá da composição química do óleo contaminante e das espécies de microorganismo que habitam a comunidade de um ecossistema particular.

A biorremediação microbiana é definida como um método que emprega microrganismos ou suas enzimas para desintoxicar contaminantes no solo ou outros ambientes. E consiste na transformação do contaminante a formas que não oferecem riscos de contaminação. A biorremediação é fundamentada nos processos de degradação microbiana e reações químicas combinadas com processo de engenharia, criando condições para maximizar as transformações dos contaminantes orgânicos do solo. Entre os microrganismos usados neste processo podemos citar as bactérias e os fungos.

2.2. Simbiose e Fixação Biológica de Nitrogênio

A FBN é um grande suporte para a produção agrícola, especialmente em solos que possuem pouca quantidade de nitrogênio, contribuindo para um uso menor de fertilizantes nitrogenados e para preservação do meio ambiente (QUESADA *et al.*, 2001). A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é um processo pelo qual o N₂ atmosférico é reduzido a NH₄⁺ e assim fica disponível para ser transferido para compostos contendo carbono, a fim de produzir aminoácidos e outras substâncias orgânicas que contêm nitrogênio (RAVEN *et al.*, 2001). Esta é realizada por microrganismos procariotos que apresentam grande diversidade morfológica, fisiológica, genética, bioquímica e filogenética. Tal diversidade garante não só a resiliência da

FBN nos ecossistemas, como também a ocorrência deste processo nos mais diversos habitats terrestres (MOREIRA & SIQUEIRA, 2002). Segundo Faria *et al.* 2003, a fixação biológica de nitrogênio é realizada por bactérias denominadas rizóbios que se associam com as raízes das plantas formando estruturas denominadas nódulos. Para Raven *et al.* (2001), as bactérias fixadoras de nitrogênio podem ser classificadas de acordo com o seu modo de nutrição: aquelas que são de vida livre (não simbióticas) e aquelas que vivem em associação simbiótica com determinadas plantas vasculares. Ainda de acordo com este autor, das duas classes de organismos fixadores de nitrogênio, as bactérias simbióticas são os mais importantes em termos da quantidade total de nitrogênio fixado. Estas associações podem ser importantes nos sistemas de agricultura sustentável no Brasil (BALDANI, 1996) e em sistemas perturbados que se encontram em estádios de reabilitação, uma vez que o nitrogênio é um nutriente escasso nesses ecossistemas (SILVA, 1994).

2.3. Bactérias Diazotróficas Noduladoras de Leguminosas

Uma importante forma de disponibilizar o nitrogênio é a utilização de espécies vegetais capazes de efetuar simbiose com bactérias que nodulam leguminosas e fixam N₂ atmosférico (BNLFN) (Franco & Faria, 1997). A FBN em raízes de leguminosas em resposta à infecção de *Rhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Sinorhizobium* entre outros gêneros, já é bem conhecida. Almeida *et al.* 1988, afirmaram que a família Leguminosae possui espécies cultivadas que podem ser auto-suficientes em nitrogênio, podendo enriquecer o solo com os restos de cultura, após a colheita. A auto-suficiência em nitrogênio, dessas plantas vêm da capacidade que as mesmas têm de permitir que a infecção das raízes por bactérias do gênero *Rhizobium* e formar uma estrutura especializada denominada nódulo onde o rizóbio sofre modificações em sua estrutura e no seu metabolismo, estabelecendo assim, uma das mais perfeitas associações conhecidas, onde a planta e a bactéria são mutuamente favorecidas: a denominada simbiose das leguminosas.

Segundo Ricklefs (2003), o termo simbiose significa “viver junto”. E, em termos gerais, o mutualismo trófico normalmente envolve parceiros especializados com formas complementares para obter energia e nutrientes que é o caso destas bactérias com as raízes de plantas leguminosas. Nesta associação simbiótica, as bactérias suprem as leguminosas com nitrogênio na forma em que este pode ser usado na síntese de proteínas, e as plantas, por sua vez, suprem as bactérias com uma fonte de energia para sua atividade de fixação de nitrogênio e com moléculas que possuem carbono, as quais são necessárias para a produção de compostos nitrogenados. Numa estimativa modesta, 150 a 200 milhões de toneladas métricas de nitrogênio fixado são adicionadas à superfície terrestre a cada ano por esses sistemas biológicos. São bastante conhecidos os efeitos benéficos da inoculação de algumas plantas com algumas bactérias FBN associativas, mas muitas vezes esses benefícios não estão relacionados somente com a capacidade de fixação do N₂ por estas bactérias, mas também com a produção e a indução da produção de substâncias reguladoras do crescimento de plantas (RCPPs) (Balota *et al.*, 1994). Para Döbereiner (1970), o peso nodular -além de outros fatores- depende da genética da planta e da estirpe de rizóbio.

Esta é, portanto, uma relação útil para o crescimento das plantas em solos pobres em nitrogênio. Para Melloni *et al.* (2006), a diversidade das bactérias que nodulam leguminosas e fixam N₂ (BNLNFN), é de extrema importância, pois quanto maior a diversidade, maior a resiliência dos processos microbianos no solo além da maximização do potencial da fixação biológica de nitrogênio em áreas degradadas.

2.4. Bactérias Diazotróficas Associativas

Uma pequena parcela de procariotos possui a enzima nitrogenase que é capaz de reduzir o N₂ para a forma inorgânica combinada NH₃ tornando-se disponível para plantas e outros organismos, estes são chamados de fixadores de N₂ ou diazotróficos (MOREIRA & SIQUEIRA, 2002). As bactérias diazotróficas endofíticas são capazes de fixar nitrogênio atmosférico e colonizar o interior de tecidos vegetais e não geram sintomas de doenças (DÖBEREINER, 1992). Segundo Moreira e Siqueira (2002), algumas espécies de bactérias diazotróficas além de colonizar abundantemente a rizosfera, podem ocorrer endofiticamente, isto é, o córtex é invadido e os tecidos internos são colonizados. As bactérias que recebem destaque entre as mais estudadas são aquelas pertencentes aos gêneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Acetobacter*, *Burkholderia* e *Azoarcus*. As bactérias do gênero *Azospirillum* são endofíticas facultativas (BALDANI *et al.*, 1997), pois, colonizam hospedeiros e podem sobreviver no solo na forma de cistos (BASHAN & HOLGUIN, 1997) e/ou, utilizar poli-β-hidroxi-butirato como fonte de carbono e energia (BALDANI *et al.*, 1999). O gênero *Herbaspirillum* é considerado endofítico obrigatório, por apresentar baixa sobrevivência no solo (OLIVARES *et al.*, 1996). O gênero *Burkholderia* é outro gênero endofítico com capacidade diazotrófica (GILLIS *et al.*, 1995; BALDANI *et al.*, 1997). Os microrganismos diazotróficos endofíticos podem desempenhar importante papel na reabilitação e sustentabilidade dos ecossistemas, pois incorporam nitrogênio por meio da fixação biológica em quantidades que podem variar de 25 a 50 kg ha⁻¹ ano⁻¹ de N e produzem e liberam substâncias reguladoras do crescimento vegetal, como auxinas, giberelinas e citocininas, que têm contribuição para melhorar a nutrição mineral e utilização de água pelas plantas (BAZZICALUPO & OKON, 2000). De uma maneira geral, espécies de bactérias diazotróficas associativas têm sido isoladas de raízes e partes aéreas de gramíneas de pastagem e de grãos (MAGALHÃES & DÖBEREINER, 1984; BALDANI *et al.*, 1986; DÖBEREINER, 1992; BALDANI, 1996; DICELLO *et al.*, 1997; ECKERT *et al.*, 2001), de tubérculos (BALOTA *et al.*, 1997), cafeeiros (SANTOS *et al.*, 2001), fruteiras (MAGALHÃES & DÖBEREINER, 1984; WEBER *et al.*, 2001) e de raízes de leguminosas arbóreas.

Atualmente o limite desta definição entre bactérias associativas e noduladoras de leguminosas encontra-se muito confuso, uma vez que espécies como *Burkholderia sp* podem estabelecer tanto associações com gramíneas ou formar nódulos em simbiose com leguminosas. Estirpes deste gênero apresentam características importantes como tolerância a xenobióticos, promovendo o crescimento vegetal por outros mecanismos além da FBN (PERIN *et al.*, 2006).

2.5. Importância da Caracterização Fenotípica

Inúmeros trabalhos têm sido publicados com base em características fenotípicas de diferentes populações de rizóbio (KUYKENDALL & ELKAN, 1976; FUHRMANN, 1990; MOAWAD & BOHLOOL, 1992; BATZLI *et al.*, 1992; LEUNG *et al.*, 1994; van BERKUM *et al.*, 1995; MARTINS *et al.*, 1997; SWEELIM *et al.*, 1997; RAMIREZ *et al.*, 1997; XAVIER *et al.*, 1998 *apud* STRALIOTTO 1999). De acordo com Straliootto 1999, os estudos taxonômicos e filogenéticos estruturam a biodiversidade de rizóbio no solo, facilitam a comunicação entre os cientistas e buscam o maior entendimento da biologia e evolução da simbiose entre rizóbio bactérias e plantas, resultando em importantes aplicações práticas. Em termos de microbiologia, durante muito tempo foi dada pouca importância aos estudos taxonômicos, em vista das grandes dificuldades de classificação impostas pelos métodos tradicionais baseados essencialmente em características fenotípicas, tanto morfológicas como fisiológicas. Para Moreira e Siqueira (2002), apesar da grande importância dos microrganismos na manutenção da biosfera, estima-se que menos de 1% tenham sido caracterizados e descritos, e que grande parte dos avanços da biotecnologia moderna e agricultura são atribuídas a descobertas recentes na área da biologia molecular de microrganismos. Porém, o número de espécies de bactérias de solos descrita na literatura vem crescendo nos últimos anos com o desenvolvimento de ferramentas de biologia molecular que possibilitam a análise de seqüências de DNA a partir de material genômico extraído diretamente do solo. As técnicas atuais evidenciaram a enorme diversidade genética de bactérias presentes em apenas 1 grama de solo. Estima-se que em 1 g de solo ocorram entre 620 e 40 mil espécies bacterianas. Apenas 4.100 espécies de bactérias foram descritas, sendo que, a maioria não é de solos. Tem-se aí, uma enorme lacuna de conhecimento a ser preenchida em estudos de biodiversidade (GTT, 1998).

Para Chanway *et al.*, 1991, os componentes microbiológicos dos solos, embora negligenciados na maioria dos estudos, são vitais à sustentabilidade de ecossistemas naturais e podem determinar o tipo de vegetação que irá ocupar uma determinada área, em função do tipo de microorganismo que está associado às espécies vegetais.

A classificação das diversas espécies de rizóbio utilizou, tradicionalmente, testes morfológicos, fisiológicos, bioquímicos e simbióticos, como a taxa de crescimento em meio de cultura que continha manitol, a habilidade em utilizar fontes de carbono e de nodular leguminosas hospedeiras, dentre outros (JORDAN, 1984).

2.6. Leguminosas Florestais Testadas no Experimento

As leguminosas arbóreas possuem um sistema radicular extenso, muitas delas são pioneiras e pouco exigentes em termos nutricionais e podem também ser utilizadas para sombreamento (CARVALHO, 1995), adubação verde e recomposição de matas ciliares. Para que a utilização dessas espécies seja bem-sucedida, é necessário utilizar estirpes de rizóbio eficientes na FBN. Segundo Franco *et al.*, (1992), as leguminosas arbóreas são utilizadas em trabalho de recuperação de áreas degradadas por apresentarem sistema radicular profuso,

crescimento rápido, tolerância à acidez do solo e estresse de temperatura, por contribuírem com deposição de matéria orgânica de baixa relação C/N. Vem demonstrando, ainda, serem ideais para um rápido restabelecimento da vida microbiana nos solos quando inoculadas com rizóbio que realizam a fixação biológica de nitrogênio eficientemente.

As leguminosas florestais apresentam especificidade hospedeira resultante do processo de reconhecimento entre a planta e a bactéria (FARIA, 2001). Através da seleção de estirpes eficientes de rizóbio é possível produzir mudas de essências florestais bem noduladas, com crescimento mais rápido e resistente às condições de campo (FARIA *et al.*, 1984). A seleção dessas estirpes é uma etapa fundamental para a produção de inoculantes comerciais, e a inoculação com estirpes eficientes é importante para o melhor desenvolvimento das plantas no campo. Normalmente, essa seleção é realizada inicialmente em substratos esterilizados, posteriormente em vasos com substratos não esterilizados e por último no campo.

Entre as leguminosas arbóreas, o sabiá (*Mimosa caesalpiniaefolia* Benth.) é uma das mais importantes leguminosas tropicais arbóreas, pela sua comprovada resistência à seca e rápido crescimento (ALMEIDA *et al.*, 1987) e por ser considerada indispensável em qualquer programa de reflorestamento na Região Nordeste, principalmente no Semi-Árido. É uma planta pioneira, descídua, heliófila, característica da Caatinga no Nordeste do país. Sua madeira é usada, dentre outros fins, para produção de moirões, estacas, postes, lenha e carvão e, devido a sua forma entouceirada, também é empregada como cerca viva (LORENZI, 1998). Vasconcelos *et al.* (1984), a partir de estudos sobre a ocorrência de *Rhizobium* e endomicorrizas em leguminosas arbóreas e arbustivas, observaram que 47,5% das plantas eram micorrizadas ou noduladas, enquanto 30% eram simultaneamente micorrizadas e noduladas, na qual o sabiá foi citado. Döbereiner (1984) relata que apenas 18% das espécies leguminosas arbóreas foram estudadas em relação a nodulação, entretanto, das 63 espécies florestais mais importantes que eram capazes de nodular, o sabiá estava presente. Além disso, é uma das leguminosas arbóreas com grande potencial para reflorestamentos na região semi-árida, devido a seu rápido crescimento e sua resistência a estiagens prolongadas (ALMEIDA *et al.*, 1986).

A *Acacia holosericea* A. Cunn. ex G. Don é uma espécie leguminosa arbórea de ocorrência natural na Austrália e que vem sendo cultivada no Brasil já há alguns anos. Na fase inicial de crescimento apresenta folhas compostas, característica comum da família Leguminosae. À medida que a planta cresce, seu pecíolo dilata e as folhas compostas caem, deixando uma cicatriz na extremidade do pecíolo dilatado, denominado filódio, que passa a exercer a função de folha. Além dessa interessante característica morfológica, esta espécie apresenta qualidades importantes para programas de recuperação ambiental. Elevadas concentrações de matéria orgânica em substratos cultivados com *Acacia holosericea* refletem sua grande capacidade de produção de biomassa, queda de filódios e, principalmente, produção de raízes, características desejáveis para espécies a serem utilizadas na revegetação de áreas degradadas (FRANCO *et al.*, 1992; DIAS *et al.*, 1999).

Albizia saman (Jacq.) Merr, é uma árvore da subfamília Fabaceae, sendo essa espécie nativa dos seguintes países: Bolívia, Brasil, Guatemala e Peru. É uma árvore semi-descídua que pode alcançar 60 m de altura, com folhas bipinadas. Conhecida como árvore da chuva porque a grama que cresce abaixo de seu dossel é mais verde, *A.saman* é nativa do Cerrado e é amplamente cultivada nos trópicos. Normalmente é encontrada em solos neutros a

moderadamente ácidos e pode crescer em solo com pH tão baixo quanto 4.6, sendo capaz de crescer em solos inférteis e alagados. É uma planta hemarfrodita cujas vagens servem como alimento e a fruta fornece suco. A madeira pode ser utilizada na produção de lenha e carvão de alta qualidade. A madeira possui grande valor de mercado, sendo utilizada para entalhes, mobília e painéis e também pode ser utilizada para construção de navios. As folhas frescas podem ser utilizadas para combater diarreia. Esta árvore oferece um efeito de microclima para as plantas que crescem abaixo de sua copa. Esta espécie pode ser usada para fazer chás, café, e baunilha e oferece sombra para pastagem. É uma das árvores mais plantadas em parques e avenidas nos trópicos. Na maioria dos lugares esta espécie não apresenta muitos problemas relacionados à pragas e doenças. De uma maneira geral, alguns desfolhadores atacam a árvore, mas não causam danos severos (WORLD AGROFORESTRY, 2007).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Caracterização Fenotípica dos Isolados

3.1.1. Origem do material caracterizado

Os 28 isolados escolhidos para este trabalho foram provenientes de experimentos prévios conduzidos em Casa de Vegetação e no Laboratório e de Coleção de Culturas da Embrapa Agrobiologia. Nestes trabalhos preliminares, áreas contaminadas por resíduos oleosos da Refinaria Duque de Caxias foram visitadas visando a coleta de material (solo e nódulos) para o isolamento de rizóbio visando a inoculação de leguminosas. A partir destas coletas foram obtidos 79 isolados de rizóbio os quais foram testados em casa de vegetação para nodulação de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) e siratro (*Macroptilium atropurpureum* Urb.), visando a confirmação de sua capacidade de nodulação e eficiência simbiótica. Vinte e três dos isolados utilizados neste trabalho estão entre aqueles que apresentaram maior massa seca de parte aérea nestas plantas (Tabela 1). Os demais 5 isolados são também oriundos de experimentos preliminares de seleção conduzidos em vasos com solo contaminado artificialmente com resíduos oleosos, tendo sido obtidos de nódulos formados em *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth (isolados identificados como 23; 33; 31.1; 52.1); e 1 de *Albizia saman* (Jacq.) Merr (isolado 27.1).

Tabela 1. Isolados de rizóbio, obtidos de nódulos de feijoeiro e siratro em experimento de casa de vegetação, que apresentaram maiores peso de massa seca da parte aérea (total de 2 plantas/ vaso).

ORIGEM	IDENTIFIC. DO ISOLADO	PESO DA P. AÉREA SECA (g)	PLANTA/QUALIDADE DA NODULAÇÃO
<i>Leucaena leucocephala</i> lem. witt (leucena)- 2ª coleta.	L1R	1,70	Nod. feijão (Boa)
	L3R	1,70	Nod. feijão (Boa)
	L8R	1,40	Nod. feijão (Boa) Nod. Siratro
	L14R	1,70	Nod. feijão (Boa)
<i>Mimosa caesalpiniaefolia</i> Benth (sabiá) - 1ª coleta.	M 03	1,40	Nod. feijão (Boa)
	M 16	1,60	Nod. feijão (Boa)
	M 19	1,70	Nod. feijão (Boa)
	M 32	1,50	Nod. feijão (Boa)
	M 36	1,50	Nod. feijão (Boa) Nod. Siratro
<i>Desmodium</i> sp (carrapicho), 1ª coleta	C 59	2,10	Nod. feijão (Muito eficiente.)
	C 72	1,40	Nod. feijão (Efic.)
<i>Leucaena leucocephala</i> lem. witt/ <i>Leucaena</i> spp (leucena) -1ª coleta	L 79	0,80	Nod. feijão (< Efic.)
	L 84	1,70	Nod. feijão (Boa) Nod. Siratro
	L 88	1,30	Nod. Feijão
	L 91	1,10	Nod. Feijão
	L 107	2,10	Nod. feijão (Mto efic.)e Siratro
<i>Phaseolus vulgaris</i> L (feijão) - solo + contaminado - 2ª coleta.	F1 P6 ⁻⁵	1,50	Nod. feijão (Boa)
<i>Macroptilium atropurpureum</i> Urb (siratro) - solos + contaminado – 2ª coleta (colônias vermelhas em meio de cultura)	S1 P4 ⁻¹	1,50	Nod. feijão e Nod. Siratro
	S1 P7 ⁻¹	1,50	Nod. feijão e Nod. Siratro
	S2 P9 ⁻²	1,30	Nod. feijão e Nod. Siratro
<i>Leucaena leucocephala</i> lem. Witt (leucena) – 1ª coleta	L 111	1,30	Nod. Feijão
	L 113	1,50	Nod. feijão e Nod. Siratro
	L 121	1,30	Nod. Feijão

3.1.2. Procedimentos realizados na caracterização fenotípica

Os 28 isolados foram caracterizados morfológicamente em placas de Petri, contendo meio levedura-manitol-ágar (YMA), conforme Vincent (1970) (ANEXO A). Nas placas, as colônias isoladas (Figura 1) foram observadas quanto as seguintes características:

1. Habilidade de provocar alteração do pH do meio (qualitativamente observado pela adição de azul de bromotimol, acidificação, alcalinização e neutralização);
2. Taxa de crescimento, medida pelo tempo de aparecimento de colônias isoladas (Muito Rápido-1 dia; Rápido-2 a 3 dias; Intermediário-4 a 5 dias; Lento-6 a 9 dias; Muito Lento - acima de 10 dias);
3. Forma (puntiforme, circular e irregular);
4. Diâmetro médio das colônias (< 1 mm, 1 a 2 mm e > 2 mm);
5. Elevação (plana, lenticular, convexa, pulvinada = drop-like);

6. Borda (inteira, ondulada, lobada, denteada);
7. Superfície (lisa, rugosa, papilada);
8. Produção de muco (escassa, pouca, moderada, abundante);
9. Consistência da massa de crescimento (seca, aquosa, gomosa, viscosa, butírica);
10. Cor (incolor, branca, creme, amarela, rosa);
11. Transparência (transparente, translúcida, opaca) e,
12. Outras observações.

Estas características foram anotadas em fichas e foram observadas sempre que as culturas de rizóbio foram repicadas para o meio levedura-manitol-ágar, a fim de conferir sua pureza e viabilidade. Também, foram caracterizadas fenotipicamente quanto ao crescimento em meio mínimo (STRALIOTTO, 1999) com oito fontes de carbono: manitol, glicerol, frutose, celobiose, lactose, succinato, sacarose e xilose. Foram anotadas as seguintes características de crescimento:

1. Tempo de crescimento (Rápido: 1-3 dias; Intermediário: 4-5 dias; Lento: 6-9 dias; Muito Lento: 10 dias ou mais);
2. Alteração de pH do meio de cultura (Ácido; Neutro; Alcalino);
3. Produção de muco (Escassa; Pouca; Moderada; Abundante);
4. Tipo de muco produzido (Aguado; Consistente);
5. Cor das colônias (Branca; Creme; Amarela; Incolor);
6. Absorção de indicador (Sim; Não);
7. Transparência (Translúcida; Opaca) e,
8. Elasticidade (Sim; Não).

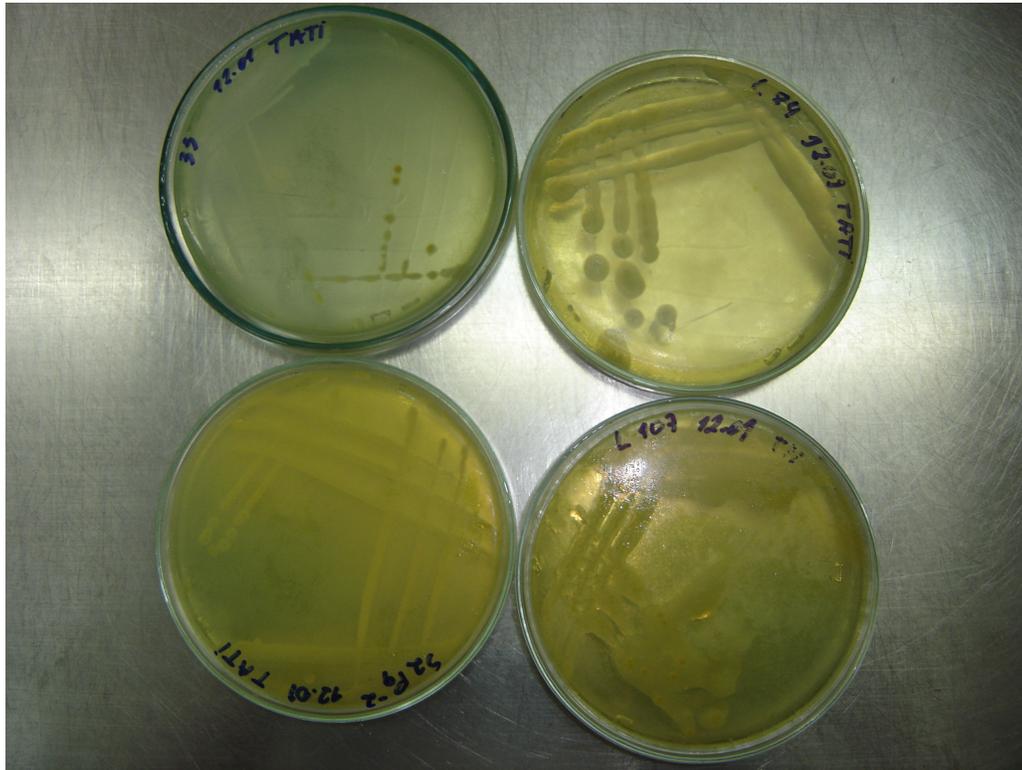


Figura 1. Colônias isoladas de rizóbio.

3.1.3. Dados utilizados para a obtenção do dendrograma de agrupamento

Usando as seguintes estirpes como padrão de comparação: *Azorhizobium doebereineriae* - BR 5401 (UFLA 1-100=LMG 9993); *Bradyrhizobium japonicum* - LMG 6138 (BR 111); *Burkholderia phymatum* - STM 815 (BR 3486); *Burkholderia tuberum* - STM 678 (BR 3487); *Burkholderia* sp. - BR 11340 (M130); *Cupriavidus taiwanensis* - LMG 19424 (BR 3471); *Mesorhizobium plurifarum* - BR 3804; *R. tropici* IIA - CFN 299 (BR 10016); *Rhizobium tropici* IIB - CIAT 899 (BR 322); *Sinorhizobium fredii* - LMG 6217 (BR 112), foi construída uma matriz de similaridade, baseada nas características analisadas, de acordo com o coeficiente Simple Matching (SM), utilizando o programa NTSYS. Esta matriz foi utilizada para proceder a análise hierárquica de agrupamento, baseada no método UPGMA (Unweighted Pair Group Analysis) (SOKAL & MICHENER, 1958). E a partir daí, foi possível gerar um dendrograma para análise de agrupamento dos isolados. Estas estirpes de rizóbio isoladas foram caracterizadas morfológicamente e preservadas dos nódulos, segundo os procedimentos descritos em Vincent (1970), para estudos posteriores de eficiência em diferentes espécies de leguminosas arbóreas.

3.2.EFICIÊNCIA DOS ISOLADOS

O teste de eficiência dos isolados, foi feito a partir do cultivo das plantas em casa de vegetação localizada no Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia (EMBRAPA/CNPAB) Seropédica/RJ, nos meses de julho à outubro de 2006. O plantio foi feito em vasos Leonard (VINCENT, 1970), com areia e vermiculita (2/1 v/v) (FARIA, 2001). Tanto os vasos quanto o substrato foram autoclavados duas vezes, para fins de esterilização.

3.2.1. Montagem dos vasos de Leonard (Vincent, 1970)

O vaso de Leonard (Figura 2) consiste de uma garrafa, cortada na sua parte inferior, colocada em posição invertida, dentro de outra garrafa de diâmetro mais largo, sendo esta cortada na parte superior (copo). Na garrafa cortada na parte inferior, coloca-se o substrato (areia e vermiculita) na proporção 2:1, e a seguir tampa-se esta garrafa com uma tampa feita com tecido de algodão e barbante a fim de impedir a passagem do substrato e permitir a ascensão da solução nutritiva adicionada na garrafa inferior (copo). Após o preenchimento dos vasos com substrato faz-se a “saia” do vaso, sendo esta feita de saco de papel de 2 kg e barbante, e a seguir, coloca-se a tampa do vaso que foi feita de jornal e barbante. Depois de preparados os vasos foram postos duas vezes em autoclave a 120°C por 1 hora a 1,5 atm de pressão (VINCENT, 1970).



Figura 2. Vasos de Leonard (VINCENT, 1970).

3.2.2. Delineamento Experimental

O experimento em vasos de Leonard foi conduzido no delineamento em blocos casualizados, com 3 repetições, em esquema fatorial 3 x 13 mais 9 testemunhas. O fatorial consistiu de 3 espécies de plantas leguminosas florestais (*Mimosa caesalpiniaefolia* Benth, *Albizia saman* (Jacq.) Merr, e *Acacia holosericea* A.Cunn.ex G. Don) e 13 isolados de bactérias (L79, L91, F1P6-5, S2P9-2, M16, L8R, L84, L117, 23, 27.1, 33, 31.1 e 52.1). As testemunhas positivas foram as estirpes comercialmente recomendadas que foram: BR3407/BR3446 para *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth, BR6204/BR6208 para *Albizia saman* (Jacq.) Merr, BR4406/BR5608 para *Acacia holosericea* A. Cunn. ex G. Don, sendo estas obtidas na Coleção de Culturas da Embrapa Agrobiologia; 3 testemunhas absolutas (sem inoculação e sem aplicação de nitrogênio), e 3 testemunhas nitrogenadas, sem inoculação, que receberam semanalmente doses de 5mgN/vaso na forma de NH_4NO_3 (UCHÔAS *et al.*, 2006).

Foi realizada a análise de variância e as médias dos tratamentos (médias entre estirpes de bactéria, entre testemunhas e entre médias do fatorial e das testemunhas) foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Analisaram-se as variáveis: massa seca da parte aérea e massa seca dos nódulos. A estatística foi conduzida com o uso do programa SISVAR (FERREIRA, 2000).

3.2.3. Manejo das Plantas

3.2.3.1-Preparo das sementes para a semeadura

Antes da semeadura, as sementes das espécies que foram testadas (*Albizia saman*, *Mimosa caesalpiniaefolia* e *Acacia holosericea*), foram escarificadas em ácido sulfúrico durante 10 minutos e lavadas com água corrente (Regras para análise de sementes, 1992). Em seguida, foram desinfestadas através de sua imersão em hipoclorito de sódio (solução comercial com 2% de cloro, como princípio ativo), durante cinco minutos e, enxaguadas por, pelo menos, seis vezes em água destilada esterilizada. E posteriormente foram colocadas em placa de Petri, contendo algodão coberto com papel filtro umedecidos, previamente esterilizados para proceder sua germinação (FARIA, 2002) e a seguir foram colocadas na câmara de germinação à temperatura ambiente (25 – 30°C) até que houvesse a emissão das radículas e estas atingissem o tamanho de aproximadamente 0,5 - 1,0 cm de comprimento (FARIA, 2001).

3.2.3.2-Inoculação e plantio

Colônias puras de bactérias foram repicadas em pequenos tubos de vidro contendo 10mL de meio 79 semi-sólido (Fred & Waksman, 1928), e posteriormente foram colocados em agitador rotativo à temperatura ambiente a fim de promover e acelerar a multiplicação. A inoculação foi realizada após o crescimento das culturas, três dias depois da germinação das sementes, tendo-se aplicado, com o uso de uma pipeta de precisão, 1mL do inoculante por plântula. Para as testemunhas positivas, antes do plantio, foi feito um coquetel das estirpes recomendadas no fluxo e próximo à chama do bico de Bunsen, para que não houvesse

contaminação do meio. Em cada vaso foram plantadas 3 sementes pré-germinadas e após inoculação cobriu-se as sementes com areia estéril.(Figura 3). Foi realizado um desbaste 15 dias após o plantio (DAP), restando somente 1 plântula por vaso.



Figura3. A. Isolados crescidos em meio 79 semi-sólido; B. pipeta automática e C. sementes cobertas com areia estéril.

3.2.3.3. Fornecimento de nutrientes

O fornecimento de nutrientes às plantas, ocorreu quinzenalmente, na forma de solução nutritiva de Guzman e Döbereiner (1968):

KCl, 2mM; K_2HPO_4 , 0,3mM; KH_2PO_4 , 0,7mM; $CaSO_4 \cdot 5H_2O$, 0,3 μ M; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,7 μ M; $MnSO_4$, 1 μ M; $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$, 0,002 μ M; H_3BO_3 , 11,5 μ M; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 17,9 μ M; ácido cítrico, 26 μ M; em volume de 0,25 L por vaso.

3.2.3.4. Coleta do experimento

A coleta foi realizada 12 semanas após o plantio, onde, a parte aérea das plantas foi acondicionada em sacos de papel, deixados em estufa a 65°C, durante 48 horas para proceder a avaliação do peso de matéria seca da parte aérea (MSPA). Os nódulos foram coletados, contados e secos em estufa para pesagem. A Figura 4 mostra a coleta de nódulos.



Figura 4. Coleta de nódulos presentes nas raízes de *Acacia holosericea*.

3.2.3.5. Eficiência e eficácia dos isolados testados

Através dos dados obtidos de massa seca de parte aérea ou massa seca de nódulos, determina-se a eficiência e a eficácia da estirpe inoculada. A contribuição da estirpe para o parâmetro avaliado (massa seca da parte aérea ou N total acumulado) determina o índice de eficiência em relação ao tratamento não inoculado (controle absoluto) (FARIA *et al.*, 2003) de acordo com a fórmula:

$$\text{EFICIÊNCIA} = \left(\frac{\text{Média dos tratamentos}}{\text{Média testemunha absoluta}} \right) \times 100$$

A eficácia é obtida a partir do desempenho da estirpe para o parâmetro avaliado (massa seca da parte aérea ou N total acumulado) comparado com o controle nitrogenado (Faria *et al.*, 2003), de acordo com a fórmula:

$$\text{EFICÁCIA} = \left(\frac{\text{Média dos tratamentos}}{\text{Média testemunha com N}} \right) \times 100$$

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização Fenotípica

A Figura 3 mostra o dendrograma obtido através da análise de agrupamento, utilizando o método UPGMA e o coeficiente de similaridade Simple Matching (SM), cuja matriz de similaridade foi construída baseada na observação do crescimento, em meio mínimo nas oito fontes de carbono, num total de 23 (vinte e três) características fenotípicas anotadas. Foram incluídas neste dendrograma as estirpes padrão de rizóbio e 28 isolados purificados.

Os resultados indicam que a maioria dos isolados agrupam-se com estirpes padrão dos gêneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium* e *Burkholderia*, ao nível de similaridade de 69,5%. Ao nível de 70% de similaridade um segundo agrupamento com 4 isolados foi obtido com estirpes de *Cupriavidus taiwanensis* e *Azorhizobium doebereineriae* sendo que o isolado L79 apresenta similaridade de 95% com esta espécie. Estes resultados indicam que os gêneros com os quais os isolados se agruparam podem ser encontrados em áreas contaminadas por resíduos oleosos, mostrando o potencial uso desses isolados para recuperação de áreas degradadas por estes resíduos. Em solos de Cerrado, Zilli *et al.*(2000) utilizando caupi como planta-isca, observou que entre os 245 isolados, foram obtidos 39 diferentes grupos a nível de 100% de similaridade pelo coeficiente SM. Cerca de 50% dos isolados eram semelhantes à estirpes de *B. japonicum*, e outro grupo agrupamento, com características muito semelhante a *B. elkanii*, continha cerca de 25% dos isolados. Os outros 25% distribuíram-se em 37 grupos diferentes, porém todos com características semelhantes ao gênero *Bradyrhizobium*. O referido gênero foi utilizado como estirpe padrão no presente trabalho, mas os isolados não se agruparam com o mesmo, o que pode ser explicado pelo fato de os mesmos serem oriundos de áreas diferentes, pelo efeito da contaminação do solo, ou mesmo da planta-isca utilizada para recuperação do rizóbio. Os resultados diferiram também do que foi obtido por Nóbrega *et al.* (2004), que estudou a caracterização fenotípica de 72 isolados de bactérias diazotróficas associativas Gram-negativas, oriundos de áreas sob diferentes estratégias de reabilitação, após a mineração da bauxita em Poços de Caldas (MG). Usando estirpes tipo e referência de espécies para comparação: *Azospirillum*, *Herbaspirillum* e *Burkholderia*, este um dos gêneros padrão utilizados no presente trabalho, os autores observaram grande diversidade, sendo obtidos 50 grupos a 81 % de similaridade. Neste trabalho detectada a presença de estirpes de *Burkholderia*. Segundo os autores, a alta dissimilaridade da maioria dos isolados em relação a estirpes tipo, admite a possibilidade da presença de novas espécies entre eles. Até o presente o número de trabalhos que estudam o isolamento de rizóbios oriundos de áreas contaminadas com resíduos oleosos é escasso, sendo esta linha de trabalho bastante promissora em termos de estudo da diversidade.

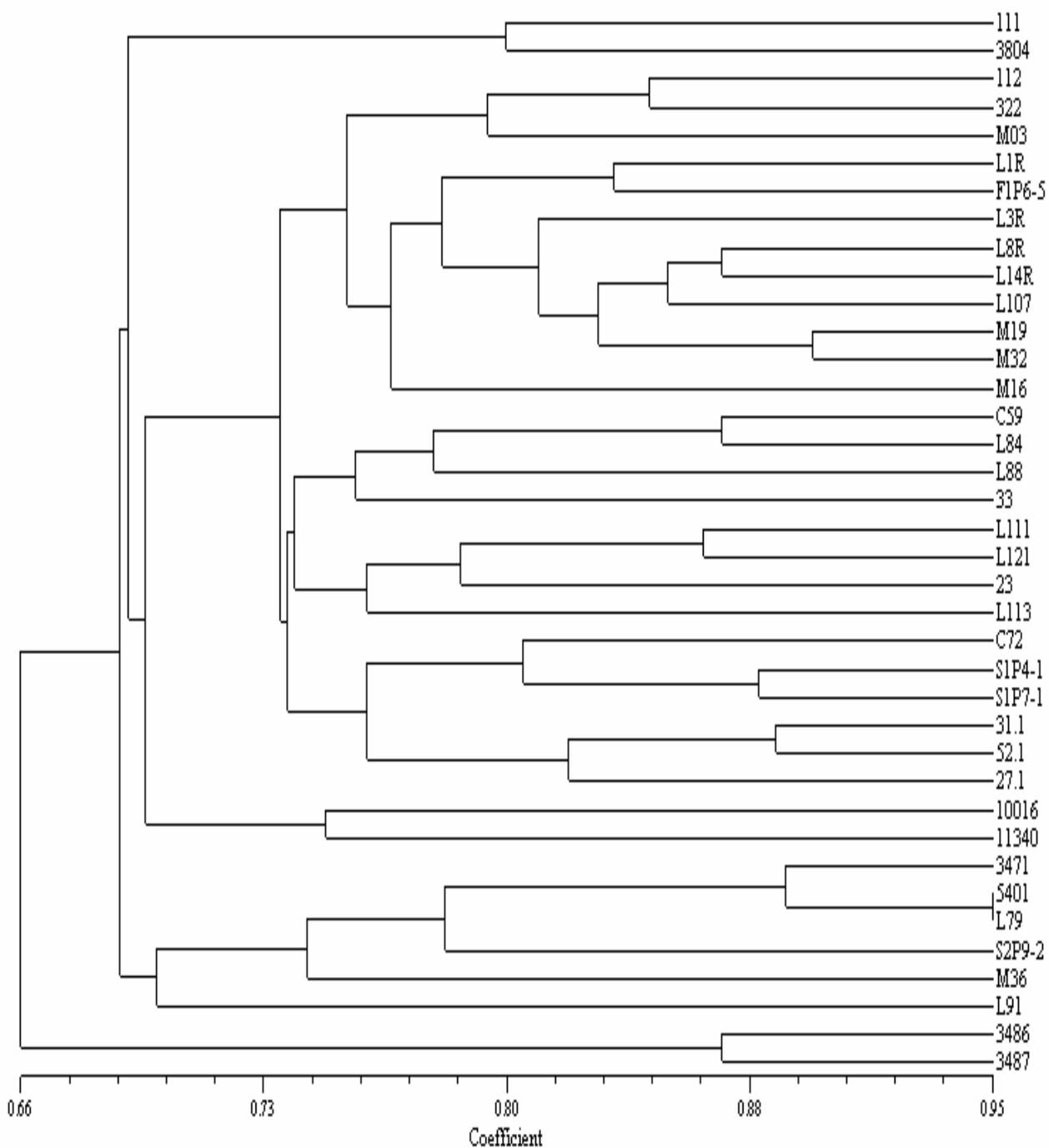


Figura 5. Dendrograma obtido pela análise de agrupamento utilizando o método UPGMA e o coeficiente de similaridade Simple Matching (SM) baseado nas características fenotípicas das estirpes padrão e isolados de rizóbio, obtidos de nódulos de feijoeiro e siratro, utilizados como plantas-iscas, e inoculados com solo de área contaminada com xenobióticos.

4.2. Eficiência dos Isolados

Em *Mimosa caesalpinifolia*, os seguintes isolados apresentaram maior produção de MSPA: M16, 23, 31.1, 33 e 52.1, juntamente com a testemunha positiva e nitrogenada (não diferiram estatisticamente). Em relação à MSN os isolados que receberam destaque com a maior produção foram: M16; 23 e 52.1; alta eficiência e eficácia foram encontradas pelos isolados: 23, 31.1 e pela testemunha nitrogenada, sendo superiores a da testemunha recomendada. Embora os isolados M16 e 52.1 tenham obtidos elevados valores de MSPA e MSN, eles tiveram eficiência menor do que os recomendados comercialmente, não sendo indicado o seu uso no lugar destes. Os isolados 23 e 31.1 apresentam potencial para o uso em conjunto com a espécie arbórea em estudo, uma vez que, seus valores de eficiência superaram os da testemunha recomendada. Os dados de MSPA, MSN, Eficiência e eficácia para *Mimosa caesalpinifolia* estão apresentados na Tabela 2.

No caso dos controles, com aplicação de nitrogênio, a diferença na produção de MSPA encontrada pode ser explicada pelo fato de que, as plantas lenhosas exibem diferenças em sua capacidade de utilizar íons nitrato e amônio. Essas diferenças estão pelo menos em parte, relacionadas à forma principal de N disponível nos seus nichos ecológicos (STEWART *et al.*, 1989). Além deste fator, há o potencial genético de cada espécie influenciado pelas reservas de nutrientes disponíveis nas sementes, podendo resultar em diferentes taxas de crescimento inicial das mudas.

Tabela 2. Efeito da inoculação de isolados de rizóbio, provenientes de áreas de biorremediação de resíduos oleosos, em *M. caesalpinifolia* sob condições esterilizadas.

Isolados	MSPA (g/planta)	MSN (mg/planta)	Eficiência %	Eficácia %
L79	0,07 b	0,00 c	77,8	18,92
L91	0,06 b	0,15 c	66,67	16,22
F1P6-5	0,08 b	0,44 c	88,89	21,62
S2P9-2	0,09 b	0,21 c	100,00	24,32
M16	0,31 a	2,07 a	344,44	83,78
L8R	0,07 b	1,98 b	77,78	18,92
L84	0,08 b	0,44 c	88,89	21,62
L117	0,05 b	1,47 b	55,56	13,51
23	0,49 a	5,13 a	544,44	132,43
27,1	0,07 b	0,51 c	77,78	18,92
33	0,22 a	1,69 b	244,44	59,46
31,1	0,39 a	1,78 b	433,33	105,41
52,1	0,33 a	3,74 a	366,67	89,19
TN (NH ₄ NO ₃)	0,37 a	0,00 c	411,11	100,00
BR3407/BR3446	0,34 a	1,62 b	377,78	91,89
T	0,09 b	0,00 c	100,00	24,32

Médias seguidas por letras iguais, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Para *Albizia saman*, o isolado que produziu maior MSPA foi o 27.1, apresentando este a maior eficiência e eficácia quando comparado com os outros tratamentos e testemunhas

nitrogenada e positiva. Os isolados que produziram os melhores resultados de MSN foram: S2P9-2, L117, 27.1 e testemunha positiva. Os isolados que apresentaram valores de eficiência maiores do que o da testemunha positiva foi: L91, F1P6-5, e 27.1, o que significa que estes isolados podem ser usados para nodulação desta espécie em alternativa aos inoculantes recomendados. Com relação aos valores de eficácia, estes mesmos isolados juntamente com as testemunhas positivas, apresentaram valores superiores a 100, isto é, maiores do que os da testemunha nitrogenada. Este fato pode ter ocorrido, devido à fonte de nitrogênio que foi utilizada, não ter sido suficiente ou ideal para a assimilação deste nutriente pela planta. Devendo-se proceder a novos testes para verificar qual a melhor fonte de nitrogênio para esta espécie e a partir daí obter resultados mais precisos de eficácia para esta espécie. Os dados de MSPA, MSN, eficácia e eficiência para *Albizia saman* encontram-se apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Efeito da inoculação de isolados de rizóbio, provenientes de áreas de biorremediação de resíduos oleosos, em *Albizia saman* sob condições esterilizadas.

Isolados	MSPA (g/planta)	MSN (mg/planta)	Eficiência %	Eficácia %
L79	0,28 b	0,00 c	215,38	87,50
L91	0,38 b	0,23 c	292,31	118,75
F1P6-5	0,35 b	1,28 c	269,23	109,38
S2P9-2	0,30 b	2,71 a	230,77	93,75
M16	0,26 b	1,84 b	200,00	130,00
L8R	0,30 b	1,63 b	230,77	93,75
L84	0,28 b	0,27 c	215,38	0,88
L117	0,29 b	2,77 a	223,08	90,63
23	0,30 b	0,15 c	230,77	93,75
27,1	0,60 a	4,39 a	461,54	187,50
33	0,23 b	0,43 c	176,92	71,88
31,1	0,30 b	0,92 c	230,77	93,75
52,1	0,30 b	0,48 c	230,77	93,75
TN (NH ₄ NO ₃)	0,35 b	0,00 c	246,15	100,00
BR6204/BR6208	0,32 b	3,02 a	269,23	109,38
T	0,13 c	0,00 c	100,00	40,63

Médias seguidas por letras iguais, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Para *Acacia holosericea*, os maiores valores de MSPA foram obtidos por: isolados L91, 23 e a testemunha positiva, diferindo estatisticamente da testemunha nitrogenada e da testemunha pura. Dos isolados que tiveram maior produção de MSPA, o 23 e a testemunha positiva apresentaram eficácia superior a 100% e elevada eficiência. Sendo a testemunha positiva a que apresentou o maior valor de eficácia e eficiência, mostrando que os inoculantes recomendados são os mais eficientes para a espécie florestal em questão, do que os isolados testados. Para MSN, a testemunha positiva foi que apresentou o maior resultado, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos e testemunhas, reforçando a idéia de que as estirpes comerciais são as melhores para esta espécie. Os inoculantes recomendados quando

comparados com os demais e as outras testemunhas, produziram os melhores resultados, sendo o seu uso mais aconselhável para esta espécie florestal. Alguns isolados: L79, F1P6-5, S2P9-2, L8R, L84, L117, 23, 27.1, 33, 31.1 e 52.1, apesar de não terem produzido quantidade significativa de MSN e MSPA, tiveram eficácia superior a 100%. Da mesma forma que ocorreu anteriormente, na *Albizia saman* onde a fonte de nitrogênio utilizada no experimento pode não ter sido suficiente ou ideal, e esta espécie pode ser capaz de absorver mais nitrogênio do que o que foi absorvido pela testemunha nitrogenada. Os dados de MSPA, MSN, eficiência e eficácia para *Acacia holosericea* estão na Tabela 4.

Tabela 4. Acúmulo de massa seca na parte aérea e de nódulos, eficiência e eficácia de vários isolados inoculados em *Acacia holosericea* aos 94 DAP (média de 3 repetições).

Isolados	MSPA (g/planta)	MSN (mg/planta)	Eficiência %	Eficácia %
L79	0,05 b	1,27 b	166,67	125,00
L91	0,22 a	0,00 c	733,33	55,00
F1P6-5	0,06 b	0,00 c	200,00	150,00
S2P9-2	0,04 b	1,62 b	133,33	100,00
M16	0,03 b	0,00 c	100,00	75,00
L8R	0,05 b	1,49 b	166,67	125,00
L84	0,04 b	1,62 b	133,33	100,00
L117	0,04 b	1,59 b	133,33	100,00
23	0,24 a	0,11 c	800,00	600,00
27,1	0,06 b	1,75 b	200,00	150,00
33	0,05 b	0,38 c	166,67	125,00
31,1	0,05 b	0,00 c	166,67	125,00
52,1	0,05 b	1,65 b	166,67	125,00
TN (NH ₄ NO ₃)	0,04 b	0,00 c	133,33	100,00
BR4406/BR5608	0,36 a	3,44 a	1200,00	900,00
T	0,03 b	0,00 c	100,00	75,00

Médias seguidas por letras iguais maiúsculas, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5 %.

Observou-se que alguns isolados, apesar de não terem produzido elevada MSPA e MSN, apresentaram elevados valores de eficácia quando comparados com a testemunha nitrogenada, isto se deve ao fato de que a solução nitrogenada utilizada para espécie pode não ter sido suficiente para que a espécie absorvesse o máximo de nutrientes. Goi *et al.* (1997), em seus estudos com *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth relata que a fonte de N ideal para o crescimento da referida espécie é NH₄⁺. Efeito deletério na nodulação decorrente da adição de nitrato foi observado em leguminosas, como *Acacia auriculiformis* (GOI *et al.*, 1992) e *Mimosa caesalpiniaefolia* (GOI *et al.*, 1997). Infelizmente estudos como estes não foram realizados isoladamente para o experimento, devendo-se efetuar os mesmos para comparar os futuros resultados com os obtidos literatura. Embora houvesse alguns estudos para *Mimosa caesalpiniaefolia* e para outras leguminosas (que não as testadas no experimento), a fonte de nitrogênio utilizada foi a mesma para as três espécies devido a falta de tempo para a pesquisa específica da fonte de nitrogênio ideal para cada uma dessas espécies.

5. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

5.1. Diversidade Fenotípica

A partir dos dados obtidos, com relação à caracterização fenotípica dos isolados estudados, pode-se concluir que houveram agrupamentos desses isolados com 5 gêneros diferentes, indicando que bactérias desses gêneros possuem capacidade de sobrevivência em áreas contaminadas por xenobióticos. Recomendando-se a sua utilização para estudos nestas áreas. A aplicação de métodos moleculares, que se baseiam em estudos de DNA dessas estirpes, podem ser utilizados para confirmação dos dados obtidos a partir da caracterização morfológica.

5.2. Recomendação de Estirpes

Os dados gerados do teste de eficiência e eficácia levam a conclusão de que, houve diferença entre o desempenho dos isolados nas espécies arbóreas testadas.

Dentre os 13 isolados testados, os que foram mais eficientes para *Mimosa caesalpinifolia* foram: 23 e 31.1 obtendo eficiência superior à das estirpes recomendadas, e para *Albizia saman*, foram: L91, F1P6-5, e 27.1, revelando a capacidade que os isolados em questão possuem para serem utilizados juntamente com estas espécies arbóreas para fins de biorremediação de áreas contaminadas por petróleo.

A Acácia teve seu melhor resultado, ou seja, maiores valores de MSPA, MSN, eficácia e eficiência, com a testemunha positiva (BR4406/BR5608).

Como sugestão, deve-se testar futuramente diferentes fontes de nitrogênio para as referidas espécies (*Mimosa caesalpinifolia* e *Albizia saman*), com o intuito de se obter dados mais precisos de eficácia.

Cabe lembrar que estes estudos foram realizados em casa de vegetação em condições esterilizadas, e que se eles forem realizados em vasos e no campo, ou seja, em condições não esterilizadas, os resultados obtidos podem ser outros, posto que as estirpes estejam submetidas à competição com bactérias presentes no solo em que estarão sendo cultivadas. Logo, para real recomendação dessas estirpes, é necessário que se façam os testes em vasos e no campo, para fins de segurança na recomendação das mesmas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, R.T. de; FREIRE, V.F.; VASCONCELOS, I. Efeitos da interação *Glomus macrocarpum*, *Rhizobium* sp. e níveis crescentes de fosfatos de rocha sobre o desenvolvimento de mudas de sabiá (*Mimosa caesalpinifolia*) e de leucena (*Leucena leucocephala* Lam. de Witt). **Ciência Agronômica**, Fortaleza, v.18, n.1, p.131-136, 1987.

ALMEIDA, R.T.; VASCONCELOS, I.; NESS, R.L.L. Infecção micorrízica vesículo-arbuscular e nodulação de leguminosas arbóreas do Ceará, Brasil. **Ciência Agronômica**, Fortaleza, v.17, v.1, p.89-97, 1986.

ALMEIDA, D.J.; SANTOS, G.A.; DE-POLLI, H.; CUNHA, L.H.; FREIRE, L.R.; SOBRINHO, N.M.B.; PEREIRA, N.N.C.; EIRA, P.A. da; BLOISE, R.N. & SALEK, R.C. **Manual de Aducação para o Estado do Rio de Janeiro**. Ed.: UFRRJ. Série Ciências Agrárias, nº2, p.64-68, 1988.

BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SELDIN, L. & DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* nov. sp. a root associated nitrogen fixing bacterium. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, 36:86-93, 1986.

BALDANI, V.L.D. **Efeito da inoculação de *Herbaspirillum* spp. no processo de inoculação e infecção de plantas de arroz e, ocorrência e caracterização parcial de uma nova bactéria diazotrófica**. 265p. Tese (Doutorado). Rio de Janeiro, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1996.

BALDANI, V.L.D.; OLIVEIRA, E.; BALOTA, E.; BALDANI, J.I. KIRCHHOF, G. & DÖBEREINER, J. *Burkholderia brasiliensis* sp. nov., uma nova espécie de bactéria diazotrófica endofítica. **Anais... Acad. Bras. Ci.**, 69:116, 1997. 1.CD-ROOM.

BALDANI, J.I.; AZEVEDO, M.S.; REIS, V.M.; TEIXEIRA, K.R.S.; OLIVARES, F.L.; GOI, S.R.; BALDANI, V.L.D. & DÖBEREINER, J. Fixação biológica de nitrogênio em gramíneas: avanços e aplicações. In: SIQUEIRA, J.O. MOREIRA, F.M.S.; LOPES, A.S.; GUILHERME, L.R.G.; FAQUIN, V.; FURTINI NETO, A.E. & CARVALHO, J.G., eds. **Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas**. Viçosa, BCS/UFLA/DCS, 1999. p.621-666.

BALOTA, E.L.; LOPES, E.; HUNGRIA, M. & DÖBEREINER, J. Inoculação de bactérias diazotróficas e fungos micorrízicos arbusculares na cultura da mandioca. **Pesq. Agropec. Bras.**, 32:627-639, 1997.

BALOTA, E.L.; HUNGRIA, M.; DÖBEREINER, J. **Promoção do crescimento de plantas por bactérias fixadoras de N₂ (FBN)**. SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE MICROBIOLOGIA DO SOLO, 3, REUNIÃO DE LABORATÓRIOS PARA RECOENDEÇÃO DE ESTIRPES DE RHIZOBIUM E BRADYRHIZOBIUM, 6., 1994, Londrina. Resumos... Londrina : Instituto Agronômico do Paraná, 1994.p.76. 1 CD-ROOM.

BASHAN, Y. & HOLGUIN, G. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). **Canadian Journal Microbiology**, 43:103-121, 1997.

BATZLI, J.WcC.; GRAVES, W.R.; van BERKUM,P. Diversity among rhizobia effective with *Robinia pseudoacacia* L. Applied and **Environmental Microbiology**, Washington, v.58, p.2137-2143, 1992.

BAZZICALUPO, M. & OKON, Y. **Associative and endophytic symbiosis**. In: PEDROSA, F.; HUNGRIA, M.; YATES, M.G. & NEWTON, W.E., eds. Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 2000. p.409-410.

BRASIL, Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária . Departamento Nacional de Defesa Vegetal. Coordenação de Laboratório Vegetal. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 1992. 365p.

CARVALHO, M. M.. **Arborização de pastagens**. Comunicado Técnico, EMBRAPA, n.18, p.1-5, 1995.

CHANWAY, C.P.; TURKINGTON, R.; HOLL, F.B. Ecological implications of specificity between plants and rhizosphere micro-organisms. **Advances in Ecological Research**, 21, 121-169. 1991.

DIAS, L. E. The use of nitrogen-fixing trees to revegetate bauxite and gold mined areas in the tropics: "Can trees substitute topsoil return?" In: BEIJING INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON LAND RECLAMATION (ISLR), 1999, Beijing. **Proceedings...** Beijing: China Coal Industry Publishing House, 1999. p. 317-325.

DICELLO, F.; BEVIVINO, A.; CHIARINI, L.; FANI, R.; PAFFETTI, D.; TABACCHIONI, S. & DALMASTRI, C. Biodiversity of a *Burkholderia cepacia* population isolated from the maize rhizosphere at different plant growth stages. **Appl. Environ. Microbiol.**, 63:4485-4493, 1997.

DÖBEREINER, J.; FRANCO, A.A.; GUZMAN, I. **Estirpes de *Rhizobium japonicum* de excepcional eficiência**. Pesquisa agropecuária Brasileira, Rio de Janeiro, v.5, p.155-161, 1970. 1 CD-ROOM.

DÖBEREINER, J. Nodulação e fixação de nitrogênio em leguminosas florestais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.19, s/n, p.83-90, jun. 1984. Edição Especial.

DÖBEREINER, J. Recent changes in concepts of plant bacteria interactions: endophytic N₂ fixing bacteria. **Ci. Cult.**, 44:310-313, 1992.

ECKERT, B.; WEBER, O.B.; KIRCHHOF, G.; HALBRITTER, A.; STOFFELS, M. & HARTMANN, A. *Azospirillum doebereineriae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C₄-grass *Miscanthus*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, 51:17-26, 2001.

ESTRATÉGIA NACIONAL DE DIVERSIDADE BIOLÓGICA. **Grupo de Trabalho Temático Microrganismos e Biodiversidade de Solos**. Versão de 1998. Embrapa Agrobiologia.

FARIA, S. M. de; FRANCO, A. A.; JESUS, R.M. de; MENANDRO, M. de S.; BAITELO, J.B.; MUCCI, E.S.F.; DÖBEREINER, J.; SPRENT, J.I. New nodulating trees from south-east Brazil. **New phytologist**, Oxford, v. 98, p. 317-328, 1984.

FARIA, S.M. de; LEWIS, G.P.; SPRENT, J.I.; SUTHERLAND, J.M. Occurrence of nodulation in the Leguminosae. **New Phytologist**, Cambridge, v.11, p. 607-619, 1989.

FARIA, S. M. de. **Obtenção de estirpes de rizóbio eficientes na fixação de nitrogênio para espécies florestais (aproximação 1999)**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 1999. 4p. (Embrapa-CNPAB.Recomendação Técnica, 5).

FARIA, S. M. de. **Obtenção de estirpes de rizóbio eficientes na fixação de nitrogênio para espécies florestais (aproximação 2000)**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2000. 12p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 116).

FARIA, S. M. de. **Obtenção de estirpes de rizóbio eficientes na fixação de nitrogênio para espécies florestais (aproximação 2001)**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, Jan. 2002. 16p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 134).

FARIA, S. M. de; MOREIRA JF.; CORDEIRO FC.; MACHADO R.L.**Obtenção de estirpes de rizóbio para leguminosas florestais (aproximação de 2004)**.Dezembro 2003.10p. (Embrapa- CNPAB. Comunicado Técnico,61).

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: **Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade Internacional de Biometria**, 45., 2000, São Carlos, SP. Programa e resumos... São Carlos: UFSCar, 2000. p. 255-258.

FRANCO, A. A.; DIAS, L. E.; FARIA, S. M. Uso de leguminosas florestais noduladas e micorrizadas como agentes de recuperação e manutenção da vida do solo: um modelo tecnológico. In: SIMPÓSIO SOBRE ESTRUTURA, FUNCIONAMENTO E MANEJO DE ECOSISTEMAS, 1992, Rio de Janeiro. **Resumos...** Rio de Janeiro: UFRJ - Inst. de Biologia, 1992. p. 93.

FRANCO, A.A.; CAMPELLO, E.F.; SILVA, E.M.R. da; FARIA, S.M. de. **Revegetação de solos degradados**. Seropédica: EMBRAPA-CNPBS, 1992. 11p. (EMBRAPA-CNPBS. Comunicado Técnico, 9).

FRANCO, A. A., CAMPELLO, E. F. C., DIAS, L. E., FARIA, S. M. Revegetation of acidic residues from bauxite mining using nodulated and mycorrhizal legume trees. **Nitrogen Fixing Trees for Acid Soils**, Ed: Evans, D. O. & Szott, L. T., p.313-320, 1995.

FRANCO, A. A.; FARIA, S. M. The contribution of N₂-fixing tree legumes to land reclamation and sustainability in the tropics. **Soil Biology Biochemistry**, v. 29, n. 5/6, p. 897-903, 1997.

FRED, E. B. & WALKSMAN, S. A. **Laboratory Manual of General Microbiology with Special Reference to the Microorganisms of the Soil**. New York: Mc-Graw-Hill Book Company, 1928.

FURHMANN, J. Symbiotic effectiveness of indigenous soybean bradyrhizobia as related to serological, morphological, rhizobitoxine and hydrogenase phenotypes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.56, p.224-249, 1990. 1CD-ROOM

GILLIS, M.; VAN, T. V.; BARDIN, R.; GOOR, M.; HEBBAR, P.; WILLEMS, A.; SEGERS, P.; KERSTERS, K.; HEULIN, T. & FERNADEZ, M. P. Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emend description of the genus and proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp.nov. for N₂-fixing isolates from rice in Vietnam. **Inter. J. System. Bacteriol.**, 45:274-289, 1995.

GOI, S. R.; SPRENT, J. I. & JACOB-NETO, J. Effect of different sources of N on the structure of *Mimosa caesalpiniaefoliar* root nodules. **Soil Biol. Biochem.** 29:983-987.

GOI, S. R.; SPRENT, J. I.; JAMES, E. K. & JACOB-NETO, J. Influence of nitrogen form on the nitrogen fixation of *Acácia auriculiformis*. *Symbiosis*, 1992, 82:505-512.

GUZMAN, I; DÖEBEREINER, J. Effectiveness and efficiency in the symbiosis of four cross-inoculated tropical legumes. In: REUNIÃO LATINO AMERICANA SOBRE INOCULANTES PARA LEGUMINOSAS, 4., 1968, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: UFRGS, 1968. P. 46-57.

HERRERA, M. A.; SALAMANCA, C. P.; BAREA, J. M. Inoculation of woody legumes with selected arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia to recover desertified mediterranean ecosystems. **Applied Environmental Microbiology**, v. 59, n. 1, p. 129-133, 1993.

JORDAN, D. C. *Rhizobiaceae* Conn 1938. In: KRIEG, N. R. & HOLT, J. G., eds. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore/London, Williams & Wilkins, p.235-244, 1984.

KUYKENDALL, L.D.; ELKAN, G.H. *Rhizobium japonicum* derivaes differing in nitrogen fixing efficiency and carbohydrate utilization. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.32, p.551-519, 1976. 1 CD-ROOM.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 2. ed. Nova Odessa: Editora Plantarum, 1998. v.1, 368p.

MAGALHÃES, F.M.M. & DÖBEREINER, J. Ocorrência de *Azospirillum amazonense* em alguns ecossistemas da Amazônia. **R. Microbiol.**, 15:246-252, 1984. 1 CD-ROOM.

MELO, I. S. de; AZEVEDO, J.L. de. **Microbiologia Ambiental**. Jaguariúna: Embrapa-CNMA, 1997. 440p.

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**, v. 30p. 235-246, 2006.

MOAWAD, H.; BOHLOOL, B.B. Characterization of Rhizobium from Leucena. **World Journal of microbiology and Biotechnology**, Oxford, v.8, p.237-392, 1992. 1 CD-ROOM.

MOREIRA, F.S.M. & SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica dos solo**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2002. 626p.

NÓBREGA, R. S. A.; MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O.; LIMA, A. S. Caracterização fenotípica e diversidade de bactérias diazotróficas associativas isoladas de solos em reabilitação após a mineração de bauxita. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. Viçosa mar./abr. 2004.

PERIN, L.; ARAÚJO, J.L.S.; REIS, V.M. In: **O Gênero Burkholderia: Um Importante Componente da Comunidade Microbiana**. Documento 219. Embrapa Agrobiologia. Seropédica, RJ. Novembro 2006.

OLIVARES, F.L.; BALDANI, V.L.D.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I. & DÖBEREINER, J. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems, and leaves, predominantly of Gramineae. **Biol. Fertil. Soils**, 21:197- 200, 1996.

QUESADA, D.M.; BODDEY, R.M.; REIS, V.M.; ALVES, B. J.R.; URQUIA S. **Potencial de genótipos de *Pennisetum purpureum* para alta produção de biomassa e eficiência da Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN)**. Comunicado Técnico 51, Embrapa Agrobiologia, dez. 2001.

RAMIREZ, M.E.; ISRAEL, D. W.; WOLLUM, A.G. Phenotypic and genotypic diversity of similar serotypes from two soil populations. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.29, p.1539-11545, 1997. 1 CD-ROOM.

RAVEN, P.; EVETR, R.R; EICHHORN,S.E. **Biologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001, p.307-311.

RICKLEFS, E.R. **A Economia da Natureza**. Editora: Guanabara Koogan, 2003. Rio de Janeiro, p.361.

SANTOS, P.E.L.; CRISTALES, R.B. & MELLADO, J.C. *Burkholderia*, a genus rich in plant-associated nitrogen fixer with wide environmental geographic distribution. **Appl. Environ. Microbiol.**, 67:2790-2798, 2001.

SILVA, G.P. **Caracterização química, física e mineralógica de materiais provenientes da mineração de ferro e comportamento de plantas para sua revegetação**. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 1994. 76p. (Tese de Mestrado).

SOKAL, R. R.; MICHENER, C. D. **A statistical method for evaluating systematic relationships**. Kansas: Kansas University Science, 1958. p. 1408-1438. (Kansas University Science Bulletin, v. 38).

SPRENT,J.I. **Nodulation in Legumes**. Kew: Royal Botanic Gardens, 2001.

STEWART, G. R., PEARSON, J., KERSHAW, J. L., CLOUGH, E. C. M. Biochemical aspects of inorganic nitrogen assimilation by wood plants. Ann. Sci. For. 46 suppl., 6485-6535. **Forest Tree Physiology**, 1989.

STRALIOTTO, R. **Diversidade fenotípica e genotípica de rizóbio que nodula o feijoeiro em solos tropicais brasileiros**. 1999. 172 p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 1 CD-ROOM.

SWEELIN, D.M.; HASHEM, F.M.; KUYKENDALL, L. D.; HEGAZI,N.I.; ABDEL-WAHAB, S.M. Host specificity and phenotypic diversity of *Rhizobium* strains nodulating *Leucaena*, *Acacia* e *Sesbania* in Egypt. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.25, p.224-232, 1997.

UCHÔAS, E.S.; MACHADO, R.L.; FARIA, S.M. Seleção de estirpes de rizóbio para *Mimosa quadrivalvis* var. *Ietocarpa* (DC) Barn, espécie leguminosa com potencial de uso na recuperação de áreas degradadas. In: Jornada de Iniciação Científica da Ufrj, **Anais...** Rio de Janeiro: UFRRJ, 2006. 1 CD-ROOM.

VASCONCELOS, I.; ALMEIDA, R.T.; MENDES FILHO, P.F.; LADIM, C.M.V. Comportamento de 13 estirpes de *Rhizobium* sp. em simbiose com sabiá, *Mimosa caesalpinifolia* Benth. **Ciência Agrônômica**, Fortaleza, v.15, n.1/2, p.133-138, 1984.

VINCENT, J.M. **A manual for the practical study of root nodules bacteria**. Oxford: Blackwell Scientific, 1970. 164p. (IBP Handbook, 15).

WEBER, O.B.; CRUZ, L.M.; BALDANI, J.I. & DÖBEREINER, J. *Herbaspirillum*-like bacteria in banana plants. **Braz. J. Microbiol.**, 32:201-205, 2001.

WORLD AGROFORETRY CENTRE. Disponível em: <http://www.worldagroforestrycentre.org/sea/products/afdbases/af/asp/SpeciesInfo.asp?SpID=180>. Acessado em 03 de maio de 2007.

XAVIER, G.R.; MARTINS, L.M.V.; NEVES, M.C.P.; RUMJANEK, N.G. Edaphic factors as determinants for the distribution of intrinsic antibiotic resistance in a cowpea rhizobia population. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin v.27, p. 386-392, 1998. 1 CD-ROOM.

ZILLI, J.E.; RUMJANEK, N.G.; FREIRE F.R.; NEVES, M.C.P. **Levantamento de Rizóbios Isolados de Nódulos de Caupi Cultivado em Amostras de Solo do Cerrado do Estado Piauí**. Documento N° 125. ISSN 0104-6187. Dezembro 2000.p.27.

ANEXOS

FÓRMULA DO MEIO 79

Manitol (*) (Crescimento lento).....	10g
K ₂ HPO ₄ sol.10%.....	1 ml
KH ₂ PO ₄ sol 10%.....	4 ml
MgSO ₄ .7H ₂ O..... sol 10%.....	2ml
NaCl..... sol 10%.....	1 ml
Extrato de levedura (**).....	0,4 g
Azul de bromotimol 0,5% em 0,2N de KOH.....	5 ml

Ajustar pH para 6,8-7,0 com KOH sol. 10%;
Completar o volume para 1000 ml com água destilada;
Adicionar 15 g de Agar.

* Usar açúcar cristal para Rhizobium de crescimento rápido.

** Pode ser substituído por 100 ml de extrato de levedura líquido por meio de cultura.

